



HAL
open science

Dialogue moléculaire plante – microbiote : Analyse des exsudats racinaires et bactériens, et évolution de la fonction d' exsudation racinaire au cours de la domestication et de l' amélioration du blé

Houssein Zhou

► To cite this version:

Houssein Zhou. Dialogue moléculaire plante – microbiote : Analyse des exsudats racinaires et bactériens, et évolution de la fonction d' exsudation racinaire au cours de la domestication et de l' amélioration du blé. Biologie végétale. Montpellier Supagro; Université Montpellier; Université Libanaise, 2022. Français. NNT: . tel-04791128

HAL Id: tel-04791128

<https://hal.inrae.fr/tel-04791128v1>

Submitted on 19 Nov 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER
ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER EN COTUTELLE AVEC
L'UNIVERSITE LIBANAISE**

En Génétique et amélioration des plantes

**École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par**

L'Institut des Sciences des Plantes de Montpellier (IPSiM)

**Dialogue moléculaire plante – microbiote : Analyse des
exsudats racinaires et bactériens, et évolution de la
fonction d'exsudation racinaire au cours de la
domestication et de l'amélioration du blé**

**Présentée par M. Houssein ZHOUR
Le 27 octobre 2022**

**Sous la direction de M. Jean-Benoît PELTIER et M. Ali CHOKR
Encadrement par Mme. Israa DANDACHE**

Devant le jury composé de

M. Guillaume BECARD, Professeur, Université Paul Sabatier UT3, Toulouse	Rapporteur
M. Yvan MOENNE-LOCCOZ, Professeur, Université Lyon 1, Villeurbanne	Rapporteur
Mme. Brigitte BRUNEL, Professeure, Institut Agro, Montpellier	Examinatrice
M. Pierre PETRIACQ, Maître de conférences, Université de Bordeaux	Examineur
M. Ali Al KHATIB, Professeur associé, Université Internationale Libanaise, Beyrouth	Examineur
M. Pierre ROUMET, Chargé de recherche, INRAE, Montpellier	Invité
Mme. Loubna EL ZEIN, Professeure associée, Université Libanaise, Beyrouth	Invitée
M. Jean-Benoît PELTIER, Chargé de recherche, INRAE, Montpellier	Directeur de thèse
M. Ali CHOKR, Professeur, Université Libanaise, Beyrouth	Co-Directeur de thèse
Mme. Israa DANDACHE, Professeure associée, Université Libanaise, Beyrouth	Encadrante

*Nul ne peut atteindre l'aube sans passer par le
chemin de la nuit.*

Gibran Khalil Gibran

Artiste, écrivain, Peintre, Poète

1883-1931

Remerciements

C'est avec un profond sentiment de gratitude que je remercie l'Université libanaise, le CNRS-Liban, L'AUF, l'Agropolis Fondation et l'INRAE pour le soutien financier tout au long de ma thèse. Je profite de ces quelques lignes pour remercier tous ceux qui m'ont accompagné dans les derniers quatre ans et sans qui ce travail n'aurait jamais été possible. Ma gratitude va à mes directeurs de thèse, Mr. Hervé SENTENAC puis Mr. Jean-Benoît PELTIER et Mr Ali CHOKR, et mes encadrantes Israa DANDACHE et Loubna EL ZEIN qui m'ont encadré ces 4 dernières années, pour leur soutien surtout dans les moments difficiles et importants, aussi pour m'avoir appris à être organisé, harmonieux et rigoureux dans le travail. Ils m'ont donné la confiance et l'encouragement nécessaires pour affronter tous les aléas de la science. Ils étaient à tous moments disponibles pour moi et grâce à leur esprit scientifique, leurs connaissances et surtout leurs remarques, de nombreux aspects de ce travail ont été améliorés.

Je suis très reconnaissant envers Mr. Hervé SENTENAC et Mme. Anne Aliénor VERY pour leur intérêt pour ce travail, d'être à côté de moi dans les moments difficiles vécus et pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse : Pr. Guillaume BECARD, Pr. Yvan MOENNE-LOCCOZ, Mme Brigitte BRUNEL, Mr. Pierre PETRIACQ et Mr. Ali AL KHATIB. J'en profite également pour remercier Mr. Ezékiel BAUDOIN, Mr. Patrick DOUMAS et Mr. Pierre Emmanuel COURTY qui m'ont fait l'honneur d'être mon comité de suivi de thèse, ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Leurs remarques ainsi que leurs conseils m'ont permis d'envisager mon travail sous différents angles.

C'est également bon de dire un grand "MERCI" à tous nos collaborateurs à l'IRAL (Institut de Recherche Agronomique au Liban) Mr. Ahmad BITAR et Mr. Ali CHEHADI. Merci aussi à Mme. Joelle BREIDY, Mme. Marie NABHAN qui m'ont aidé dans l'identification des plantes et les analyses du sol. Je tiens à remercier Mr. Guillaume MARTI qui m'a formé pour effectuer les traitements des données et les analyses statistiques pour la partie métabolomique effectuée à Metatoul-Toulouse, Mr. Christian ROLANDO, Mr. Fabrice BRAY, Mme Stéphanie FLAMENT à la plateforme de Miniaturisation pour la Synthèse, l'Analyse & la Protéomique (MSAP) à Lille, et Mme. Véronique SANTONI, Mme Sonia HEM, Mme. Valérie ROFIDAL et Mr. Vincent DEMOLOMBE-LIOZU de la Plateforme de Spectrométrie de Masse Protéomique (MSPP) à Montpellier d'avoir contribué à l'analyse protéomique, Mr. Llorenç CABRERA-

BOSQUET et Mme Maëlle LIS d'avoir contribué à l'analyse PhenoArch à Montpellier, Mme. Cécile FIZAMES qui m'a aidé dans les analyses des séquences génomiques, Mr. Thibaut PEREZ qui m'a assisté dans les analyses de la teneur d'azote et Mr. Nico NOUWEN, Mme Amber WEBB et Mme. Jennifer MORRELL-FALVEY d'avoir donné les matériels biologiques pour la transformation bactérienne et merci beaucoup à Mme. Carine ALCON pour la formation en microscopie, à Mr. Pierre ROUMET, Mr. Pascal SARTRE, Mr. Sébastien REY, Mme. Aline ROCHER, Mr. Antonin GRAU pour la Culture de l'EPO à Mauguio et l'accès aux ressources génétiques.

J'ai beaucoup apprécié toutes les installations communes de l'IPSiM (Institut des Sciences des Plantes de Montpellier) en France et au RLM (Laboratoire de Recherche de Microbiologie) au Liban, qui ont facilité les expériences que j'ai faites pour que le travail aille dans le bon sens.

Par ailleurs, je voudrais également montrer ma gratitude aux membres permanents de notre équipe TICER en France (Mr. Doan TRUNG LUU, Mr. Jean-Christophe BOYER, Mme Claire CORRATGE-FAILLIE, Mr. Pierre BERTHOMIEU et Mr Martin BOEGLIN) et RLM (Mme Faten MERHI et Mme Rana BARAKAT) au Liban pour leurs gentillesse ainsi que leur attitude réactive où ils étaient toujours prêts à offrir leur aide généreuse et leurs préoccupations. Ici, à Mr. Doan TRUNG LUU, merci de m'avoir offert l'occasion de travailler avec vous dans un autre projet de recherche qui m'a permis d'acquérir beaucoup de compétences en biologie moléculaire et dans l'interaction plantes-champignons.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux amis qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de mon parcours : Abas KANJ, Ali ALHAJ, Ali JANBAIN, Ahmad RAMADAN, Bassel AWADA, Dorsaf HMIDI, Jing ZHOU, Hala MANSOUR, Hasan KOLKAS, Hawraa SHAHROUR, Houssein DAOUD, Houssein MORTADA, Khawla CHMEISS, Layla CHMEISS, Mariame HAMMOUD, Marie-Joelle HARB, Malak ALHAJ, Marwa ASSAF, Mayssa GHADDAR, Mohamad KANJ, Mohamad MAKI, Mohamad RACHINI, Mohamad WAZNI, Mourad SALAH, Nour DIAB, Rima SALMA, Safia BOURJI, Sahar NAHLE, Suzanne JONBLAT, Yara NOURIDDINE,. Ici, je voudrais spécialement montrer et exprimer ma profonde appréciation à Iman KABALAN, Ikram MADANI, Talal HAJ et Mohamad FAKHRI qui m'ont accompagné pendant cette période. Ici, je dis, Ikram MADANI, merci encore pour chaque soutien que j'ai eu de ta part, pour nos discussions dans les moments heureux et tristes. Aussi, j'apprécie vraiment chaque moment que nous avons passé pendant ma thèse, merci d'être toujours à mes côtés.

À ma belle copine Zahraa BOURJI, il n'y a aucun mot pour expliquer à quel point je suis reconnaissant de t'avoir dans ma vie. Tu as été là pour moi dans mes moments les plus difficiles, même lorsque je n'avais rien; J'apprécie cela. Non seulement tu m'assistes, mais tu es aussi constamment là pour me soutenir et t'occuper de moi quand j'en ai besoin.

Aucun mot ne peut exprimer mes sentiments et ma gratitude envers ma famille notamment ma mère et mon père, mes grands-mères et mes grands-pères qui se tiennent à mes côtés au cours des cinq dernières années durant mes hauts et mes bas ainsi que leur soutien inconditionnel qui m'a permis de poursuivre mes études. A mon frère Mohammad-Aljawad, et ma sœur Abir, son mari Ali HAMDAN et mon neveu Amir, je suis vraiment béni de vous avoir dans cette vie. Je vous remercie vraiment pour les beaux moments que nous passons à chaque fois que je retourne au Liban.

Enfin, j'ai eu la chance d'être hébergé ces dernières années en France par des gens sympas et adorables à Montpellier. J'aimerais montrer mon amour à la France qui m'a donné l'opportunité d'améliorer mes compétences, mon style de vie et mes connaissances scientifiques.

Résumé

Le modèle classique de l'agriculture industrialisée, basé sur l'utilisation effrénée d'intrants, est aujourd'hui largement considéré comme non durable car générant érosion de la biodiversité et pollutions multiples. L'utilisation de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) comme biofertilisants est considérée comme un moyen de réduire la dépendance actuelle aux produits agrochimiques dangereux. Notre hypothèse de travail est qu'au cours de la domestication des plantes cultivées, les migrations humaines puis la sélection ont éloigné les plantes cultivées de leur microbiote originel ayant co-évolué avec elles pendant des milliers d'années et que certaines capacités d'interaction plantes-microbiote ont pu s'altérer. Ces capacités d'interactions étant générées par des échanges de signaux hydrosolubles ou volatils, nous avons analysé les profils d'exsudation racinaire de différentes sous-espèces de blé récapitulant les grandes étapes de la domestication depuis l'amidonner sauvage (*T. t. dicoccoides*), l'amidonner cultivé (*T. t. dicoccum*) et le blé dur (*T. t. durum*) mettant en évidence quasiment exclusivement des métabolites secondaires comme des benzoxazinoïdes, des peptides et des phytohormones avec des variations notables entre les sous-espèces. En parallèle, nous avons isolé des bactéries PGPR diazotrophes de la rhizosphère d'un amidonnier sauvage isolé d'une zone refuge au Liban, région faisant partie du croissant fertile d'où le blé est apparu et a été domestiqué. Ces bactéries ont montré un effet PGPR sur un blé dur moderne cultivé en serre sous limitation en azote, avec une augmentation de 90% de la teneur totale en azote des graines. Le surnageant de culture de ces souches a été mis en contact avec le système racinaire de plantules de blé moderne cultivées en hydroponie et ont altéré différemment le développement des racines avec une forte augmentation de la longueur et de la densité des poils absorbants observée lors de l'ajout d'exsudats d'une des souches testées. L'analyse du profil de ces exsudats bactériens a révélé là encore essentiellement des métabolites secondaires dont de nombreux antibiotiques, des peptides mimant potentiellement des phytohormones et des protéines de la voie d'excrétion formant des vésicules à partir de la membrane externe et enfermant des activités enzymatiques comme des protéases et des métabolites secondaires. Enfin, des bactéries endophytes des graines du blé sauvage ont été isolées et l'étude de leur localisation in situ est en cours grâce à un marquage à la GFP. En conclusion, les sous-espèces de blé ont montré des profils d'exsudation racinaire complexes. Les blés modernes semblent avoir conservé les capacités à interagir avec des bactéries PGPR, ces dernières peuvent altérer la croissance racinaire dont celle des poils absorbants.

Mots clés : Domestication de blé, Exsudats racinaires, Exsudats bactériens, Bactéries endophytes, Diazotrophes, PGPR, Métabolomique, Protéomique.

Abstract

The classical model of industrialized agriculture, based on the unbridled use of inputs, is now widely considered unsustainable because it generates biodiversity erosion and multiple pollutions. The use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers is considered as a way to reduce the current dependence on hazardous agrochemicals. Our working hypothesis is that during the domestication of crops, human migrations and then selection have distanced crops from their original microbiota having co-evolved with them for thousands of years and that some plant-microbiota interaction capacities may have been altered. As these interaction capacities are generated by exchanges of water-soluble or volatile signals, we analyzed the root exudation profiles of different wheat subspecies recapitulating the main stages of domestication from the wild emmer (*T. t. dicoccoides*), the cultivated emmer (*T. t. dicoccum*) and the durum wheat (*T. t. durum*) showing almost exclusively secondary metabolites such as benzoxazinoids, peptides and phytohormones with notable variations between subspecies. In parallel, we isolated diazotrophic PGPR bacteria from the rhizosphere of a wild emmer accession isolated from a refuge area in Lebanon, a region part of the Fertile Crescent from where wheat originated and was domesticated. These bacteria showed a PGPR effect on modern durum wheat under nitrogen limitation, with a 90% increase in total seed nitrogen content. The culture supernatant of these strains was brought in contact with the root system of hydroponically grown modern wheat seedlings and altered root development differently with a strong increase in length and density of root hairs observed when exudates of one of the tested strains were added. Analysis of the profile of these bacterial exudates revealed again mainly secondary metabolites including many antibiotics, peptides potentially mimicking phytohormones and proteins of the secretory pathway forming vesicles from the outer membrane and enclosing enzymatic activities such as proteases and secondary metabolites. Finally, endophytic bacteria from wild wheat seeds have been isolated and the study of their in-situ localization is in progress thanks to GFP labeling. In conclusion, wheat subspecies showed rich and different exudation profiles. Modern wheat seems to have retained the ability to interact with PGPR bacteria which can alter root growth, including that of the root hairs.

Key words: Wheat domestication, Root exudates, Bacterial exudates, Endophytic bacteria, Diazotrophs, PGPR, Metabolomics, Proteomics.

Table des matières

	Page
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Généralité.....	3
1.2. Le blé dur : importance dans l'alimentation mondiale	3
1.3. Origine et domestication du blé dur	5
1.4. Changements morphologiques et physiologiques associés à la domestication.....	5
1.4.1. La domestication et la variabilité génétique	7
1.4.2. Domestication et modification des traits morphologiques	8
1.4.3. Domestication et modifications biochimiques.....	8
1.4.4. Domestication et association microbienne.....	9
1.5. Les Bactéries PGPR: plant growth promoting rhizobacteria.....	11
1.5.1. Les bactéries diazotrophes.....	12
1.5.2. Les bactéries solubilisatrices du phosphate.....	13
1.5.3. Les bactéries solubilisatrices du potassium.....	13
1.5.4. Les bactéries endophytes.....	14
1.6. Les exsudats racinaires	17
1.6.1. Définition et systèmes de sécrétion.....	17
1.6.2. Méthodes de récolte et techniques d'analyses approuvées.....	19
1.6.3. Les exsudats racinaires : rôles majeurs.....	21
1.7. Les sécrétions bactériennes :	23
1.8. L'interaction plante-bactéries bénéfiques : un mutualisme via les exsudats	26
1.9. Objectifs et plan.....	27
Chapitre 2: Matériel et méthodes.....	29
2.1. Zones de prélèvement et d'essais au Liban et en France.....	32
2.2. Identification des plantes poussant dans la zone refuge de Nabi-Chit.....	32
2.3. Prélèvement d'échantillons de sol.....	36
2.4. Analyses physico-chimiques du sol.....	36
2.5. Matériel végétal.....	38
2.6. Culture en champ.....	38
2.7. Obtention des exsudats racinaires afin d'étudier leurs fluctuations au cours de la domestication.....	40
2.7.1. Désinfection des grains de blé.....	40
2.7.2. Sélection des graines germées et non contaminées.....	41

2.7.3. Système de culture hydroponique.....	41
2.7.4. Transfert des plantules.....	42
2.7.5. Test de stérilité des exsudats récoltés.....	42
2.7.6. Préparation des échantillons d'exsudats pour les analyses métabolomiques et protéomiques.....	43
2.8. Isolement des bactéries endophytes de la graine de blé	43
2.9. Isolement et purification de bactéries diazotrophes à effet PGPR sur le blé.....	45
2.9.1. Culture de plants de <i>Ttd-NC-2019</i> (dicoccoides) dans les échantillons de sol.....	45
2.9.2. Isolement et purification des bactéries.....	45
2.10. Analyse phylogénétique et moléculaires des souches bactériennes isolées.....	50
2.10.1. Extraction d'ADN génomique.....	50
2.10.2. Amplification PCR de la BOX-A1R.....	50
2.10.3. Amplification PCR de l'ADNr 16S.....	51
2.10.4. Séquençage et analyse des séquences.....	51
2.10.5. Amplification PCR des gènes contributeurs à un effet PGPR.....	51
2.11. Analyses biochimiques des souches bactériennes isolées.....	53
2.11.1. Test de capacité de fixation de l'azote atmosphérique.....	53
2.11.2. Test de capacité de production d'acide indole acétique (AIA).....	53
2.11.3. Test de production de cyanure d'hydrogène.....	55
2.11.4. Test de capacité bactérienne à utiliser des sources insolubles de Phosphate et de potassium.....	55
2.12. Souches bactériennes.....	57
2.13. Transformation bactérienne.....	57
2.13.1. Extraction d'ADN plasmidique.....	58
2.13.2. Préparation des cellules compétentes.....	58
2.13.3. Transformation par électroporation.....	58
2.14. Culture en serre sur sol artificiel pour étudier l'effet PGPR des bactéries sélectionnées.....	60
2.14.1. Préparation de l'inoculum bactérien et conditions de culture des plantes.....	60
2.14.2. Acquisition et analyse d'images.....	61

2.14.3. Analyse des teneurs totales en azote et carbone dans les graines.....	62
2.15. Récolte des exsudats bactériens.....	62
2.15.1. Milieu de culture bactérienne.....	62
2.15.2. Croissance bactérienne.....	62
2.15.3. Récolte des exsudats.....	63
2.16. Croissance en hydroponie pour le phénotypage de développement de système racinaire et pour récolter les exsudats racinaires en présence des exsudats bactériens.....	63
2.16.1. Conditions de culture.....	63
2.16.2. Phénotypage du système racinaire.....	64
2.17. Tampon et milieu de culture.....	64
2.18. Analyses métabolomiques.....	66
2.19. Analyses protéomiques.....	67
2.20. Analyses statistiques.....	68
Chapitre 3. Exsudation racinaire : Mise au point du dispositif d'exsudation et premiers résultats d'analyse métabolomique et protéomique des exsudats racinaires de blé.....	70
3.1. Introduction.....	72
3.2. Matériel et méthodes.....	72
3.3. Résultats et discussion.....	74
3.3.1. Choix des conditions de récolte des exsudats	74
3.3.2. Analyse métabolomique comparative entre deux méthodes de récolte des exsudats.....	74
3.3.3. Analyse protéomique des exsudats racinaires d'une variété de blé dur.....	76
Chapitre 4. Effet de la domestication du blé dur sur sa capacité d'exsudation au niveau racinaire.....	85
4.1. Introduction.....	87
4.2. Matériel et méthodes.....	87
4.3. Résultats.....	91
4.3.1. Comparaison des métabolites racinaires exsudés par 3 sous espèces du transect (Panel A).....	91

4.3.2. Comparaison des métabolites racinaires exsudés par 3 sous espèces du transect (PanelB).....	100
4.4. Discussion.....	100
Chapitre 5. Caractérisation de bactéries endophytes chez l'amidonnier sauvage (<i>T. t. dicoccoides</i>).....	104
5.1. Introduction.....	106
5.2. Matériel et méthodes.....	106
5.3. Résultats.....	108
5.3.1. Une endophyte présente dans l'amidonnier sauvage.....	108
5.3.2. Présence de plusieurs endophytes dans le blé sauvage.....	119
5.3.3. Analyse des exsudats de l'amidonnier sauvage en présence ou non de son endophyte.....	119
5.3.4. Impact de l'endophyte <i>P. agglomerans</i> sur la croissance du blé élite Anvergur.....	120
5.4. Discussion.....	124
Chapitre 6. Sélection des souches bactériennes PGPR fixatrices d'azote.....	128
6.1. Introduction.....	130
6.2. Matériel et méthodes.....	130
6.3. Résultats et discussion.....	130
6.3.1. Isolement et caractérisation de souches diazotrophes dans 2 types de sol.....	130
6.3.2. Caractérisation approfondie de 2 souches diazotrophes aux caractéristiques contrastées.....	139
Chapitre 7. Wild Wheat Rhizosphere-Associated Plant Growth-Promoting Bacteria Exudates: Effect on Root Development in Modern Wheat and Composition (Article)	143
Abstract.....	145
1. Introduction.....	145
2. Results.....	147
2.1. Diazotrophic bacteria: origin and characterization.....	174
2.2. PGPR effect on a wheat elite cultivar.....	148

2.3. Development of culture media suitable for metabolomics and proteomics analyzes of bacterial exudates.....	150
2.4. Bacterial exudates affect root development.....	150
2.5. Comparative metabolomics profiling of <i>BPMP-PU-28</i> and <i>BPMP-EL-40</i> exudates.....	151
2.6. Comparative proteomics profiling of <i>BPMP-PU-28</i> and <i>BPMP-EL-40</i> exudates.....	154
3. Discussion.....	156
3.1. Bacterial strains isolated from the rhizosphere of a wheat ancestor can behave as efficient PGPR in modern wheat varieties.....	156
3.2. <i>BPMP-PU-28</i> and <i>BPMP-EL-40</i> exudates modify root system development.....	157
3.3. The high complexity of the exo-metabolomes and exo-proteomes offer extensive communication and action possibilities for bacteria.....	157
3.4. Conclusions.....	159
4. Materials and methods.....	160
4.1. Soil sampling.....	160
4.2. Diazotrophic bacteria selection and characterization.....	160
4.3. PGPR effect on growth and development on an elite wheat cultivar.....	161
4.4. Bacterial culture media for metabolomic and proteomic profiling.....	161
4.5. Bacterial growth curve in minimal media for metabolomic and proteomic analyses.....	162
4.6. Metabolomics and proteomics profiling of bacterial exudates.....	162
4.7. Effects of bacterial growth supernatants on wheat development in Hydroponics condition.....	162
4.8. Statistical analysis.....	163
References (article).....	164
Supplementary data (article).....	169
Chapitre 8. Conclusion Générale et perspectives.....	186
Annexe.....	193
Références.....	223

Chapitre 1

Introduction

1.1. Généralités

La révolution verte initiée après la seconde guerre mondiale a entraîné une augmentation spectaculaire de la production agricole mondiale améliorant la sécurité alimentaire dans le monde tout en devenant très dépendante de l'agrochimie et entraînant au final une dégradation de nombreux services écosystémiques. Les modèles de prévision annoncent une dégradation accrue de ces services au cours des prochaines décennies si les stratégies de gestion restent inchangées (Vance *et al.*, 2003). Cette dégradation est en grande partie due à une baisse drastique de la biodiversité, conséquence de l'extrême simplification des agro-écosystèmes et de leur artificialisation, et de la pollution induite par ce modèle agricole (Tilman, 1999). La réorientation nécessaire vers de nouveaux modèles assurant une production agricole suffisante de façon durable (Lynch, 2007) ne pourra cependant pas être un simple retour empirique aux pratiques agricoles d'avant la première révolution verte.

Actuellement, la compréhension des relations trophiques complexes au niveau du sol entre la plante et son microbiote permet d'envisager une utilisation plus efficace des ressources hydrominérales et une meilleure capacité à gérer certains stress biotiques ou abiotiques dans un nouveau modèle agricole plus diversifié.

1.2. Le blé dur : importance dans l'alimentation mondiale

Le blé dur (*Triticum turgidum durum*, $2n = 4x=28$) est une monocotylédone de la famille des Poaceae (Graminées), de la tribu des Triticées. C'est une culture céréalière importante en termes de production commerciale et d'alimentation humaine. Cette espèce est la deuxième plus importante du genre *Triticum* après le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et représente environ 20 % de la superficie cultivée en blé dans le monde. La production mondiale de tous les types de blés est de 777 millions de tonnes lors de la campagne 2021. En volume de production, c'est la quatrième culture mondiale derrière la canne à sucre, le maïs et le riz. Les statistiques mondiales sont calculées par le FAO (Food and Agriculture Organization). La Chine, l'Inde et la Russie sont les trois principaux producteurs de blé au monde, représentant environ 41 % de la production mondiale de blé (<https://worldpopulationreview.com/country-rankings/wheat-production-by-country>).



Figure 1.1. La zone domestication de blé au sein du Croissant fertile.

Le Croissant fertile est indiqué par la couleur verte.

Le blé dur contribue considérablement aux apports caloriques et nutritionnels de la population dans plusieurs pays du monde, il fournit environ un cinquième des calories consommées par l'homme. Il est riche en protéines et la force de son gluten en fait le blé privilégié des transformateurs pour la préparation de pâtes alimentaires et pour la fabrication de la semoule, du boulghour et bien d'autres types.

1.3. Origine et domestication du blé dur

Tout comme le blé tendre, le seigle et l'orge, le blé dur a été domestiqué dans le Croissant fertile. En effet, le Croissant fertile marqué en couleur verte (Figure 1.1) correspond à une zone steppique englobant les vallées du Tigre et de l'Euphrate à l'est et toute la côte du Levant à l'ouest rejoignant la vallée du Nil (Times, 1916).

Le blé dur est trouvé dès le 7^{ème} millénaire av. J.-C. à Can Hasan III (Turquie) et Tell Aswad (Syrie), puis en proportions croissantes à la fin du néolithique, au 5^{ème} millénaire avant notre ère en Grèce et dans l'ouest de la Méditerranée. Les ancêtres du blé dur et ses géniteurs directs ont évolué dans une zone du proche et moyen orient et leur domestication s'est déroulée dans le Croissant fertile, zone bioclimatique confinée à l'ouest par la Méditerranée et à l'est par le golfe persique, et où la limite inférieure de la pluviométrie est de 200 mm par an. Il est probable que dans cette zone steppique, une certaine relation entre adaptation et co-évolution s'est mise en place pendant plusieurs millions d'années entre les céréales et les souches du microbiome local.

1.4. Changements morphologiques et physiologiques associés à la domestication

La domestication du blé a impliqué des changements du point de vue génétique morphologique et physiologique et l'analyse de tous ces traits complexes a été réalisée via des caractères quantitatifs appelés QTL (Zvi, 2011). L'étude de ces modifications s'est faite non seulement chez le blé (Peng, 2003) mais aussi dans diverses plantes cultivées comme le riz (Lee *et al.*, 2005), le maïs (White et Doebley, 1998), le sorgho (Paterson *et al.*, 1995), le soja (Liu *et al.*, 2007), et la tomate (Doganlar *et al.*, 2002) et a indiqué que plusieurs groupes de gènes ayant d'importants

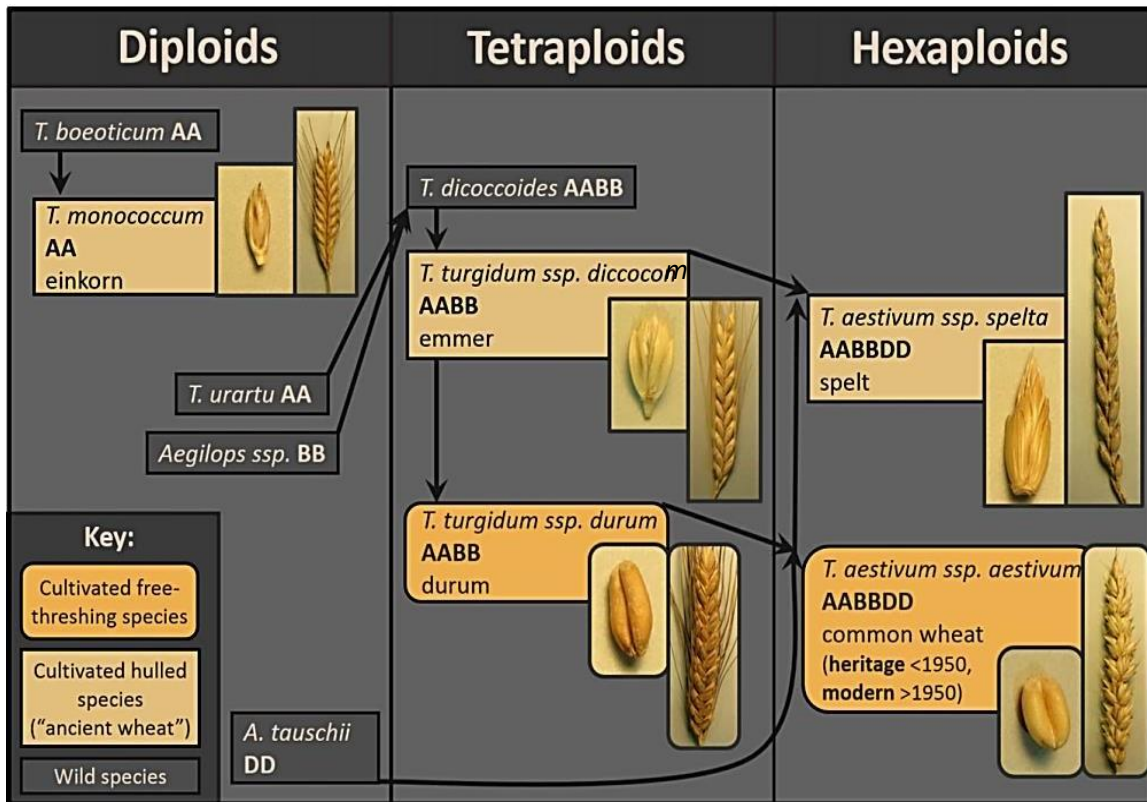


Figure 1.2. La généalogie des membres cultivés de la famille *Triticum*, y compris diverses espèces de blé ancien cultivés, le blé dur et le blé tendre (Kucek et al., 2015). Les blés durs à 28 chromosomes (BBAA) sont des allotétraploïdes possédant les génomes B provenant d'*Aegilops spelta* et A de *Triticum urartu*. Une telle hybridation aurait donné naissance au *T. t. diccoides* qui se serait diversifié et par sélection aurait engendré *T. t. diccoides* et *T. t. durum* (Kucek et al., 2015).

effets sont responsables de la plupart des variations entre la forme de blé domestiqué et celle des géniteurs sauvages.

1.4.1. La domestication et la variabilité génétique

Par la constitution chromosomique du large éventail d'espèces et de génotypes dans le genre *Triticum*, on distingue l'existence de trois sous-groupes (Kucek *et al.*, 2015) (Figure 1.2) :

- (i) Le groupe diploïde ($2n = 2x = 14$ chromosomes) avec *Triticum monococcum aegilopoides* (engrain sauvage) ; *Triticum monococcum* (petit épeautre).
- (ii) Le groupe tétraploïde ($2n = 4x = 28$ chromosomes) à grains vêtus avec *Triticum turgidum diccocoïdes* ou amidonnier sauvage, *Triticum turgidum diccoccum* (amidonnier) ou à grains nus, *Triticum turgidum turgidum* ou blé poulard ; *Triticum turgidum polonicum* ou blé de Pologne ; *Triticum turgidum carthlicum* ou blé de Perse ; *Triticum turgidum durum* ou blé dur.
- (iii) Le groupe des blés hexaploïdes ($2n = 6x = 42$) avec des grains vêtus comme *Triticum aestivum spelta* (grand épeautre ou blé gaulois) ou des grains nus comme *Triticum aestivum aestivum* ou blé tendre, *Triticum aestivum compactum* ou blé hérisson.

Le principal trait de la domestication du blé est le changement qui a lieu lors de la dispersion des graines via le maintien des épillets sur l'épi à maturité, dont la conséquence majeure est la facilitation de la récolte. D'autres traits peuvent aussi être cités tels que la réduction des glumes, la modification de l'architecture de la plante, la perte de l'aspect dormant de la graine et la taille de l'épi et du grain (Harlan, 1973).

Malgré le fait que le blé moderne montre des caractéristiques agronomiques et productives performantes par rapport à l'amidonnier, ce dernier présente une diversité génétique importante et est une source significative de résistances aux maladies et aux ravageurs (Faris, 2013). La réduction de la diversité génétique durant la domestication est estimée entre 50 et 60% (Bonnin *et al.*, 2014). Trois groupes de gènes sont responsables des trois grands caractères influencés lors de la domestication du blé parmi lesquels on peut citer les groupes de gènes Br1^{3A}, Br1^{3B}

et Br1^{3D} ayant un impact sur la fragilité des rachis, le gène Q présent sur le chromosome 5A ayant une influence sur le battage du blé et les gènes Tg1^{2D} et Tg2^{2B} responsables de la réduction des glumes (Faris *et al.*, 2013).

1.4.2 Domestication et modification des traits morphologiques

Au niveau des racines, il était constaté que les anciennes variétés avaient approximativement une biomasse racinaire trois fois plus importante avec une profondeur plus importante que la variété domestiquée et la taille des racines des cultivars modernes est réduite par rapport à celle des variétés sauvages (Waines et Ehdai, 2007; Roucou *et al.*, 2020). Par contre, la masse de racines séminales a augmenté chez les blés modernes (Golan *et al.*, 2018). Quant aux barbes, des extensions filamenteuses longues et rigides des glumes, ils participent à 40% à la photosynthèse et contribuent à l'alignement des épillets portant les graines aux niveaux des épis. C'est la raison pour laquelle leur présence a été conservée lors de la domestication malgré le fait que les barbes des variétés domestiquées soient plus courtes que les sauvages (Haas *et al.*, 2018). De plus, la domestication a réduit en grande partie la dormance des graines et augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'azote (Gioia *et al.*, 2015) tandis qu'elle a augmenté le taux net de photosynthèse, le taux de production de feuilles et la teneur en azote (Roucou *et al.*, 2020).

1.4.3. Domestication et modifications biochimiques

De nombreux métabolites présents dans les grains de blé ont subi des changements importants à chaque étape de la domestication (Ben-Abu *et al.*, 2022). D'après Beleggia *et al.*, 2021, il existe une étroite corrélation entre l'expression génétique et la production des métabolites. De multiples métabolites secondaires de l'embryon du grain ont montré au cours de la domestication une augmentation très remarquable. En effet, ces métabolites sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes comme les antibiotiques et dans la réponse au stress biotique. Parmi ces composés, les phytoalexines, les jasmonates, les benzoxazinoïdes, les glucosinolates, les acides coumariques et d'autres alcaloïdes qui servent de bactéricides, fongicides et insecticides (Okada, 2015; Arbona *et al.*, 2016; De Bruijn *et al.*, 2018 ; Zaynab *et al.*, 2018). Concernant le stress oxydatif qui peut être présent chez les plantes dans le cas d'un stress biotique (présence d'agents pathogènes) et un stress abiotique (la sécheresse, les carences nutritives...), les antioxydants assurent une protection des plantes. (Gill et Tuteja, 2010). Ils s'accumulent dans les grains de blé et ces

composés dérivent de l'acide cinnamique, de l'apigénine, des flavonols, du glutathion, des anthocyanines et d'autres phénols (Gill et Tuteja, 2010). Le métabolisme des acides aminés a été aussi modifié durant la domestication et présente une augmentation tandis que celui de la tyrosine a diminué considérablement. Il est intéressant de noter que la tyrosine est un précurseur direct de l'acide p-coumarique, un composant du mécanisme de défense du blé contre le stress biotique et abiotique (Ben-Abu *et al.*, 2022). De manière remarquable, les taux de DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one), un benzoxazinoïde et de ses dérivés impliqués dans l'allélopathie et la sélection du microbiote ont montré des fluctuations importantes au cours de la domestication du blé et sa fonction dans la réponse contre les espèces fongiques pathogènes (Ben-Abu *et al.*, 2021).

1.4.4. Domestication et association microbienne

La domestication des plantes a permis d'obtenir des cultivars productifs mais aussi de modifier le microbiote végétal de manière significative. La composition de la communauté microbienne rhizosphérique a un impact sur le développement des phytopathogènes (Nehl *et al.*, 1997), l'acquisition de nutriments (Lynch, 1990), la résistance aux métaux lourds (Bradley *et al.*, 1981).

En effet, des plantes de même espèce peuvent recruter différentes espèces bactériennes colonisatrices potentielles de la rhizosphère et suivant le type de sol où elles poussent, modulé aussi par le génotype de la plante, ce qui indique l'effet important du site de culture sur l'assemblage bactérien de la rhizosphère (Abdullaeva, 2021). La domestication ainsi que la sélection ont entraîné une réduction de la diversité génétique des cultivars des plantes et cela a été démontré pour le haricot (Bitocchi *et al.*, 2013), le riz (Ram *et al.*, 2007) et le blé (Haudry *et al.*, 2008).

De même, Germida et Siciliano (2001) ont révélé que la communauté bactérienne de la rhizosphère d'anciens cultivars était plus diversifiée que celle des cultivars modernes. Wipf et Coleman-Derr (2021) ont validé une plus grande abondance des actinobactéries dans les racines d'espèces tétraploïdes et hexaploïdes ainsi qu'une diversité plus élevée chez les polyploïdes dans la rhizosphère, en comparaison avec les diploïdes. En plus, la domestication a aussi altéré la communauté fongique (Hetrick *et al.*, 1995 ; Spor *et al.*, 2022).

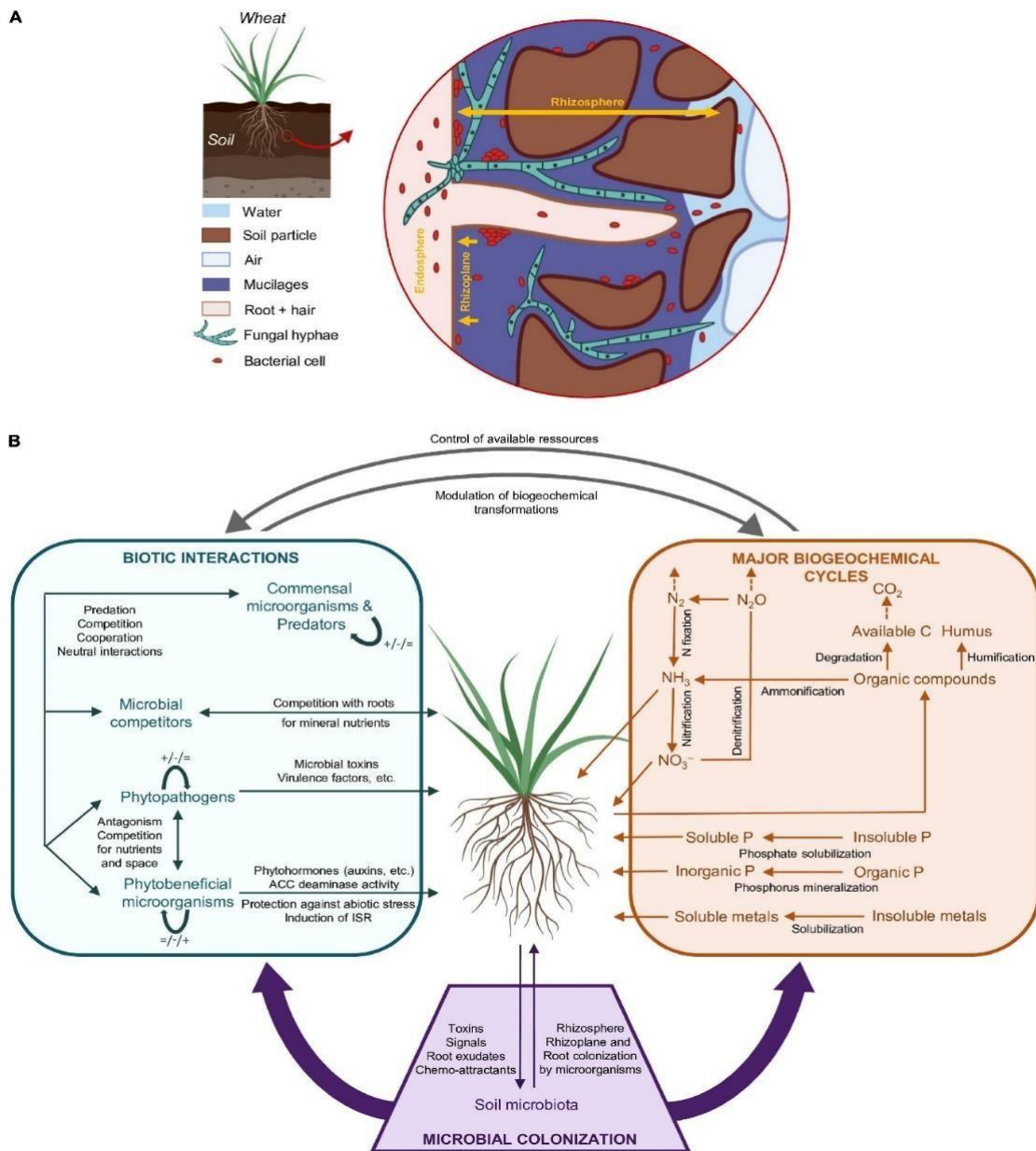


Figure 1.3. Mécanismes d'interaction entre les racines de blé et les microorganismes de la rhizosphère (Gruet *et al.*, 2022).

1.5. Les Bactéries PGPR: plant growth promoting rhizobacteria

Avec les champignons et les protozoaires, les bactéries constituent le groupe de micro-organismes le plus abondant coexistant dans **la rhizosphère** (Singhet *al.*, 2018; Gruet *et al.*, 2022), la zone située autour de la racine, où le système racinaire de la plante a une influence directe et significative sur la composition du sol et la diversité microbienne. Par ailleurs, la communauté bactérienne située au niveau de la surface racinaire est définie comme **le rhizoplan** et les bactéries peuvent coloniser les tissus intérieurs de la racine et définissent **l'endosphère** (Gruet *et al.*, 2022) (Figure 1.3. A). Les bactéries nommées Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) font partie des bactéries bénéfiques capables d'améliorer la croissance des plantes et leur résistance aux stress biotiques ou abiotiques où elles peuvent être utilisées comme biopesticides ou biofertilisants (Oumair Riaz, 2021; Shah *et al.*, 2021). Les PGPR favorisent la croissance des plantes via une grande variété de mécanismes, tels que l'amélioration de la nutrition minérale résultant de la fixation ou la solubilisation de sources de nutriments comme l'azote, le potassium et le phosphore, la production de phytohormones qui affectent le développement du système racinaire et stimulent souvent le développement des poils absorbants et la protection contre les ravageurs des plantes via, par exemple, des processus compétitifs d'acquisition des ressources du sol (Vacheron *et al.*, 2013) (Figure 1.3.B). L'activité PGPR émane de manière significative des interactions dans la rhizosphère, dans laquelle de nombreux types de bactéries attachées aux racines des plantes ont été identifiés (Bakker *et al.*, 2013). Par exemple, une étude menée dans notre laboratoire a montré que le rhizobium *Mesorhizobium loti* se comporte comme une PGPR lorsqu'elle interagit avec *Arabidopsis thaliana*, provoquant une augmentation de la biomasse produite ainsi qu'une forte augmentation, de plus de 100%, de la longueur de poils absorbants (Poitout *et al.*, 2017). Un résultat similaire de stimulation de l'allongement des poils absorbants par différentes souches bactériennes diazotrophes chez le blé dur a été aussi obtenu dans l'équipe (Rongsawat, 2019, Thèse de doctorat). Par conséquent, il est raisonnable de supposer que la stimulation des poils absorbants par de telles bactéries entraîne une amélioration de la nutrition minérale de la plante puisque les poils absorbants jouent un rôle majeur dans l'exploration du sol et l'acquisition des

ions nutritifs principalement l'azote, le phosphore et le potassium par le système racinaire (Rongsawat *et al.*, 2021).

1.5.1. Les bactéries diazotrophes

L'azote, un élément minéral clé pour les plantes, est souvent le composant le plus limitant de la croissance des plantes. Le manque d'azote affecte la qualité et la productivité des cultures (Muhammad Razaq, 2017). L'azote est présent dans le sol sous deux formes : organique et inorganique. Bien que les plantes utilisent principalement les deux formes inorganiques prédominantes, l'ammonium (NH_4^+) et le nitrate (NO_3^-), ce dernier étant plus mobile dans les sols fertiles et donc plus facilement acquis par la plante que l'ammonium (Andrews *et al.*, 2013).

Les bactéries diazotrophes sont l'un des types les plus courants de PGPR avec les PSB (bactéries solubilisant le phosphate) et les KSB (bactéries solubilisant le potassium). Parmi les diazotrophes, certaines bactéries fixent l'azote à l'état libre comme *Acetobacter sp.*, *Azospirillum sp.* et *Azoarcus sp.*. Ces souches peuvent être trouvées soit dans la rhizosphère, soit sous forme d'endophytes. Elles peuvent favoriser la croissance des plantes en réduisant l'azote atmosphérique en ions ammonium (Shin *et al.*, 2016). Les bactéries diazotrophes semblent pouvoir être plus efficaces, en termes de croissance des plantes, que l'utilisation d'engrais chimiques azotés (dans certaines conditions) où leur effet positif sur le développement des plantes se traduit par une augmentation de la masse racinaire, de la masse foliaire et du rendement en graines (Pham *et al.*, 2017). La co-inoculation de bactéries diazotrophes ou avec d'autres PGPR pourrait avoir un avantage agronomique en augmentant l'accumulation d'azote dans la plante, ce qui se traduit par un rendement accru, comme par exemple dans le soja co-inoculé avec *Bradyrhizobium sp.* et *Azospirillum brasilense* dans un sol enrichi en azote par rapport à une inoculation unique (Fipke *et al.*, 2016). Dans un système hydroponique et dans des conditions limitées en azote, la co-inoculation de cinq bactéries *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Nitrospirillum amazonense* et *Paraburkholderia tropica* améliore l'activité de la nitrate réductase dans la canne à sucre (Dos Santos *et al.*, 2017). En plus, des fluctuations de réponses entre différents cultivars et différentes souches bactérienne suggère une interaction spécifique entre la bactérie et la plante hôte (Do Amaral *et al.*, 2016; Otanga *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2020).

1.5.2. Les bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB)

Le phosphore est l'un des éléments les plus essentiels dont les plantes ont besoin pour leur croissance. Il intervient dans la synthèse des acides nucléiques et est impliqué dans la respiration et la photosynthèse des plantes par son intégration dans des liaisons riches en énergie (ATP, ADP...). Il est présent sous des formes organiques et inorganiques. Les plantes ne peuvent pas absorber le phosphore sans solubiliser ou mobiliser le phosphate. En fait, ce processus nécessite un environnement acide favorisé par la croissance de micro-organismes actifs autour de la région racinaire. Ces micro-organismes, connus sous le nom de bactéries minéralisant le phosphore organique ou bactéries solubilisant le phosphate (PSB), ont la capacité de sécréter des acides organiques tels que l'acide oxalique et l'acide acétique, réduisant ainsi le pH autour de la plante (Kalayu, 2019). Dans les systèmes agricoles, ces bactéries sont utilisées comme biofertilisants. Bi *et al.* (2020) ont démontré que des souches de *Bradyrhizobium* et de *Methylobacterium* ont une activité puissante pour dissoudre des formes de phosphore dans le sol, améliorant ainsi la croissance des plantes et spécialement du riz. Ils ont également montré l'induction de l'expression des gènes bactériens, *phoD* et *pqqC* qui codent respectivement pour la phosphatase alcaline et pour la pyrroloquinoline quinone synthase intervenant dans la régulation et la mobilisation du phosphore inorganique et organique (Shi *et al.*, 2022). Certaines espèces de *Pseudomonas sp.* sécrètent des anions organiques tels que le gluconate, qui joue un rôle important dans le processus de minéralisation d'une forme de phytate de calcium (CaHP) impliquant l'expression du gène *Gcd* codant pour une quinoprotéine glucose déshydrogénase considérée comme le biomarqueur clé de la solubilisation du phosphate (Giles *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2022).

1.5.3. Les bactéries solubilisatrices du potassium (KSB)

Avec une importance similaire au nitrate et au phosphore et depuis longtemps il a été vérifié que la plante a tendance à absorber du potassium en plus grande quantité que ses besoins (Bartholomew *et al.*, 1929). Cet élément est essentiel dans le processus de formation des sucres et dans le maintien de la santé et de l'immunité de la plante. Il joue un rôle important dans la résistance aux maladies et la tolérance aux stress environnementaux (Amtmann *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2022). Le potassium présent dans la muscovite, l'orthose, la biotite, le feldspath, l'illite et le mica est difficile à absorber par les plantes sans la présence de bactéries saprophytes autour des

racines (Meena *et al.*, 2014). Il a déjà été rapporté que les espèces bactériennes *Bacillus sp.*, *Acidithiobacillus sp.* et *Paenibacillus sp.* dissolvent ces formes de potassium (Meena *et al.*, 2014). Anjanadevi *et al.* (2016) ont montré que *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*, qui poussent à la surface des roches, dissolvent le feldspath en augmentant l'acidité du sol par la sécrétion d'exopolysaccharides. De même, *Bacillus pseudomycoïdes* peut dissoudre des micas, augmentant ainsi le niveau de potassium dans le sol, ce qui a contribué à une augmentation du rendement des plantes (Paramanik *et al.*, 2019). Dans un système agricole expérimental, l'inoculation de grains de blé avec *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas sp.* a augmenté le rendement de 19% en raison d'une absorption plus importante du potassium (Khani *et al.*, 2019 ; Ashley *et al.*, 2006 ; Srivastava *et al.*, 2020). Dans des conditions de carence en potassium dans le sol, des engrais chimiques tels que le dihydrogénophosphate de potassium sont ajoutés. La surexpression des gènes transporteurs de potassium *MbTrkH* d'origine bactérienne chez le tabac poussant en carence en potassium a permis d'augmenter les masses fraîches et sèches ainsi que la teneur en potassium des plantes (Ding *et al.*, 2020).

1.5.4. Les bactéries endophytes

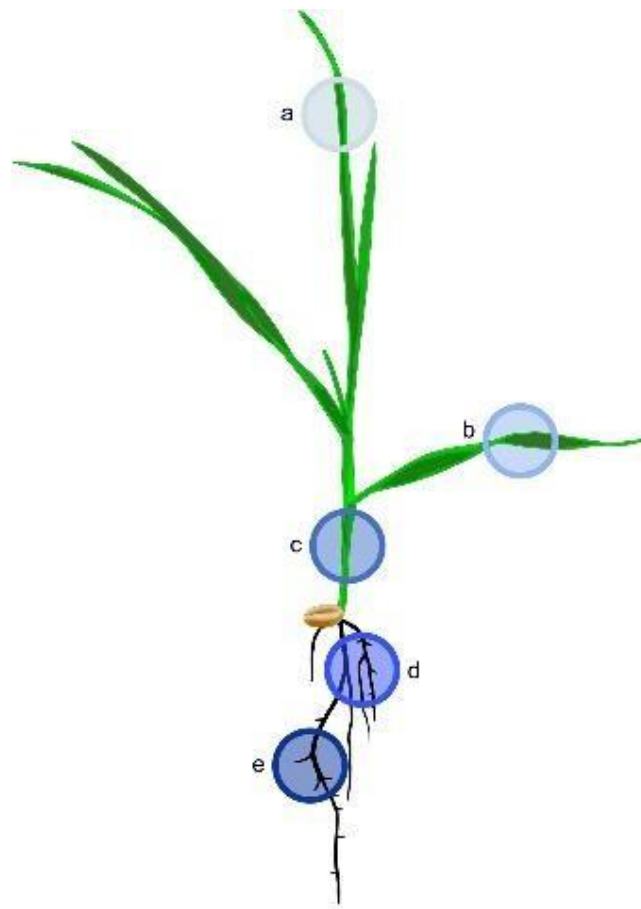
Lorsque les plantes sont apparues il y a plus de 500 millions d'années, des études ont montré la présence de microbes à l'intérieur des plantes pour l'acquisition de nutriments et la tolérance aux stress (Johnston-Monje *et al.*, 2011). Parmi ceux-ci, des bactéries endophytes qui colonisent les tissus internes des plantes et vivent en symbiose ou de manière commensale chez l'hôte (Schulz *et al.*, 2006). Considérant les 300 000 espèces de plantes présentes sur Terre, chaque plante peut héberger plusieurs types d'endophytes (Strobel *et al.*, 2004) En effet, des endophytes envahissent une niche écologique qui ressemble largement à celle des phytopathogènes, ce qui leur confère le potentiel de contrôler d'autres microorganismes pathogènes (Sturz et Matheson, 1996; Duijff *et al.*, 1997 ; Etesami et Alikhani, 2017), les insectes (Azevedo, 2000) et même les nématodes (Munif *et al.*, 2000). Ces bactéries participent également à la croissance des plantes dans certains cas en fournissant des nutriments inorganiques (Cipriano *et al.*, 2021) et en synthétisant des métabolites antifongiques ou antibiotiques pour prévenir le développement de maladies chez les plantes (Mohamad *et al.*, 2018 ; Xia *et al.*, 2022).

Certaines bactéries endophytes jouent un rôle important dans la phytoremédiation de manière naturelle et augmentent le rendement (Afzal *et al.*, 2014).

La capacité des bactéries à coloniser des parties spécifiques d'une plante dépend de la souche bactérienne et de l'espèce. En général, les endophytes se trouvent dans les espaces intercellulaires et très peu dans l'espace intracellulaire des tissus végétaux (Mahaffee, 1997). Cependant, compte tenu de la fonctionnalité, la colonisation intracellulaire semble être beaucoup plus attrayante que la colonisation intercellulaire, et ce phénomène a été observé chez le riz (You et Zhou, 1989) et le blé (Velichko *et al.*, 2022). Pour cela, différentes communautés bactériennes ont été révélées dans plusieurs tissus de graines tels que le tégument, l'embryon, l'endosperme et le péricarpe (Singh et Mathur, 2004; Shade, 2017). Récemment, la distribution spatiale de la communauté bactérienne et fongique au sein des plantules et des graines laisse supposer qu'une grande diversité du microbiome des graines est transmise à la phyllosphère et aux racines des plantules en développement (Abdelfattah *et al.*, 2021). D'autres types d'endophytes profitent des tubes de xylème de leurs racines hôtes dans lesquels ils se développent grâce au mouvement des flagelles et à la transpiration de leur plante hôte (Compant *et al.*, 2005). Une fois que les bactéries endophytes sont présentes dans les graines, apparaît la notion de « transmission verticale » par laquelle elles peuvent être transmises verticalement d'un tissu à l'autre et d'une génération à l'autre.

Les graines (structures sexuées des spermatophytes) sont largement impliquées dans la transmission verticale des bactéries d'une génération à l'autre et représentent pour les cultures la première source d'inoculum (Darasse *et al.*, 2010). En effet, les endophytes peuvent être transférés des parties végétatives des plantes à travers les tissus vasculaires de la plante parentale via le funiculus dans l'endoderme des graines (Agarwal et Sinclair, 1996 ; Barret *et al.*, 2015). Différentes études ont montré ce type de transmission dans les semences de riz (Mukhopadhyay, 1996), de blé (Coombs et Franco, 2003) et de maïs (Wu *et al.*, 2022).

Un autre type de transmission bactérienne peut se produire horizontalement. La transmission horizontale a généralement été notée chez les microbes vivant dans la spermosphère définie comme une zone microbiologiquement dynamique entourant une graine en germination (Schiltz *et al.*, 2015) ou dans la rhizosphère dans laquelle



location	CFU per gram (fw)	
	38 days	46 days
a	$70,9 \times 10^3$	$0,4 \times 10^5$
b	0,80	$0,1 \times 10^5$
c	$1 \times 10^6, 3 \times 10^7$	$3 \times 10^6, 3 \times 10^8$
d	$2 \times 10^8, 2 \times 10^8$	$2 \times 10^9, 2 \times 10^9$
e	$6 \times 10^7, 2 \times 10^7$	$7 \times 10^7, 2 \times 10^7$

Figure 1.4. Persistance et densité de *Pantoea sp.* chez le blé au cours du temps (Soluch *et al.* 2021).

a : feuille supérieure ; b : feuille la plus basse ; c : tige ; d : radicelle et ;, racine primaire.

la plante sécrète des exsudats qui attirent les microbes du sol en augmentant les populations microbiennes au niveau de la zone rhizosphérique (Bulgarelli *et al.*, 2012).

De nombreuses bactéries ont été détectées dans des semences et cultures stérilisées comme la luzerne (Cottyn *et al.*, 2001), le riz (Hardoim *et al.*, 2012), le maïs (Liu *et al.*, 2013), le tabac (Mastretta *et al.*, 2009), le blé (Díaz Herrera *et al.*, 2016) et le quinoa (Pitzschke, 2016). Il a été montré que ces bactéries appartiennent à des genres spécifiques notamment des *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pantoea* et *Acinetobacter*.

Pantoea sp. est capable de persister dans le blé après 40 jours après l'inoculation et a été identifiée en plus grande abondance dans la tige et les racines (principalement dans les jeunes racines de la couronne), mais moins dans les feuilles (Figure 1.4) (Soluch *et al.* 2021).

1.6. Les exsudats racinaires

1.6.1. Définition et systèmes de sécrétion

Les exsudats racinaires sont un mélange complexe de composés organiques solubles ou volatils comprenant les métabolites primaires tel que les glucides, les acides aminés et les acides organiques et les métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les glucosinolates, les auxines, etc. (Badri et Vivanco 2009).

Les plantes ont développé différents mécanismes pour sécréter ces métabolites dans la rhizosphère, impliquant différents types de transport : passif et actif (Figure 1.5) sans que des données précises globales sur le transport d'exsudats aient été démontrées.

Traditionnellement, la sécrétion des exsudats racinaires est considérée comme un processus passif, médié par différentes voies : par transport diffusif à travers la membrane plasmique racinaire via les canaux ioniques et par exocytose (Baetz et Martinoia, 2014). Les propriétés chimiques des composés à exsuder déterminent le processus de sécrétion correspondant. Le transport diffusif implique des molécules de faible poids moléculaire, notamment des sucres, des acides aminés, des acides carboxyliques et des phénols. Ce processus est soumis à des gradients de

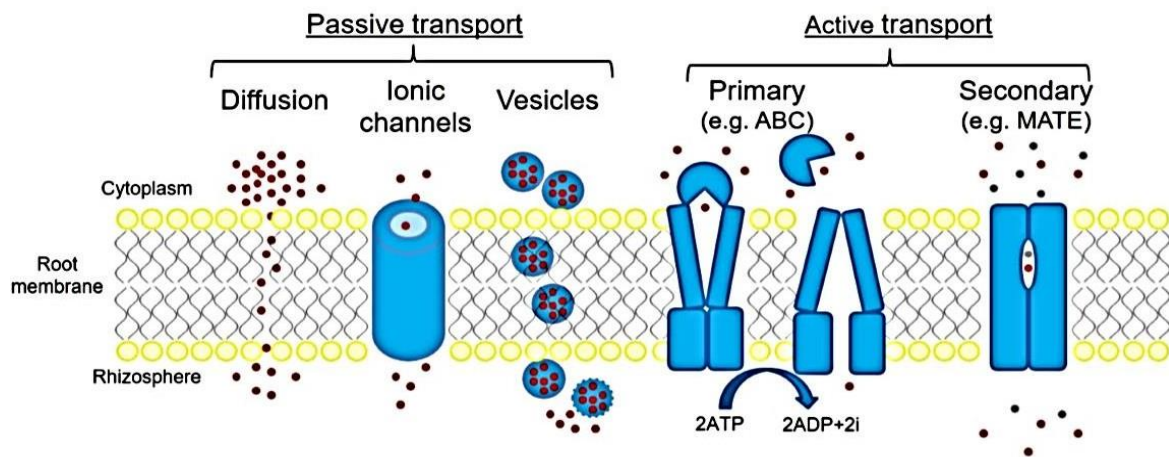


Figure 1.5. Mécanismes du système de sécrétion des exsudats racinaires (Vives-Peris *et al.* 2019). Les points rouges correspondent aux exsudats sécrétés.

concentration entre le cytoplasme des cellules racinaires et la rhizosphère (Badri et Vivanco, 2009). Les canaux ioniques sont responsables de la sécrétion de glucides et de carboxylates spécifiques tels que le malate et l'oxalate. Plusieurs types de canaux anioniques ont été caractérisés comme perméables à ces types de composés, à des degrés divers, ainsi qu'aux ions inorganiques (Cl^- et NO_3^-). Les canaux de type ALMT (Aluminium-activated malate transporters) présentent une forte perméabilité au malate et au fumarate (Sharma *et al.*, 2016). Ce type de canaux joue un rôle important notamment en exsudant des acides di- et tri-carboxyliques de tolérance à Al^{3+} , en complexant (immobilisant) cet ion toxique à la surface racinaire. L'expression du gène *ALMT* s'est également avérée sensible aux facteurs biotiques. Par exemple, une sécrétion accrue de malate suite à l'induction d'*AtALMT1* a été observée lorsque des tissus végétaux aériens étaient infectés par des bactéries pathogènes, et l'hypothèse d'un mécanisme de défense des plantes impliquant la formation d'un biofilm de bactéries bénéfiques à la surface des racines suite à l'exsudation de malate a été proposée. (Rudrappa *et al.*, 2008). Outre les canaux de type AMLT, les canaux perméables au NO_3^- et au Cl^- de type SLAC/SLAH, dont certains sont fortement exprimés dans les racines, présentent également une perméabilité (mais faible) au malate et au bicarbonate (Geiger *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). L'exocytose, l'autre grand type de mécanisme de transport passif, est impliquée dans la sécrétion de métabolites de haut poids moléculaire stockés dans des vésicules (Badri et Vivanco, 2009). Les métabolites exsudés proviennent du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi et certains contribuent à la protection contre les agents pathogènes (Weston *et al.*, 2012). Concernant les systèmes responsables du transport actif des exsudats racinaires, deux grandes familles de transporteurs membranaires ont été identifiées, appelées transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) et MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) (Kang *et al.*, 2011).

1.6.2. Méthodes de récolte et techniques d'analyses approuvées

Trouver une stratégie de récolte des exsudats racinaires dans des conditions axéniques, proche des conditions naturelles (plus significatifs) et avec une reproductibilité des répliqués d'échantillons reste une gageure. Selon l'objectif d'étude, différentes méthodes/systèmes ont été utilisé(e)s pour réaliser la récolte des exsudats racinaires. Les protocoles de récolte se regroupent généralement en trois classes selon le

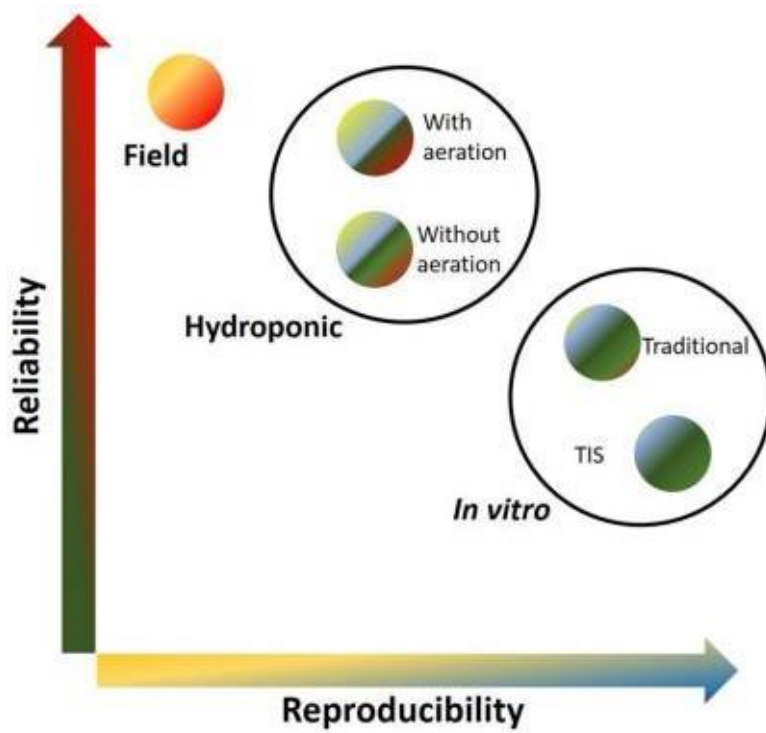


Figure 1.6. Comparaison des méthodologies utilisées pour la récolte des exsudats racinaires en fonction de leur fiabilité et de leur reproductibilité, (Vicente Vives-Peris *et al.*, 2019).

système de culture (Figure 1.6.) (champ, hydroponie et *in vitro*) regroupés en deux grandes catégories (VicenteVives-Peris *et al.*, 2019) :

- La première catégorie est basée sur une culture dans un substrat généralement non stérilisé donc proche des conditions naturelles avec des exsudats ayant subi de potentielles altérations par les microorganismes ou le substrat lui-même.
- La deuxième catégorie regroupe des systèmes de culture hydroponique (Kawasaki *et al.*, 2018), semi hydroponique (Lopez-Guerrero *et al.*, 2022), solide (dans un milieu gélosé) (Wu *et al.*, 2000 ; Seal *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2020) ou dans un système de culture in-vitro/Rhizobox (dans un substrat artificiel) (Wenzel *et al.*, 2020). Malgré une reproductibilité souvent forte des échantillons et leur protection contre les dégradations, ces systèmes sont assez éloignés des conditions naturelles rencontrées par les plantes au champ.

L'identification et la quantification des métabolites s'effectuent généralement, en utilisant les techniques comme la LC-MS/MS, la GC-MS, la RMN Nuclear magnetic resonance (NMR) ou la FT-ICR-MS (Da Silva Lima *et al.*, 2013 ; Carvalhais *et al.*, 2021; Leoni *et al.*, 2021). La récolte des exsudats s'effectue soit après immersion des racines dans l'eau pure après une étape du lavage des racines pour se débarrasser des restes de solution nutritive ou de substrat (avec le risque de dommages sur les racelles ou au niveau des poils absorbants) soit après dessalage de la solution nutritive ou piégeage des métabolites dans l'eau de ruissèlement par des résines (avec le risque de ne pas pouvoir capturer toutes les molécules présentes) (Oburger *et al.*, 2018).

1.6.3. Les exsudats racinaires : rôles majeurs

Les exsudats sont la principale voie de communication de la plante avec son environnement. L'exsudation racinaire peut modifier le pH du sol, entraînant la solubilisation des nutriments sous des formes assimilables, la chélation de métaux ou de composés toxiques permettant leur absorption (par exemple le fer) ou leur immobilisation dans la rhizosphère (aluminium). L'exsudation permet aussi l'attraction d'un microbiote bénéfique, ou la libération de substances toxiques pour les organismes pathogènes ou allélopathiques en général, en compétition avec d'autres plantes (Vives-Peris *et al.*, 2019). Les racines dégagent un répertoire diversifié de métabolites consommant 10 à 20 % du carbone fixé par les plantes. La composition des exsudats est très variable selon la plante, le stade de développement et l'environnement. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* cultivé en hydroponie,

environ 100 composés ont été enregistrés, dont environ 40 ont été identifiés (Strehmel *et al.*, 2014). Cette diversité métabolique suggère un langage chimique végétal complexe médiant d'innombrables interactions rhizosphériques. Par exemple, les coumarines et les benzoxazinoïdes sont des métabolites secondaires connus pour être exsudés par les racines et jouer un rôle dans la formation du microbiote racinaire (Stringlis *et al.*, 2018; Cotton *et al.*, 2019). De petits changements dans la structure des communautés microbiennes sélectionnées par le système racinaire peuvent entraîner de grandes altérations des phénotypes de l'hôte (Brinker *et al.*, 2019). Il a également été montré que le microbiote de la rhizosphère induit plusieurs signaux systémiques de l'hôte, qui déclenchent une reprogrammation métabolique et donc une exsudation différentielle des racines (Korenblum *et al.*, 2020). Ce phénomène d'exsudation de métabolites racinaires induit de façon systémique (Systemic Induced Root Exudation of Metabolism) est modulé par la colonisation microbienne locale des racines. Certains métabolites exsudés sont allélopathiques et sont utilisés par la plante en compétition pour la lumière ou la nutrition hydrominérale.

Chez le sorgho, les exsudats racinaires contiennent plusieurs hydroquinones à longue chaîne, principalement la sorgoléone et son analogue le résorcinol, qui inhibent la croissance des plantes voisines par divers mécanismes, dont l'inhibition de la photosynthèse et de la respiration (Czarnota *et al.*, 2001; Dayan *et al.*, 2010). La sorgoléone, le résorcinol et d'autres hydroquinones apparentées ne sont produits que par des poils absorbants vivants et sont exsudés sous forme de gouttelettes dorées à partir des pointes des poils (Czarnota *et al.*, 2003; Dayan *et al.*, 2009). Il a été vérifié que les gènes de biosynthèse clés responsables de la production de sorgoléone, en particulier SOR1, codant pour une désaturase, ne sont exprimés que dans les poils absorbants (Yang *et al.*, 2004). Les benzoxazinoïdes (BX), comme le 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazine-3 (4H)-one (DIMBOA), sont des métabolites secondaires dérivés du tryptophane et impliqués dans la défense des plantes contre les attaques par les ravageurs aériens et les pathogènes souterrains. Ils peuvent également exercer des activités allélochimiques ou antimicrobiennes. Ils ont été identifiés chez les monocotylédones, notamment chez les Poacées et certaines dicotylédones (Mikic et Ahmad, 2018). Il a été démontré que la synthèse et l'exsudation de DIMBOA dans le blé sont amplifiées en présence de mauvaises herbes (Lu *et al.*, 2012). Ils sont synthétisés sous forme inactive en étant complexé avec un sucre alors que la glucosidase permet leur activation.

1.7. Les sécrétions bactériennes

La sécrétion bactérienne est le processus par lequel les bactéries libèrent des substances chimiques dans leur environnement. Les métabolites bactériens peuvent varier en fonction des souches bactériennes, de la profondeur du sol, des sources de carbone ainsi que du type de plantes associées avec elles (Sharrar *et al.*, 2020 ; Ruiz *et al.*, 2010). Au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne, des métabolites majeurs tels que les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les glucides sont sécrétés (Sanchez and Demain, 2008). En phase stationnaire, qui est définie par l'état d'équilibre entre la division cellulaire et la mort cellulaire des bactéries, des métabolites secondaires sont accumulés, notamment différents types de composés antimicrobiens, des phytohormones, des phytostimulants, des exopolysaccharides (EPS) et des composés organiques volatils (COV) (Sunita *et al.*, 2020 ; Mhlongo *et al.*, 2020). De plus, des débris membranaires appelés vésicules de la membrane externe transportent des produits biologiquement actifs, tels que des protéines, des composants de la paroi cellulaire, des toxines et des substrats extracytoplasmiques (Lee *et al.*, 2007 ; Bitto *et al.*, 2017).

Diverses protéines sécrétées sont impliquées dans les deux processus physiologiques que sont l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm durant la phase de la colonisation bactérienne. Ces protéines sont soit des protéines uniques exposées à la surface cellulaire, soit des sous-unités de complexes supramoléculaires de surface cellulaire, tels que des pili ou des flagelles. L'intégralité des protéines sécrétées par une bactérie donnée est appelée sécrétome ou d'une façon plus générique exo-protéome.

Plusieurs rhizobactéries Gram négatif ont la capacité de libérer des protéines et des métabolites dans le périplasme par la voie d'exportation canonique (SecB) et le système de sécrétion de translocation à 2 arginines (TAT), en plus des systèmes de sécrétion de type I, III, IV et VI influençant la relation symbiotique (Deakin et Broughton, 2009).

Les systèmes de sécrétion de type I transportent les protéines directement du cytoplasme vers l'espace extracellulaire au travers des 2 membranes sans dépendre donc du système GEP (General Export Pathway) tandis que les systèmes de sécrétion de type II transportent les protéines présentes dans le périplasme et sont dépendants des systèmes TAT ou GEP qui eux exportent les protéines du cytoplasme vers le périplasme.

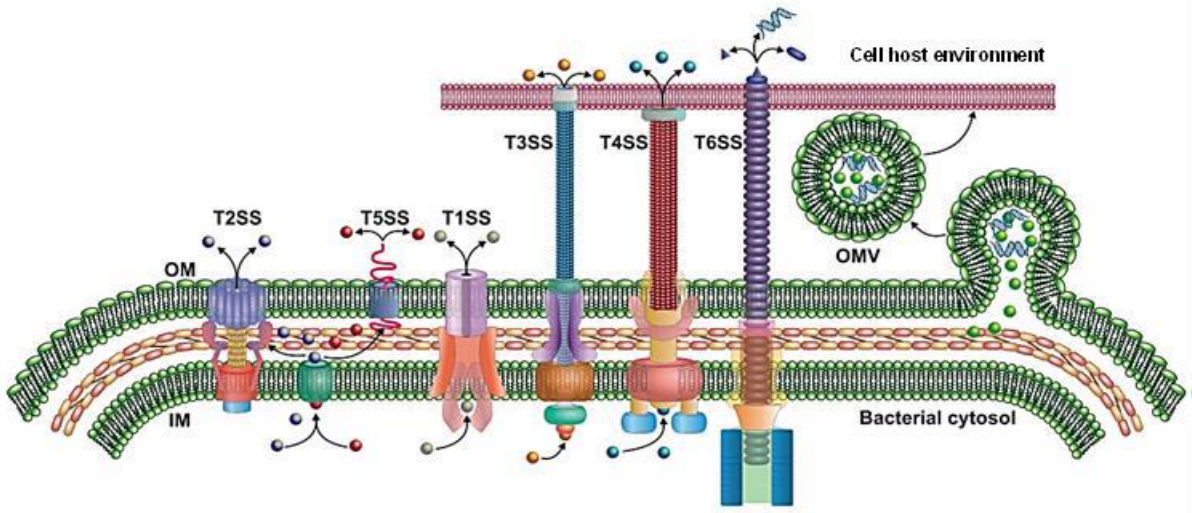


Figure 1.7. Système de sécrétion bactérien (Salavati *et al.*, 2013).

Les systèmes de sécrétion de type III ATP dépendant permettent aux bactéries d'injecter des protéines/métabolites bactériens directement dans le cytoplasme de la plante, ce qui facilite le contournement de l'environnement extracellulaire. De plus, le type IV transloque simultanément l'ADN et les protéines, améliorant ainsi le dialogue plante-bactérie (Salavati *et al.* 2013).

Concernant les bactéries gram-positives, de légères différences peuvent apparaître par rapport aux bactéries gram-négatives. Par exemple, SecA2 est un transporteur utilisé par de nombreuses bactéries Gram-positives pour la sécrétion générale d'un groupe restreint de protéines. En outre, elles utilisent également des structures spécialisées appelées "injectosomes" pour transférer des protéines/métabolites du cytoplasme bactérien vers le cytoplasme d'une cellule hôte dans un processus en deux étapes (Green et Meccas, 2016).

En outre, les bactéries libèrent tantôt des protéines solubles et des médiateurs tels que les porines, les protéines du système de sécrétion de type I-VI, les protéines flagellaires et fimbriales, les protéines périplasmiques et les lipoprotéines, tantôt des protéines en association avec des vésicules membranaires (VM) et cette voie est considérée comme un système de sécrétion (Figure 1.7). Les OMV (outer membrane vesicles) sont définies comme des protéolipides sphériques composés d'une bicouche lipidique d'un diamètre moyen de 20 à 200 nm (Lee *et al.*, 2016) ; elles sont composées de protéines de la membrane externe (OMP), de lipopolysaccharides (LPS), de lipides membranaires, de protéines périplasmiques, de protéines cytoplasmiques, de métabolites ioniques, de molécules de signalisation, d'ADN, d'ARN et d'autres facteurs associés à la virulence. Ces OMV sont des vésicules cargos impliquées dans l'acquisition de nutriments, la résistance aux antibiotiques, la réponse au stress, la compétition ou la défense contre d'autres microbes, le transfert des acides nucléiques (ex transfert horizontal de gènes), la délivrance de toxines et facteurs de virulence, la formation de biofilms dépendant du statut de la communauté microbienne via la sécrétion des molécules de type « signal du quorum » (QS) (Kulp and Kuehn, 2010; Manning and Kuehn, 2011 ; Kim *et al.*, 2013; Schwechheimer *et al.*, 2013; Bonnington and Kuehn, 2014 ; Kulkarni and Jagannadham, 2014 ; Orench-Rivera and Kuehn, 2016; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017 ; Jan, 2017 ; Caruana and Walper, 2020). Cependant, il existe peu d'études sur l'exsudation des bactéries PGPR, celles présentes se concentrent sur les bactéries pathogènes et les cyanobactéries à Gram négatif (Shrivastava et Miller, 2009 ; Mariappan *et al.*, 2011)

et la caractérisation de leurs systèmes de sécrétion (Economou *et al.*, 2006; Dalbey et Kuhn, 2012).

1.8. L'interaction plante-bactéries bénéfiques : un mutualisme via les exsudats

Les sécrétions produites à la fois par les racines et les bactéries sont impliquées dans la signalisation chimique entre les deux partenaires (Olanrewaju *et al.*, 2019 ; Ur Rehman *et al.*, 2020). L'importance de l'investissement que la plante doit concéder pour la mise en place et l'entretien de telles interactions bénéfiques, en termes de quantités de composés carbonés transmis aux microorganismes partenaires, augmente lorsque les ions nutritifs sont faiblement disponibles dans le sol (Clarkson, 1985). De plus, un processus de chimiotaxie par les exsudats racinaires contribue à la sélection des espèces microbiennes constituant le microbiote rhizosphérique, dont la composition diffère de celle des communautés microbiennes vivant hors de la rhizosphère (Bulgarelli *et al.*, 2013). La nature des exsudats impliqués dans cette communication chimique et les mécanismes sous-jacents sont mal caractérisés (Oburger et Jones, 2018). En modulant la composition des exsudats racinaires, les plantes peuvent modifier les propriétés du sol pour s'adapter et survivre dans des conditions défavorables. Une étude a montré que les bactéries PGPR telles que *Pseudomonas putida* KT2440 présentent une transcription accrue des gènes contrôlant le catabolisme et la chimiotaxie des benzoates, et les racines de maïs de type sauvage produisant du DIMBOA attirent beaucoup plus de *P. putida* que les racines du mutant bx1 déficient en DIMBOA (Neal *et al.*, 2012). Ainsi, le DIMBOA joue un rôle chimique central dans le recrutement des rhizobactéries bénéfiques et de la communauté fongique par les plantes (Cotton *et al.*, 2019). L'acide azélaïque, un acide dicarboxylique synthétisé par plusieurs céréales, joue un rôle dans la signalisation plante-bactérie. Il est aussi impliqué dans l'acquisition de la résistance systémique (SAR) chez les plantes (Lim *et al.*, 2016). Plusieurs bactéries telles que *Pseudomonas nitroreducens* peuvent utiliser l'acide azélaïque comme seule source de carbone, et il a été démontré qu'*AzeR* est un répresseur bactérien qui répond spécifiquement à l'acide azélaïque et n'est présent que dans quelques genres de protéobactéries (Bez *et al.*, 2020). De plus, l'acide azélaïque s'est avéré être un acteur clé de la résistance à *Pseudomonas syringae* chez *Arabidopsis* (Jung *et al.*, 2009; Cecchini *et al.*, 2019).

Ainsi, à travers leur exo-métabolome et exo-protéome, les PGPR interagissent avec les plantes en régulant la disponibilité des nutriments qui à son tour augmente la fertilité du sol. Le dialogue chimique peut également être établi par des changements dans la morphologie des racines, le développement des poils absorbants (Vacheron *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2021), le métabolome foliaire (Mahmood et Kataoka, 2020) ou les profils d'exsudats racinaires (Lucke *et al.*, 2020; De-la-Peña *et al.*, 2008). Ces changements entraînent des effets qui peuvent intervenir directement ou indirectement dans la tolérance des plantes aux stress biotiques ou abiotiques (Gouda *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018).

1.9. Objectifs et plan

Nous avons émis l'hypothèse que la capacité du blé à interagir efficacement avec son environnement (macro/micro-organismes) a pu évoluer au cours de la domestication du blé avec la perte de son microbiote d'origine via les migrations humaines et la sélection surtout depuis la révolution verte, dans des sols artificialisés et l'utilisation massive d'intrants.

Afin de mieux comprendre le dialogue entre le blé dur et les bactéries, nous avons analysé les exsudats racinaires et bactériens car ces exsudats sont directement impliqués dans les processus de signalisation chimique et les relations trophiques entre plantes et bactéries. Par conséquent, le plan que nous avons suivi est le suivant:

- (i) Analyse de l'exsudation d'une série de sous-espèces récapitulant les grandes étapes de la domestication (Chapitre 3 et 4),
- (ii) Caractérisation des bactéries endophytes isolées à partir de graines d'un blé sauvage sur l'exsudation racinaire de ce blé et effet d'une de ces endophytes sur la croissance d'un cultivar de blé élite (Chapitre 5),
- (iii) Sélection de souches diazotrophes du sol du centre d'origine de la domestication du blé dur (Chapitre 6) et test de leurs effets sur la croissance du blé moderne sous limitation d'azote,
- (iv) Test de l'effet de leurs exsudats sur la morphologie racinaire et analyse du profil de ces exsudats au niveau métabolomique et protéomique (Chapitre 7).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

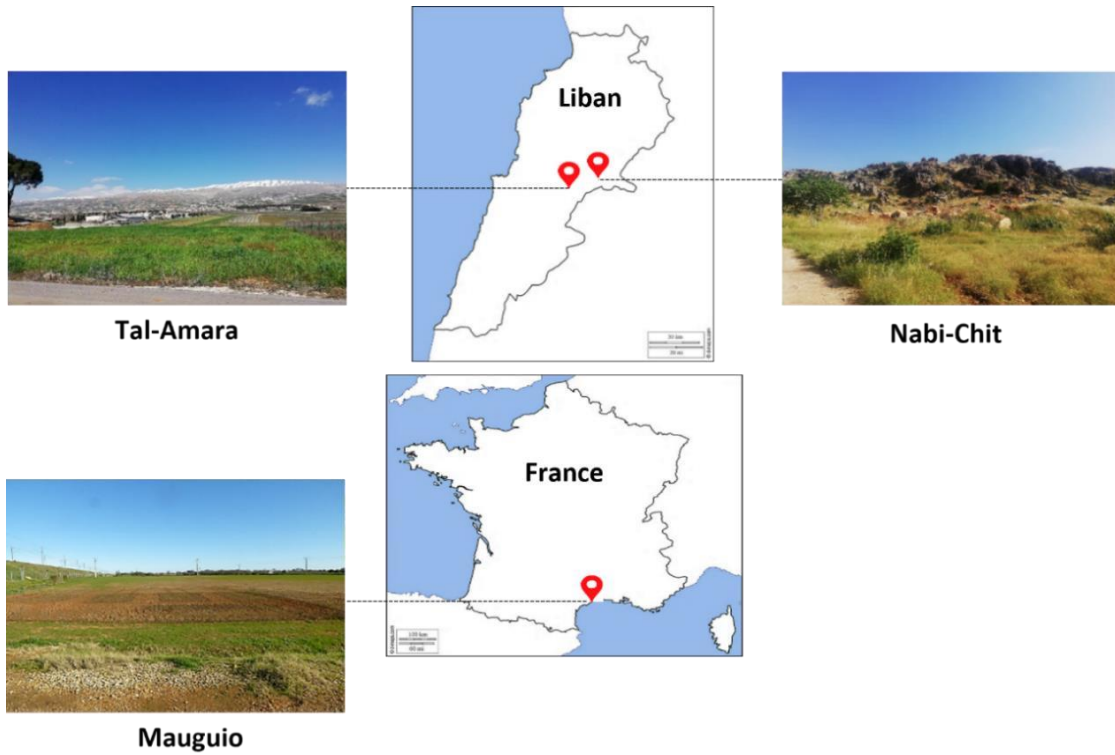


Figure 2.1. Localisation des trois zones prospectées et utilisées au Liban et en France.

Nabi-Chit et Mauguio (Domaine expérimental INRAE) ont été utilisées comme sites d'isolement de bactéries diazotrophes (Cf. § 2.9) et d'étude métagénomique des microbiotes et macrobiotes associées à chaque accession du transect de domestication (Cf. § 2.6). Tal-Amara (campus IRAL, Institut de la recherche agronomique libanais) et Mauguio comme sites de sélection expérimentale pour l'EPO « Evolutionary Pre-breeding pOpulation » (Cf. § 2.6).

2.1. Zones de prélèvement et d'essais au Liban et en France

Le Liban fait partie intégrante de la région définie historiquement comme le Croissant fertile, zone de domestication du blé dur et de l'apparition de l'agriculture. Dans ce centre d'origine, il peut encore potentiellement exister des zones refuges où des blés ancestraux continuent de survivre, ce qui offre la possibilité d'étudier ces blés tant au niveau génétique qu'au niveau de leurs interactions avec leur biotope, en particulier avec leur microbiote et leurs adventices/plantes compagnes.

Nous avons donc recherché de telles zones au Liban. D'autre part, pour conduire des analyses comparatives, nous avons aussi sélectionné une zone de référence hors Croissant fertile (Domaine INRAE de Melgueil, Mauguio, France).

Au Liban, dans la vallée de la Bekaa, deux zones ont été sélectionnées. La première se trouve sur le campus IRAL (L'Institut de Recherche Agronomique Libanais) à Tal-Amara. La seconde zone sélectionnée en tant que « zone refuge » dans laquelle des blés sauvages poussent spontanément, est localisée à proximité du village de Nabi-Chit. Ces deux zones Tal-Amara et Nabi-Chit sont situées respectivement à 33°52'22,6" et 33°51'35,6" de latitude N, à 35°58'91,7" et 36°07'09,6" de longitude E, et à une altitude de 907 mètres et 1220 mètres au-dessus du niveau de la mer.

En France, une parcelle d'une station expérimentale de l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement), utilisée depuis plus de 10 ans pour des essais d'agriculture biologique intégrant des légumineuses et céréales en rotation a été choisie. Elle est localisée sur la commune de Mauguio (à proximité de Montpellier), à 43°37'11,0" de latitude N, à 3°58'45,2" de longitude E et à une altitude de 12 mètres au-dessus du niveau de la mer (Figure 2.1).

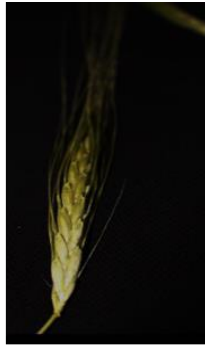
2.2. Identification des plantes poussant dans la zone refuge de Nabi-Chit

Trois plants de blé sauvage au stade épiaison (Figure 2.2) ainsi que les plantes compagnes poussant autour d'eux ont été prélevés. Ces plantes ont ensuite été identifiées (Figure 2.3) avec les clés habituelles de systématique à l'Institut de



Figure 2.2. Blé amidonnier sauvage identifié à Nabi-Chit au Liban.

Les zones refuge où poussent l'amidonnier sauvage (*Ttd-NC-2019*) sont des zones rocheuses où le sol est souvent superficiel. Les blés sauvages font plus d'un mètre de haut et possèdent de longues barbes ainsi que des épis formés de deux rangées d'épillets situés de part et d'autre de l'axe. Ces blés sont entourés de différentes espèces de plantes compagnes.



Triticum dicoccoides



Aegilops biuncialis



Aegilops ovata



Hordeum vulgare



Hordeum bulbosum



Avena barbata



Pilgerochloa blanchei



Melica persica



Poa bulbosa



Phleum pratense



Lagoecia cuminoides



Stachys nivea



Alhagi graecorum



Lactuca stebbins



Trifolium lagrangei

Figure 2.3. Plantes récoltées dans la proximité immédiate des blés sauvages de la zone refuge identifiée à Nabi-Chit.

Tableau 2.1. Propriétés physico-chimiques du sol sur les sites d'échantillonnage de trois zones prospectées et utilisées au Liban et en France.

Propriétés Physiques

	Origine du sol		
	Nabi-Chit	Tal-Amara	Mauguio
Sable (%)	41	25	33
Limon (%)	39	23	40
Argile (%)	20	52	27
Texture du sol	Argileux alluviale	Argileux	Argileux alluviale

Propriétés Chimiques

Paramètres	Origine du sol					
	Nabi-Chit		Tal-Amara		Mauguio	
	Valeur	Remarque	Valeur	Remarque	Valeur	Remarque
pH (H ₂ O)	7	Neutre	8	Basique	7.5	Basique
Conductivité (ms.cm ⁻¹)	0.13	Faible	0.12	Faible	0.2	Faible
Matières organiques (%)	2.1	Moyen	1.1	Faible	1.76	Moyen
Calcaire totale (%)	8	Moyen	16	Moyen	3	Faible
Calcaire actif (%)	2.7	Faible	5.5	Moyen	1	Faible
Azote organique (%)	0.13	Faible	0.06	Faible	0.11	Faible
P disponible (ppm)	51.2	Moyen	72.4	Moyen	104	Moyen
K échangeable (ppm)	544	Elevé	660	Elevé	413	Elevé
Na échangeable (ppm)	118	Faible	102.6	Faible	165	Faible
Mg échangeable (ppm)	665	Elevé	173	Faible	468	Elevé
Ca échangeable (ppm)	10126	Elevé	16126	Elevé	7502	Elevé

Recherche Agronomique Libanais (IRAL) en collaboration avec Madame Joëlle Breidy, botaniste et responsable de la banque des graines à l'IRAL. La variété de blé sauvage trouvée à Nabi-Chit semble morphologiquement identique à la variété du blé dur sauvage (amidonnier sauvage) codée « Leb 1061 *Triticum turgidum dicoccoides* » dans l'herbier à IRAL. La nomenclature utilisée dans les expériences pour cette variété de blé sauvage identifiée est « *Ttd-NC-2019* » (*Ttd* pour *Triticum turgidum dicoccoides* et *NC* pour Nabi-Chit pour un prélèvement en 2019). A maturité, des épillets de blé sauvage (*Ttd-NC-2019*) et des graines des plantes compagnes ont été récoltés et stockés à 4°C.

2.3. Prélèvement d'échantillons de sol

Des échantillons de sols ont été prélevés au Liban et en France pour déterminer leurs caractéristiques physico-chimiques et isoler des bactéries diazotrophes.

- Pour les analyses physico-chimiques, les échantillons ont été prélevés dans chaque site, à Nabi-Chit, Tal-Amara et Mauguio, à une profondeur de 20 cm environ.

- Pour l'isolement des bactéries diazotrophes, des échantillons ont été prélevés sur les sites de Nabi-Chit et Mauguio. Les échantillons de Nabi-Chit ont été obtenus à partir de sol rhizosphérique du blé ancestral *Ttd-NC-2019* au stade "maturation". L'échantillonnage a été réalisé dans différentes zones, choisies de façon aléatoire, et les échantillons ont été mélangés, placés dans une boîte stérile et stockés à 4°C. A Mauguio, le sol a été prélevé à une profondeur de 15-20 cm environ dans une parcelle cultivée en blé (et utilisée depuis plus de 10 ans pour des essais d'agriculture biologique intégrant des légumineuses et céréales en rotation (Cf. § 2.1). Les échantillons de ce sol ont été prélevés un jour avant leur utilisation en vue de l'extraction de bactéries.

2.4. Analyses physico-chimiques du sol

Les analyses physico-chimiques des sols libanais issus des sites de Nabi-Chit, Tal-Amara et Mauguio ont été réalisées au laboratoire de biotechnologie à IRAL (Institut de Recherche Agronomique au Liban) par madame Marie Nabhan selon les méthodes

Tableau 2.2. Les différentes variétés de blé utilisées dans cette étude.

Variété ou numéro d'accession	Sous-espèce	Origine ou référence
Panel A		
<i>Ttd-NC-2019</i>	<i>T. turgidum dicoccoides</i>	Liban
Escandia	<i>T. turgidum dicoccum</i>	Espagne
Zagharine	<i>T. turgidum durum</i> (élite)	Liban
Anvergur	<i>T. turgidum durum</i> (élite)	France
Panel B		
70	<i>T. turgidum dicoccoides</i>	Mr. Pierre ROUMET
139	<i>T. turgidum dicoccum</i>	Mr. Pierre ROUMET
411	<i>T. turgidum durum</i> (élite)	Mr. Pierre ROUMET
Panel C		
EL_4 X201	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X331	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X49	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X303	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X237	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X394	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X65	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X104	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X197	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X288	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X03	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014
EL_4 X35	<i>T. turgidum</i> -	David et al., 2014

utilisées par Estefan *et al.*, 2013. Les propriétés physico-chimiques sont présentées dans le tableau 2.1.

2.5. Matériel végétal

Trois panels de graines du blé dur ont été utilisés (Tableau 2.2), le premier (panel A) est formé de quatre variétés dont chacune appartient à une étape de domestication du blé dur, une variété sauvage (dicoccoides) identifiée dans une zone refuge de croissant fertile au Liban (*Ttd-NC-2019*) (Cf. § 2.2), une variété dicoccum (Escandia) et deux variétés durum élites dont l'une est d'origine française (cv. Anvergur) et l'autre d'origine libanaise (cv. Zagharine). Le deuxième (panel B) se compose de 3 variétés différentes comprenant les sous-espèces dicoccoides, dicoccum et durum définissant un « transect de domestication du blé dur » et le troisième panel (panel C) regroupe l'ensemble de 12/183 lignées issues de l'EPO (Evolutionary Pre-breeding pOpulation) (David *et al.*, 2014).

Pour l'expérimentation en champs, la totalité des variétés de deux panels B et C ont été utilisés.

Pour les expérimentations *in vitro*, certaines variétés de chacun des trois panels (A, B et C) ont été choisies (Tableau 2.2). Dans ce rapport nous nous sommes focalisés sur les variétés suivantes : *Ttd-NC-2019* (dicoccoides), Escandia (dicoccum), Anvergur et Zagharine (durum élite) du panel A, Dicoccoides 70 (dicoccoides), Dicoccum 139 (dicoccum), Durum 411 (durum élite) du panel B. Les graines de ces sept variétés ont été récoltées après leur amplification en serre. Les grains du blé récoltés sont décortiqués manuellement pour éviter la contamination due au battage. Ensuite ces graines sont pesées et triées visuellement afin d'augmenter l'homogénéité des plantules lors de la germination, de la croissance et du développement. La masse des grains choisis oscille entre 0.04 et 0.06g selon l'accession.

2.6. Culture en champ (Travail en cours)

Dans une première série d'expériences, le panel composé de 20 variétés comprenant des dicoccoides, dicoccum et durum a été cultivé dans la zone refuge de Nabi-Chit afin de récolter le microbiote présent chez chacune de ces accessions (Cf. § 2.1). Le sol a été préparé superficiellement et protégé des ravageurs par un grillage.

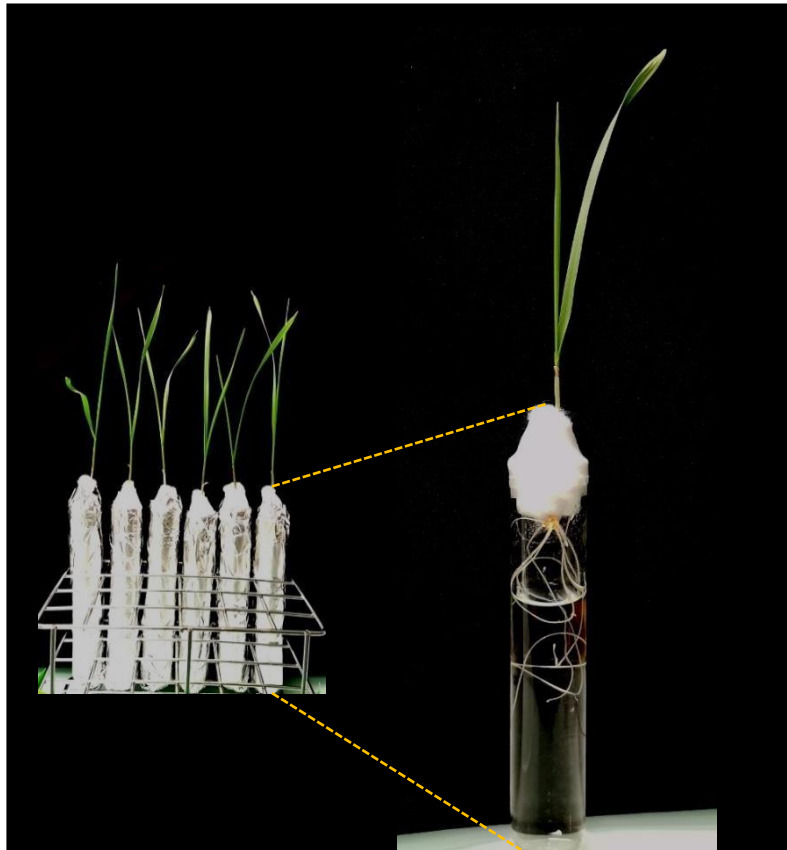


Figure 2.4. Système de culture hydroponique utilisé pour récolter les exsudats racinaires dans des conditions axéniques.

Ce système est formé d'un tube à essai classique en verre de volume (50 ml) dans lequel une plante du blé est immergée dans un contenu de 40 ml d'une solution nutritive « Hoagland » complet ; composition de la solution : Cf. § 2.17). L'obturation de ce système utilise un bouchon de coton entourée par deux parafilms, qui permet les échanges gazeux entre l'intérieur du tube et l'extérieur. Les tubes ont été finalement emballés dans du papier d'aluminium pour protéger les racines de la lumière dans la chambre de culture.

Une deuxième série de culture a été effectuée en utilisant les accessions de l'EPO (Evolutionary Pre-breeding pOpulation, 183 lignées). Dans le champ identifié à Tal Amara (Cf. § 2.1) et en parallèle dans la parcelle de Mauguio, les accessions de l'EPO mélangées dans un ratio 1 :1 :1... ont été cultivés en triplicats sur des placettes de 20 m² à une densité d'environ 300 graines/m² après préparation du sol. Ces cultures seront menées durant 6 années sans apport d'engrais suivant une logique d'évolution expérimentale ou « dérive darwinienne » afin de repérer les accessions les mieux adaptées aux conditions locales. Après chaque récolte, une aliquote de celle-ci est ressemée à l'automne suivant, une autre aliquote pouvant servir à analyser la dérive des proportions de chaque accession année après année par rapport à la population de départ est conservée.

2.7. Obtention des exsudats racinaires afin d'étudier leurs fluctuations effectuées au cours de la domestication.

2.7.1. Désinfection des grains de blé

Afin de récolter des exsudats racinaires dans des conditions axéniques, la première étape consiste à désinfecter le matériel biologique c'est-à-dire les caryopses de blé. Les méthodes testées de désinfection des grains de blé, bien que notées efficaces dans la littérature, ne permettent pas, dans nos mains, d'obtenir un taux de germination et de non-contamination sur milieu agar ou sur des papiers Whatman de 100 % mais conduisent à des taux plutôt proches de 65%. Plusieurs composants utilisés pour la stérilisation ont une influence sur la germination, la décontamination et le développement racinaire (ex l'alcool à 70° a une forte influence négative sur la germination).

Les graines de trois variétés du blé *Ttd-NC-2019* (dicoccoides), *Escandia* (dicoccum), et *Zagharine* (durum élite) du panel A et dicoccoides 70, *Dicoccum* 139 et *Durum* 411 du panel B, ont été désinfectées. Le protocole de désinfection se compose de deux étapes importantes. La première, correspondant à la désinfection sensu stricto, consiste à traiter les caryopses par une solution d'hypochlorite de calcium (40 g.L⁻¹). Au début du traitement, après avoir transféré les graines dans la solution d'hypochlorite, le récipient est placé dans une cloche à vide pendant 2 épisodes de

10 minutes, avec agitation des caryopses dans la solution entre ces deux épisodes. Ce traitement "sous vide" a pour objectif d'éliminer les bulles d'air à la surface des caryopses, en particulier celles prisonnières du sillon central, de façon à ce que la solution de désinfection immerge la totalité de la surface du caryopse. Après élimination de la solution d'hypochlorite par une série de rinçages, les caryopses sont soumis à un traitement par de l'eau stérile tiède. En pratique, quel que soit la variété du blé, les graines sont immergées dans un volume d'eau stérile de 40 ml à 55°C. Dans certaines conditions d'expérimentation, pour la variété *Ttd-NC-2019* (dicoccoides), cette étape est réalisée en ajoutant en plus de la tétracycline (50 mg.L⁻¹) (Díaz Herrera *et al.*, 2016) afin d'éliminer les souches bactériennes endophytes. Ensuite la solution contenant les graines est déposée dans un incubateur à 26°C durant une nuit. Le principal intérêt d'un tel traitement thermique, sur la base des observations faites, est d'accélérer et d'homogénéiser la cinétique de germination des différents caryopses, probablement en favorisant l'étape d'hydratation.

2.7.2. Sélection des graines germées et non contaminées

Après l'étape de désinfection, les caryopses stériles sont transférés (sous la hotte à flux laminaire) sur papier « Whatman » stérile dans une boîte de Petri et mis à germer pendant 7 jours à 26°C à l'obscurité. Certaines variétés de blé dur comme le *Ttd-NC-2019* (dicoccoides) ne peuvent germer sans vernalisation, pour cela une stratification est effectuée par transfert des caryopses au froid à 4°C pendant 4 jours avant la mise à l'obscurité pour la germination. La présence d'éventuelles contaminations est détectée sous une loupe binoculaire.

2.7.3. Système de culture hydroponique

Différents dispositifs expérimentaux ont été essayés dans notre laboratoire afin de parvenir à cultiver des plantes pendant plusieurs semaines en condition hydroponique de façon stérile. Un système de culture hydroponique plus simple a été développé en utilisant un "bouchon" de coton pour assurer l'isolement de la solution nutritive par rapport à l'atmosphère extérieure. Différents systèmes d'une telle culture hydroponique ont été testés. Le système choisi consiste en un tube à essai en verre de 50 ml obturé par un coton entourant le coléoptile. Ce système permet une croissance satisfaisante des parties aériennes et racinaires de la plante (Figure 2.4) et des tests microbiologiques ont révélé que la solution nutritive dans le tube reste

stérile durant toute la durée de l'expérimentation. La solution nutritive utilisée est le milieu Hoagland modifié complet, les composants cette solution sont détaillés dans la partie § 2.17.

2.7.4. Transfert des plantules

Les grains germés ne présentant aucun signe de contamination sont laissés pendant 7 jours jusqu'au moment où les premières feuilles apparaissent. Sous la hotte, 6 plantules de blé sont transférées individuellement, après excision des graines, dans un tube en verre de 50 ml dans le milieu de culture (Cf. § 2.7.3). Les tubes ont été emballés dans du papier d'aluminium pour protéger les racines de la lumière et éviter toute dégradation photosensible de molécules exsudées. Les tubes sont placés dans la chambre de culture avec une photopériode de 16 h de jour, une température jour/nuit de 22/20 °C, une intensité lumineuse de 150 µE, et une humidité relative de l'air de 70%, pendant 7, 14 ou 21 jours. Un ajout de milieu (de 20 à 25 ml) après 14 jours est nécessaire pour compenser la perte du milieu nutritif par évapo-transpiration (foliaire).

2.7.5. Test de stérilité des exsudats récoltés

A l'issue de la période de culture, afin de vérifier l'absence de contamination bactérienne dans la solution de nutritive, des aliquotes de 100 µl de solution sont prélevées, étalées sur du milieu LB (Luria Bertani) et incubés à 37°C pendant 48 heures. Si ce test ne révèle pas de contamination, la solution nutritive (contenant les exsudats racinaires) est prélevée et répartie dans trois tubes de 15 ml (10 ml par tube environ), qui sont ensuite congelés (à -50°C) en attendant l'analyse de leur contenu en métabolites, protéines et peptides.

Un deuxième type d'échantillon d'exsudats racinaires est récolté consistant à récolter des exsudats racinaires en immergeant dans de l'eau pure pendant une période courte (2 heures) le système racinaire de plantes précédemment cultivées en hydroponie. Le système racinaire est rincé à l'eau distillée avant exsudation. Ce deuxième échantillon d'exsudat est obtenu par immersion des racines de chaque plante dans 6 ml d'eau distillée pendant deux heures après le temps de culture (7 jours). Les solutions de récolte sont ensuite lyophilisées et les échantillons stockés à -50°C en attendant les analyses.

2.7.6. Préparation des échantillons d'exsudats pour les analyses métabolomiques et protéomiques

La solution nutritive d'Hoagland contient des sels qui ne sont pas compatibles avec l'analyse LC-MS/MS, les exsudats racinaires récoltés doivent être dessalés avant l'analyse.

Les colonnes C18 Sep Pak sont déposées sur une chambre à vide SPE CHROMABOND® branchée à une pompe à vide. Après l'activation des colonnes C18 Sep Pak par l'acétonitrile 70% suivie d'un lavage avec l'acide formique 2%, les échantillons préalablement acidifiés par 2% d'acide formique sont dessalés sur C18 Sep Pak selon (Lehmann *et al.*, 2021) ou d'abord réduits avec 10 mM de DTT (1,4-dithiothréitol), et alkylés avec 50 mM d'iodoacétamide puis dessalés sur C18 Sep Pak pour l'analyse métabolomique et protéomique respectivement. Les molécules non retenues sur la colonne sont conservées (Flow through) et les molécules retenues sur la colonne après 2 lavages par une solution d'acide formique 2% sont éluées par une solution d'acétonitrile 70% et d'acide formique 2% (de 900 à 1800µl suivant la colonne utilisée). Enfin, les éluats ont été lyophilisés et stockés à -20 °C pour analyse.

2.8. Isolement des bactéries endophytes de la graine de blé

Les graines de blé sauvage *Ttd-NC-2019* (*T.t. dicoccoides*) ont été désinfectées suivant le protocole décrit dans la partie 2.7.1, (sans l'étape de l'ajout de l'antibiotique «tétracycline»). Une bactérie endophyte a été isolée après l'observation d'une contamination récurrente des exsudats racinaires lors de test de stérilité dans le milieu LB (*Cf.* § 2.7.5). Les colonies bactériennes issues de cette contamination ont été purifiées individuellement et multipliées dans un milieu LB puis stockées à -80 °C.

De même, des graines décortiquées de blé sauvage *Ttd-NC-2019* (*T.t. dicoccoides*) ont été désinfectées suivant un autre protocole décrit par Díaz Herreraa *et al.* (2016) avec quelques modifications. Brièvement, la surface des graines est désinfectée avec de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, suivi d'une immersion dans 4 % d'hypochlorite de calcium (CaCl₂) pendant 2,5 minutes et à nouveau une imbibition dans d'éthanol à 70 % pendant 30 secondes. Après trois rinçages à l'eau distillée stérilisée, un ml de la dernière eau de rinçage a été ajouté à 10 ml de milieu de culture LB liquide et incubé pendant 48 h pour vérifier la désinfection externe complète.

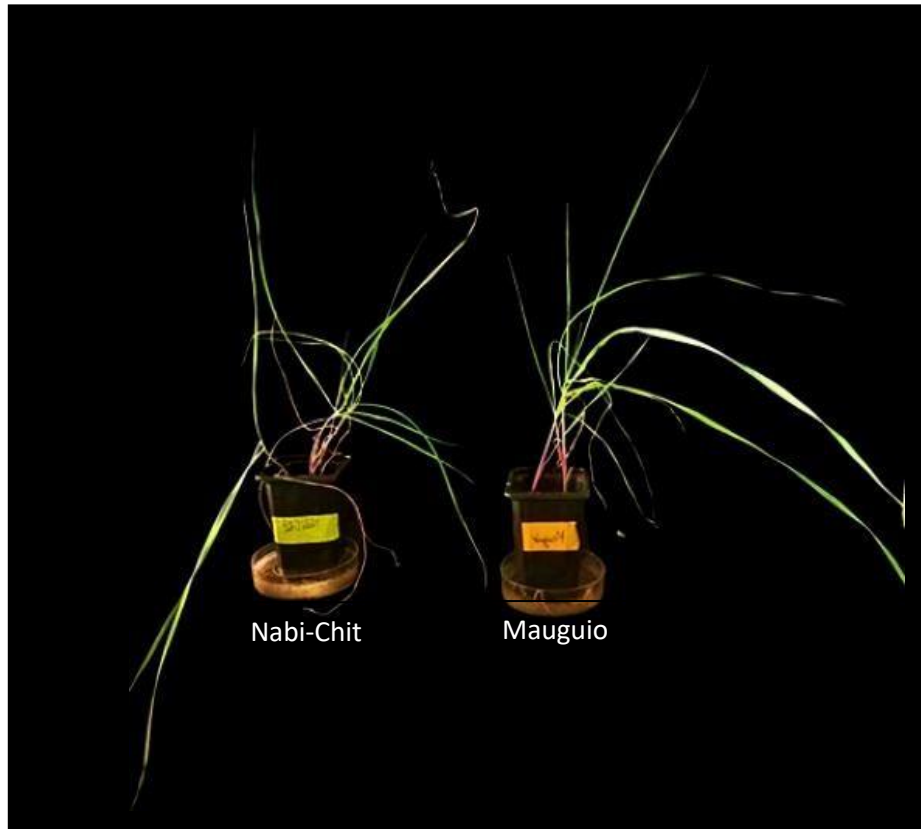


Figure 2.5. Cultures de plants de *Ttd-NC-2019* sur le sol d'origine de Nabi-Chit ou sur le sol de Mauguio en pot pour l'isolement de bactéries diazotrophes. Niveau de développement atteint par les plants à l'issue des 5 semaines de culture.

Deux types de substrat ont été utilisés, dénommés "Nabi-Chit" et "Mauguio". Le premier a été préparé à partir du sol rhizosphérique provenant de Nabi-Chit (Cf. Figure 2.1, Figure 2.2) en mélange avec du sable autoclavé (sable filtration piscine 0.4/1.4mm), dans une proportion sol:sable 2:1 v:v. Le second substrat correspond directement à du sol prélevé sur la station expérimentale de l'INRAE de Mauguio (Cf. Figure 2.1). Les plants (issues de semences récoltées à Nabi-Chit) ont été cultivées pendant 5 semaines en chambre de culture avec une photopériode de 16 h de jour, une température jour/nuit de 22/20 C, une intensité lumineuse de 150 μ E, et une humidité relative de l'air de 70%. Le substrat, avec les racines, a été alors prélevé et transféré dans des récipients en verre et conservé à température ambiante avant d'être utilisé pour l'extraction et l'isolement de bactéries diazotrophes.

Ensuite, six graines désinfectées ont été broyées dans des conditions stériles à l'aide d'un mortier et des dilutions en séries ont été faites (10^6), puis 200 μ l de chaque dilution ont été étalés dans une boîte de Petri contenant 30 ml de milieu LB et incubées à 24 °C. Cinq réplicats ont été préparés. Après 5 jours d'incubation à 28 °C, quelques colonies représentatives apparaissent sur la majorité des boîtes. Après des sous-cultures répétées dans un milieu LB, plusieurs isolats ont été obtenus et stockés à -80 °C.

2.9 Isolement et purification de bactéries diazotrophes à effet PGPR sur le blé.

2.9.1. Culture de plants de *Ttd-NC-2019* (dicoccoides) dans les échantillons de sol

La première étape du protocole mis en œuvre pour isoler des bactéries présentes dans les échantillons de sol prélevés à Nabi-Chit et Mauguio a consisté à cultiver des plants de *Ttd-NC-2019* (dicoccoides issus de semences récoltées à Nabi-Chit) dans des pots en chambre de culture pendant 5 semaines comme décrit dans la Figure 2.5. Deux types de substrat ont été utilisés, dénommés "Nabi-Chit" et "Mauguio". Le premier a été préparé à partir du sol présent autour des blés amidonniers sauvages prélevés à Nabi-Chit (Cf. figure 2.1 et 2.2) en mélange avec du sable autoclavé (sable filtration piscine 0.4/1.4 mm), dans une proportion sol: sable 2:1 v:v. Le second substrat correspond directement à du sol prélevé sur la station expérimentale de l'INRAE de Mauguio (Cf. Figure 2.1). Les plantes ont été cultivées en chambre de culture avec une photopériode de 16 h de jour, une température jour/nuit de 22/20 C, une intensité lumineuse de 150 μ E, et une humidité relative de l'air de 70%. Le substrat, avec les racines, a été alors prélevé et transféré dans des récipients en verre et conservé à température ambiante avant d'être utilisé pour l'extraction et l'isolement de bactéries diazotrophes.

2.9.2. Isolement et purification des bactéries

L'isolement des bactéries diazotrophes a été réalisé dans un milieu sélectif NFb semi-solide (Nitrogen-Free Bromothymol blue medium), la composition de ce milieu est

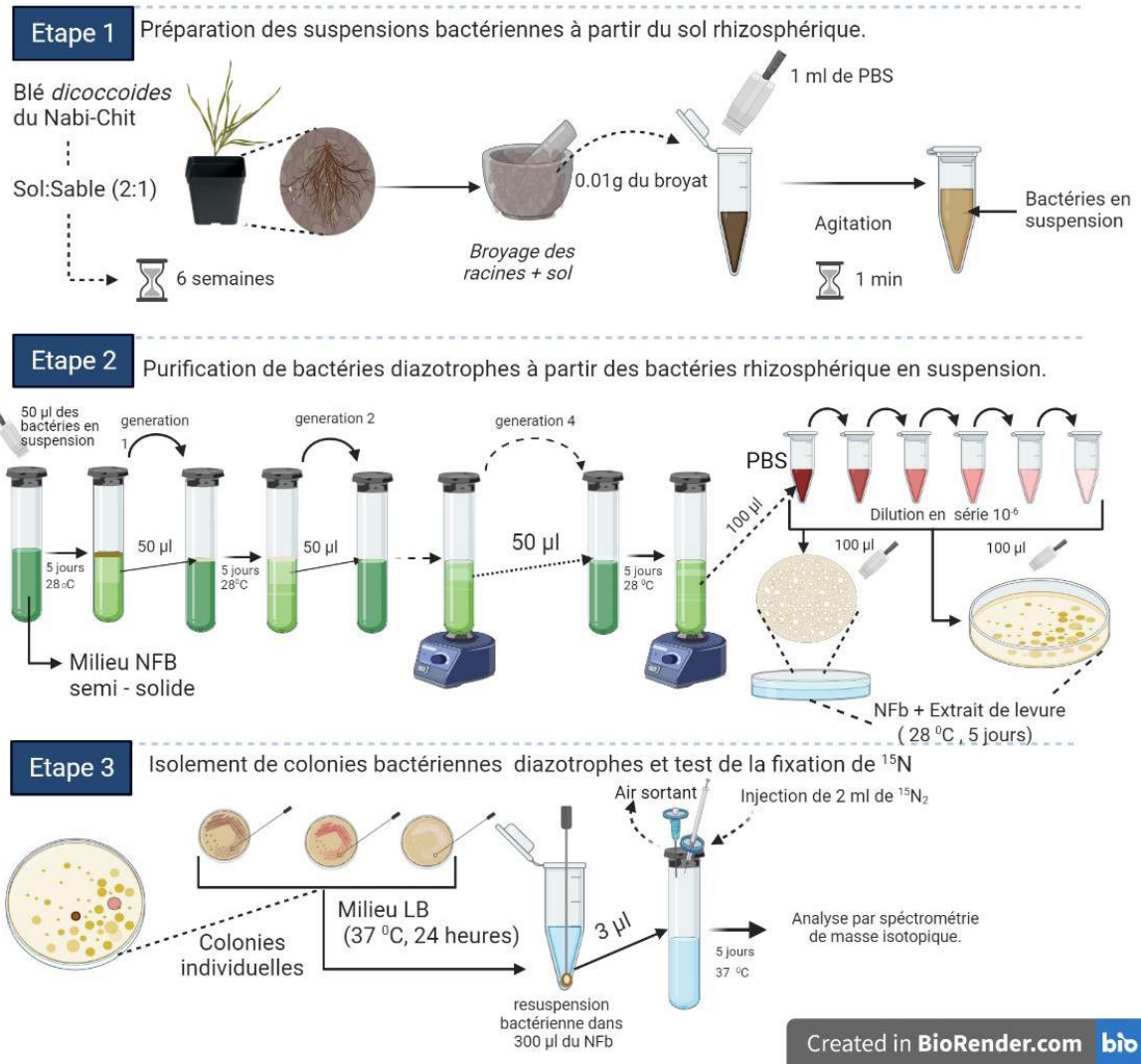


Figure 2.6. Représentation schématique des étapes du protocole d'isolement et de purification de bactéries diazotrophes à partir d'un substrat sur lequel des plants de *Ttd-NC-2019* se sont développés.

Culture des plants de *T. t. dicoccoïdes Ttd-NC-2019* dans du sol de Nabi Chit (en mélange avec du sable) ou du sol de Maugiuo : voir Figure 2.5. Le protocole d'isolement des bactéries diazotrophes comprend 3 étapes.

détaillée dans la partie § 2.17. Le protocole utilisé est présenté de façon détaillée dans les Figures 2.5 et 2.6. Après quatre repiquages successifs de la population bactérienne issue du sol rhizosphérique (plants cultivés en pots : Cf. Figure 2.5) dans le milieu NFb, les colonies bactériennes individuelles ont été isolées sur un milieu NFb solide complété d'un extrait de levure (30g.L^{-1}) puis multipliées dans un milieu LB et stockées à -80°C dans des cryotubes contenant du glycérol (50 %). Les étapes de l'isolement et de la purification sont présentes dans la figure 2.6. et sont décrites en détail ci-dessous :

Etape 1 : Extraction et mise en suspension des populations bactériennes. Un échantillon de sol (0,01 g) est mélangé à 1 ml de solution PBS ("Phosphate Buffer Saline » ; composition : Cf. § 2.17) dans un tube de type Eppendorf de 2 ml. Le tube est agité fortement pendant 1 min de façon à obtenir une population bactérienne en suspension.

Etape 2 : Purification de populations de bactéries diazotrophes à partir des suspensions bactériennes. Une partie aliquote de 100 μl de la suspension (de bactéries et particules de sol) obtenue à l'issue de l'étape précédente est déposée sur un milieu NFb « Nitrogen-Free Bromothymol blue medium » semi-solide contenu dans un tube en verre de type vacuette® muni d'un capuchon possédant un septum en caoutchouc (5 ml NFb par VACUETTE®).

Le tube est incubé à 28°C pendant 5 jours. La capacité de réduction de l'azote atmosphérique par le complexe enzymatique de la nitrogénase permet aux bactéries de se développer dans ce milieu sans azote assimilable. Une migration de bactéries en profondeur dans le milieu leur permet d'atteindre une région où la pression partielle d'oxygène ("toxique" pour l'activité de la nitrogénase) est réduite, ce qui favorise le développement bactérien.

La formation d'un "disque" relativement diffus, résultant de la concentration de bactéries, peut être observé à une certaine profondeur dans le milieu NFb. A l'issue des 5 jours de développement à 28°C , une partie aliquote (50 μl) du disque bactérien est récupérée par pipetage à travers le milieu et transférée dans un nouveau tube de milieu NFb, placé à 28°C pendant 5 jours, ce qui conduit à l'apparition d'un nouveau disque bactérien, plus fin et plus net que le précédent.

Une partie aliquote (50 µl) de ce disque est à nouveau prélevée par pipetage à travers le milieu NFb semi-solide, et transférée dans un nouveau tube. Ces cycles d'enrichissement/purification d'une population bactérienne sont reproduits 4 fois au total. A l'issue du 4^{ème} cycle de culture, le tube est fortement agité (à l'aide d'un vortex), de façon à former une suspension bactérienne homogène dont une aliquote (50 µl) est prélevée et transférée dans un nouveau tube. Après 5 jours de développement, la population bactérienne est remise en suspension par agitation du tube et 100 µl de la suspension sont prélevés et mélangés à 900 µl d'une solution PBS dans un tube Eppendorf. 100 µl de cette suspension sont étalés dans une boîte de Petri à la surface d'un milieu NFb complétementé avec de l'extrait de levure (30 g.L⁻¹) sur lequel est coulé une seconde couche de milieu (NFb + extrait de levure) de façon à réaliser une culture bactérienne "profonde". Une seconde aliquote de 100 µl de la suspension bactérienne est diluée (10 fois) dans du tampon PBS, et cette nouvelle suspension est elle-même diluée d'un facteur 10. Cinq dilutions successives sont ainsi effectuées à partir de la suspension initiale. Pour chacune de ces suspensions, 100 µl sont prélevés et étalés à la surface d'un milieu NFb + extrait de levure. Les différentes boîtes de Petri (en culture "profonde" ou culture classique) sont incubées pendant 5 jours à 28 °C.

Etape 3 : Isolement de colonies bactériennes et capacité de fixation de l'azote atmosphérique des bactéries sélectionnées. Une des boîtes de Petri correspondant à la série des 5 dilutions successives, présentant des colonies bactériennes isolées en nombre relativement important, est sélectionnée. Des colonies d'apparence différente (couleur, forme, taille, aspect des marges) sont prélevées à partir de cette boîte, ainsi qu'à partir de la boîte de culture en condition "profonde", et étalées par stries croisées sur milieu LB de façon à obtenir des colonies isolées après 24 h d'incubation à 37 °C.

La capacité des colonies bactériennes sélectionnées à fixer l'azote atmosphérique sera ensuite contrôlée par l'incorporation de ¹⁵N₂. Une demi-anse de bactéries, issues d'une préculture d'une colonie individuelle, est re-suspendue dans un eppendorf contenant 300 µl du milieu NFb liquide (Cf. § 2.17). Ensuite, 3µl de cette suspension sont transférés dans un tube sur le même milieu NFb. Ensuite, 2 ml de l'isotope ¹⁵N₂ filtré sont injectés au travers d'un filtre stérile de 0,22 µm au-dessus d'une aiguille stérile immergée dans le tube VACUETTE® contenant 3 ml de milieu NFb dépourvu d'azote. Cette étape entraîne une légère surpression dans le tube et est accompagnée d'un ré-équilibrage immédiat de la pression par une seconde aiguille surmontée d'un filtre enfoncée dans le

Tableau 2.3. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification de BOX-A1R, du gène de l'ARNr 16S, *nifH*, *ipdC*, *accD*, et *chiA* dans cette étude.

Gènes	Noms et séquences d'amorces	Références
BOX-PCR	BOX-A1R: 5'-CTACGGCAAGGCGA CGCTGACG-3'	Louws et al. (1994)
ARNr 16S	27 F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3' 1525 R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	Reinhardt et al. (2008)
<i>nifH</i>	PoI F: 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3' PoI R: 5'-ATSGCCATCATYTCCRCCGGA-3' AQER: 5'-GACGATGTAGATYTCCTG-3'	Poly et al. (2001)
<i>ipdC</i>	Ipdc F: 5'-CTGGGGATCCGACAAGTAATC AGGC-3' Ipdc R: 5'-GAAGGATCCCTGTTATGCGA ACC-3'	Sinha et al. (2019)
<i>accD</i>	acdS F3: 5'-ATCGGCGGCATCCAGWSNA AYCANAC -3' acdS R3: 5'GTGCATCGACTTGCCCTCRT ANACNGGRT-3'	Li et al. (2015)
<i>chiA</i>	chiA F: 5'- ATGGATCCATGCGCAA TTTAATA-3' chiAR: 5'- GCGGCCGCTTATTGAAC GCCGGCGC-3'	Ben Farhat et al. (2014)

septum du tube. Après 5 jours de culture à une température de 37°C, la culture bactérienne est centrifugée pendant 10 minutes à 4000 g à température ambiante. Enfin, le culot bactérien est retenu pour l'analyse permettant une estimation de la capacité de fixation d'azote par les bactéries sélectionnées.

2.10. Analyse phylogénétique et moléculaires des souches bactériennes isolées

2.10.1. Extraction d'ADN génomique

Dans un milieu nutritif LB, chaque bactérie isolée a été cultivée pendant 24 heures à 37°C. L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (Neo-Biotech Quick Bacteria Genomic DNA Extraction Kit), puis la concentration d'ADN est déterminée au spectrophotomètre Nanodrop (Nano Photomètre® N60/N50-IMPLEN).

2.10.2. Amplification PCR de la BOX-A1R

L'amplification PCR palindromique extra génique répétitive basée sur BOX-A1R est faite pour sélectionner les souches bactériennes isolées suivant leur profil de séquences. Les séquences BOX-A1R sont répétées et inversées, leur amplification a été effectuée en utilisant une seule amorce BOX-A1R (Tableau 2.3).

L'amplification PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL en additionnant 2 µL d'ADN bactérien, 0,3 µL de d'ADN polymérase Taq (5 U µL⁻¹), 5 µL de tampon Taq(5x), 2 µL de deoxynucleotides triphosphates (dNTPs) (2,5 mM), 2 µL de MgCl₂ (25mM) et 1,25 µL de l'amorce *BOX-A1R* (20 µM) pour un volume final de 25 µL complété par de l'eau distillée. Après l'étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, la phase d'amplification comprend 35 cycles, chaque cycle comprend les étapes suivantes à savoir 94°C durant 1 min, 48°C durant 1min et 72°C durant 1 min, suivies d'une phase d'extension à 72°C pendant 5 min. Les produits PCR des séquences de la *BOX-1AR* amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose (1,2%) pendant 45 minutes et les acides nucléiques colorés au Clear Sight DNA et visualisés avec GelDoc™ EZ imager (Bio-Rad).

2.10.3. Amplification PCR de ADNr 16S

Les segments d'ADNr 16S (1,5 kb) sont amplifiés en utilisant les deux amorces universelles 27F et 1525R (Tableau 2.3). L'amplification PCR est réalisée dans un volume final de 25 µl, en additionnant 1 µL d'ADN bactérien 0.12 µL d'ADN polymerase Taq (5 U µL⁻¹), 2,5 µL de tampon Taq (5x), 0,5 µL de désoxynucléotide triphosphates (dNTPs) (10 mM), 2 µL de MgCl₂ (25 mM) et 1 µL de chaque amorce (10 µM), qsp 25 µL par de l'eau distillée. Après l'étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 3 min, la phase d'amplification comprend 30 cycles, chaque cycle comprend les étapes suivantes à savoir 96°C durant 30 s, 62°C durant 30 s et 72°C durant 2 min, suivies d'une phase d'extension à 72°C pendant 10 min. Les produits PCR du gène *ADNr 16S* amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose (1,2%) pendant 30 minutes et les acides nucléiques colorés au Clear Sight DNA et visualisés avec Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad).

2.10.4. Séquençage et analyse des séquences

Les produits PCR de l'ADNr 16S ont été purifiés et élués du gel grâce à Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA). Les produits PCR purifiés ont été séquencés par Eurofins en France.

Les séquences d'ADNr 16S ont été analysées et comparées grâce à EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) et à BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'alignement des séquences et la construction des arbres phylogénétiques via « Neighbor-Joining method » ont été effectués en utilisant les logiciels bio-informatiques MEGA version 11.

Le reséquençage du génome entier bactérien a été réalisé au Beijing Genomics Institute (BGI) à Hong Kong en utilisant la technologie de séquençage dnbseq (Chen *et al.*, 2018). L'assemblage des contigs, l'annotation des gènes et des protéines ont été réalisés via <https://galaxy.migale.inrae.fr/> et les cartes génomiques ont été construites à l'aide du BLAST Ring Image Generator (logiciel BRIG) (Alikhan *et al.*, 2011) en comparant avec le génome de la bactérie de référence déposé sur NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

2.10.5. Amplification PCR des gènes contributeurs à un effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Différents gènes potentiellement présents chez les rhizobactéries bénéfiques ont été amplifiés. Ces gènes choisis sont impliqués d'une façon directe ou indirecte dans l'effet PGPR sous conditions biotiques ou abiotiques particulières.

Pour le gène *nifH* (360 bp) qui code pour une sous-unité de la nitrogénase impliquée dans la fixation de l'azote atmosphérique, deux étapes d'amplification ont été réalisées. La première étape de l'amplification du gène *nifH* se déroule en utilisant les amorces PolF et PolR (Tableau 2.3). Dans cette étape, un volume final de 25 µl a été préparé à partir de 2 µl d'ADN bactérien ajoutés à 0,3 µL d'ADN polymérase Taq (5 U µL⁻¹), 5 ml de tampon Taq (5x), 2 ml de dNTPs (2,5 mM), 0.5 µL de BSA « Bovine Serum Albumin » (10 mg.ml⁻¹) et 0,625 µL de chaque amorce PolF et PolR (20 µM) et une quantité suffisante pour atteindre le volume final de 25 µL avec de l'eau distillée stérile. La seconde étape d'amplification se déroule en utilisant les amorces PolF et AQER. Le volume réactionnel est toujours de 25 µL contenant 0,5 µL de produit PCR de la première étape, 0,2 µL of d'ADN polymérase Taq (5 U µL⁻¹), 5 µL de tampon Taq(5x), 2 µL de dNTPs (2,5 mM), 0.5 µL de BSA (10 mg.ml⁻¹) et 0,625 µL de chaque amorce PolF et AQER (Tableau 2.3) (20 µM) et une quantité suffisante pour atteindre le volume final 25 µL avec de l'eau distillée stérile. Dans les deux étapes, le protocole de la réaction est le suivant : dénaturation initiale à 94°C durant 5 min, puis 30 cycles comprenant les étapes suivantes : 94°C durant 1 min, 55°C durant 1 min, 72°C durant 1 min, et une extension finale à 72°C pendant 10 min.

Les autres gènes choisis qui sont impliqués dans l'effet PGPR sont : *lpdC* (1,6 Kb) qui est impliqué dans la synthèse de l'auxine AIA « acide indole acétique », *accD* (750bp) qui régule l'ACC désaminase impliqué dans la tolérance contre les stress abiotiques tels que la sécheresse et *chiA* (2,4 kb) qui code pour une chitinase possédant une forte activité antifongique.

L'amplification PCR de ces gènes est réalisée dans un volume final de 25 µl, en additionnant 1 µL d'ADN bactérien 0,12 µL de d'ADN polymérase Taq (5 U.µL⁻¹), 2,5 µL de tampon Taq (5x), 0,5 µL de désoxynucléotide triphosphates (dNTPs) (10 mM), 2 µL de MgCl₂ (25 mM) et 1 µL de chaque amorce (10 µM) spécifique pour chaque gène (Tableau 2.3), et une quantité suffisante pour atteindre le volume final de 25 µL par de l'eau distillée. Après l'étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 3 min, la phase d'amplification comprend 35 cycles, chaque cycle comprend les étapes

suivantes à savoir 96 °C durant 30 s, et respectivement (62°C, 53°C, 63°C, 63°C) durant 30 s et 72°C durant (2 min, 1 min, 40 s, 2,5 min) pour *ipdC*, *accD* et *chiA* suivies d'une phase d'extension à 72°C pendant 10 min.

Les produits PCR du gène amplifié ont été séparés sur gel d'agarose (1,2%) pour les gènes *nifH*, *ipdC*, *accD*, et (1%) pour le gène *chiA*, pendant 30 minutes et les acides nucléiques colorés au Clear Sight DNA et visualisés avec Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad).

2.11. Analyses biochimiques des souches bactériennes isolées

2.11.1. Test de capacité de fixation de l'azote atmosphérique

La capacité des colonies bactériennes sélectionnées à fixer l'azote atmosphérique est évaluée par l'incorporation de $^{15}\text{N}_2$. Les étapes de ce test sont détaillées dans la Figure 2.6.

Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse isotopique (Analyseur Élémentaire Vario-PYROcube couplé à un spectromètre de masse IsoPrime Precision, Elementar, UK). Les échantillons après pesage ont été placés dans une cupule en étain, séchés dans une étuve à 60°C puis injectés dans un analyseur élémentaire (Vario-PYROcube, Elementar, UK). Après combustion à 920°C en présence d'oxygène et de CuO, les molécules de gaz issues de l'échantillon (principalement H₂O, CO₂, N₂ et NOS) sont transportées par un flux de gaz vecteur (Helium ultrapur) vers un four de réduction où les oxydes d'azote sont réduits en N₂ en présence de cuivre à 600°C (réaction de Dumas). Le H₂O produit est piégé par des colonnes de SICAPENT (Merck). Le N₂ et le CO₂ sont alors séparés. Le CO₂ est piégé à température ambiante dans une colonne TPD (Température Programmable Désorption) puis relargué à 100°C. Un Détecteur de conductivité thermique (TCD) permet la quantification du N et C total. Le N₂ et puis le CO₂ sont ensuite analysés par le spectromètre de masse (IsoPrime Precision, Elementar, UK) pour déterminer le $\delta_{15}^{15}\text{N}_2$.

2.11.2. Test de capacité de production d'acide indole acétique (AIA)

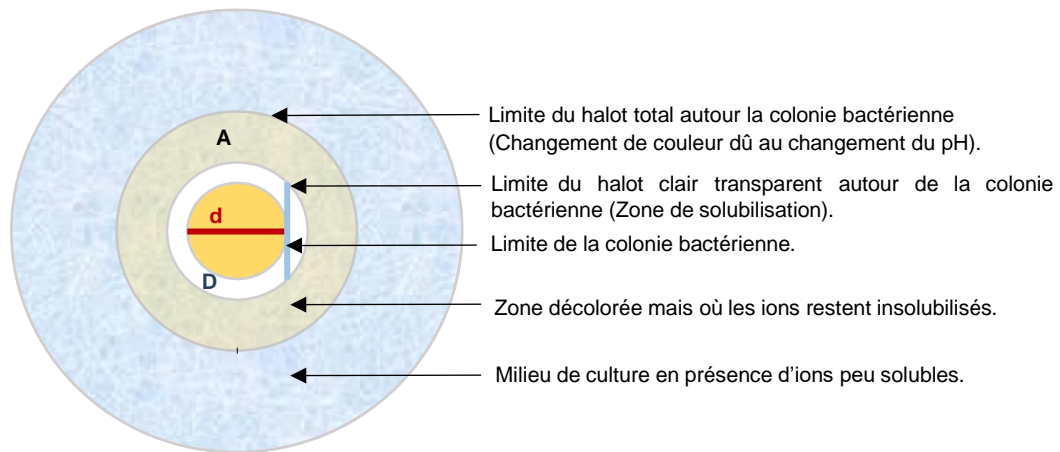


Figure 2.7. Représentation schématique du diamètre de la zone de changement de couleur et de la zone claire autour de la colonie bactérienne qui nous permet de calculer deux index.

L'index d'acidification (Ia) : $Ia = A/d$

L'index de solubilisation (Is) : $Is = D/d$

Certaines bactéries synthétisent de l'auxine à partir du tryptophane. La production d'acide indole-3-acétique (AIA), est détectée selon la méthode décrite par Gordon et Weber, 1951 et Haque *et al.*, 2020 avec quelques modifications. En résumé, une seule colonie de chaque bactérie a été inoculée dans 5 mL de milieu LB (additionné de 0,2% de L-tryptophane (Sigma-Aldrich) et incubé à 28°C sous une agitation (200 rpm). Après 48 heures d'incubation, 1 ml de culture est collecté et centrifugé à 3220 g pendant 10 min. Ensuite, 500 µL de surnageant ont été transférés dans un microtube de 2ml avec 1 ml de réactif de Salkowski composé de 98 ml d'acide perchlorique à 35 % et de 2 ml de FeCl₃ (0,5 M). Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 45 min à l'obscurité. Qualitativement, le développement de la couleur rose est un indicateur de la production d'auxine. La production d'AIA a été quantifiée par spectrophotométrie à 540 nm et a été comparée ensuite avec une courbe standard préparée à partir d'AIA commercial (Sigma-Aldrich) dans une plage de concentration de 0 à 1000 µg.mL⁻¹.

2.11.3. Test de production de cyanure d'hydrogène (HCN)

Le test de production de cyanure d'hydrogène est choisi au vu de son implication dans la suppression d'agents pathogènes et dans l'augmentation de l'exsudation chez la plante.

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par (Haque *et al.*, 2020). Chaque colonie bactérienne a été striée dans une boîte de Petri contenant 30 ml du LB gélosé supplémenté par 0,45% de glycine, un papier filtre stérile a été trempé à l'aide d'une pince stérilisée dans une solution alcaline de picrate de sodium (acide picrique à 0,25 % dans du carbonate de sodium à 1,25 %) (Lorck, 1948) puis appliqué sur la face interne des couvercles des boîtes de Petri. Les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées à 28°C sous conditions statiques pendant 24 h. Un changement de couleur sur les papiers filtres du jaune à un brun rougeâtre est un indicateur de la production d'HCN.

2.11.4. Test de capacité bactérienne à utiliser des sources insolubles de phosphate (P) et de potassium (K).

La capacité de solubilisation du phosphate de calcium, du phytate et du feldspath par les souches bactériennes isolées a été testée. Le P peu mobilisable est fourni aux

Tableau 2.4. Souches bactériennes sélectionnées et utilisées dans cette étude.

Souches bactériennes	Sources
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ORS285	Dr. Nico Nouwen, IRD Montpellier
<i>Azospirillum lipoferum</i> sp4B	Pr. Guilhem Desbrosses, Université de Montpellier
5-alpha F'lq <i>E. coli</i>	New England Biolabs
BPMP-PU-28 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Cette étude
BPMP-EL-40 (<i>Enterobacter</i> sp.)	Cette étude
BPMP-PA-65 (<i>Pantoea</i> sp.)	Cette étude

bactéries sous forme de phosphate tri-calcique ou de phytate. Le K peu mobilisable est fourni sous forme de feldspath potassique. La croissance des bactéries est estimée à partir de l'acidification du milieu que la croissance provoque, visualisée par le changement de couleur d'un indicateur coloré additionné au milieu de culture. La solubilisation des ions/molécules utilisés est visualisée par un anneau transparent autour de la colonie. Le milieu utilisé pour les expériences concernant la capacité de solubilisation de P est un milieu dérivé de celui décrit par Pande *et al.*, 2017. Le milieu utilisé pour les expériences concernant la capacité de solubilisation de K est le milieu d'Alexandrov modifié par Rajawat *et al.*, 2016. La source de P présente dans ce milieu (phosphate tri-calcique) est également peu mobilisable. Les bactéries cultivées sont mises en culture à 28°C pendant 3 jours. Le diamètre de la colonie bactérienne et celui de la zone "décolorée" autour de la colonie sont mesurés en utilisant le programme ImageJ, et les indices de solubilisation sont calculés selon la procédure décrite dans la Figure 2.7.

2.12. Souches bactériennes

Les bactéries isolées et sélectionnées après la comparaison de *BOX-A1R* (Cf. § 2.10.2) ont été utilisées pour la caractérisation moléculaire et les tests de solubilisation de phosphate tri-calcique, de phytate et de feldspath.

Pour les autres tests et les autres expériences, nous nous sommes focalisés sur trois souches bactériennes présentant des caractéristiques singulières à la suite des différents tests. Ces trois souches c'est à dire les souches utilisées comme contrôle négatif et positif ou de référence sont présentées avec leur origine dans le Tableau 2.4.

2.13. Transformation bactérienne

Afin de déterminer la localisation de la bactérie endophyte *BPMP-PA-65* isolée (Cf. § 2.8) au niveau des tissus racinaires et foliaires ainsi qu'au niveau de la graine, une transformation de cette souche avec le GFP a été réalisée en utilisant le plasmide pMG103-nptII-GFP (Inui *et al.*, 2000), (Bonaldi *et al.*, 2011). D'autre part, un autre plasmide intégratif contenant la GFP attTn7: P(A1/04/03): GFPmut (Armbruster *et al.*,

2019) a été aussi utilisé (transféré dans *BPMP-PA-65*) afin d'intégrer des gènes d'intérêt dans les futures expériences.

2.13.1. Extraction d'ADN plasmidique

Dans un milieu modifié YM (la composition est dans la partie § 2.17) supplémenté avec la kanamycine ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$), la souche *Bradyrhizobium ORS285* a été cultivée pendant 24 heures à température 37°C , l'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (Wizard® SV 96 and SV 9600 Plasmid DNA Purification Systems), puis la concentration d'ADN a été déterminée au spectrophotomètre Nanodrop (Nano Photomètre® N60/N50 – IMPLEN).

2.13.2. Préparation des cellules compétentes

Dans un erlenmeyer de 5 litres, une colonie bactérienne de la souche endophyte *BPMP-PA-65 (Pantoea sp.)* a été cultivée dans un litre du milieu LB à température 37°C pendant 30 heures afin d'obtenir une densité optique DO_{600} entre 0.5 et 1. La culture bactérienne a été centrifugée à froid (4°C) sous une vitesse 3220 rcf pendant 5 minutes, suivi d'un lavage avec 10% de glycérol.

Après le dernier lavage, et dans la glace, le culot bactérien est re-suspendu dans un volume total de $500 \mu\text{l}$ contenant 10% de glycérol. La concentration des cellules bactériennes doit être comprise entre 2 et 4×10^{10} cellules. mL^{-1} . Enfin, les bactéries resuspendues ont été aliquotées dans des microtubes de 0.5 ml puis stockées à -80°C .

2.13.3. Transformation par électroporation

La transformation bactérienne a été faite selon la méthode décrite par (Dower *et al.*, 1988). En résumé, $1 \mu\text{l}$ d'ADN plasmidique pMG103-nptII-GFP ou attTn7:P(A1/04/03):GFPmut (*Cf.* § 2.13.1) a été ajouté dans $40 \mu\text{l}$ de suspension de cellules bactériennes compétentes (*Cf.* § 2.13.2). Ce mélange a été versé dans une cuvette pré-réfrigérée. Ensuite, la cuve a été insérée dans la chambre d'électroporation du module de commande d'impulsion, et l'électroporation à $2,5 \text{ kV}$, $25 \mu\text{F}$ avec une constante de temps d'environ 5 ms. Après l'électroporation, et rapidement, 1ml de milieu LB (sans antibiotique) a été mis dans la cuvette pour faciliter la récupération des cellules bactériennes qui ont été ensuite transférées dans un tube de 12 ml et ont été incubées pendant une heure à température 37°C . Enfin, les bactéries transformées ont été



Triticum turgidum subsp. dicoccoides
(Ttd. N-C 2019)



Triticum turgidum subsp. durum
(Anvergur)

Figure 2.8. Les deux variétés du blé dur utilisées pour l'étude de l'effet PGPR.

Les bactéries diazotrophes ou endophytes ont été isolées de la rhizosphère ou d'exsudats racinaires de l'amidonner sauvage identifiée au Liban « *Ttd-NC-2019* ». L'effet PGPR de certaines souches sélectionnées a été testé sur une variété élite française « Anvergur ». Les deux variétés du blé sont morphologiquement et physiologiquement très distinguables.

sélectionnées dans le milieu LB gélosé supplémenté avec 50 mg.L⁻¹ de kanamycine pour la transformation avec pMG103-nptII-GFP et avec 10 mg.L⁻¹ de gentamycine pour la transformation avec le plasmide intégratif contenant la GFP attTn7:P(A1/04/03):GFPmut.

2.14. Culture en serre sur sol artificiel pour étudier l'effet PGPR des bactéries sélectionnées

A l'issue d'une première étape de sélection des bactéries diazotrophes isolées sur différents traits PGPR testés au niveau moléculaire et biochimique, trois bactéries sélectionnées à partir du lot des bactéries isolées de la rhizosphère ou des exsudats, la souche (*BPMP-PA-65*) du blé sauvage *Ttd-NC-2019* (Cf. § 2.8, 2.9), *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas* sp.), *BPMP-EL-40* (*Enterobacter* sp.) et *BPMP-PA-65* (*Pantoea* sp.) ont été choisies. Un premier essai de l'effet PGPR en serre sous conditions limitées en azote (100 µM de KNO₃) n'ayant pas permis la croissance des plantes à un stade avancé, l'étude de leur capacité de transfert d'azote sous limitation azoté a été poursuivie mais sous moindre contrainte (250µM de KNO₃). La variété de blé utilisée dans cette expérience est « Anvergur » (une variété de blé dur élite française) (Figure 2.8.).

2.14.1. Préparation de l'inoculum bactérien et conditions de culture des plantes

Pour préparer l'inoculum bactérien, une colonie bactérienne de chaque souche *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas* sp.), *BPMP-EL-40* (*Enterobacter* sp.) et *BPMP-PA-65* (*Pantoea* sp.) a été inoculée dans 15 ml de milieu LB et incubée pendant une nuit jusqu'à l'obtention d'une densité optique entre 0,5 et 1. Trois cycles de centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à une vitesse 3220 rcf suivie d'un lavage à l'eau distillée stérile ont été réalisés pour éliminer toutes traces de milieu LB. Ensuite la densité optique de chaque culture bactérienne a été ajustée à 0,1.

Pour les conditions de co-inoculation avec deux bactéries (*BPMP-PU-28+BPMP-EL-40*, *BPMP-PU-28+BPMP-PA-65*, *BPMP-EL-40+BPMP-PA-65*) ou trois bactéries (*BPMP-PU-28+BPMP-EL-40+BPMP-PA-65*), un volume de chaque inoculum (OD= 0,1) dans une proportion respectivement de 1:1 (v:v) ou 1:1:1 (v:v:v) a été préparé.

Les graines de blé dur élite « Anvergur » ont été désinfectées suivant le protocole décrit dans la partie § 2.7.1. Les graines ont été placées dans une boîte de Petri sur du papier filtre stérile et humidifié avec de l'eau distillée et mises à l'obscurité à 26°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à ce qu'elles montrent un hypocotyle visible et des racines de 3 à 4 cm de long. Les graines germées ont été inoculées pendant une heure avec chaque souche bactérienne ($OD_{600} = 0,1$) ou co-inoculées avec deux ou trois souches. 24 plantes par condition ont été cultivées dans des pots de 3L (4 graines par pot) contenant un mélange autoclavé tourbe/sable/vermiculite de proportion v/v/v (1/1/1). Les plantes considérées comme contrôle positif non inoculées ont été arrosées avec une solution Hoagland complète (11 mM d'azote) (Cf. § 2.17). Pour les plantes inoculées et le contrôle négatif non inoculé, les plantes ont reçu une solution Hoagland modifiée à faible teneur en azote, 250 μ M de KNO_3 utilisé uniquement comme source d'azote, 4,75 mM de KCl est utilisé pour compenser l'apport de potassium issu du KNO_3 . Le $Ca(NO_3)_2$ est remplacé par $CaCl_2$. Les deux solutions ont été ajustées à pH = 6 en utilisant du KOH 0,5 M.

2.14.2. Acquisition et analyse d'images

Après 5 semaines de culture, les plants de blé d'anvergur ont été phénotypés sur la plateforme PhenoArch (Cabrera-Bosquet *et al.*, 2016) hébergée au M3P, Plateformes de Phénotypage Végétal de Montpellier (<https://www6.montpellier.inrae.fr/lepse/Plateformes-de-phenotypage/Montpellier-Plant-Phénotypage-Plateformes-M3P>) en collaboration avec Llorenç Cabrera-Bosquet et Maelle Lis. Des images RVB ont été prises pour chaque plante à partir de 13 vues (12 vues latérales vues à partir d'une différence de rotation de 30 ° et une vue de dessus). Brièvement, les pixels végétaux ont été segmentés de ceux en arrière-plan en utilisant une combinaison de seuillage et de champs aléatoires tels que décrits dans (Brichet *et al.*, 2017) et disponibles sur (<https://github.com/openalea/phenomenal>). La surface foliaire entière de la plante, le poids frais et la hauteur de la plante ont ensuite été estimées à l'aide de courbes d'étalonnage construites avec des modèles de régressions linéaires multiples basés sur des images traitées par rapport aux mesures de « vérité terrain » de la surface foliaire et de la biomasse fraîche.

2.14.3 Analyse des teneurs totales en azote et carbone dans les graines

Les graines ont été récoltées, décortiquées et puis broyées individuellement à l'aide d'un mortier. Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse isotopique en utilisant la même méthode d'analyse décrite dans la partie § 2.11.1.

2.15. Récolte des exsudats bactériens

2.15.1. Milieu de culture bactérien

Deux milieux de culture ont été utilisés sur la base d'une solution nutritive minimale "solution Hoagland" (H) complète modifiée (Cf. § 2.17) additionnée d'acide lactique (AL)2% comme source de carbone sans tampon K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (STP), pH = 7 ou avec tampon K_2HPO_4 / KH_2PO_3 (TP) de concentration 150 mM (TP) pH = 6,8.

L'acide lactique ($90,08 \text{ g.mol}^{-1}$) est choisi comme source de carbone puisque sa masse molaire ne dépasse pas 100 g.mol^{-1} et ne perturbe pas les analyses métabolomique des exsudats dans la fenêtre des m/z analysables c.à.d. 100-1500 Da.

2.15.2. Croissance bactérienne

Une seule colonie de chaque bactérie *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas sp.*), *BPMP-EL-40* (*Enterobacter sp.*) et *BPMP-PA-65* (*Pantoea sp.*) a été inoculée individuellement sur du milieu LB gélosé pendant 24 heures à 37 °C. Une demi-anse des colonies bactériennes de chaque boîte a été mise en suspension dans un microtube contenant 300 µl de chacun des deux milieux H/AL/STP et H/AL/TP pour *BPMP-PU-28* et *BPMP-EL-40* respectivement. Ensuite, 30 µl de chaque suspension bactérienne obtenue à partir de chaque milieu de culture ont été injectés dans un tube de pré-culture contenant 3 ml de son milieu correspondant. Les tubes de pré-culture ont été incubés à 37 °C sous agitation à 200 rpm. Après 24 heures d'incubation, 300 µl de chaque pré-culture bactérienne de concentration proche de 3×10^9 unités (UFC/mL) ont été réensemencés dans un erlenmeyer de 200 ml contenant 50 ml du même milieu de culture correspondant et incubés pendant 3 jours dans les mêmes conditions. La densité optique et la concentration bactérienne sont mesurées toutes les deux heures pour tracer la courbe de croissance. De même, le pH et la concentration d'acide lactique restant dans le milieu sont mesurés respectivement à l'aide d'un pH-mètre et par une analyse

chromatographique (Thermo Scientific Dionex™ ICS-5000+ Ion Chromatography).

2.15.3. Récolte des exsudats

Trois réplicats biologiques dédoublés (soit six réplicats au final) de la culture bactérienne dans les deux milieux de cultures ont été analysés. Suivant la courbe de croissance déterminée pour chaque bactérie, les exsudats bactériens ont été récoltés à partir de deux phases de croissance bactérienne, la phase exponentielle (phase planctonique) et la stationnaire (phase de formation du biofilm). Le recueil des exsudats a été réalisé après 24h (phase exponentielle) et 48h (phase stationnaire) pour *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas sp.*), après 16h (phase exponentielle) et 40h (phase stationnaire) pour *BPMP-EL-40* (*Enterobacter sp.*) et après 48h. Après deux centrifugations (3320 rcf, 15 minutes à 4°C) les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un filtre de 0,22 µm et les échantillons d'exsudats bactériens filtrés et les culots de chaque bactérie ont été préparés pour les analyses métabolomiques et protéomiques suivant le même protocole décrit dans la partie § 2.7.6.

2.16. Croissance en hydroponie pour le phénotypage de développement du système racinaire et pour récolter les exsudats racinaires en présence des exsudats bactériens

2.16.1. Conditions de culture

Les graines d'Anvergur (variété élite française) ont été désinfectées comme décrit dans la partie §2.7.1. Cinq plantules ont été transférées dans le même système décrit dans cette partie, après excision des graines, dans un tube à essai de 50 ml où 40 ml de solution complète de Hoagland modifiée ont été apportés (Cf. § 2.17) additionnés de 5 % des exsudats de *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas sp.*) ou *BPMP-EL-40* (*Enterobacter sp.*) récoltés à partir du milieu tamponné H/AL/TP (Cf. § 2.15.1) pendant la phase stationnaire avec un pH ajusté à 6,5. Le milieu Hoagland modifié additionné d'une solution de Hoagland à 5 % contenant 0,8 % d'acide lactique (correspondant à la concentration d'acide lactique restant dans le milieu en phase stationnaire) et 150 mM de tampon K_2HPO_4/KH_2PO_3 a été utilisés comme témoin. Les tubes ont été

emballés dans du papier d'aluminium et placés en chambre de culture (voir condition dans la partie 2.7.4) pendant 7 jours et un test de stérilité a été réalisé ensuite sur milieu LB. Les masses fraîches des racines et des feuilles ont été enregistrées et les échantillons d'exsudats racinaires récoltés et préparés pour l'analyse métabolomique et protéomique suivant le protocole décrit dans la partie § 2.7.6.

2.16.2. Phénotypage du système racinaire

Les racines des plantes ont été scannées (Epson Perfection V850 Pro Scanner), la longueur et la surface totale des racines ont été mesurées à l'aide du logiciel WINRHIZO™ (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montréal, QC, Canada) développé comme indiqué par le site Web de la société Regent Instruments Inc. : http://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.html pour l'analyse des systèmes racinaires lavés.

2.17. Tampon et milieu de culture

Hoagland complet modifiée

Le milieu Hoagland est utilisé pour la culture des plantes en hydroponie, et pour la culture en serre. De même il est utilisé comme solution nutritive de base pour la récolte des exsudats bactériens. Ce milieu se compose en (mM) de : 1 NH₄NO₃, 5 KNO₃, 2 Ca (NO₃)₂, 2 MgSO₄, 1 KH₂PO₄, 0,1 NaFe (III) EDTA, 0,0125 H₃BO₃, 0,002 MnCl₂, 0,003 ZnSO₄, 0,0005 CuSO₄, 0,0001 Na₂MoO₄, 0,0001 NiSO₄.6H₂O et 0,025 KCl. (Shavrukov *et al.*, 2012).

LB

Le milieu LB « Luria-Bertani » est un milieu riche non sélectif utilisé dans la multiplication bactérienne. Il est formé en g.L⁻¹ de : 5 Tryptone, 5 bactopeptone, 5 NaCl et 5 extrait de levure (yeast extract). Pour le milieu LB solide, 12 g.L⁻¹ d'agar typeE sont ajoutés.

NFb

Le NFb « Nitrogen-Free Bromothymol blue medium » (Baldani *et al.*, 2014) est classiquement utilisé comme milieu sélectif pour l'isolement des bactéries diazotrophes et pour tester leurs capacités à fixer l'azote.

Ce milieu contient en g.L⁻¹ : 3,7 acide malique, 0,509 citrate de sodium, 0,53 fructose, 0,265 glucose, 0,5 K₂HPO₄, 0,2 MgSO₄.7H₂O, 0,02 CaCl₂.2H₂O, 0,1 NaCl, 2,8 KOH et 0,04 d'extrait de levure (yeast extract) pour le milieu NFb solide et des micronutriments et vitamines comme suit :

- Micronutrient: 2 mL (0,04 CuSO₄.5H₂O, 0,12 ZnSO₄.7H₂O, 1,40 H₃BO₃, 1,0 Na₂MoO₄.2H₂O et 1,175 MnSO₄. H₂O, dessous dans 1 litre d'eau distillé), 3,2 ml de NaFeEDTA (1640 g.L⁻¹).

- Vitamines : 1 mL (10 mg biotine et 20 mg pyridoxine-HCl) dissous dans 100 mL d'eau distillée).

- Les micronutriments, le NaFeEDTA et les vitamines sont filtrés et ajoutés après l'autoclavage du milieu.

Dans le cas d'un milieu gélosé classique, 12 g.L⁻¹ de bacto-agar sont ajoutés, dans le cas d'un milieu semi-solide l'extrait de levure et le bacto-agar sont remplacés par 1,8 g de Bacto-Agar. Le pH final est ajusté à 7,5 avec le KOH (1M).

Milieu YM modifié

Le milieu YM (Yeast Mannitol) est un milieu sélectif convenable pour la croissance des *Bradyrhizobium*, il est composé en (g.L⁻¹) de 2,5 glutamate de sodium, 2 d'extrait de levure, 0,66 K₂HPO₄, 0,05 NaCl, 0,1 MgSO₄.7H₂O, 0,04 CaCl₂, et 0,004 FeCl₃.

Milieu de Pikovskaya modifié

Le milieu utilisé pour les expériences concernant la capacité de solubilisation de P est le milieu « Pikovskaya » dérivé de celui décrit par (Pande *et al.*, 2017). Il contient en (g.L⁻¹), 5 d'extrait de levure (yeast extract), 10 glucose, 0,5 (NH₄)₂SO₄, 0,2 KCl, 0,25 MgSO₄.7H₂O, 0,0001 MnSO₄, 0,0001 FeSO₄, et 5 Ca₃(PO₄)₂ (phosphate tri- calcique), ou 5 C₆H₁₈O₂₄P₆ (phytate : Carbosynth 86 Limited (Compton, UK)), comme source de phosphate. Il est solidifié par de l'agar (12 g.L⁻¹), le pH étant ajusté à 7 avec

HCl 1 M. Avant étalement du milieu en boîte de Petri, du violet de bromocrésol (pour 20mL de PVK, 150 µl d'une solution à 5 g.L⁻¹ de violet de bromocrésol (pKa 6,3) dans 0,2 N KOH) est ajouté en tant qu'indicateur de pH.

Milieu d'Alexandrov modifié

Le milieu utilisé pour les expériences concernant la capacité de solubilisation de K est le milieu d'Alexandrov modifié par (Rajawat *et al.*, 2016). La source de P présente dans ce milieu (phosphate tri-calcique) est également peu mobilisable. Le milieu contient (g.L⁻¹) : 5, glucose, ; 2 Ca₃PO₄, 0,5 MgSO₄, 0,1 CaCO₃, 0,005 FeCl₃, 2 KAlSi₃O₈ (potassium aluminosilicate : Potash Feldspar, Bath Potters' Supplies, Somerset, UK) comme source de potassium non soluble. Le milieu est solidifié par de l'agar (12 g.L⁻¹), le pH final ayant été ajusté à 7,2 avec HCl 1 M. Avant étalement du milieu en boîte de Petri, le milieu est additionné de l'indicateur coloré (pour 20 mL de milieu, 75 µL d'une solution à 5 g.L⁻¹ de bleu de bromothymol (pKa 7,1) dans 0,2 N KOH) est ajouté en tant qu'indicateur de pH (3.25 ml d'une solution à 5 g.L⁻¹ de bleude bromothymol dans KOH 0,2 N sont introduits par litre de milieu).

Tampon PBS

Le PBS "phosphate-buffered saline" est utilisé lors de la préparation des suspensions bactériennes à partir du sol rhizosphérique et de la dilution en série des colonies bactériennes isolées et individualisées (figure 2.4). Il est composé en g.L⁻¹ de 8 NaCl, ; 0,2 KCl, 0,24 KH₂PO₄, 1,44 Na₂HPO₄. Ces composés sont dissous dans un volume total d'un litre d'eau. Le pH 7,4 est ajusté avec le HCl 1M.

2.18. Analyses métabolomiques

Des analyses métabolomiques ont été réalisées par chromatographie-MS haute résolution (UPLC-HRMS) sur un Spectromètre de masse quadripolaire Q-Exactive Plus (Orbitrap), équipé d'une sonde électrospray (HESI II) couplée à un système U-PLC Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Royaume-Uni). Le procédé et l'étape de séparation, de traitement, de nettoyage et d'annotation des pics a été faite à l'aide de MS-DIAL version 4.80, MSCleanR et MS Finder modèle respectivement, décrit en détail par (Fraisier-Vannier *et al.*, 2020), (Tsugawa *et al.*,

2015) et (Tsugawa *et al.*, 2016). Les bases de données (DB) basées sur *Triticum turgidum* (genre), *Poaceae* (famille), *Pseudomonas sp.* et *Enterobacter sp.* ont été constituées avec le dictionnaire de produit naturel (DNP, CRC presse, DNP sur DVD v.28.2). Les DB génériques de MS-FINDER utilisées étaient KNapSack, PlantCyc, NANPDB, UNPD et COCONUT pour les exsudats racinaires de blé et NPA pour les exsudats bactériens. La priorisation des annotations a été effectuée en hiérarchisant les bases de données de *Poaceae*, *Triticum turgidum* puis celles de génériques des exsudats racinaires. Pour les bactéries, la priorisation s'est faite avec les banques *Pseudomonas sp.* et *Enterobacter sp.* puis celles des génériques en utilisant la dernière étape MS-CleanR.

2.19. Analyses protéomiques

Pour la protéomique, les échantillons ont été digérés ou non avec de la trypsine. Ils ont été analysés en ligne par nanoHPLC (NCS3000, Thermo Fisher), avec un gradient de 140 min, couplé à un spectromètre de masse disposant d'une source nano electrospray Q-Exactive plus (Thermo Fisher Scientific). Des algorithmes de recherche dépendant de la base de données et un séquençage *de novo* ont été effectués à l'aide du logiciel PEAKS X plus (Bioinformatics Solutions Inc) (Ma *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012). La base de données des peptides déduits des 6 cadres de lecture générés à partir de chaque génome bactérien a été utilisée pour les identifications de peptides et de protéines. La carbamidométhylation de la cystéine (+57,02 Da) a été définie comme une modification statique, l'oxydation de la méthionine (+15,99 Da) et la désamidation (+0,98 Da) comme une modification variable. La tolérance d'erreur de masse du parent a été fixée à 10 ppm et la tolérance d'erreur de masse du fragment a été fixée à 0,05 Da. Pour la digestion à la trypsine, les clivages manqués ont été fixés à 3 maximum et pour la non-digestion, aucune enzyme et digestion non spécifique n'ont été utilisées. Le seuil du taux de fausses découvertes (FDR) a été fixé à 1 %. Les peptides identifiés par séquençage *de novo* ont été blastés (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> PAGE=Proteins). Les données brutes ont été déposées sur PRIDE - Proteomics Identification Database (PXD034914).

2.20. Analyses statistiques

Concernant les analyses phénotypiques, physiologiques ainsi que pour les caractérisations biochimiques, Les données ont été analysées à l'aide du logiciel statistique GraphPad Prism (version 8.0). Pour la comparaison entre les deux groupes, des différences moyennes significatives ont été réalisées en utilisant le testt de Student à $p \leq 0,01$. Pour les comparaisons multiples, des différences moyennes significatives ont été réalisées à l'aide d'une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) suivie du test de Newman et Keuls ou du test post-hoc de Tukey à $P \leq 0,05$.

Concernant la métabolomique, les analyses statistiques ont été réalisées avec le métaboanalyste 5.0 <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>. Toutes les données étaient UV- (unité variance) mises à l'échelle avant l'analyse multivariée, ensuite les analyses en composantes principales (ACP) et les cartes de chaleur ont été effectuées. La validité des modèles a été évaluée à l'aide de CV-ANOVA (valeur $p < 0,01$)

Chapitre 3

Exsudation racinaire : Mise au point du dispositif d'exsudation et premiers résultats d'analyse métabolomique et protéomique des exsudats racinaires de blé

3.1. Introduction

Deux grands types de méthodologies sont rencontrés pour la récolte d'exsudats racinaires. La première méthode consiste, à partir d'une plante poussant en sol ou en hydroponie, à prélever cette plante et à laver les racines par de l'eau distillée. Cette étape est suivie d'une exsudation dans l'eau distillée pendant 1 à 2 heures. La solution recueillie est alors lyophilisée et analysée directement. Cette méthode n'est généralement pas utilisée en condition axénique et permet de s'affranchir de l'étape de dessalage puisque l'exsudation est effectuée dans l'eau distillée. La seconde méthode consiste à réduire les perturbations subies par la plante et récolter les exsudats soit par recirculation d'une solution nutritive dans un sol où une cartouche (résine) piège les composés organiques libérés, soit par analyse de la solution d'hydroponie après dessalage. Dans ce dernier cas, les exsudats de la solution d'hydroponie sont soit i) retenus sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE, Solid-Phase Extraction) permettant de se débarrasser des sels présents dans la solution nutritive soit ii) sels et molécules organiques sont partitionnés entre une phase aqueuse et une phase plus apolaire comme avec l'acétate d'éthyle. Les exsudats retenus sur la SPE sont élués ensuite par un solvant organique comme l'acétonitrile, ceux contenus dans la phase d'acétate d'éthyle sont directement lyophilisés, le solvant étant très volatile. Ces 2 méthodes génériques de collecte des exsudats (issues d'une exsudation dans l'eau ou utilisation directe de la solution nutritive) ont été testées afin de définir les meilleures conditions en termes de spécificité et de rendement.

3.2. Matériel et méthodes

La mise en point de protocole de récolte des exsudats racinaires (temps de la mise en culture et la méthode de récolte) a été réalisée sur la variété du blé élite d'origine libanaise « Zagharine » (Cf. § 2.5, Tableau 2.2).

Les étapes effectuées pour l'obtention des exsudats racinaires en utilisant les deux méthodes de collecte des exsudats sont détaillées dans la partie 2.7.

Les informations sur le mode d'analyses métabolomiques et protéomiques sont présentées dans les parties 2.18 et 2.19 respectivement.

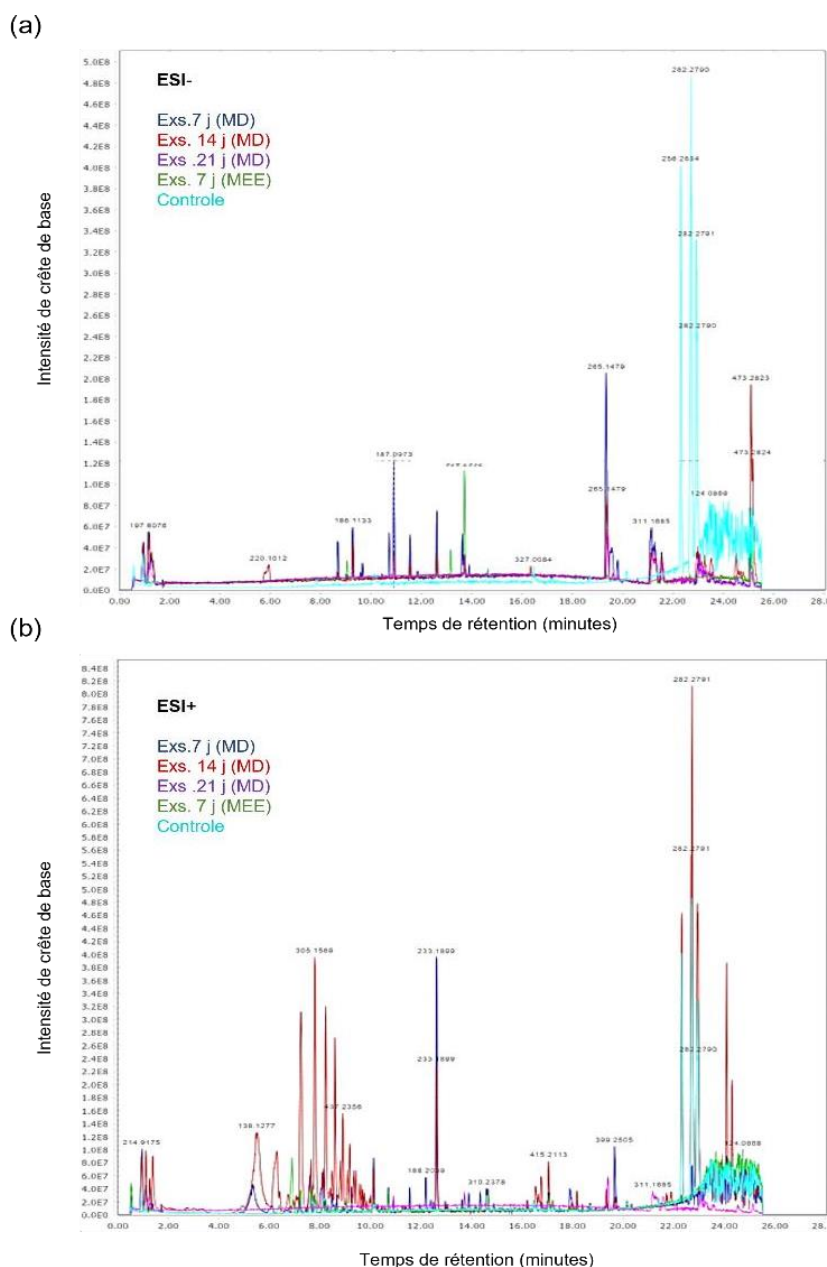


Figure 3.1. Variation du profil des spectres de fractions d'exsudats racinaires de la variété élite de blé dur Zagarine analysés par spectrométrie de masse LC-MS/MS (mode ESI- et ESI+) en fonction de la méthodologie de récolte des exsudats et du temps de mise en culture.

Les pics de couleur bleu foncé, rouge et violet représentent les échantillons d'exsudats racinaires récoltés à partir de la solution d'hydroponie (MD, méthode de dessalage) après 7, 14 et 21 jours respectivement. Les pics de couleur verte représentent les échantillons récoltés par la MEE, méthode d'exsudation dans l'eau, (récolte des exsudats après transfert des systèmes racinaires dans l'eau pure pendant 2h).

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Choix des conditions de récolte des exsudats

La Figure 3.1 présente les profils chromatographiques des métabolites du blé dur (Zagharine) exsudés dans la solution d'hydroponie après 7, 14 et 21 jours de mise en culture et comparés avec une exsudation dans l'eau distillée d'une plante âgée de 7 jours. Le contrôle est la solution d'hydroponie dessalée sur la colonne SepPak et les pics présents en fin d'élution représentent des composés relargués par la colonne SPE. Les deux modes d'ionisation (ESI+ et ESI-) en mode positif et négatif permettent de visualiser des composés sur l'ensemble du gradient d'élution qui semblent spécifiques du mode d'ionisation. De même, une spécificité des composés est enregistrée suivant la durée d'exsudation des plantes dans le milieu d'hydroponie et suivant le mode d'exsudation à savoir dans l'eau distillée (MEE, méthode d'exsudation dans l'eau) ou à partir de la solution d'hydroponie (MD, méthode de dessalage).

3.3.2. Analyse métabolomique comparative entre deux méthodes de récolte des exsudats

L'analyse métabolomique comparative des exsudats de blé dur élite (Zagharine) a été réalisée par UHPLC-MS/MS. Le rapport masse/charge (m/z) d'un métabolite peut varier dans certaines circonstances (liaison à un sel, ajout d'une molécule d'eau) et pour une vision plus complète des composés, il est souvent préférable d'utiliser les 2 modes d'ionisation positif et négatif. La masse de l'ion parent et des ions issus de la fragmentation de cet ion parent permettent de déterminer une formule brute du composé avec une précision de masse importante (< 5 ppm). L'ensemble des données de fragmentation et le temps de rétention permettent d'interroger des banques « maison » où des métabolites standards sont régulièrement re-fragmentés et donnent une identification de niveau 1 qui peut être considérée comme une identification « sûre ». L'interrogation de banques externes souvent génériques donne des identifications de niveau 3 où la classe du composé est hautement probable mais l'identité reste moins fiable.

Les profils chromatographiques des molécules exsudées dans le milieu nutritif semblent plus complexes ou abondants que l'exsudation dans l'eau. Concernant la

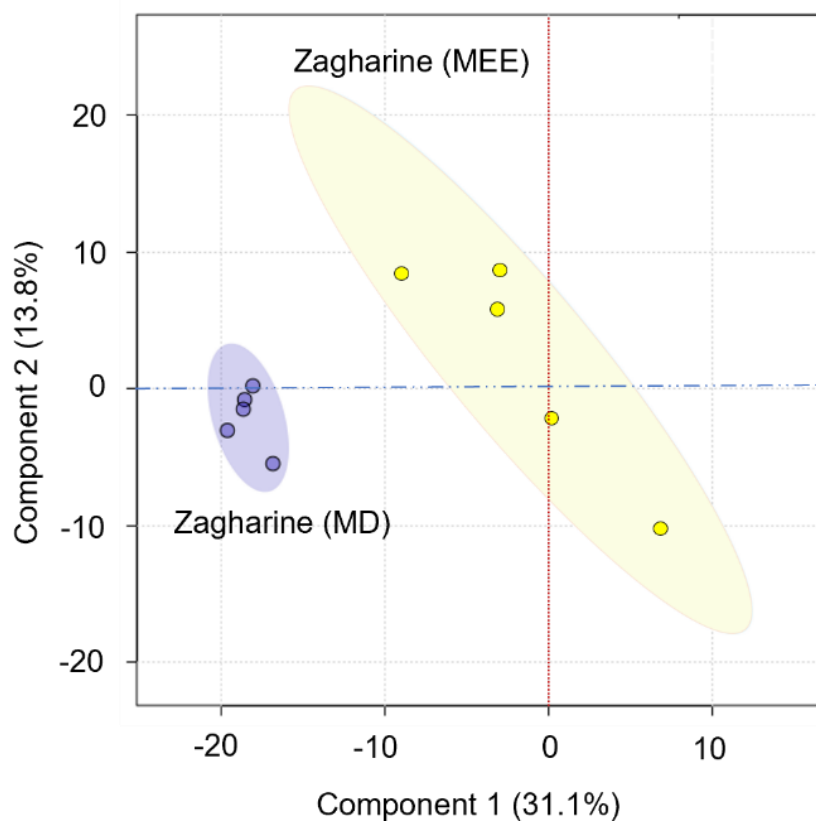


Figure 3.2. Analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) d'exsudats racinaires mesurés en modes positif et négatif.

Comparaison globale des métabolites identifiés dans 5 répliqués d'exsudats racinaires du blé Zagharine (*durum*) récoltés en utilisant deux méthodes différentes. La première méthode s'effectue directement à partir de la solution nutritive récoltée à partir de la solution d'hydroponie (MD, méthode de dessalage) après 7 jours et la deuxième s'effectue après trempage dans l'eau distillée pendant 2 heures des systèmes racinaires issus de la même culture (7 jours) (MEE, méthode d'exsudation dans l'eau). L'analyse (PLS-DA) a été réalisée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>).

date de récolte des exsudats, les profils semblent assez différents entre les différentes dates montrant une dynamique d'exsudation au cours des premières semaines de culture du blé. L'analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) (Figure 3.2) montre une grande dispersion des 5 réplicats issus de MEE (méthode d'exsudation dans l'eau) alors que les réplicats pour MD (méthode de dessalage) sont tous regroupés. Cette caractéristique entre les 2 méthodes est enregistrée tant au niveau de la composante 1 que de la composante 2. Il semble donc que la reproductibilité entre les réplicats MEE soit plus difficile à obtenir. Une comparaison entre les 50 composants les plus discriminants entre les 2 modes d'exsudation représentée par la carte de chaleur (Figure 3.3) montre que les 2 modes d'exsudation possèdent des composés très spécifiques qui ne se retrouvent qu'à des concentrations faibles dans l'autre mode d'exsudation. L'essentiel des métabolites retrouvés sont des métabolites secondaires dont le rôle est le plus souvent inconnu et spécialement en tant que métabolite exsudé (Annexe, Tableau 3.1). La broussonetine G (composé 325, MD) est un inhibiteur de glycosidase initialement isolé chez l'arbre à papier *Broussonetia papyrifera*. Sa présence est explicable dans les exsudats puisque les parois et membranes des procaryotes et eucaryotes ont des protéines très souvent glycosylées et que ces sucres forment, entre autre, un premier rideau de défense contre les pathogènes. Dans l'analyse d'un échantillon précédent d'exsudats racinaires de la même variété, nous avons identifié 3 benzoxazinoïdes (DIMBOA-Glc, HMBOA-Glc et le DIM2BOA-Glc). Dans la comparaison entre les 2 modes de récolte d'exsudats MD et MEE, nous avons identifié 5 benzoxazinones mais avec des scores inférieurs à 6 donc exclus de l'analyse comparative. Les benzoxazinones sont des composés secondaires dérivés du tryptophane (cycle indole) et présents chez certaines *Poaceae*. Ils sont impliqués dans l'allélopathie et sont considérés comme des pesticides naturels, de durée de vie courte participant à la sélection du microbiote de la rhizosphère (Schütz *et al.*, 2019).

3.3.3. Analyse protéomique des exsudats racinaires d'une variété de blé dur

L'analyse protéomique d'un exsudat de blé dur élite (Zagharine, méthode MD) a été réalisée en parallèle avec et sans digestion de l'échantillon par la trypsine. Ladigestion tryptique permet une coupure spécifique (après les acides aminés K et R) et régulière car les deux acides aminés sont assez bien répartis dans les protéines

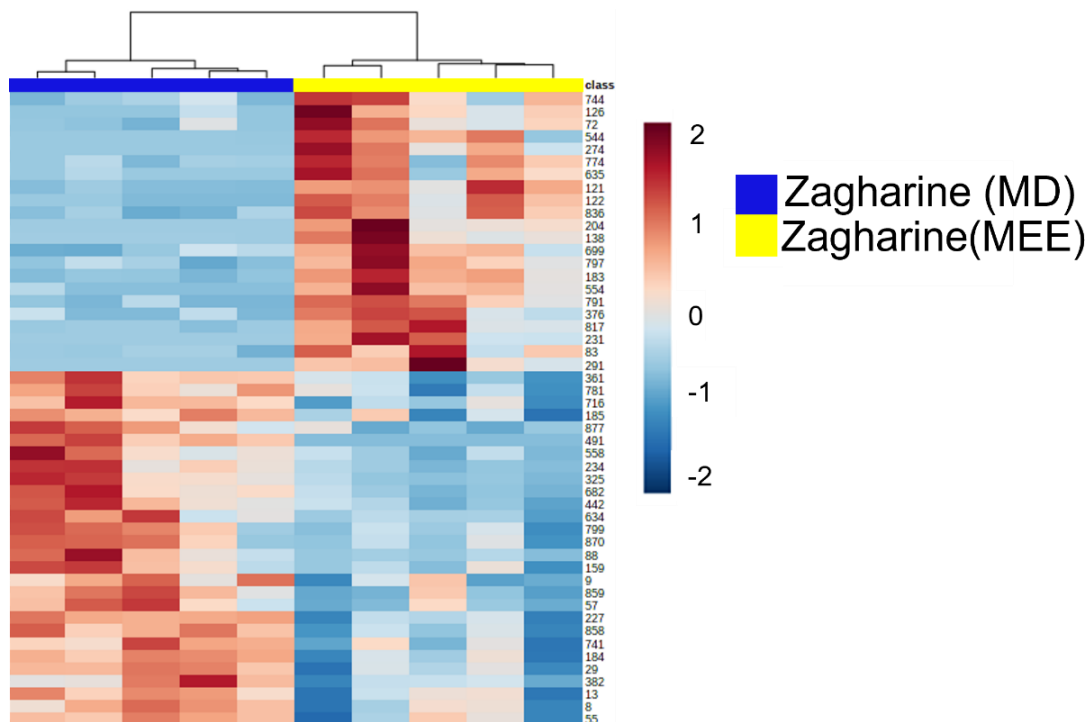


Figure 3.3. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 réplicats d'exsudats racinaires de la variété élite de blé dur (Zagharine) récoltés par deux méthodes différentes.

Les exsudats racinaires ont été récoltés après 7 jours soit directement à partir de la solution nutritive (RD) dans laquelle les plantes ont été mises en culture en conditions axéniques ou après trempage dans l'eau distillée pendant 2 heures (MEE). La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>).

(taille des fragments entre ~7 et 20 aa) générant des tailles de fragments facilement analysables en fragmentation MS/MS et suffisamment longs pour être discriminants (Olsen *et al.*, 2004). Les données de fragmentation et le temps de rétention permettent d'interroger des banques contenant la digestion trypsique virtuelle de l'ensemble des protéines des organismes considérés. Les données de fragmentation vont donc être directement interrogées contre une banque digérée virtuellement. Si la banque ne contient pas le peptide correspondant à la fragmentation, le spectre ne sera pas interprété. L'analyse peptidomique, quant à elle, est le plus souvent réalisée sans digestion de l'échantillon et utilise des logiciels d'interprétation des spectres différents (ex : Peaks X, Maxquant) sans interrogation d'une banque de protéines digérées virtuellement. Si la fragmentation du peptide donne des masses précises, une séquence sera générée à partir de cette fragmentation. Ce séquençage est dit « *de novo* » et est donc basé uniquement sur l'interprétation des spectres de fragmentation sans référence à une banque de protéines ou peptides quelconque. Un score est attribué à chaque peptide dont la pondération est différente du score attribué lors d'une digestion trypsique. Dans Peaks X, le score individuel du peptide varie entre 0 et 100%. Nous avons pris comme seuil minimal 80% ce qui correspond à la probabilité que la séquence interprétée soit la bonne. Il est ensuite nécessaire d'interroger les peptides interprétés par le séquençage « *de novo* » avec des outils comme BlastP pour connaître l'identité de la protéine à laquelle appartient ce peptide. En résumé, le séquençage « *de novo* » permet une interprétation individuelle du spectre avec des logiciels différents d'un séquençage après digestion trypsique dont l'interprétation de la fragmentation est dépendante de la présence de séquences dans les banques avec un score largement majoré par la présence des résidus K, R en fin de séquence. Avec le séquençage « *de novo* », tout peptide bien fragmenté sera interprété et générera une séquence. Les 2 modes d'interprétation sont, au final, dépendants de la présence de séquences bien annotées dans les banques puisque pour le séquençage « *de novo* » un Blast(P) est requis après l'interprétation de la séquence.

Si l'annotation des gènes présents dans les banques est imparfaite (épissage alternatif non détecté, petits ARN traduits non annotés), la protéine ou le peptide peuvent ne pas être identifiés. Pour pallier ce problème, il est souvent conseillé de compléter la banque contenant l'ensemble des gènes annotés, (traduits et virtuellement digérés par la trypsine dans le cas *ad hoc*) de l'organisme étudié par une

Tableau 3.2. Protéines identifiées dans les exsudats racinaires d'une variété élite libanaise (Zagharine).

Après digestion trypsique des protéines, l'analyse des données MS/MS a été effectuée sur une banque de blé dur (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). L'échantillon d'exsudats racinaires a été récolté après 7 jours de mise en culture hydroponique dans le milieu Hoagland complet sous conditions axéniques. Pour les détails voir § 2.19.

Nom de protéine	Espèce	Score de protéine	Couverture
Mannanendo-1,4-beta-mannosidase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	744,01	30,91
Pectin acetylerase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	742,31	38,59
Chitinase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	899,83	54,09
Aminopeptidase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	93,97	2,89
Carboxypeptidase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	115,64	20,96
Peroxidase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	895,87	56,37
Protein disulfide-isomerase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	244,87	11,71
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	110,53	24,56
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	214,86	26,24
Thioredoxin H	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	155,04	37,8
Uncharacterized protein	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	603,75	74,13

Tableau 3.3. Peptides identifiés dans les exsudats racinaires d'une variété élite libanaise (Zagharine).

Séquençage *de novo* et analyse des données MS/MS par le logiciel Peaks. Les peptides dont le score est supérieur à 80 ont été blastés (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) contre l'ensemble des protéines présentes dans NCBI (all (taxid1)). L'échantillon d'exsudats racinaires a été récolté après 7 jours de mise en culture hydroponique dans le milieu Hoagland complet sous conditions axéniques. Pour les détails voir § 2.19.

Peptide	m/z	Rt.min	Score <i>de novo</i>	Longueur de la séquence	Nom de la protéine	Espèce	Localisation sub- cellulaire	Fonction
TASNPVRTQ	487.2569	15.24	98	9	Fasciclin-like protein FLA12	<i>Triticum aestivum</i>	Membrane cellulaire	Adhesion cellulaire
ASNPVRTQ	436.7329	15.24	95	8	Fasciclin-like protein FLA12	<i>Triticum aestivum</i>	Membrane cellulaire	Adhésion cellulaire
VTGGPEVPFHP	568.7905	39.16	90	11	L- ascorbate peroxidase CFC21_01 5182	<i>Triticum aestivum</i>	Cytosol	Redox
ALNQGADVVRGH	627.2968	17.72	85	12	DIMBOA- Glc hydrolase	<i>Triticum turgidum</i> <i>subsp.</i> <i>Durum</i>	Différentes localisations	Défense
VPVTGVNVPVVG GHA	701.3959	43.55	90	15	Unnamed protein product	<i>Triticum turgidum</i> <i>subsp.</i> <i>durum</i>	?	?

QLAGVVA**VEVSGGPVIPFHPG**REDKPQPP
QLAGVVA**VEVSGGPVIPFHPG**REDKPQPP
QLAGVVA**VEVSGGPVIPFHPG**REDKPQPP
QLAGVVA**VEVSGGPVIPFH**PGREDKPQPP
QLAGVVAV**EVSGGPVIPFHPG**REDKPQPP
QLAGVVAVE**VSGGPVIPFH**PGREDKPQPP
QLAGVVAVE**VSGGPVIPFHPG**REDKPQPP

Figure 3.4. Peptides identifiés (jaune et rouge) dans les exsudats racinaires et appartenant à la L-ascorbate peroxidase.

L'analyse protéomique a été effectuée avec (jaune) ou sans (rouge) digestion trypsique et les données MS/MS ont été directement interrogées sur une banque *Triticum durum* (jaune) ou interprétées en séquençage *de novo* via le logiciel Peaks X (rouge) puis interrogés via BlaspP. L'échantillon d'exsudats racinaires a été récolté après 7 jours de mise en culture hydroponique dans le milieu Hoagland complet sous conditions axéniques.

banque d'ADNc (traduits, digérés virtuellement...). Il peut être aussi opportun dans le cas d'une recherche de petits peptides de digérer virtuellement le génome traduit de l'organisme dans les 6 cadres de lecture et de créer une banque de polypeptides (taille > 6 aa) interrogeable. Cette solution a été retenue dans cette étude car l'implication de peptides et micro-peptides signaux entre la plante et le microbiote et générés par des miARN est documentée (Laressergues *et al.*, 2015 ; Combarrous *et al.*, 2020; Middleton *et al.*, 2021). Néanmoins, si un peptide est généré à partir d'une liaison entre 2 exons, même la digestion virtuelle dans les 6 cadres de lecture ne permettra pas de le retrouver. Ce peptide pourra être identifié seulement dans la banque d'ADNc qui souligne la complémentarité des banques mais par là même la taille importante de ces banques combinées.

Parmi les protéines identifiées (Tableau 3.2) dans les exsudats racinaires de blé dur élite (Zagharine) cultivé en hydroponie pendant 7 jours, certaines sont impliquées dans la formation de la paroi (pectine acétyl-transférase, mannosidase), d'autres dans le statut redox et la conformation des protéines (peroxidase, superoxide dismutase, cis-trans isomérase...) et d'autres dans la dégradation (peptidase) ou la défense (chitinase). Certains peptides ont permis d'identifier d'autres protéines présentes dans les exsudats (Tableau 3.3). FLA12 (*FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 12*) est une glycoprotéine ancrée dans la membrane plasmique côté apoplasme par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et est impliquée dans le dépôt de cellulose et l'intégrité de la paroi. Elle aurait aussi un rôle dans la signalétique de la biosynthèse de la paroi (Seifert *et al.*, 2014). De façon remarquable, une DIMBOA-glucosidase a été identifiée dans ces exsudats. Cette enzyme permet l'activation des benzoxazinoïdes en déglycosylant la forme complexée à un sucre libérant les aglycones toxiques. La spécificité des isoenzymes formant généralement des homo-oligomères a montré une certaine plasticité parmi les substrats (Czjzek *et al.*, 2000 ; Sue *et al.*, 2000). Nous avons identifié des substrats potentiels de cette enzyme car tous les benzoxazinoïdes identifiés sont sous forme glycosylée donc inactive sauf le HBOA (voir la partie métabolomique). La plante exsude donc à la fois le substrat inactif et l'enzyme l'activant dont l'activité doit être régulée de façon précise. Enfin, nous avons identifié (Figure 3.4) après digestion (en jaune) et sans digestion trypsique (en rouge), 7 peptides appartenant à l'ascorbate peroxidase. Aucun de ces peptides n'est trypsique donc tous étaient présents dans les exsudats (à l'exception potentielle du second

VEVSGGPVIPFHPGR qui a pu être généré par la digestion trypsique du premier VEVSGGPVIPFHPGRED). Tous ces peptides proviennent d'une zone réduite de 17 aa de la protéine et aucun autre peptide n'a été identifié dans cette protéine qui est cytosolique. Il est donc probable que la protéine n'a jamais été exsudée mais seuls ces peptides l'ont été après avoir été générés dans le cytosol ou dans une organelle. Ces peptides peuvent être impliqués dans une signalétique mise en place par la plante.

Chapitre 4

**Effet de la domestication du blé dur sur sa capacité
d'exsudation au niveau racinaire**

4.1. Introduction

La domestication du blé et de céréales comme l'orge, le seigle ou l'avoine dans le croissant fertile a été à l'origine de l'avènement de l'agriculture il y a environ 12000 ans. Cette domestication a débuté par la sélection empirique de traits phénotypiques comme le maintien des épillets sur l'épi à maturité, la non-adhérence des enveloppes sur le grain (grain nu) permettant une récolte et un battage plus facile. La sélection de traits phénotypiques s'est poursuivie avec la diffusion de l'agriculture de par le monde et l'adaptation des variétés aux conditions locales mais s'est accélérée lors de la révolution verte et l'utilisation des lois de la génétique. Des traits comme la taille de la plante, le nombre d'axillaires/talles formés, l'organisation des pièces reproductrices ont un lien étroit avec la balance phytohormonale ou sont susceptibles d'avoir eu un impact important sur le métabolisme et par ricochet potentiellement sur l'exsudation (Waines et Ehdaie, 2007; Roucou *et al.*, 2020; Ben-Abu *et al.*, 2022). Cette sélection a, de plus, été réalisée majoritairement hors de l'aire d'origine du blé donc sans lien étroit avec le microbiote originel. L'impact de cette domestication sur l'exsudation racinaire et donc sur la relation plante-microbiote peut fournir des pistes importantes de sélection dans le nouveau modèle agro-écologique moins dispendieux en intrants et plus respectueux de la biodiversité et de l'environnement en général. Les grandes étapes de la domestication peuvent se résumer au travers des différentes sous-espèces définissant un transect de domestication depuis l'amidonner sauvage *T. t. dicocoides* (épillets caducs, grains vêtus, plantes > 1 m) vers l'amidonner cultivé *T. t. dicoccum* (épillets persistants, grains vêtus, plante >1m) puis la sélection des durums (épillets persistants, grains nus) *T. t. durum* avec les variétés pays (plantes > 1m) et enfin les blés modernes élites (plantes < 1m) descendants de la révolution verte.

4.2. Matériel et méthodes

Dans ce chapitre, nous nous focalisons sur trois variétés de blé dur résumant les grandes étapes de domestication de chaque panel, A (*Ttd-NC-2019* (amidonner sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicocoides*), Escandia (*T. t. dicoccum*) et Zagharine

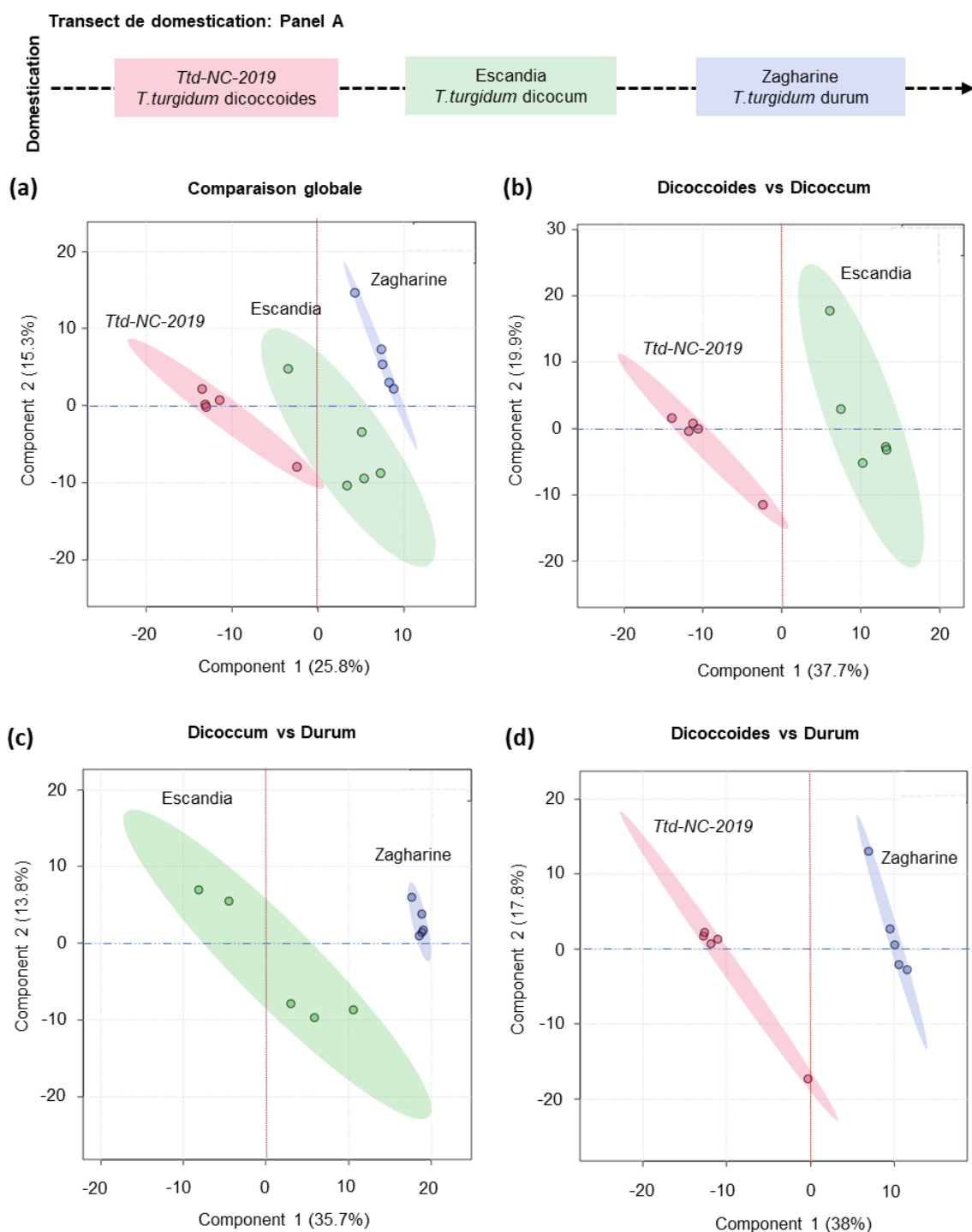


Figure 4.1. Analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) des métabolites présents dans les exsudats racinaires de trois variétés du blé dur du panel A (Cf. § 2.7) résumant les grandes étapes de la domestication.

(a) comparaison globale des métabolites identifiés entre les trois accessions du blé dur résumant les grandes étapes de la domestication *Ttd-NC-2019* (amidonnier sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicoccoides*), *Escandia* (*T. t. dicocum*) et *Zagharine* (*T. t. durum*). (b), (c) et (d) représentent les comparaisons globales des métabolites entre une paire d'accessions, *Ttd-NC-2019* vs *Escandia*, *Escandia* vs *Zagharine* et *Ttd-NC-2019* vs *Zagharine* respectivement. Les analyses métabolomiques des échantillons, les étapes de séparation, de traitement, de nettoyage et d'annotation sont détaillées dans la partie § 2.18. L'analyse (PLS-DA) a été réalisée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>).

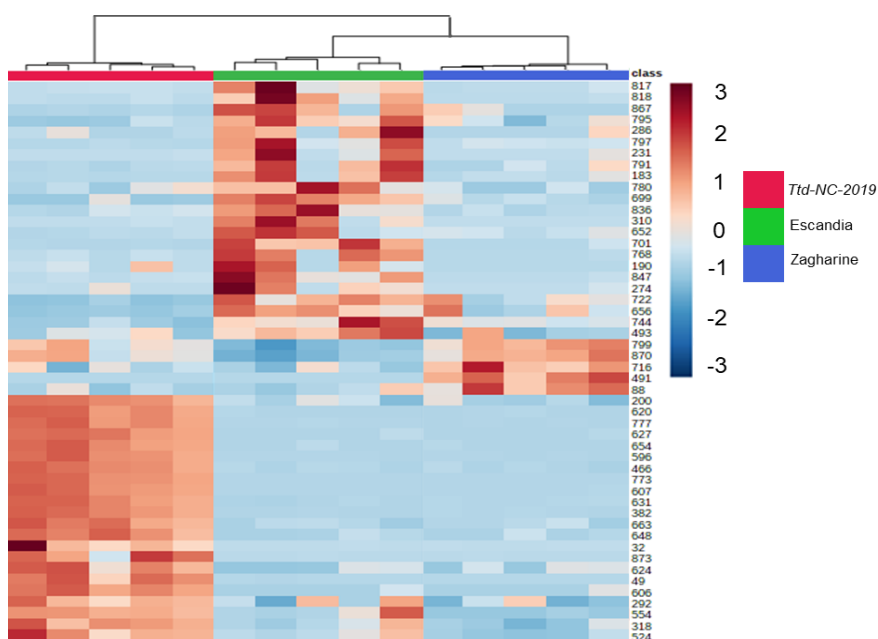


Figure 4.2. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur résumant les grandes étapes de la domestication du panel A (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les trois variétés du blé dur résumant les grandes étapes de la domestication, *Ttd-NC-2019* (dicoccoides), *Escandia* (dicoccum) et *Zagharine* (durum). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : voir Tableau 4.1.

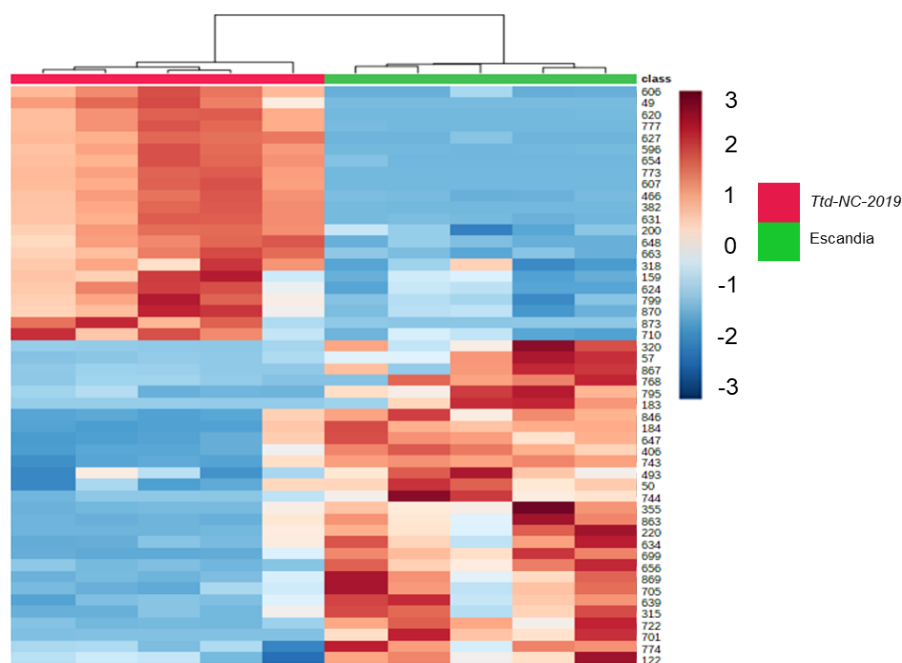


Figure 4.3. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur « dicoccoides » et « dicoccum » du panel A (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les deux variétés *Ttd-NC-2019* (dicoccoides) et *Escandia* (dicoccum). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : voir Tableau 4.2.

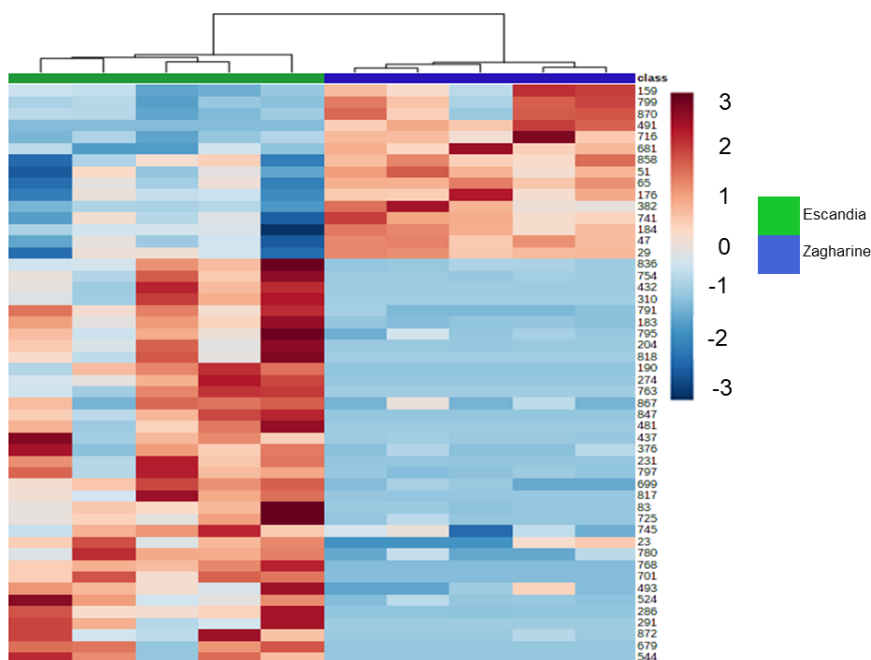


Figure 4.4. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur « dicoccum » et « durum » du panel A (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les deux variétés Escandia (dicoccum) et Zagharine (durum). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : voir Tableau 4.3.

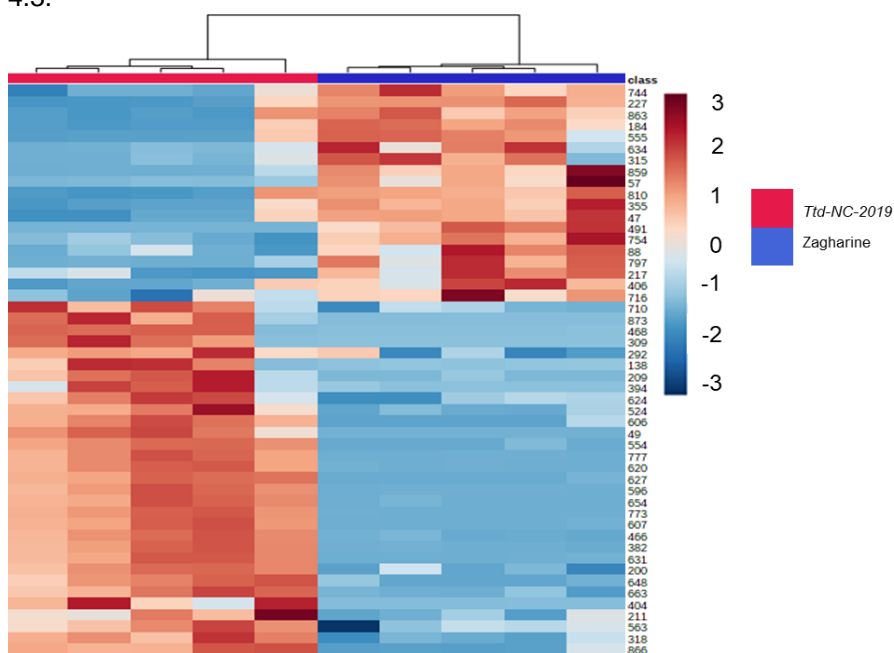


Figure 4.5. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur « dicoccoides » et « durum » du panel A (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les deux variétés Ttd-NC-2019 (dicoccoides) et Zagharine (durum). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : voir Tableau 4.4.

(*T. t. durum*) et B (Dicoccoïdes 70, Dicocccum 139 et durum Durum 411) (Cf. § 2.5, Tableau 2.2).

A partir des résultats obtenus dans le chapitre 3, nous nous sommes fondés sur la méthode de récolte des exsudats racinaires après 7 jours de la mise dans un système hydroponique en utilisant la méthode MD (Méthode de dessalage).

Les étapes effectuées pour l'obtention des exsudats racinaires sont détaillées dans la partie 2.7. Pour la variété (*Ttd-NC-2019* (amidonnier sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicoccoïdes*)), un traitement avec la tétracycline est effectué lors d l'étape de domestication.

Les informations sur le mode d'analyses métabolomiques et protéomique sont présentées dans les parties 2.18, 2.19 respectivement.

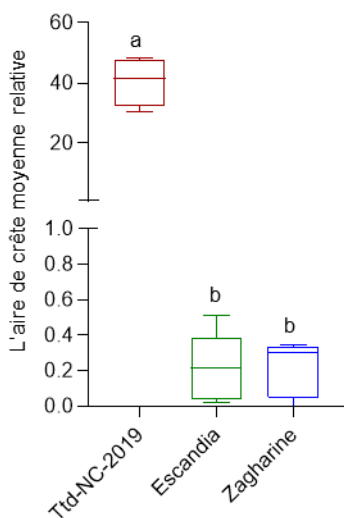
4.3. Résultats

4.3.1. Comparaison des métabolites racinaires exsudés par 3 sous espèces du transect (*dicoccoïdes* (*Ttd-NC-2019*), *dicocccum* (Escandia), *durum* élite (Zagharine), panel A

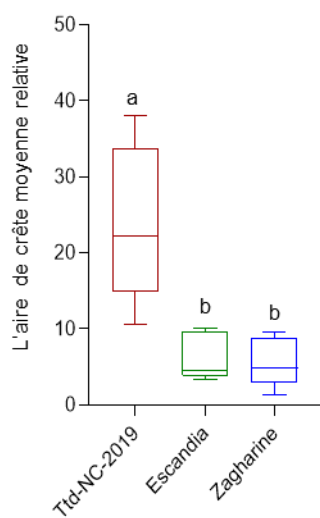
Dans un premier temps, trois sous-espèces de *Triticum turgidum*, représentant les grandes étapes de la domestication, ont été comparées. L'amidonnier sauvage (*T. t. dicoccoïdes*) est l'espèce ancestrale non domestiquée dont les épillets sont caducs dès maturité et correspond à la sous-espèce trouvée dans la zone refuge près de Nabi Chit au Liban (*Ttd-NC-2019*). Escandia est une variété espagnole d'amidonnier (cultivé) *T. t. dicocccum* provenant de Navarre (salinas de Pampluna). Les épillets sont persistants sur l'épi mûr mais les enveloppes du grain, les glumelles (lemme et paléole) sont encore adhérentes et le grain est vêtu comme pour *T.t. dicoccoïdes*. Enfin, Zagharine, *T.t. durum*, est une variété élite libanaise à épillets persistants et grain nu.

L'analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) (Figure 4.1 a) de tous les réplicats des sous-espèces utilisées montre que la composante 1 expliquant 25% de la variance sépare assez bien *T. t. dicoccoïdes* des 2 autres sous-espèces. La composante 2 expliquant 15% de la variance sépare plutôt Zagharine des autres sous-

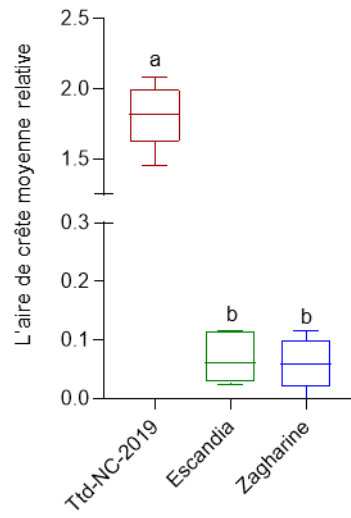
873: Pharboside E



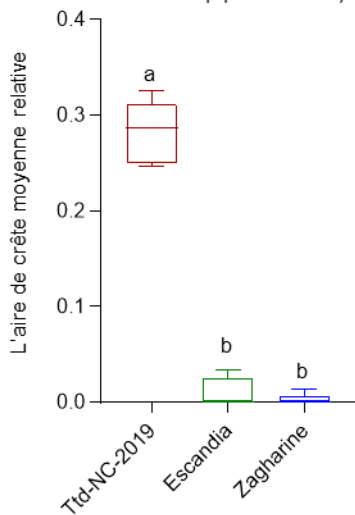
710: HMBOA-Glc



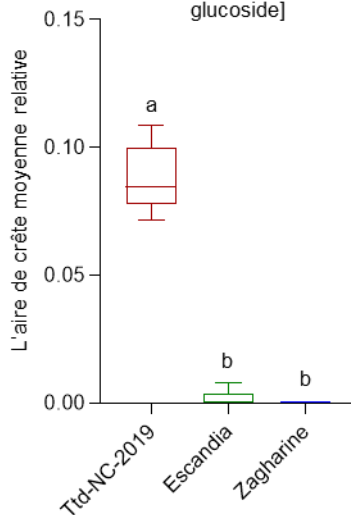
466: Quinine



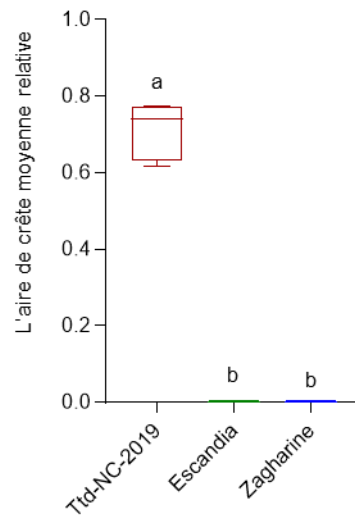
648: BQ 123 (Cyclo(D-trp-D-asp-pro-D-val-leu)



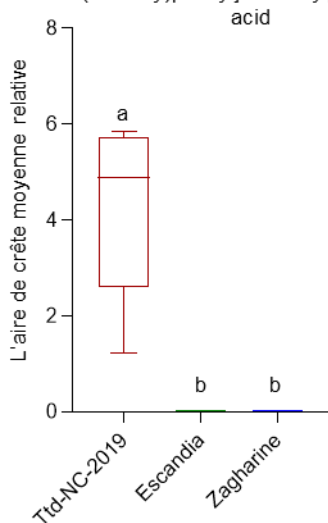
606: Blumenol C O-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]



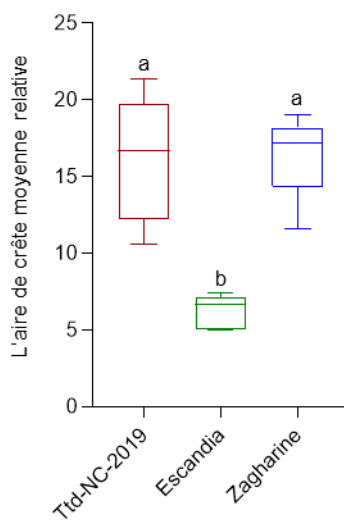
631: Mesoporphyrin IX (MPIX)



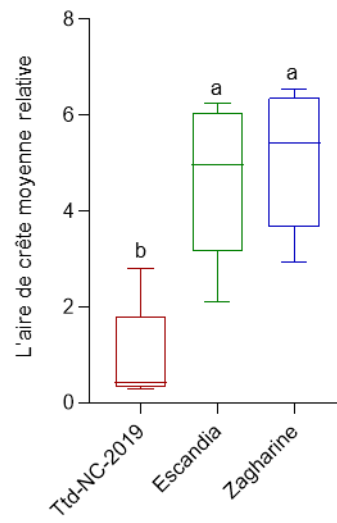
32: (2S)-2-amino-3-[4-hydroxy-3-(sulfoxy)phenyl]-2-methylpropanoic acid

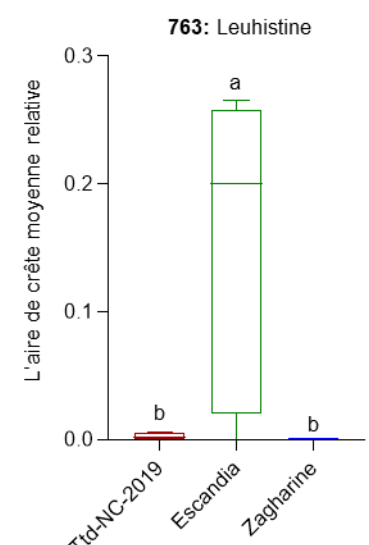
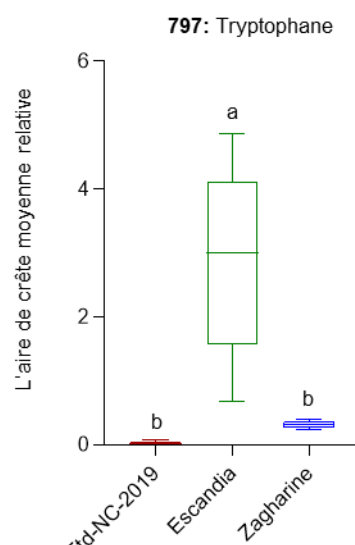
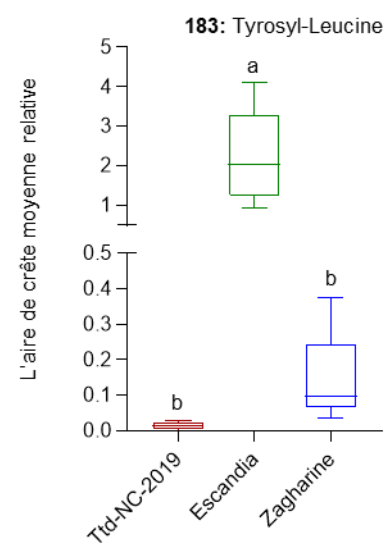
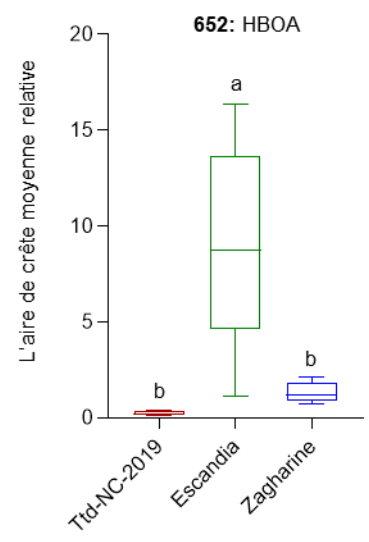
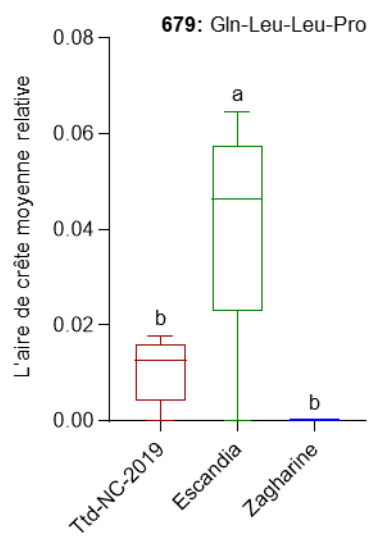
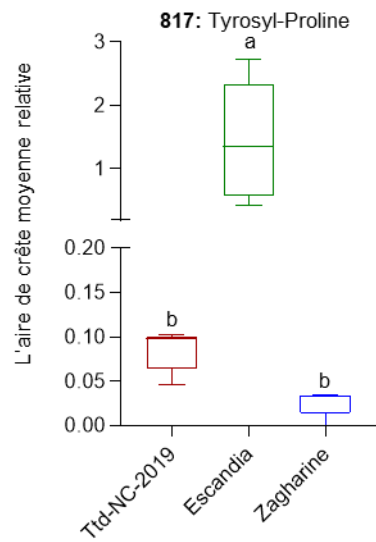
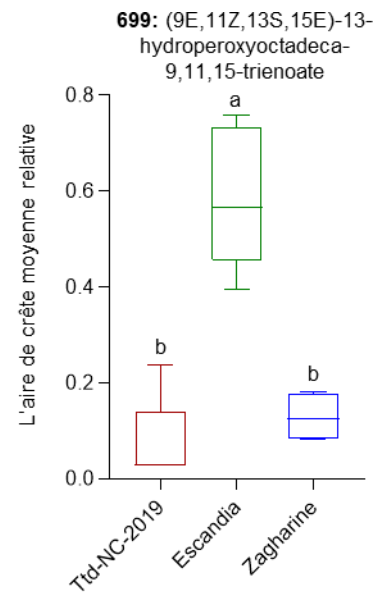
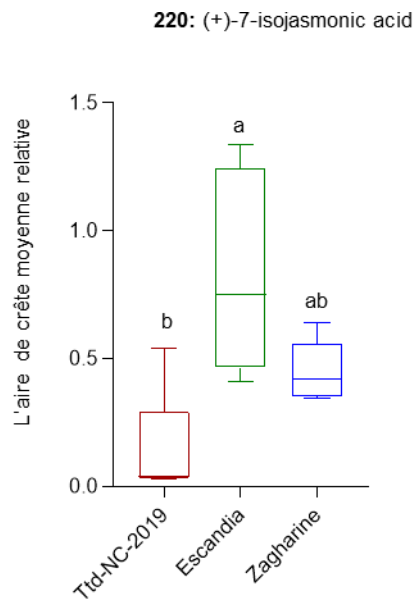
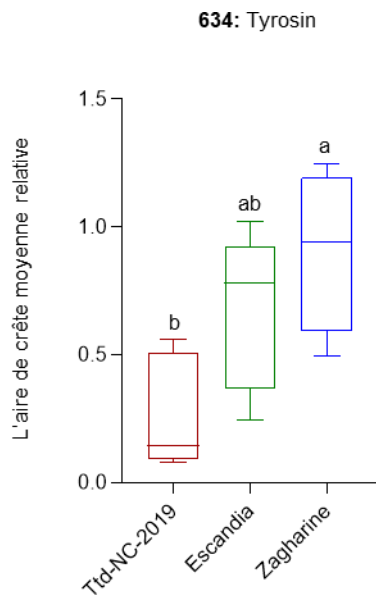


870: N-Nonanoylglycine



315: Leu-Gln-Pro





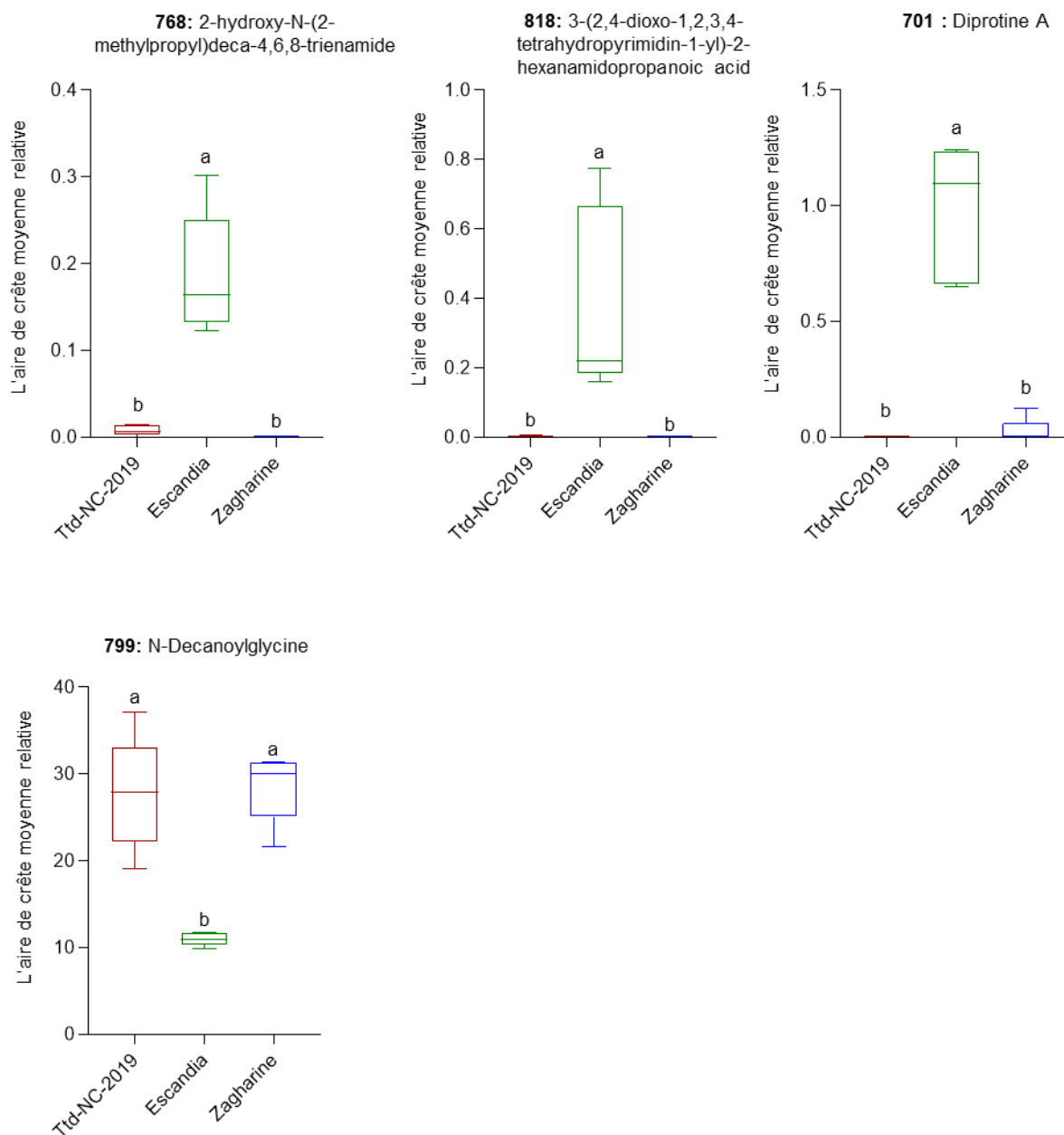


Figure 4.6. Boîtes à moustaches (Box plot) montrant la surface de crête relative moyenne (Relative Mean Peak Area) de quelques métabolites identifiés dans les exsudats racinaires chez les trois accessions du blé dur résumant les grandes étapes de la domestication (panel A).

La surface de crête relative moyenne des métabolites est comparée en fonction de chacune des variétés résumant les grandes étapes de la domestication de blé dur Ttd-NC-2019 (dicoccoides), Escandia (dicoccum) et Zagharine (durum). Les différentes lettres au-dessus des tracés indiquent des différences significatives déterminées par une ANOVA unidirectionnelle avec le test post hoc de Tukey ($P < 0.05$).

espèces. Les 3 sous-espèces sont bien distinguables les unes des autres même si en général, un réplicat sur les 5 est plus distant des autres. Dans l'analyse par binôme (Figure 4.1 b, c, d), la composante 1 distingue les sous-espèces sauf dans le binôme Escandia Zagharine.

L'analyse des 50 métabolites les plus discriminants entre les sous-espèces représentées sur la carte de chaleur (Figure 4.2) montre que seulement 5 composés parmi 50 caractérisent Zagharine et les cartes de chaleur (Figure 4.4 et 4.5) tendent à confirmer une proximité plus grande de Zagharine envers Escandia. Par contre *T. t. dicoccoides* et *T. t. dicoccum* possèdent autant de singularité l'un que l'autre (Figure 4.3).

L'essentiel des composés identifiés est composé de métabolites secondaires et comme on le verra pour les bactéries chapitre 6, la classe des acides gras ou acides amides (406, 355, 29, 176, 870...), potentiels réservoirs ou métabolites associés aux composés volatils sont particulièrement représentés (Annexe, Tableau 4.1, 4.2, 4.3, 4.4). Ils peuvent aussi représenter des métabolites liés à certains stress oxydatifs (Wang *et al.*, 2014). De nombreux composés identifiés n'ont pas de fonction connue.

Différents composés peuvent être regroupés par classe suivant leur abondance dans une sous espèce particulière. Certains de ces composés ne sont quasiment pas retrouvés dans les autres sous espèces et pourraient être considérés comme des marqueurs spécifiques. Par exemple, les composés 32, 606, 631 semblent des marqueurs du dicoccoides *Ttd-NC-2019* (Figure 4.6). Les composés 873 (pharboside E), 648 (CycloW-D-P-V-L), 710 (HMBOA-GLc), 466 (quinine) sont aussi plus abondants chez dicoccoides *Ttd-NC-2019*. De même, les composés 652 (HBOA), 699, 768, 818, 817(Y-P), 183(Y-L), 679 (Q-L-L-P), 763 (Leuhistin), 797 (W), 701 (Diprotine A, I-P-I) et 220 (acide 7-jasmonique) sont retrouvés plus abondants ou marqueurs du dicoccum Escandia. Très peu de marqueurs peuvent être associés au durum élite Zagharine. Dans cette comparaison, l'abondance de certains composés semblent se réduire depuis le dicoccoides jusqu'au durum 873 (pharboside E), 648 (CycloW-D-P-V-L), 710 (HMBOA-GLc), 466 (quinine) et à l'inverse d'autres montrent une accumulation progressive de dicoccoides vers durum comme 634 (Y) et 315 (L-Q-P).

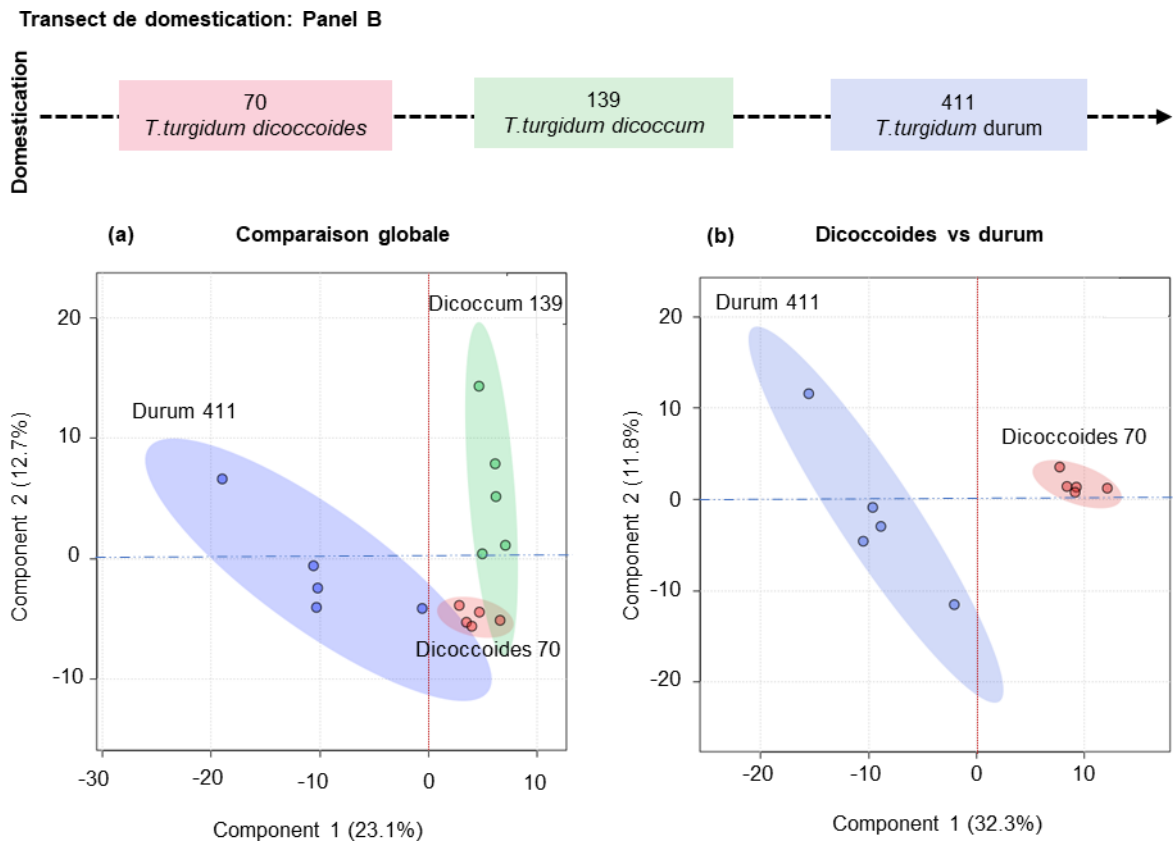


Figure 4.7. Analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) des métabolites présents dans les exsudats racinaires de trois variétés du blé dur du panel B (Cf. § 2.7) résumant les grandes étapes de la domestication.

(a) comparaison globale des métabolites identifiés entre les trois accessions du blé dur résumant les grandes étapes de la domestication dicoccoides 70 (amidonnier sauvage, *T. t. dicoccoides*), Dicoccum 139 (*T. t. dicoccum*) et durum 411 (*T. t. durum* élite). (b) représente la comparaison globale des métabolites entre les deux étapes extrêmes de la domestication « dicoccoides » et « durum », dicoccoides 70 vs durum 411 respectivement. Les analyses métabolomiques des échantillons, les étapes de séparation, de traitement, de nettoyage et d'annotation sont détaillées dans la partie § 2.18. L'analyse (PLS-DA) a été réalisée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>).

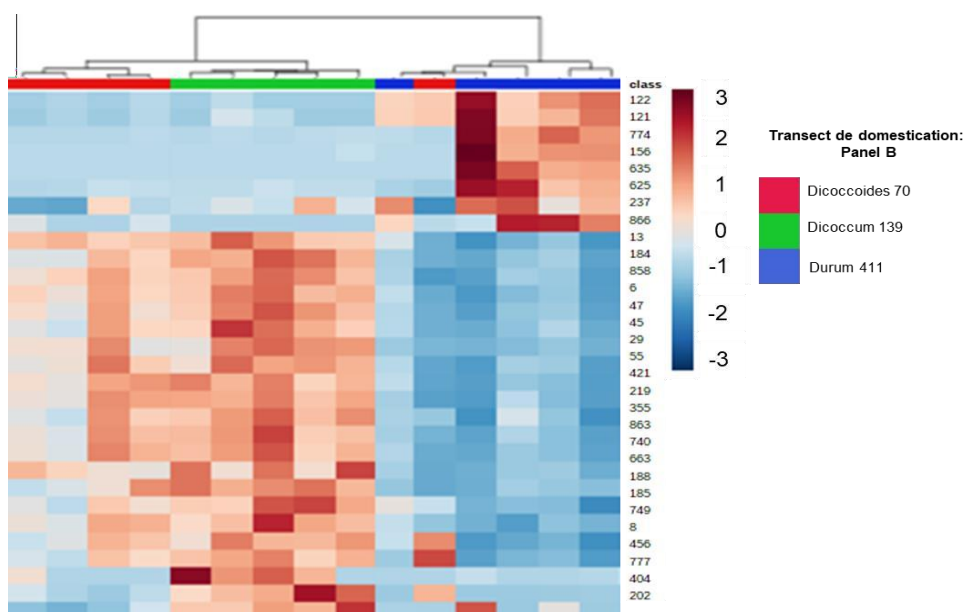


Figure 4.8. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 30 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur résumant les grandes étapes de la domestication du panel B (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les trois variétés du blé dur résumant les grandes étapes de la domestication diccooides 70 (amidonnier sauvage, *T. t. diccooides*), Dicoccum 139 (*T. t. dicoccum*) et durum 411 (*T. t. durum* élite). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : Données non présentés.

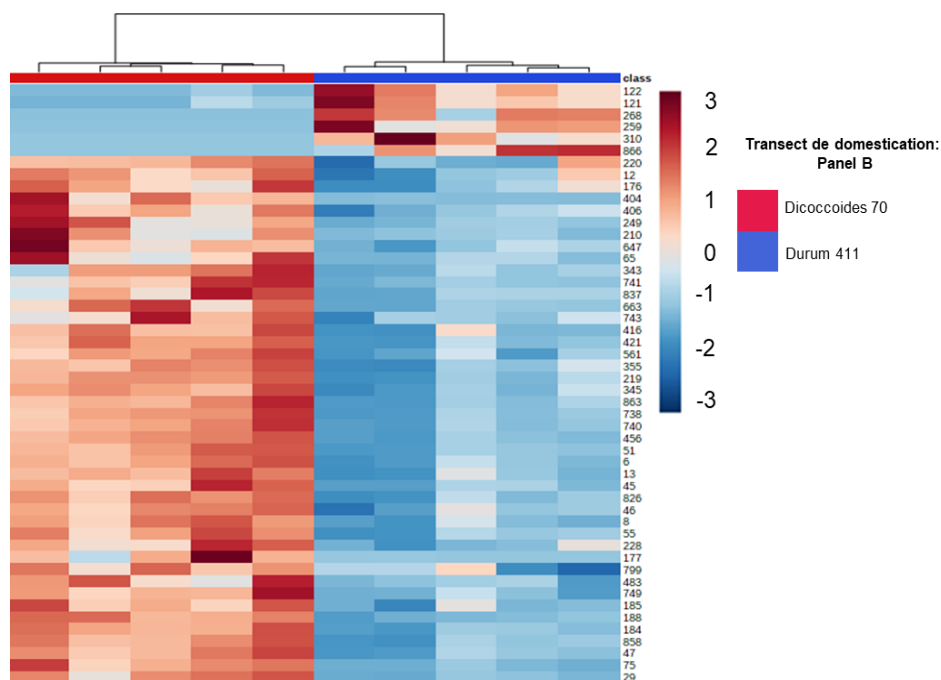
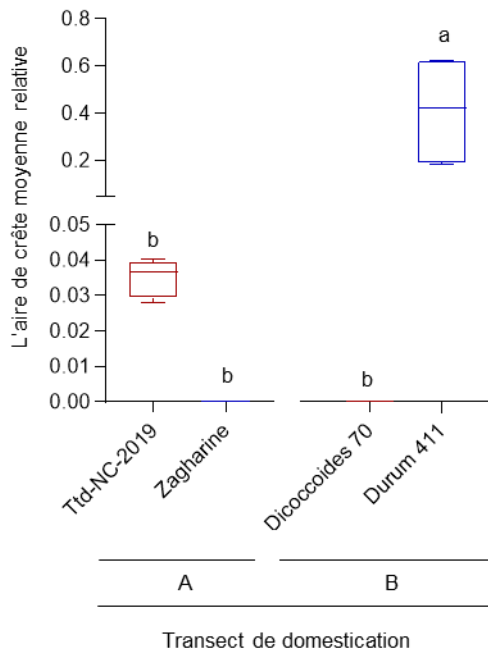


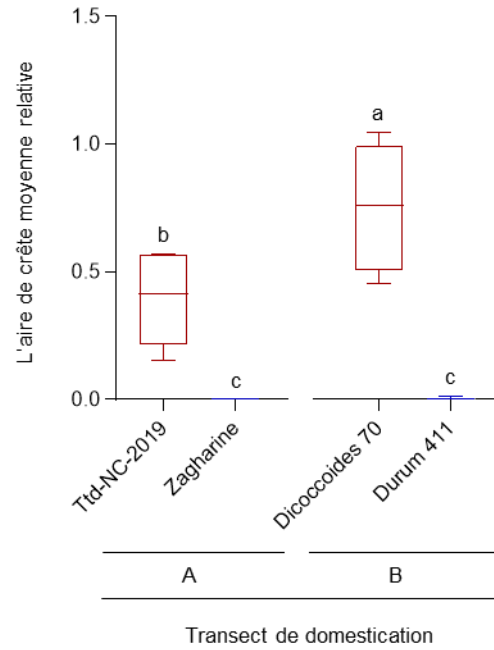
Figure 4.9. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 reliquats d'exsudats racinaires de blé dur « diccooides » et « durum » du panel B. (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) avec les deux variétés Ttd-NC-2019 (diccooides) et Zagharine (durum). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18. Chiffres à droite : voir Tableau 4.5.

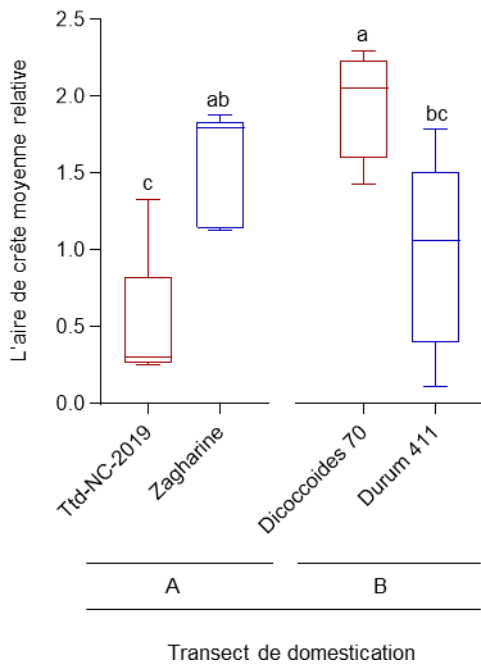
866: Linoleamide



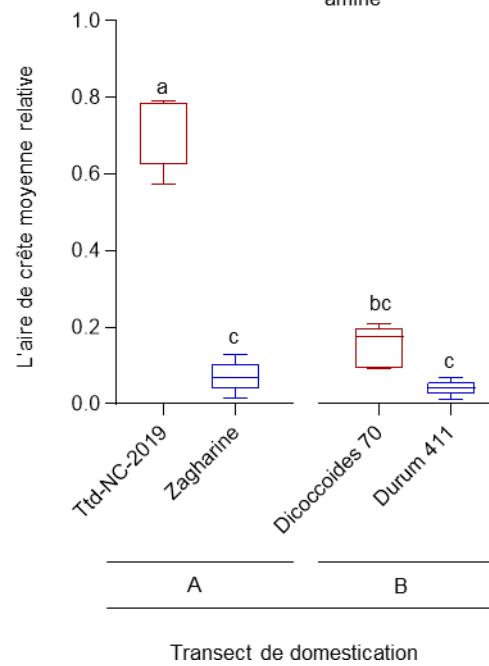
404: 1-[3-(7-methoxy-4,8-dimethyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)propanoyl]piperidine-4-carboxamide

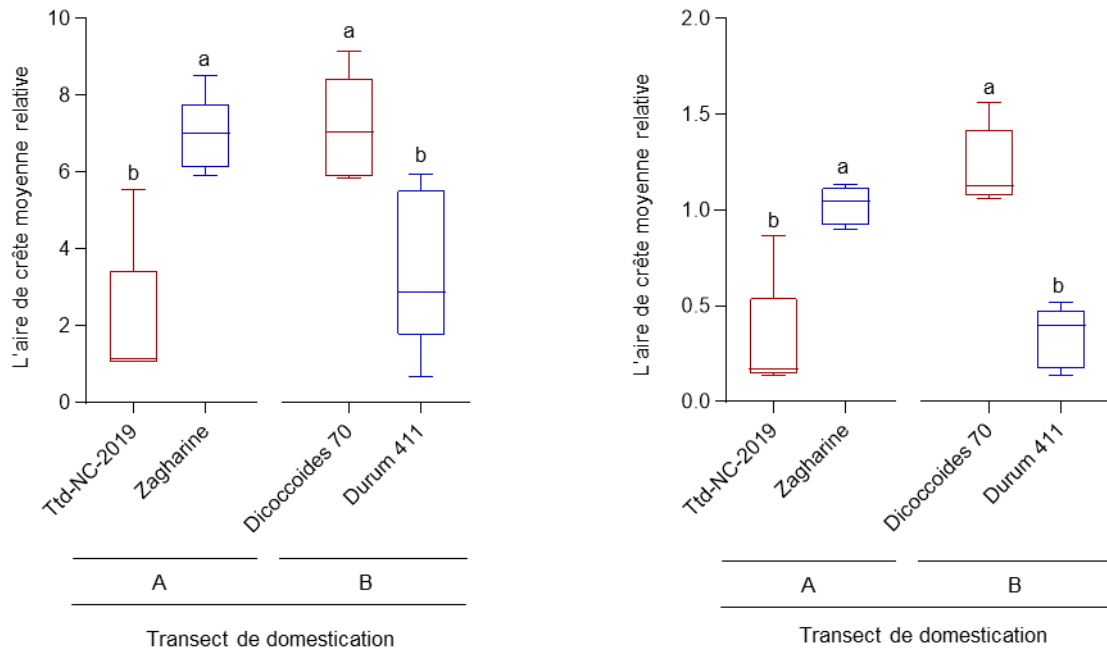


406: (9E)-12-oxododec-9-enoate



663: N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine





47: (9S,10R)-9,10-dihydroxyoctadecanoate

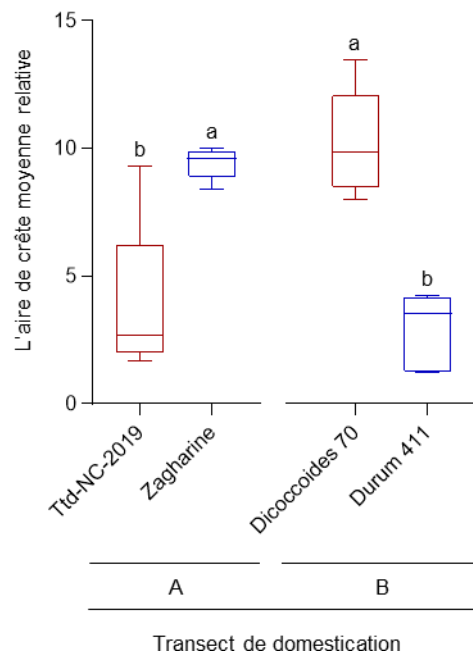


Figure 4.10. Boîtes à moustaches (Box plot) montrant la surface de crête relative moyenne (Relative Mean Peak Area) de métabolites communs entre les 2 sous-espèces extrêmes du transect de panel A (*Ttd-NC-2019* (dicoccoïdes) et Zagharine (durum)) et B (*Dicoccoïdes 70* et *Durum 411*).

Les différentes lettres au-dessus des tracés indiquent des différences significatives déterminées par une ANOVA unidirectionnelle avec le test post hoc de Tukey ($P < 0.05$).

4.3.2. Comparaison des métabolites racinaires exsudés par 3 sous espèces du transect (*Dicoccoides* 70), *Dicoccum* 139, *Durum* élite 411), panel B

Cette comparaison a été testée pour appréhender la diversité au sein des différentes sous-espèces. Nous avons donc pris un nouveau panel (B) de 3 sous-espèces et appliqué le même type d'analyse. L'analyse partielle des moindres carrés (Figure 4.7) montre que la première composante expliquant 23% de la variance discrimine l'élite des 2 autres sous-espèces et la composante 2 expliquant 12% de la variance permet de discriminer les 2 sous-espèces ancestrales. La carte de chaleur des 30 composés les plus discriminants (Figure 4.8) montre que les 2 sous espèces ancestrales ont des composés difficilement distinguables et qu'il existe une grande variabilité au sein même d'une sous espèce entre les différents réplicats.

Dans ce panel, une série remarquable de 13 métabolites comprenant des acides carboxyliques et dicarboxyliques a été identifiée mais dont les rôles restent à définir. Ces (di)anions au pH physiologique pourraient être impliqués dans le métabolisme des composés organiques volatils. En comparant maintenant les 2 sous-espèces extrêmes du transect (panel B) à savoir *Dicoccoides* 70 et *Durum* 411 avec les 2 autres sous-espèces du transect précédent (panel A) *Ttd-NC-2019* et *Zagharine*, 7 composés ont été trouvés en commun (Figure 4.10) dans les 50 métabolites les plus discriminants (voir Figure 4.9, Annexe : Tableau 4.5 et Figure 4.5, Annexe : Tableau 4.4) respectivement. Les composés 404 (1-[3-(7-methoxy-4,8-dimethyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl) propanoyl] piperidine-4-carboxamide) et le 663 (N-(1-cyclohexylethyl) - 4-phenylphthalazin-1-amine) sont les seuls composés qui se comportent de façon identique dans les 2 transects.

4.4. Discussion

Dans la comparaison du panel A, l'analyse des métabolites révèle des composés spécifiques de certaines sous espèces ou très fortement enrichis. De nombreux composés n'ont souvent pas de fonction connue comme le Phorboside E (873) un diterpène glycoside isolé initialement des graines de la convolvulaceae *Ipomea/Pharbitis nil* (Kim *et al.*, 2009). Un représentant des benzoxazinones, le HMBOA-Glc (710), déjà évoqué au chapitre III, a été identifié et semble plus abondant

dans le *T. t. dicoccoides* que dans les autres sous-espèces étudiées. Impliqué dans l'allélopathie et la sélection du microbiote, il pourrait avoir subi une contre-sélection au cours de la domestication mais peut constituer un facteur important dans la compétition en milieu sauvage (Figure 4.6). Il serait intéressant d'éprouver cette hypothèse en analysant d'autres accessions de ces sous-espèces. La quinine (466) a été identifiée comme marqueur du blé *T. t. dicoccoides* de Nabi Chit. Identifié chez des arbustes de la famille des Rubiaceae (Quinquina, *Cinchonia pubescens* et *C. calisaya*), cet alcaloïde est bien connu pour le traitement de la malaria (paludisme). Sa présence spécifique et son rôle dans le blé sauvage reste énigmatique (Figure 4.6).

Le dicoccum Escandia possède de nombreux métabolites spécifiques ou enrichis en particulier de HBOA, un benzoxazinoïde qui, à l'instar du DIMBOA, très abondant chez le dicoccoides, est impliqué dans la sélection du microbiote (Kudjordjie *et al.*, 2019 ; Cotton *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2021), la résistance aux pathogènes (Saravanakumar *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2016) et l'allélopathie (Schandry and Becker, 2020; Hickman *et al.*, 2021). Il semble que les benzoxazinoïdes, essentiellement trouvés chez les Poaceae, présentent des particularités structurales propres à chaque espèce. De façon remarquable toujours chez Escandia, une classe de composés est particulièrement représentée dans les métabolites et correspond à des peptides de 2 à 4 acides aminés (Y-P (817); Y-L (183); I-P-I (Diprotin A, 701); L-Q-P (315); Q-L-L-P(679)). Pour 4 d'entre eux, ils contiennent une proline qui est terminale pour deux d'entre eux. La diprotine A est un inhibiteur de protéase comme la leuhistin (763) identifiée aussi dans les échantillons. Certains de ces peptides ont montré une action chez l'homme ou la souris mais leur rôle n'a pas été étudié chez les plantes à notre connaissance. Q-L-L-P issu d'un hydrolysat de caryopse de maïs est un peptide impliqué dans le métabolisme de l'alcool (Ma *et al.*, 2016) et Y-L a une action anxiolytique chez la souris (Kanegawa *et al.*, 2010 ; Mizushige *et al.*, 2020). Y-P classé parmi les dipeptides opioïdes a une activité analgésique (Guzevatykh *et al.*, 2008) et son transport dans le cerveau diminuerait l'action de la protéine β -amyloïde impliquée dans les troubles de la mémoire (Tanaka *et al.*, 2020). L-Q-P, préparé à partir d'un hydrolysat de blé, aurait une action sur l'hypertension (Motoi et Kodama, 2003 ; Tonuchi *et al.*, 2008) et aurait une action anti-protéasique (Nongonierma *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données sur ces peptides montre que la présence de ces derniers

dans les exsudats n'est pas une contingence et devrait faire l'objet d'investigations poussées (Figure 4.6). Chez *Escandia* encore l'acide 7-iso-jasmonique (220) identifié comme marqueur. L'acide jasmonique (AJ) est une phytohormone impliquée dans de nombreux processus de croissance et de développement comme la croissance racinaire, la sénescence des feuilles, la floraison et la fertilité (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021). Il est particulièrement impliqué dans la défense des plantes et dans l'induction de la résistance systémique acquise (SAR) (Van Wees *et al.*, 2000). L'acide jasmonique est synthétisé dans les plastes à partir de l'acide α -linoléique par des lipases régulées par l'acide abscissique (Wang *et al.*, 2018). L'exsudation de l'acide 7-iso-jasmonique et son rôle nécessite de nouvelles investigations. Le tryptophane (797) est l'un des seuls acides aminés identifié dans les exsudats racinaires et son action exogène dans la synthèse d'auxine par certaines bactéries est utilisée pour révéler ce trait PGPR (voir chapitre II). Il apparaît plus abondant chez *T. t. dicoccum* que chez les autres sous espèces. Son abondance ne semble pas reliée directement à la domestication (Figure 4.6).

Globalement, cette analyse a permis de mettre en évidence des métabolites comme le HMBOA-Glc plus présents chez les formes ancestrales que chez les blés modernes, sachant que ces composés sont impliqués dans la résistance aux pathogènes et dans la sélection du microbiote et l'allélopathie. La sélection a favorisé la « sociabilité » des céréales comme le blé au travers d'une densité de semis importante pouvant contre-sélectionner des molécules comme les benzoxazinoïdes impliqués dans l'allélopathie (Rice *et al.*, 2012, Reiss *et al.*, 2018 ; Schandry *et al.*, 2020). Des petits peptides à la composition particulière semblent être excrétés particulièrement dans certains sous espèces ou cultivars et comme certains sont des inhibiteurs de protéases, ils pourraient participer à la défense des plantes contre certains pathogènes. Enfin, certaines phytohormones comme l'AJ pourraient contribuer à la résistance aux stress. Les comparaisons entre séries de domestication ont souligné la difficulté pour certaines accessions d'obtenir une bonne reproductibilité entre échantillons.

Chapitre 5

**Caractérisation de bactéries endophytes chez
l'amidonnier sauvage (*T. t. dicoccoides*)**

5.1. Introduction

La plante est en contact au niveau racinaire et foliaire avec de multiples organismes formant avec elle son holobionte. Seulement une proportion très faible des micro-organismes présents dans l'environnement immédiat de la plante est susceptible de pénétrer à l'intérieur de celle-ci sans provoquer de symptômes majeurs et en laissant la plante saine. La frontière entre micro-organismes pathogènes et bénéfiques est donc ténue car les mutualistes côtoient commensaux, pathogènes latents ou avérés (Hardoim *et al.*, 2015). Les endophytes, champignons ou bactéries se développent généralement à l'extérieur des cellules dans l'apoplasme mais certaines bactéries par exemple peuvent envahir les vaisseaux et se répandre dans l'ensemble des tissus de la plante y compris dans les graines (Frank *et al.*, 2017). La transmission peut se faire de façon horizontale à chaque génération par différentes voies, racinaires majoritairement mais possiblement via les ravageurs comme les insectes piqueurs-suceurs, nématodes, via les pollinisateurs, via le vent avec entrée par les stomates ou blessures. De façon plus rare, la transmission peut être verticale et passer d'une génération à l'autre via la colonisation des méristèmes des organes floraux et envahir la graine ou la spermosphère (Frank *et al.*, 2017). La majorité des endophytes est acquise par transmission horizontale et permet sans doute une meilleure adaptabilité des plantes à des situations pédoclimatiques changeantes (Edwards *et al.*, 2015). Une certaine spécificité d'hôte est enregistrée mais est souvent moins déterminante que des facteurs comme le type de sol (Yeoh *et al.*, 2017). Des applications biotechnologiques sont envisagées avec ces souches endophytes comme contre le flétrissement bactérien impactant la circulation de la sève (Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014 ; Eljounaidi *et al.*, 2016) chez des plantes comme les Solanaceae ou en termes de phytoremédiation (Weyens *et al.*, 2009) avec la dégradation d'herbicides par exemple.

5.2. Matériel et méthodes

Les étapes de l'isolement des bactéries endophytes sont décrites dans la partie (2.8). Les protocoles de la caractérisation moléculaire et biochimique sont détaillés dans la partie 2.10 et 2.11 et respectivement.

Les étapes de la transformation bactérienne sont expliquées dans la partie 2.13.

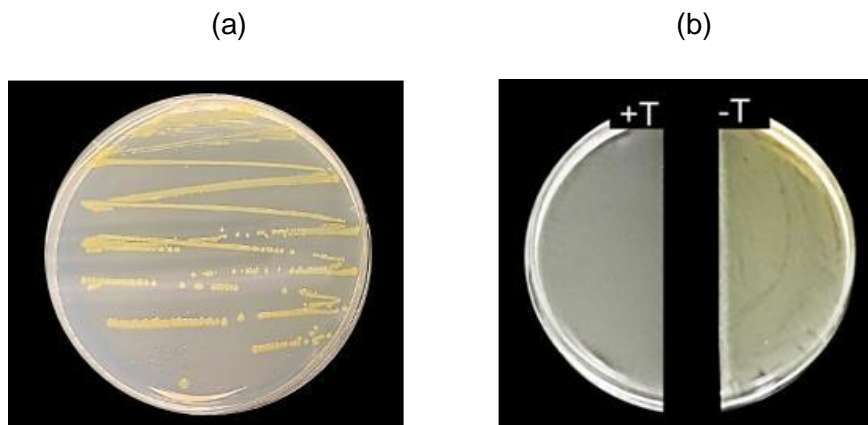


Figure 5.1. Isolement de la souche endophyte *BPMP-PA-65* (*Pantoea agglomerans*) à partir des graines de l'amidonnier sauvage (*Ttd-NC-2019*).

(a) Colonies bactériennes de *BPMP-PA-65* issues de la contamination récurrente des exsudats racinaires de *Ttd-NC-2019* lors du test de stérilité de ces derniers (Cf. § 2.8). Une colonie bactérienne a été ensemencée dans un milieu LB gélosé pendant 48 heures. Les colonies bactériennes sont de couleur jaune clair.

(b) Une suspension bactérienne (50 μ l) de la souche *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*) a été cultivée dans une boîte contenant pour moitié du milieu LB supplémenté (+T) ou non supplémenté (-T) par la tétracycline (50 mg.L⁻¹) (Díaz Herrera *et al.*, 2016).

La visualisation de la croissance bactérienne est effectuée après 48 heures à 37°C.

Les méthodologies de la récolte des exsudats racinaires et bactériens sont détaillées dans la partie 2.7 et 2.15 respectivement.

Les conditions de la culture en serre sont présentées dans la partie 2.14.

5.3. Résultats

5.3.1. Une endophyte présente dans l'amidonnier sauvage

Après stérilisation des graines de l'amidonnier sauvage de Nabi Chit (*Ttd-NC-2019*), il s'est avéré impossible d'obtenir des exsudats racinaires non contaminés. Un étalement d'une aliquote du milieu de culture a révélé la présence d'au moins une contamination bactérienne (Figure 5.1a). Les colonies de cette bactérie possèdent une couleur jaune-orangé facilement repérable. Seul l'emploi d'un antibiotique (tétracycline) permet la récolte d'exsudats indemne de toute contamination (Figure 5.1b). La souche a été caractérisée avec le profil de son amplicon BoxA1R et le séquençage de l'amplicon 16S. La souche identifiée est *Pantoea agglomerans*, endophyte répertoriée chez plusieurs organismes mais aussi souche pathogène chez d'autres (Dutkiewicz *et al.*, 2016). Elle possède comme *E. ludwigii* le gène *nifH*, le gène *ipdC*, le gène *accD* en tant que gènes potentiellement impliqués dans un effet PGPR mais elle ne porte pas le gène *chiA* (Figure 5.2a, b, c, d). *P. agglomerans* est une diazotrophe et son activité de fixation de $^{15}\text{N}_2$ a été vérifiée (Figure 5.3). Sa capacité à produire de l'auxine a aussi été vérifiée (Figure 5.4) et *P. agglomerans* n'est pas une souche cyanogénique (Figure 5.5) mais solubilise les 2 sources de phosphate peu disponible (phosphate de calcium et phytate) ainsi que le feldspath (K insoluble) (Figure 5.6). Le séquençage complet de la souche a montré que *P. agglomerans* possède 2 plasmides (Figure 5.7). La souche a été récemment transformée avec un plasmide intégratif contenant la GFP confirmant sa forme en bâtonnet (Figure 5.8) et permettant de repérer la bactérie dans le blé à la fois dans les tissus végétatifs et dans la graine. En effet, sa présence dans la graine signifie que *P. agglomerans* est à transmission verticale mais sa localisation précise dans la graine ou sur celle-ci (spermosphère) n'est pas connue. *P. agglomerans* est cultivable dans les mêmes conditions que les 2 souches diazotrophes isolées à savoir *P. urmiensis* et *E. ludwigii* c'est-à-dire dans un milieu minimal (milieu pour céréales Hoagland) additionné d'acide lactique (2%). Les caractéristiques de la courbe de croissance de *P. agglomerans*

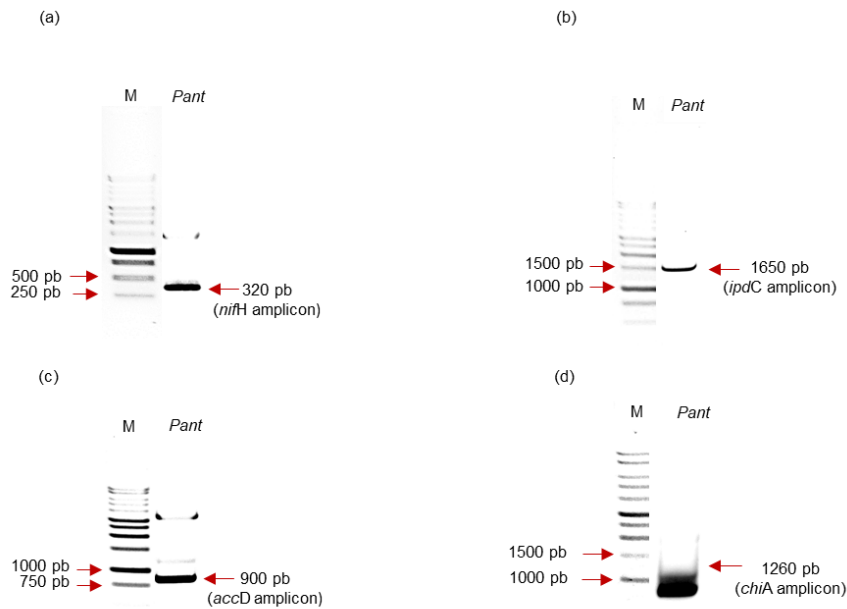


Figure 5.2. Caractérisation moléculaire de la souche bactérienne purifiée BPMP-PA-65 (*P. agglomerans*).

(a) *nifH* (320 pb), (b) *ipdC* (1650 pb), (c) *accD* (900 pb) et (d) *chiA* (1260 kb) sont les quatre gènes choisis car impliqués respectivement dans la fixation de l'azote atmosphérique, la synthèse de l'auxine, la tolérance contre le stress abiotique et la synthèse d'une chitinase possédant une forte activité antifongique. M : marqueur de longueur moléculaire de 1 kb. Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.5.

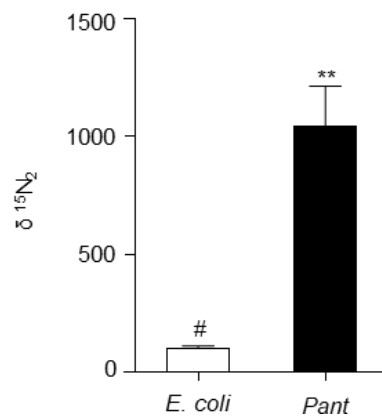


Figure 5.3 Capacité de fixation de l'azote de la souche bactérienne purifiée BPMP-PA-65 (*P. agglomerans*).

L'incorporation de $^{15}\text{N}_2$ a été utilisée pour évaluer la capacité de diazotrophie de la souche BPMP-PA-65 (*Pantoea agglomerans*) désignée « *Pant* ». La souche *E. coli* a été utilisée comme contrôle négatif. La phase gazeuse (6 ml) au-dessus de la suspension bactérienne (3 ml) contenait environ 16 % de $^{15}\text{N}_2$, 65 % de $^{14}\text{N}_2$ et 18 % d' O_2 . Les cellules ont été centrifugées après 5 jours d'incubation (37°C, 200 rpm) et le $\delta^{15}\text{N}_2$ dans les culots bactériens a été déterminé. Moyenne \pm SE (n = 3). ** au-dessus des barres indiquent que la différence avec *E. coli* (#) est statistiquement significative (Student's t-Test, P < 0,01).

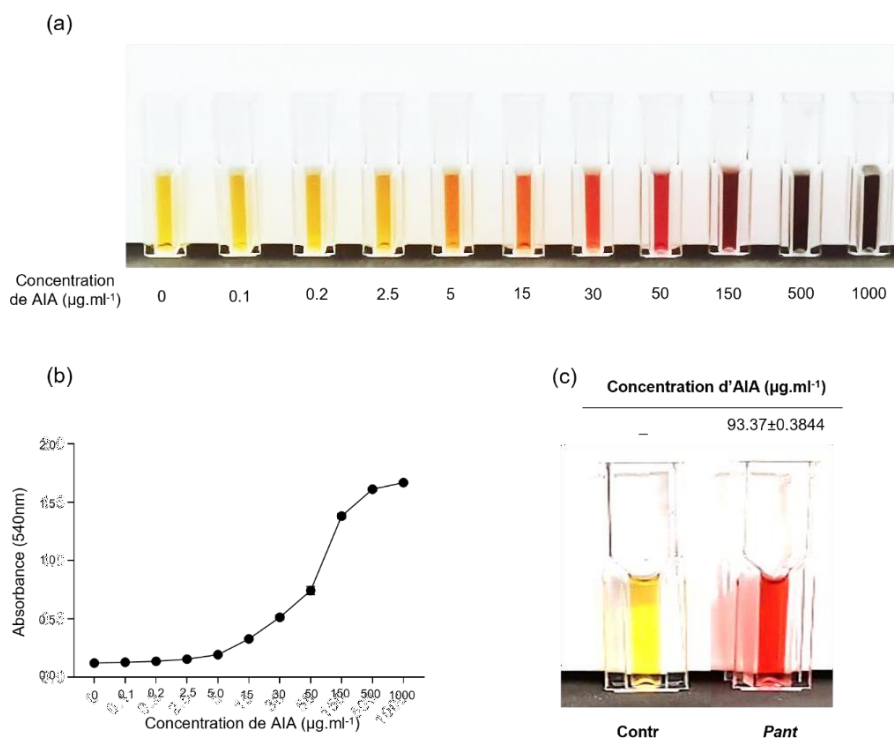


Figure 5.4. Test de la production d'AIA par de la souche bactérienne purifiée *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*).

Le protocole de ce test est détaillé dans le chapitre 2 (Cf. § 2.11.2). Les bactéries ont été cultivées pendant 48h dans du milieu LB additionné de tryptophane (0,2%). Témoin (contr) : même milieu mais sans bactérie. L'AIA a été dosé dans les milieux comme décrit ((Haque *et al.*, 2020) et (Gordon & Weber, 1951)).

La production d'AIA a été quantifiée à partir d'AIA commercial (Sigma-Aldrich) dans une plage de concentration de 0 à 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (a) par spectrophotométrie à 540 nm et a été comparée ensuite avec une courbe standard (b). Le développement de la couleur rose est un indicateur de la production d'auxine (a). Le marquage au-dessus de la cuvette (*Pant*) est la moyenne des trois expériences indépendantes \pm l'erreur standard.

(-) : Absence

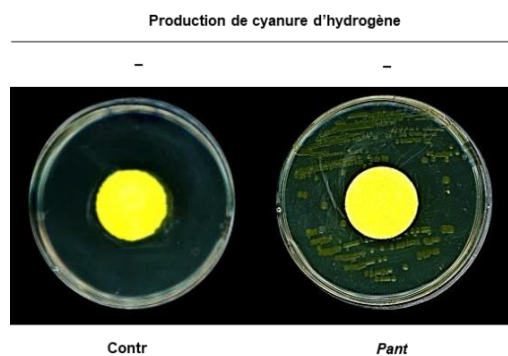


Figure 5.5. Production de cyanure d'hydrogène par de la souche bactérienne purifiée *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*).

La souche *BPMP-PA-65* (*Pant*) a été cultivée sur une boîte contenant du milieu LB gélosé additionné de glycine (0,25%). Témoin (contr) : boîte sans bactéries. La persistance de la couleur du jaune d'un morceau de papier filtre imbibé d'une solution alcaline de picrate et adhérant à la surface interne du couvercle indique l'absence de production de cyanure d'hydrogène.

(-) : Absence

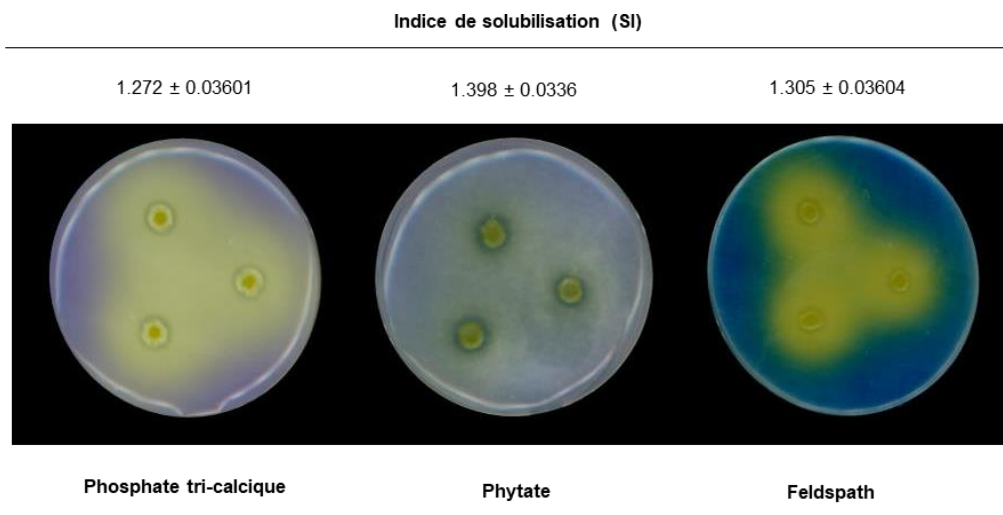


Figure 5.6. Évaluation de la capacité de la souche bactérienne purifiée *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*) à utiliser une source peu soluble de Pi (phosphate tricalcique ou phytate) ou Ki (feldspath).

Les bactéries se développent (tests en goutte) sur un milieu gélosé de Pikovskaya modifié, complémenté avec soit du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ou du phytate ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$) comme source de P peu soluble et additionné de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH. Le milieu d'Alexandrov modifié, complémenté avec du feldspath potassique (KAISi_3O_8) (potassium aluminosilicate, Potash Feldspar (Bath Potter's; Supplies, Somerset, UK) et du phosphate tricalcique comme sources de P et K, est quant à lui additionné de pourpre de bromothymol comme indicateur de pH (voir chapitre 2, Figure 2.7). Les bactéries sont cultivées pendant 5 jours à 28 °C. La croissance bactérienne entraîne une acidification du milieu, qui fait passer la couleur de l'indicateur de pH du violet au jaune. La capacité bactérienne à utiliser ces sources de nutriments peu disponibles a été évaluée comme décrit classiquement (Pande *et al.*, 2017 ; Rajawat *et al.*, 2016) par la détermination de l'indice de solubilisation (IS), basé sur la mesure du diamètre de la colonie bactérienne et le diamètre de la zone de halo autour de la colonie (voir chapitre 2, Figure 2.7). Une valeur SI supérieur à 1 indique la capacité bactérienne à solubiliser la source de nutriment. Moyenne ± SE (n = 3).

(a) *Pantoea agglomerans*

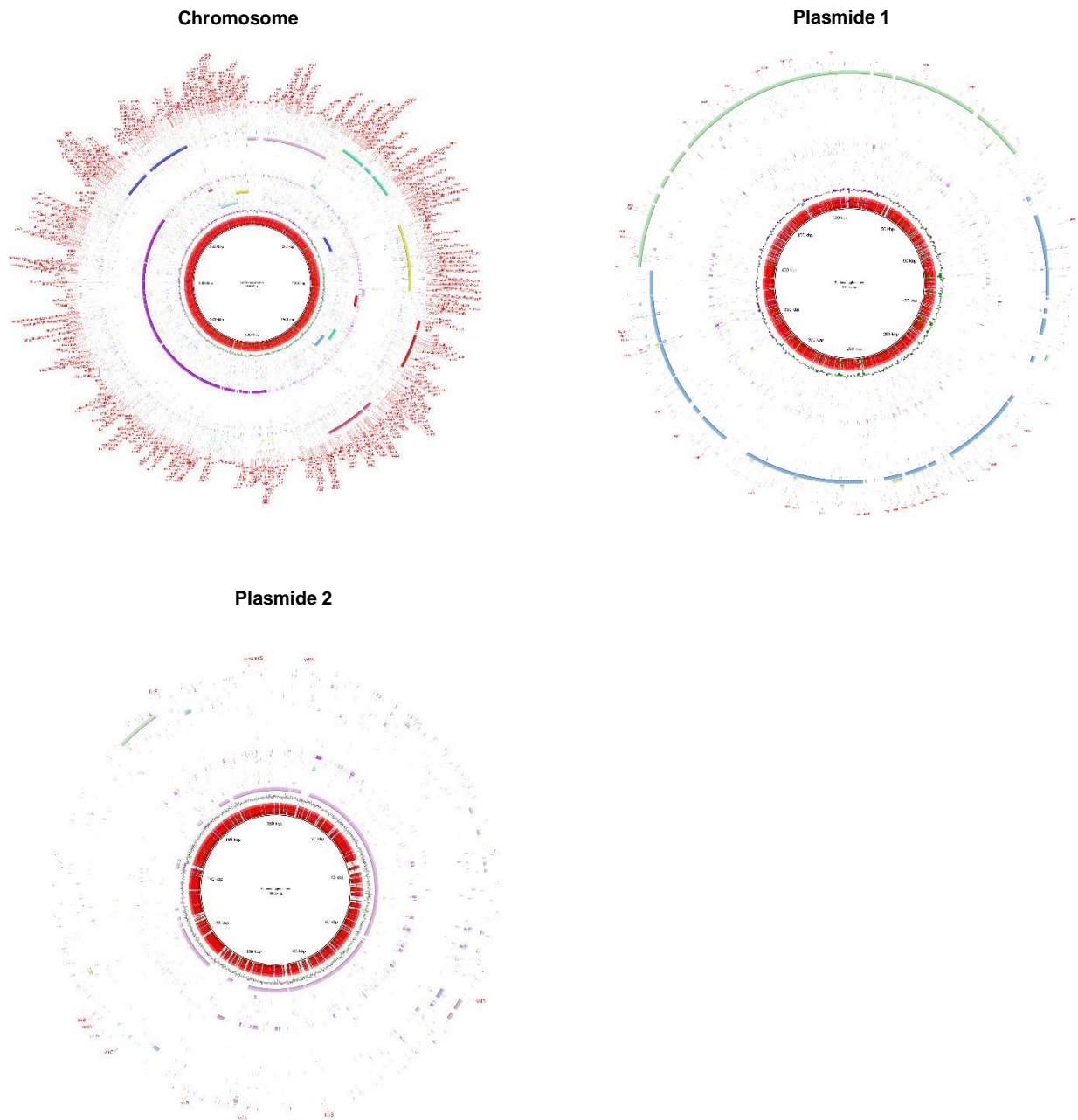


Figure 5.7. Cartes génomiques de la souche *BPMP-PA-65* purifiée (Cf. § 2.8).

Diagramme Blast Ring Image Generator (BRIG) montrant des segments homologues de chromosomes et de plasmides résultant du séquençage du génome BPMP-PA-65 (*Pantoea* sp.). Les séquences génomiques ont été blastées contre le génome de référence de *Pantoea agglomerans* (NZ_CP077366.1, NZ_CP077367.1, NZ_CP077368.1) de NCBI. Deux plasmides sont présents chez *P. agglomerans*.

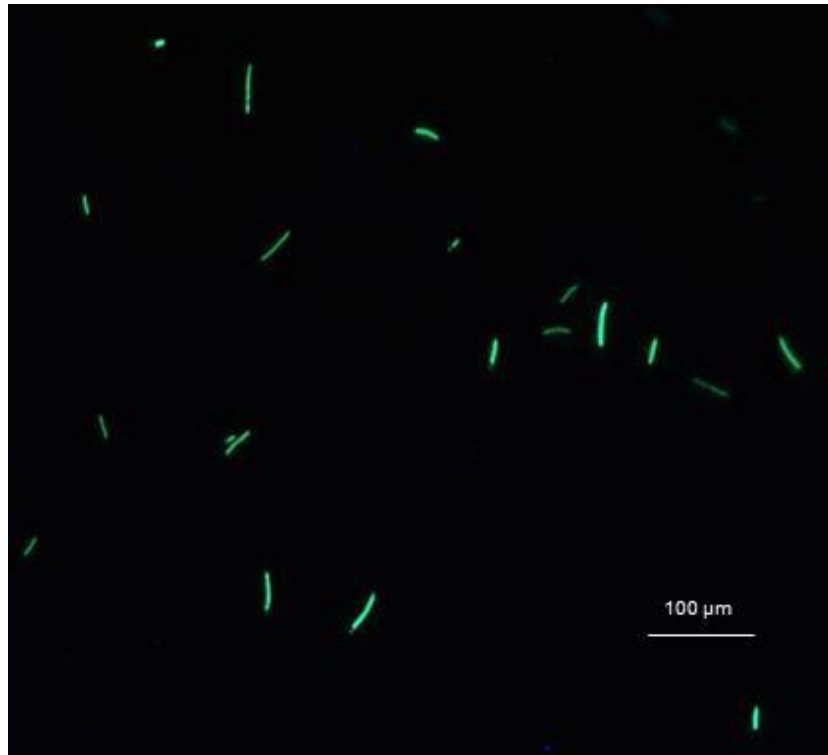


Figure 5.8. Transformation de l'endophyte *P. agglomerans* en vue de sa localisation in situ.

Micrographies en fluorescence de la souche *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*) transformée avec un plasmide intégratif contenant la GFP attTn7 : P(A1/04/03): GFPmut (Armbruster *et al.*, 2019) (Cf. § 2.13) et montrant la forme typique en bâtonnet. Cette microphotographie a été prise avec des cellules bactérienne cultivées dans un milieu LB sélectif supplémenté avec 50 mg. L⁻¹ de la kanamycine (Cf. § 2.13) en phase exponentielle de croissance (48 h). La microphotographie a été acquise en utilisant la microscopie à épifluorescence (microscope Olympus BX61 (100X)).

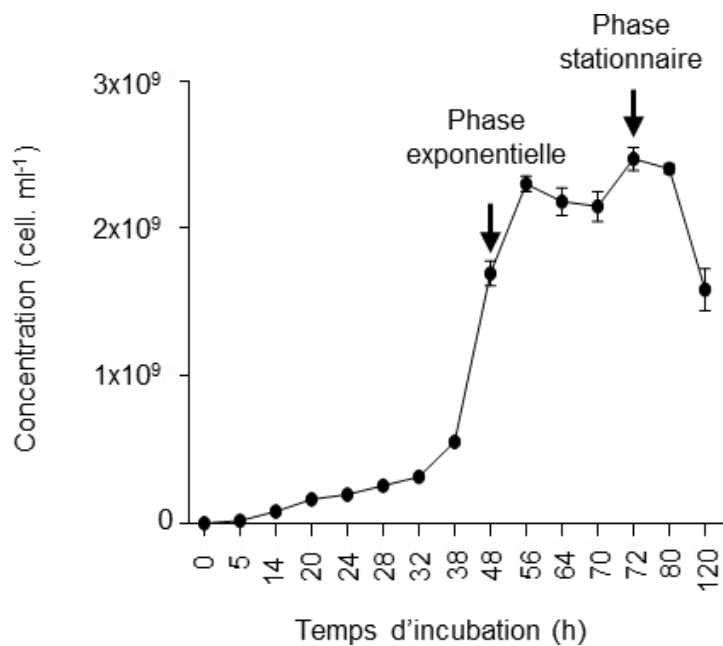


Figure 5.9. Croissance de *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*) dans un milieu minimal additionné de lactate comme source de carbone.

Composition du milieu de croissance : Solution de Hoagland additionnée de 2 % (env. 220 mM) de lactate, et tamponnée avec K_2HPO_4 / KH_2PO_3 200 mM (pH 6.5). Les bactéries ont été cultivées pendant 120 heures à 37°C et 200 tr/min. Cinétique de croissance typique de *BPMP-PA-65* (*P. agglomerans*). Les flèches au-dessus de la cinétique indiquent les moments pour lesquels les aliquotes du milieu de croissance ont été prises pour les analyses métabolomiques et protéomiques (en cours).

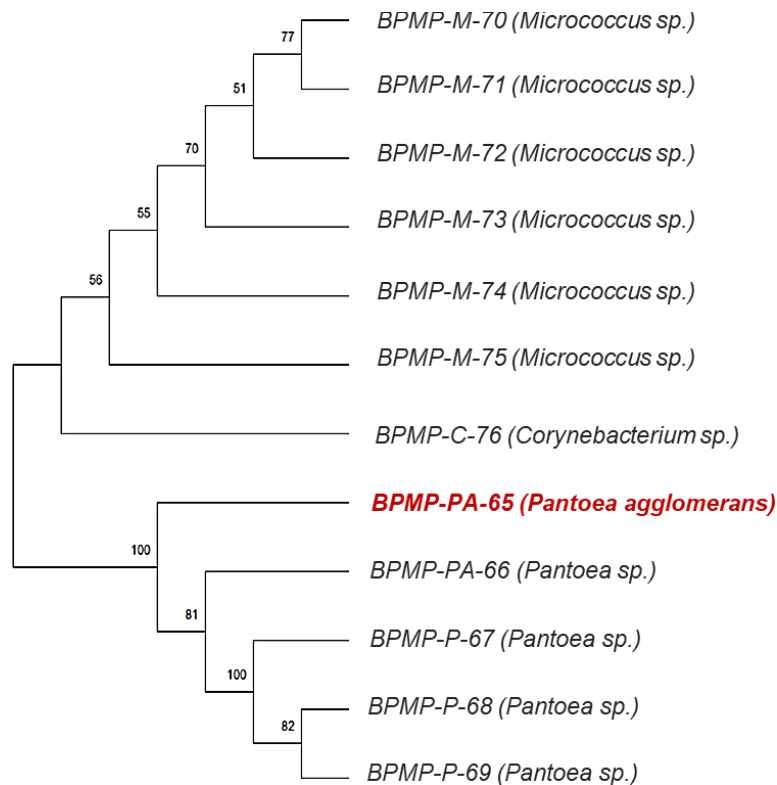


Figure 5.10. Dendrogramme des bactéries endophytes isolées de la graine de l'amidonniér sauvage (Ttd-NC-2019) identifié à Nabi-Chit (Liban).

Les séquences d'ARNr 16S ont été analysées et comparées grâce à EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) et à BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'alignement des séquences et la construction des arbres phylogénétiques ont été effectués via « Neighbor-Joining method » en utilisant le logiciel bio-informatique « MEGA » version 10.

La bactérie (BPMP-PA-65) marquée en rouge est une *Pantoea agglomerans*, purifiée à partir des exsudats racinaires de l'amidonniér sauvage (Ttd-NC-2019) non traité avec la tetracycline (voir figure 5.1).

Etape d'isolement : voir 2.8. Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.2.

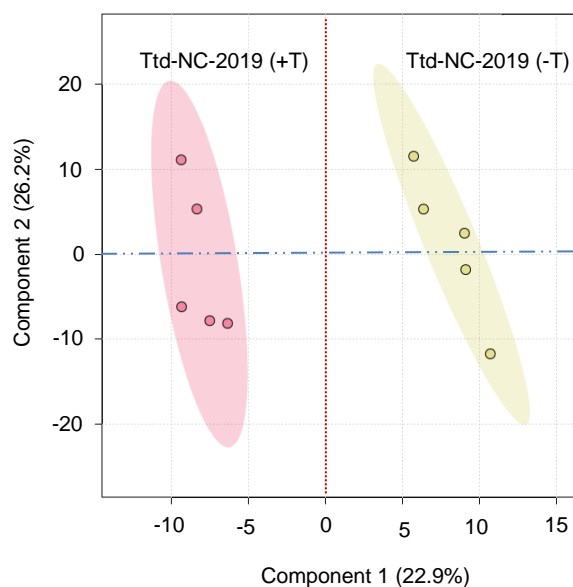


Figure 5.11. Analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) des métabolites présents dans les exsudats racinaires du blé *Ttd-NC-2019* traité ou non traité par la tétracycline (Cf. § 2.7).

La comparaison est effectuée entre les exsudats issus de l'amidonniér sauvage *Ttd-NC-2019* exposé à un traitement à la tétracycline (50 mg.L⁻¹) lors de l'étape de désinfection (+T), en absence de bactéries endophytes) ou non (-T) en présence des bactéries endophytes) (Díaz Herrera *et al.*, 2016). L'analyse (PLS-DA) a été réalisée par MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>).

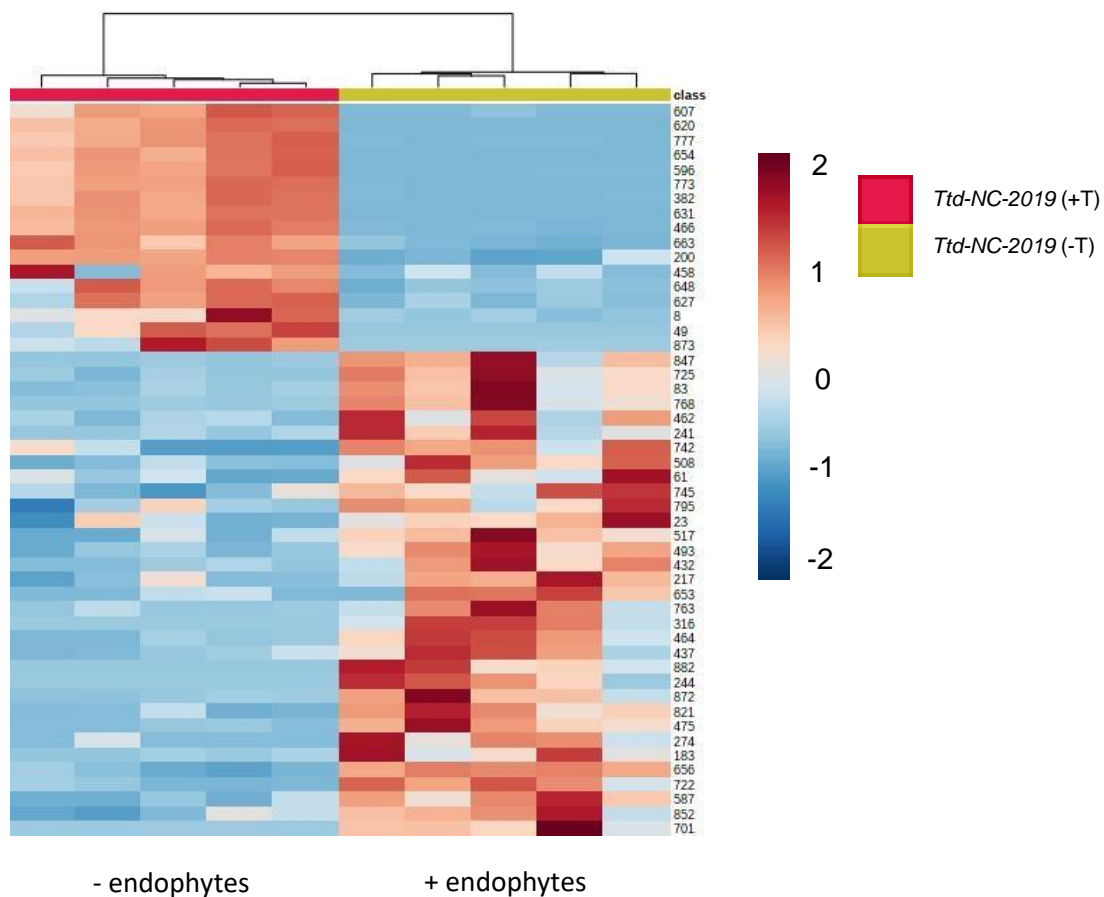


Figure 5.12. Carte de chaleur indiquant la distribution et l'abondance des 50 métabolites principaux (score ≥ 6) pour 5 réplicats d'exsudats racinaires de l'amidonner sauvage *Ttd-NC-2019* traité ou non traité par la tétracycline (Cf. § 2.7).

La carte de chaleur a été générée par MetaboAnalyst 5. (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>). Pour les détails voir § 2.7 et § 2.18.

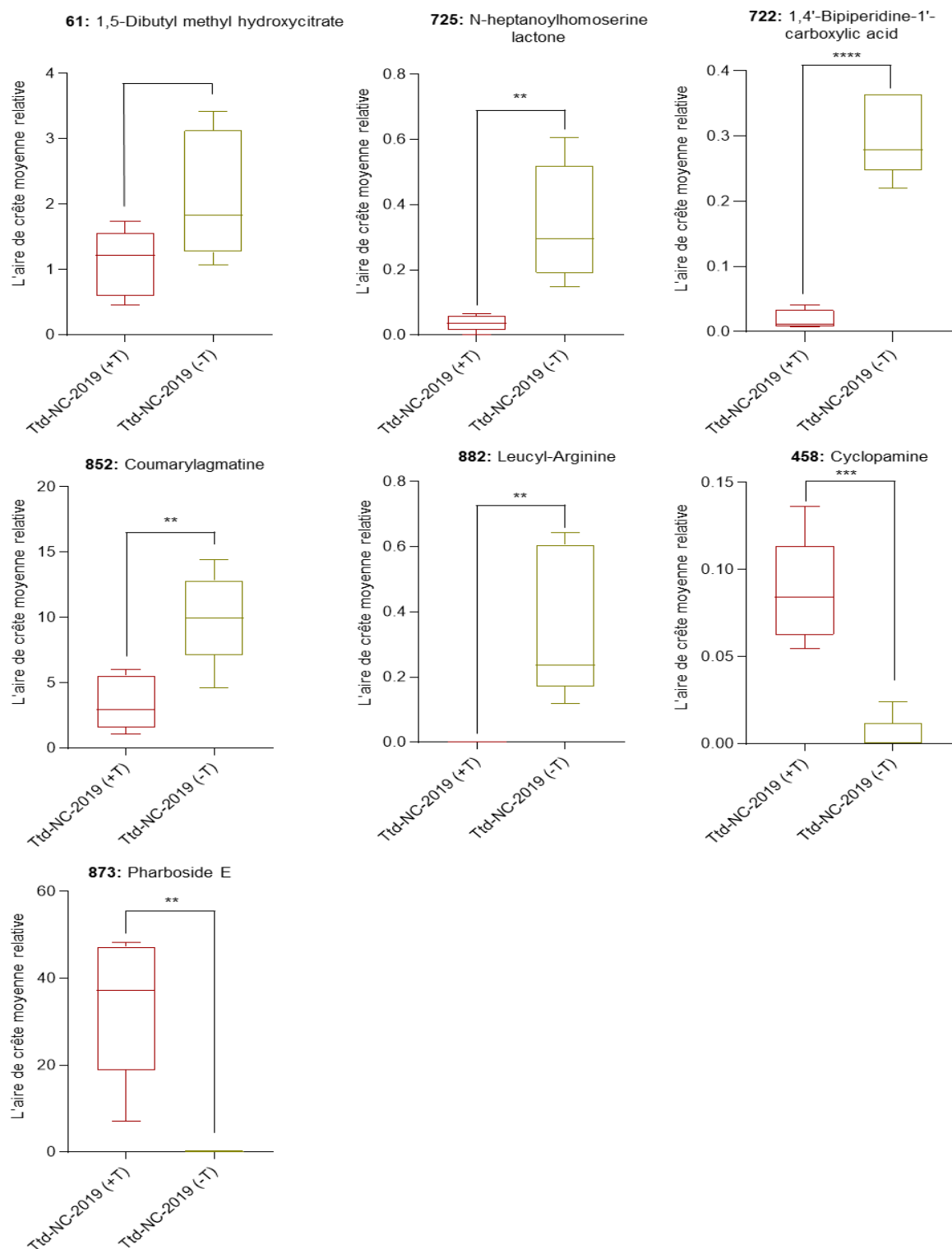


Figure 5.13. Boîtes à moustaches (Box plot) montrant la surface de crête relative moyenne (Relative Mean Peak Area) de quelques métabolites identifiés dans les exsudats racinaires chez l'amidonnier sauvage (*Ttd-NC-2019*) traité (+T) ou non traité (-T) par la tétracycline.

La surface de crête relative moyenne des composés est comparée en absence (+T) ou présence (-T) des bactéries endophytes. Les étoiles au-dessus des tracés indiquent des différences significatives (Student's t-Test, $P < 0,05$).

n'ont pas montré de différences majeures avec les souches diazotrophes *P. urmiensis* et *E. ludwigii* (Figure 5.9) sauf une croissance cependant plus lente que pour les 2 autres diazotrophes et à titre de comparaison les prélèvements des exsudats en phase stationnaire (en cours d'analyse) sont effectués à 72H au lieu de 40 et 48H pour *P. urmiensis* et *E. ludwigii* respectivement (Figure 5.9).

5.3.2. Présence de plusieurs endophytes dans le blé sauvage

Une recherche récente au niveau de ce blé sauvage a permis de mettre en évidence la présence d'endophytes potentielles additionnelles (stage M1 Zahraa Bourgi, IPSiM, équipe Ticer) appartenant à 3 genres différents *Micrococcus*, *Corynebacterium* et *Pantoea*. (Figure 5.10). Les genres *Micrococcus* et *Pantoea* sont sans doute représentés par plusieurs espèces. Les résultats montrés ci-dessous ne prennent en compte que partiellement ces nouvelles données comme l'effet PGPR sur le blé moderne qui a été testé avec seulement la première souche endophyte isolée *P. agglomerans*.

5.3.3. Analyse des exsudats de l'amidonniér sauvage en présence ou non de ses endophytes

Une analyse des exsudats de l'amidonniér sauvage en présence ou non de son endophyte a été réalisée. Comme évoqué précédemment, l'amidonniér a été traité après désinfection classique avec de la tétracycline pour lui ôter son(ses) endophyte(s). L'analyse partielle des moindres carrés discriminants (PLS-DA) (Figure 5.11) de tous les réplicats (5) des 2 conditions avec et sans endophyte(s) montre que la composante 1 expliquant 23% de la variance sépare très bien ces 2 conditions. De façon assez surprenante, la composante 2 expliquant malgré tout 26% de la variance révèle un éclatement des réplicats. L'analyse par carte de chaleur des 50 métabolites les plus discriminants entre les 2 conditions montre un contraste assez fort entre les 2 conditions avec plus de composés discriminants lorsque la plante est en présence d'endophyte(s) que sans endophyte(s). Malgré tout, l'abondance des métabolites en présence d'endophyte(s) semblent moins reproductible que sans endophyte(s) (Figure 5.12). L'analyse des métabolites racinaires exsudés par l'amidonniér sauvage sans endophyte(s) sont sans surprise conforme à ceux retrouvés lors des confrontations avec les autres sous-espèces du transect de domestication. Certains de ces métabolites (Annexe, Tableau 5.1) sont de nouveau des « marqueurs » de la

sous-espèce face à la présence d'endophyte(s) comme la quinine, la mesoporphyrine IX, le pharboside E ou encore mais dans une moindre mesure la cyclopatamine (Figure 5.13a, b).

5.3.4. Impact de l'endophyte *P. agglomerans* sélectionnée sur la croissance du blé élite Anvergur

P. agglomerans a été inoculée sur le blé élite cv. Anvergur sous limitation azotée seule ou en combinaison avec une ou l'ensemble des 2 souches diazotrophes *P. urmiensis* et *E. ludwigii*. L'effet sur la croissance et le développement a été enregistré jusqu'à la récolte. Des plantes non inoculées, sous contrainte azotée (250 $\mu\text{M NO}_3^-$) ou recevant une solution nutritive complète (11 mM d'azote) ont servi de contrôle négatif et positif respectivement. La surface foliaire et la hauteur des plantes ont été mesurées à 5 semaines (Figure 5.14) et à 16 semaines. Concernant la surface foliaire (SF), à 5 semaines, l'inoculation de *P. agglomerans* permet un gain de près de 40% par rapport au contrôle non inoculé. Pour comparaison, *P. urmiensis* seule augmente la SF de 50% et *E. ludwigii* de 34% (voir chapitre 7). La co-inoculation ne permet aucune synergie entre les souches puisque la double inoculation ne provoque qu'un gain entre 25% et 35% de la SF tout comme la triple inoculation. Si l'on compare maintenant avec le contrôle positif recevant la solution nutritive à 11mM d'azote, le stress est majeur (40 fois moins d'azote) puisque la SF du contrôle positif enregistre une augmentation de 260% (Figure 5.15a). La hauteur des plantes montre une augmentation avec l'inoculation mais le gain est plus de moitié moindre par rapport à la surface foliaire (Figure 5.15b). Le gain au niveau du nombre d'épillets est du même ordre que pour la hauteur et, là encore, les doubles inoculations n'apportent aucun bénéfice (Figure 5.15c). La masse de 1000 grains est aussi peu affectée par l'inoculation et le gain est au maximum de 17% pour une inoculation avec *P. urmiensis* (Figure 5.15d). Par contre la masse totale des grains par pot est affectée de façon équivalente à la surface foliaire avec un gain de l'ordre de 40% pour l'inoculation simple de *Pantoea* et un gain variant autour de 20-30% dans les co-inoculations (Figure 5.15e). L'azote de la plante est remobilisé durant le remplissage des grains et est transféré vers ces derniers. En comparant l'azote total des grains par pot, une estimation de l'apport d'azote par la/les bactérie(s) est possible. Lorsque *Pantoea* est inoculée seule, le gain d'azote total est de l'ordre de 50% comme pour *P. urmiensis* et monte à 70% pour *E. ludwigii* et jusqu'à 80% dans le cas de la co-inoculation avec

Plantes de 5 semaines

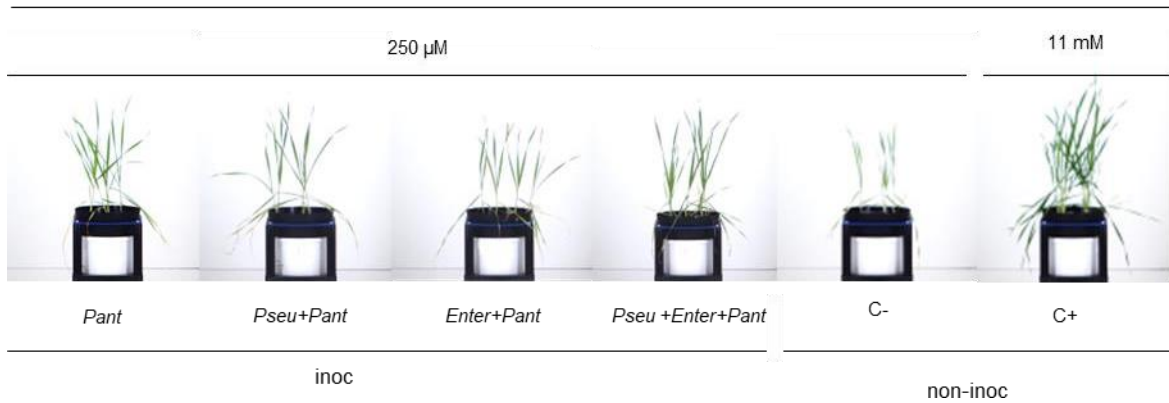


Figure 5.14. Photo montrant la croissance des plantes de blé dur élite « Anvergur » inoculées individuellement par la souche bactérienne *P. agglomerans* ou co-inoculée avec *P. urmiensis* ou *E. ludwigii* (Cf. § Chapitre 6 et 7) sous limitation azotée.

Après 5 semaines de culture (Etapes et conditions de la culture : voir § 2.14). Les plants de blé (cv. Anvergur) ont été imagés sur la plateforme PhenoArch. Les nutriments nécessaires à la croissance des plantes ont été apportés avec 2 solutions d'arrosage différentes, toutes issues du milieu Hoagland soit 250 µM d'azote assimilable (fourni sous forme de NO_3^-) pour les plantes inoculées ou non inoculées, contrôles "négatives", (C-), ou contenant 11 mM d'azote assimilable (10 mM NO_3^- et 1 mM NH_4^+) pour plantes non inoculées, contrôles positifs", (C+).

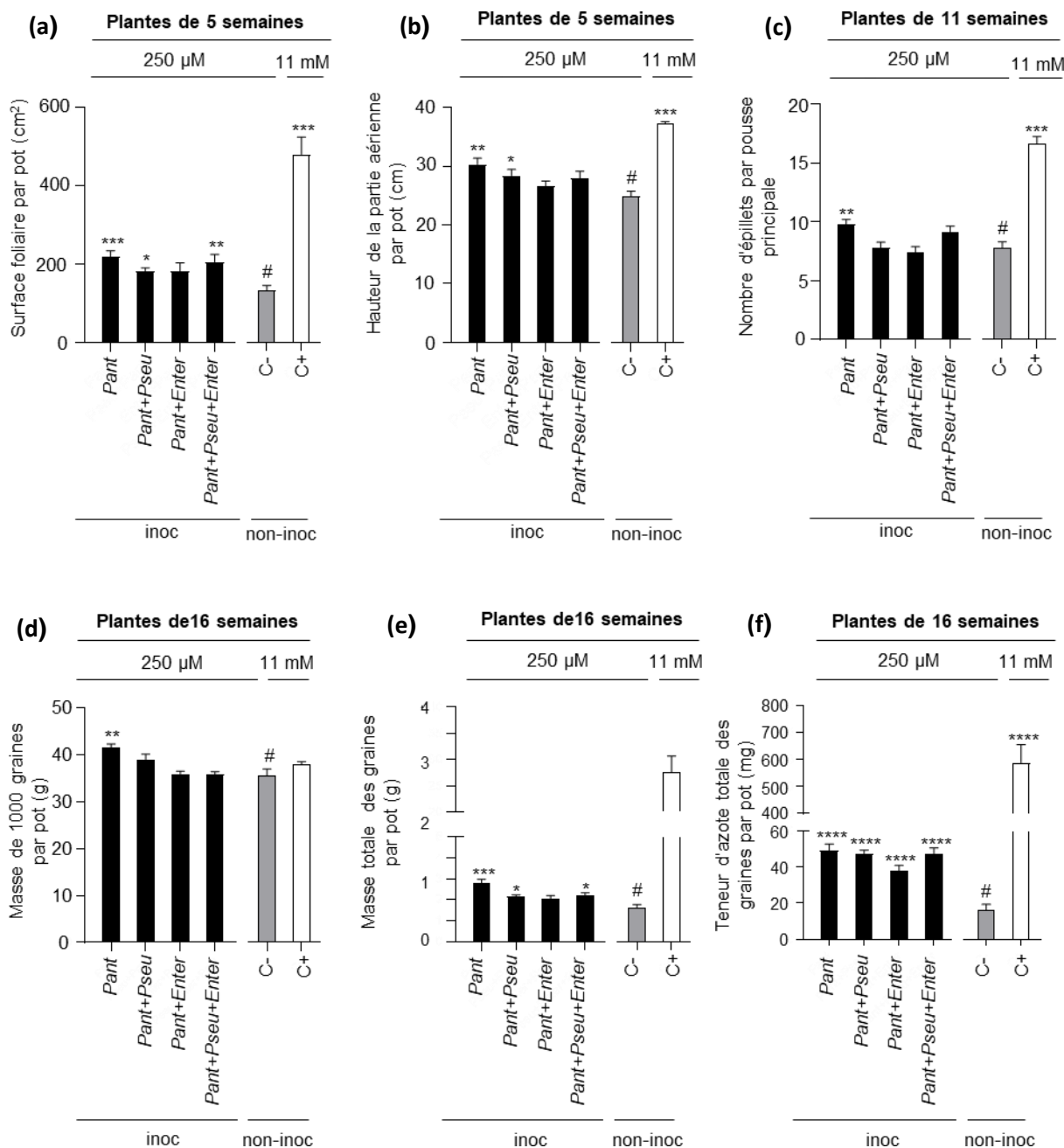


Figure 5.15. Effet de la co-inoculation de *BPMP-PA-65* (*Pantoea* sp.) avec *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas* sp.) et *BPMP-EL-40* (*Enterobacter* sp.) sur le développement des plantes sous faible disponibilité d'azote assimilable.

Les plantes du cultivar de blé dur Elite Anvergur ont été cultivées en serre dans des pots sur un substrat solide artificiel (6 pots par condition, 4 plantes par pot). Ils ont été inoculés avec *BPMP-PA-65* (*Pant*), ou co-inoculés soit avec *BPMP-PA-65* (*Pant*) + *BPMP-PU-28* (*Pseu*), *BPMP-PA-65* (*Pant*) + *BPMP-EL-40* (*Enter*) ou avec *BPMP-PA-65* (*Pant*) + *BPMP-PU-28* (*Pseu*) + *BPMP-EL-40* (*Enter*). *BPMP-PU-28* (*Pseu*) et *BPMP-EL-40* (*Enter*) sont deux bactéries diazotrophes isolées de la rhizosphère de l'amidonier sauvage *Ttd-NC-2019* (Cf. chapitre 6) ou non inoculé (non-inoc). Les nutriments nécessaires à la croissance des plantes ont été apportés avec 2 solutions d'arrosage différentes, toutes issues du milieu Hoagland soit 250 μ M d'azote assimilable (fourni sous forme de NO_3^-) pour les plantes inoculées (barres noires) ou non inoculées, contrôles "négatives", (C-, barres grises), ou contenant 11 mM d'azote assimilable (10 mM NO_3^- et 1 mM NH_4^+) pour plantes non inoculées, contrôles positifs", (C+, barres blanches). La surface foliaire et la hauteur de la plante ont été mesurées par la plateforme de phénotypage PhenoArch. (a) Surface foliaire de plantes âgées de 5 semaines. (b) Hauteur de la

plante (plantes âgées de 5 semaines). (c) Nombre d'épillets par pousse principale (plantes âgées de 11 semaines). (d) Masse de mille graines (plantes âgées de 16 semaines). (e) Masse totale de graines par pot. (f) Teneur en azote des graines (% par g de masse sèche). (h) Teneur en carbone des graines (% par g de DW). (i) Teneur totale en azote des graines (mg) par pot. Moyenne \pm SE (n = 6 pots). Les *, **, *** et **** au-dessus des barres indiquent que la différence avec la condition non inoculée sous limitation d'azote (#, contrôle négatif : C-) est statistiquement significative (test t de Student, $P \leq 0,05$, 0,01, 0,001 et 0,0001 respectivement).

les 3 bactéries. Si nous comparons au niveau du contrôle positif pour cette mesure, le gain est de 3420% par rapport au contrôle négatif, un gain au final beaucoup plus important que celui enregistré à 5 semaines concernant la surface foliaire (260%).

5.4. Discussion

La présence d'endophytes chez les espèces sauvages semble assez répandue et auraient un effet de protection contre les stress biotiques comme le stress hydrique (Llorens *et al.*, 2019). La caractérisation des colonies fongiques dans les tiges de blés sauvages ou apparentés révèle une construction de communautés assez différente de celles des blés cultivés avec des cooccurrences spécifiques (Sun *et al.*, 2020). L'hypothèse avancée serait la perte progressive de l'association avec les endophytes chez les espèces cultivées due à la fois à la dispersion loin de l'aire d'apparition de l'espèce et aux méthodes de sélection sur sols artificialisés où ces interactions ne sont pas recherchées. L'opportunité de comparer les métabolites d'une espèce sauvage en présence ou non de son (ses) endophyte(s) peut nous renseigner sur l'impact de la présence de cette endophyte sur le profil d'exsudation racinaire.

Certains métabolites sont prépondérants lorsque l'endophyte est présente comme la coumaroylagmatine, le 1,5-dibutyl methyl hydroxycitrate, l'acide 1,4'-bipiperidine-1'-carboxylique ou le dipeptide Leucine-arginine (Figure 5.13c, d, e, g). La coumaroylagmatine (CA) provient de la complexation de l'acide coumarique, dérivé de la phénylalanine et de l'agmatine, dérivée, elle, de l'arginine. La CA est fortement induite par un traitement au jasmonate et fonctionne comme une phytoalexine. Formant un hétérodimère avec la feruloylagmatine pour donner l'hordatine, elle agit en tant que puissant antifongique. La CA est impliquée dans la résistance chez le blé liée au gène *Lr34* (Lee *et al.*, 1997; Bucher, 2016, thèse de doctorat). De façon remarquable, la N-heptanoylhomoserine lactone (HHSL) a été identifiée lorsque le blé contient son endophyte (Figure 5.13f). La HHSL est une N-acyl homoserine lactone (AHL) impliquée dans le quorum sensing (QS) chez les bactéries. Le terme "quorum sensing" (QS) décrit le phénomène de coopération intercellulaire des bactéries utilisé pour coordonner les activités des cellules individuelles. Les molécules du QS jouent un rôle crucial dans la transduction du signal et lorsqu'une concentration seuil est atteinte, ces molécules peuvent coordonner l'expression de plusieurs gènes et

modifier le comportement de la population bactérienne par l'activation de protéines régulatrices (Liu *et al.*, 2015). Dans l'analyse des exsudats bactériens de *P. urmiensis* et *E. ludwigii*, la N-tetradecenoyl-L-homoserine lactone, autre AHL impliquée elle aussi dans le QS avait été identifiée (voir chapitre 7).

Les endophytes microbiens, champignons ou bactéries, ont été définis comme des micro-organismes ayant la capacité de coloniser et de survivre dans les tissus internes des plantes sans causer de dommages à l'hôte (Hallmann *et al.* 1997). Ils sont ainsi isolés après stérilisation de la surface de tissus végétaux de plantes saines. Le prototype de l'endophyte est imprévisible puisque les différentes souches d'une même espèce bactérienne n'ont pas la même capacité à coloniser les tissus internes d'une plante donnée. Par exemple, *Azospirillum brasilense*, PGPR largement étudiée comporte des souches rhizosphériques et d'autres sont endophytiques (Baldani *et al.*, 1997). Chez le peuplier, la richesse en bactéries endophytiques est dominée par les Gammaproteobacteria (54 %) et Alphaproteobacteria (23 %) et cette richesse est dix fois plus faible que celle présente dans la rhizosphère associée aux racines qu'elle est dominée par des Acidobacteria (31 %) et des Alphaproteobacteria (30 %) (Gottel *et al.*, 2011). Cette diversité est aussi sensible à différents facteurs et à long terme l'application d'herbicides ou d'engrais influencent cette communauté endophytique (Seghers *et al.*, 2004). La communauté des bactéries endophytes des graines de maïs domestiqué et celle de son ancêtre, la téosinte, récoltées dans différentes régions n'ont pas montré de différence significative dans leur diversité endophytique mais varient en fonction de la phylogénie des cultivars. Un noyau d'endophytes composé de 5 genres cultivables, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Clostridium* et *Paenibacillus*, s'est avéré contribuer de manière significative aux traits endophytiques les plus conservés chez le maïs (Johnston-Monje et Raizada 2011).

Nos données montrent que *Pantoea sp.* a un effet PGPR sur le blé élite et donc que ce blé élite est capable d'interagir avec de nombreuses diazotrophes puisqu'il a été montré pouvant interagir avec les souches *E. ludwigii* et *P. urmiensis*. *P. agglomerans* n'est pas la seule endophyte présente dans le blé dicoccoides de Nabi Chit puisque 2 autres genres d'endophytes ont été détectés à savoir *Micrococcus*, *Corynebacterium* et *Pantoea*. Ces 3 genres sont connus pour contenir des endophytes. Il est intéressant de noter que seul ce blé dicoccoides de Nabi Chit a montré une contamination récurrente et les premiers blés utilisés pour l'exsudation racinaire de la core collection

de l'EPO (>20) n'ont pas révélé la présence de contaminants « cultivables » sur LB. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à stériliser l'ensemble des accessions du transect de domestication. Il est aussi important de noter que la désinfection est possible uniquement si nous disposons d'épis non battus, l'étape de battage facilite la dispersion des spores dans des endroits difficiles à désinfecter comme le sillon central de la graine.

P. agglomerans a montré un gain de croissance et une augmentation de l'azote total dans les graines du même ordre de grandeur que les autres bactéries diazotrophes rhizosphériques. Ce gain apporté par les diazotrophes est au final bonifié par l'azote total transféré qui peut atteindre 80% par rapport au contrôle non inoculé. Malgré tout, ces bactéries ne couvrent pas les besoins pour atteindre le rendement obtenu avec une solution nutritive optimisée mais peuvent par ailleurs contribuer à bénéficier à la plante au travers des nombreux traits PGPR (synthèse hormonale, protection contre les pathogènes...).

Chapitre 6

Sélection des souches bactériennes PGPR fixatrices d'azote (complément introductif de l'article, chap. 7)

6.1. Introduction

Comme évoqué dans les chapitres précédents, le sol du croissant fertile renferme un microbiote ayant co-évolué pendant des milliers d'années avec les blés ancestraux. Notre hypothèse est que parmi ce microbiote peut se trouver des bactéries et champignons particulièrement bénéfiques pour la croissance et le développement du blé. Les migrations humaines et la sélection de traits phénotypiques avantageux dans la domestication accompagnée de l'utilisation massive d'intrants ont pu faire perdre aux blés modernes certaines capacités à interagir avec le microbiote en impactant sa principale voie de communication avec les organismes telluriques à savoir l'exsudation racinaire.

6.2. Matériel et méthodes

Nous avons fait pousser l'amidonier sauvage (*T.t. dicoccoides*, *Ttd-NC-2019*) identifié dans une zone refuge du croissant fertile (Liban) dans 2 types de sol, son sol d'origine (Nabi Chit, Bekaa, Liban (NC)) et un sol de référence (Domaine de Melgueil, Mauguio, France, (M)). Le sol rhizosphérique et les radicelles associées ont été broyées et ont représenté le matériel de départ pour l'isolement des bactéries (voir chapitre 2, Figure 2.6). Cet échantillon a ensuite été déposé sur un milieu de sélection des bactéries diazotrophes (NFb) déplété en azote.

Après 5 repiquages sur ce milieu (Figure 6.1), une dilution en série sur un milieu NFb additionné d'extrait de levure a permis d'isoler des colonies individuelles. Celles-ci ont été repiquées sur milieu LB puis un stock de chacune d'entre elles a été réalisé et stocké à -80°C.

Les protocoles de la caractérisation moléculaire et biochimiques sont détaillés dans la partie 2.10 et 2.11 et respectivement.

6.3. Résultats et discussion

6.3.1. Isolement et caractérisation de souches diazotrophes dans 2 types de sol

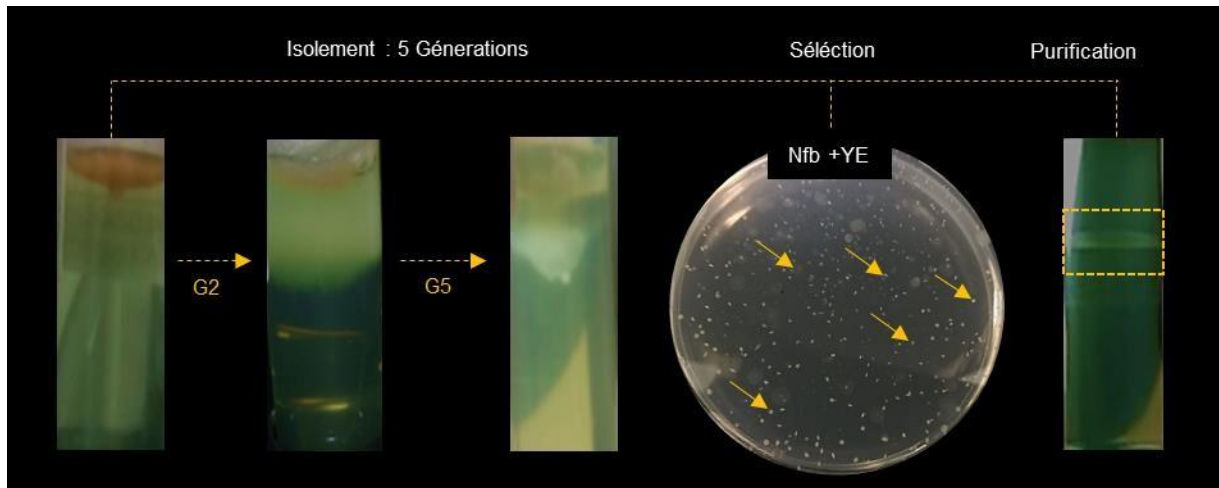


Figure 6.1. Premières étapes de la sélection des bactéries diazotrophes présentes dans la rhizosphère de l'amidonnier sauvage cultivé sur deux types de sol.

Après la croissance de l'amidonnier sauvage pendant 5 semaines sur deux types de sol, un issu du Croissant fertile (Nabi-Chit, Liban) et l'autre hors de cette zone (Mauguio, France), les plantes ont été arrachées et la terre adhérent aux racines ainsi que les radicelles ont été broyées. Le mélange a été ensuite déposé sur un milieu semi-solide déplété en azote (NFb). Après cinq repiquages sur le même milieu, une aliquote a été déposée sur un milieu solide supplémenté avec de l'extrait de levure en boîte de Petri afin d'obtenir des colonies individualisées. Les colonies présentant un phénotype différent (couleur, marges et aspect de la colonie) ont été remises individuellement en culture sur milieu NFb afin de vérifier leur compétence à pousser en milieu sans azote.

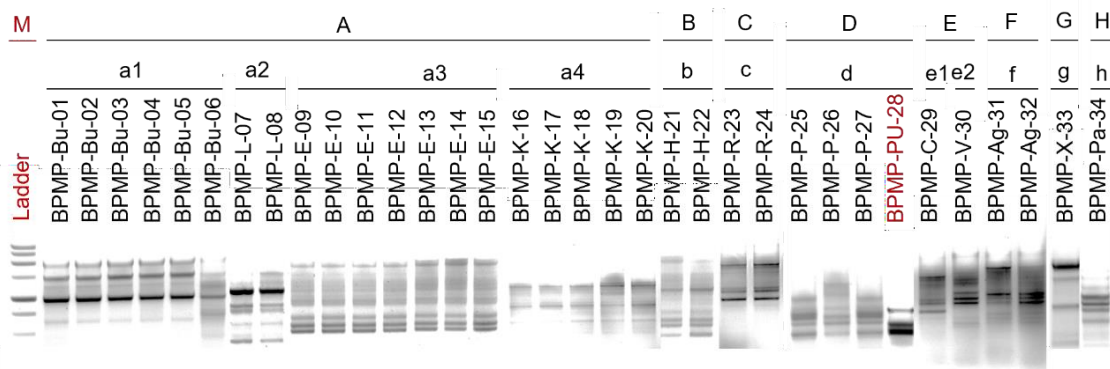


Figure 6.2. Caractérisation moléculaire des amplicons *Box-A1R* des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de l'amidonner sauvage cultivé dans le sol du Nabi-Chit (Liban).

Profil des amplicons *Box-A1R* de chaque souche bactérienne isolée avec leur code généré au laboratoire. Le puit M représente le marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA ladder, Promega, USA).

Les souches bactériennes sont regroupées selon leur famille ainsi que leur genre. Les différentes familles des bactéries isolées (*Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Lysobacteraceae* et *Paenibacillaceae*) sont représentées par les lettres A, B, C, D, E, F, G, H respectivement. Les genres des souches liées à chaque famille sont représentés par les petites lettres. Pour la famille A (*Enterobacteriaceae*), a1 (*Buttiauxella* sp.), a2 (*Lelliottia* sp.), a3 (*Enterobacter* sp.), a4 (*Klebsiella* sp.). Pour la famille B (*Hafniaceae*), b (*Hafnia* sp.). Pour la famille C (*Yersiniaceae*), c (*Rahnella* sp.). Pour la famille D (*Pseudomonadaceae*), d (*Pseudomonas* sp.). Pour la famille E (*Comamonadaceae*), e1 (*Comamonas* sp.) et e2 (*Variovorax* sp.). Pour la famille F (*Rhizobiaceae*), f (*Agrobacterium* sp.), Pour la famille G (*Lysobacteraceae*), g (*Xanthomonas* sp.). Pour la famille H (*Paenibacillaceae*), h (*Paenibacillus* sp.). Les sous-groupes au sein des familles présentent des similarités plus ou moins fortes dans leur profil d'amplification *BOX-A1R*.

La bactérie (BPMP-PU-28) marquée en rouge est une *Pseudomonas urmiensis* suite au séquençage de son génome complet. Elle a été sélectionnée pour la suite des expériences.

Les genres ont été identifiés après l'analyse des séquences d'ARNr 16S (Figure 6.5.a) grâce à un logiciel bio-informatique EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) et à BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.2.

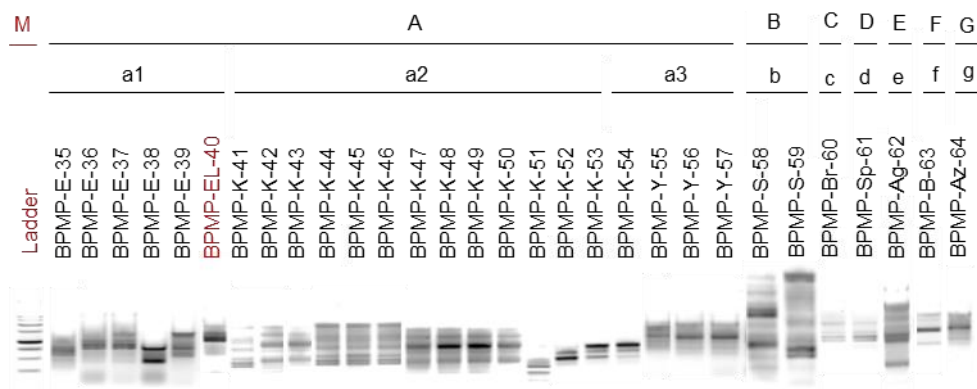


Figure 6.3. Caractérisation moléculaire des amplicons *Box-A1R* des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de l'amidonniér sauvage cultivées dans le sol de Mauguio (France).

Profil des amplicons *Box-A1R* de chaque souche bactérienne isolée avec leur code généré au laboratoire. Le puit M représente le marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA ladder, Promega, USA).

Les souches bactériennes sont regroupées selon leur famille ainsi que leur genre. Les différentes familles des bactéries isolées (*Enterobacteriaceae*, *Lysobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Rhizobiacea*, *Bacillaceae* et *Azospirillaceae*) sont représentées par les lettres A, B, C, D, E, F, G respectivement. Les genres des souches liées à chaque famille sont représentés par les petites lettres. Pour la famille A (*Enterobacteriaceae*), a1 (*Enterobacter* sp.), a2 (*Klebsiella* sp.), a3 (*Yokenella* sp.). Pour la famille B (*Lysobacteraceae*), b (*Stenotrophomonas* sp.). Pour la famille C (*Caulobacteraceae*), c (*Brevundimonas* sp.). Pour la famille D (*Sphingomonadaceae*), d (*Sphingobium* sp.). Pour la famille E (*Rhizobiacea*), e (*Agrobacterium* sp.). Pour la famille F (*Bacillaceae*), f (*Bacillus* sp.). Pour la famille G (*Azospirillaceae*), g (*Azospirillum* sp.). Les sous-groupes au sein des familles présentent des similarités plus ou moins fortes dans leur profil d'amplification *BOX-A1R*.

La bactérie (*BPMP-EL-40*) marquée en rouge est une *Enterobacter ludwigii* suite au séquençage de son génome complet. Elle a été sélectionnée pour la suite des expériences.

Les genres ont été identifiés après l'analyse des séquences d'ARNr 16S (Figure 6.5.b.) grâce à un logiciel bio-informatique EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) et à BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.2.

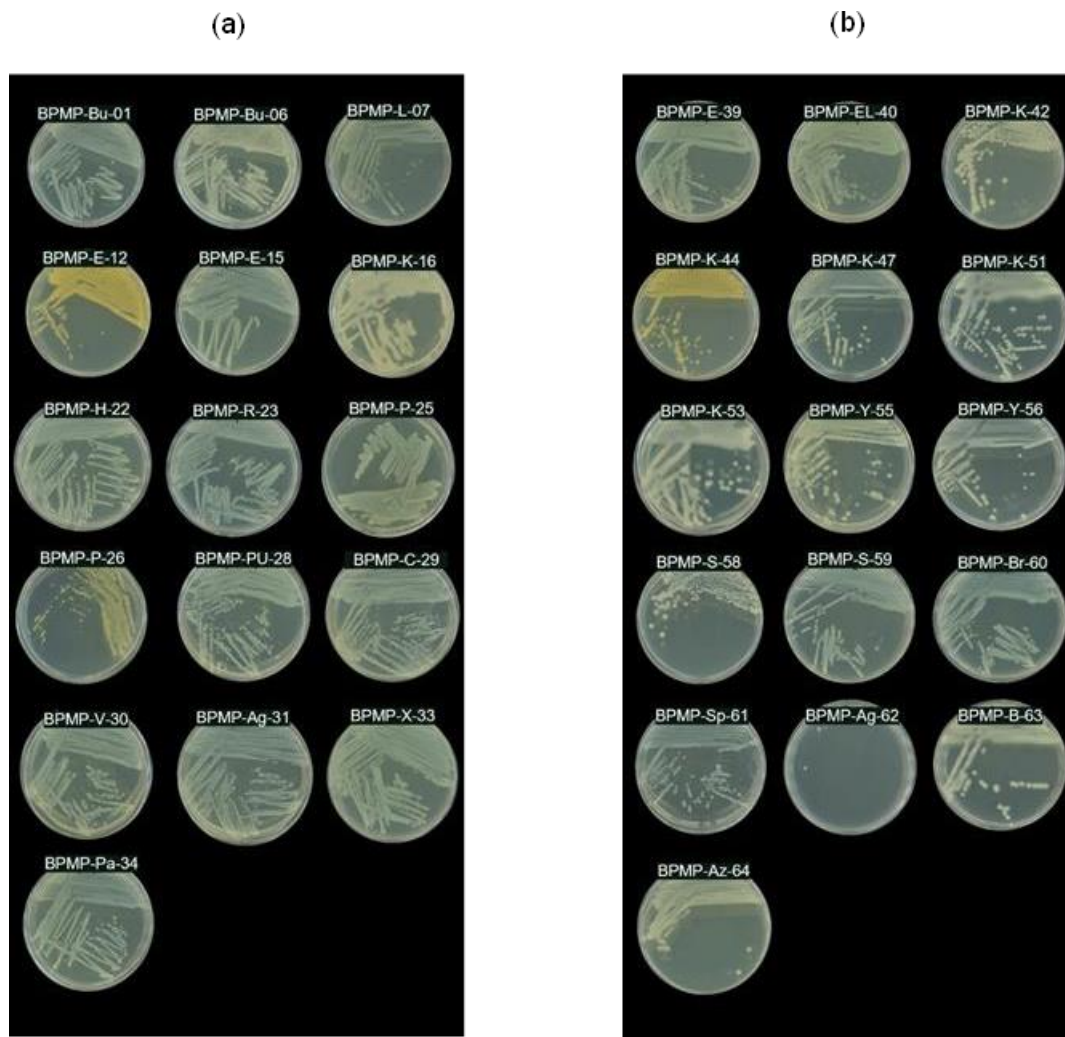
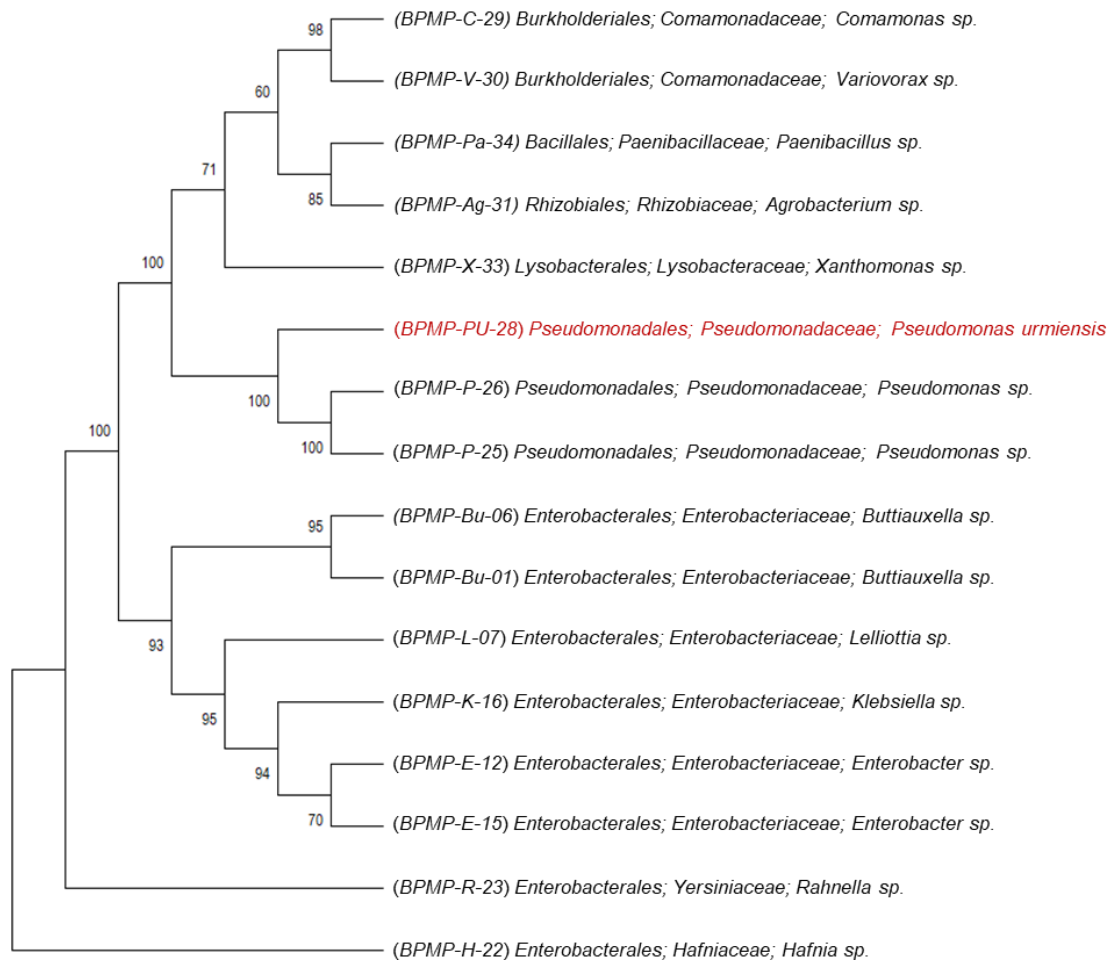


Figure 6.4. Phénotype des bactéries diazotrophes isolées (a) du sol du Nabi-Chit (Liban) et (b) du sol de Mauguio (France) après la première sélection issue des profils des amplicons *Box-A1R* (Cf. Figure 6.2 et 6.3).

Une colonie bactérienne de chaque souche isolée a été étalée par stries croisées sur milieu LB de façon à obtenir des colonies purifiées après 24 heures d'incubation à 37 °C.

L'ensemble des bactéries isolées, a été mis en culture pure sur milieu NFb et l'observation de l'apparition d'un disque de bactéries à une profondeur variable dans le milieu semi-solide a permis de confirmer que les bactéries isolées étaient probablement diazotrophes (Figure 6.1). La validation du statut de diazotrophe a été réalisée avec la fixation de $^{15}\text{N}_2$ sur seulement quelques souches (voir chapitre 5 et 7). Afin de discriminer les bactéries entre elles et éviter les redondances, le profil des amplicons *BoxA1R* a été réalisé pour les souches des 2 sols. La Figure 6.2 montre les profils *BoxA1R* pour les bactéries issues du sol de Nabi-Chit. Le séquençage d'ADNr 16S a permis de regrouper des souches en 8 familles (*Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Lysobacteraceae* et *Paenibacillaceae*) et 12 genres (*Buttiauxella*, *Lelliottia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Variovorax*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus*). Certaines de ces familles et genres sont répertoriés comme contenant des diazotrophes et agissent comme PGPR. La Figure 6.3 (pendant de la Figure 6.2) montre les profils *BoxA1R* pour les bactéries issues du sol de Mauguio. Dans ce sol, des bactéries appartenant à 7 familles (*Enterobacteriaceae*, *Lysobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Bacillaceae* et *Azospirillaceae*) et 9 genres différents (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yokenella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Azospirillum*) ont pu être isolées. Là encore les familles et genres hébergent des diazotrophes à effet PGPR. De façon remarquable seulement 3 familles et 3 genres sont en commun entre les 2 sols qui ont des caractéristiques physico-chimiques assez proches (voir Tableau 2.1). Les précédents culturaux, prairie sauvage pour le sol de Nabi Chit et blé pour le sol de Mauguio ont pu influencer sur l'abondance relative de certaines souches alors plus facilement repérable ensuite dans la rhizosphère de l'amidonier sauvage. La Figure 6.4 illustre les différences de couleur et d'aspect des colonies (marges plus ou moins diffuses) du panel de bactéries isolées. Une caractérisation de traits PGPR a ensuite été réalisée sur l'ensemble de ces souches en particulier leur aptitude à croître sur un milieu avec une source minérale (P, K) peu soluble (phosphate de calcium, feldspath) ou nécessitant des enzymes particulières (phytases). La présence du gène *nifH* codant pour un composant de la nitrogénase, le gène *ipdC* impliqué dans la synthèse d'auxine, le gène *accD* impliqué dans l'adaptation aux stress abiotiques (stress hydrique) et le gène *chiA* codant pour une chitinase à forte activité antifongique.

(a)



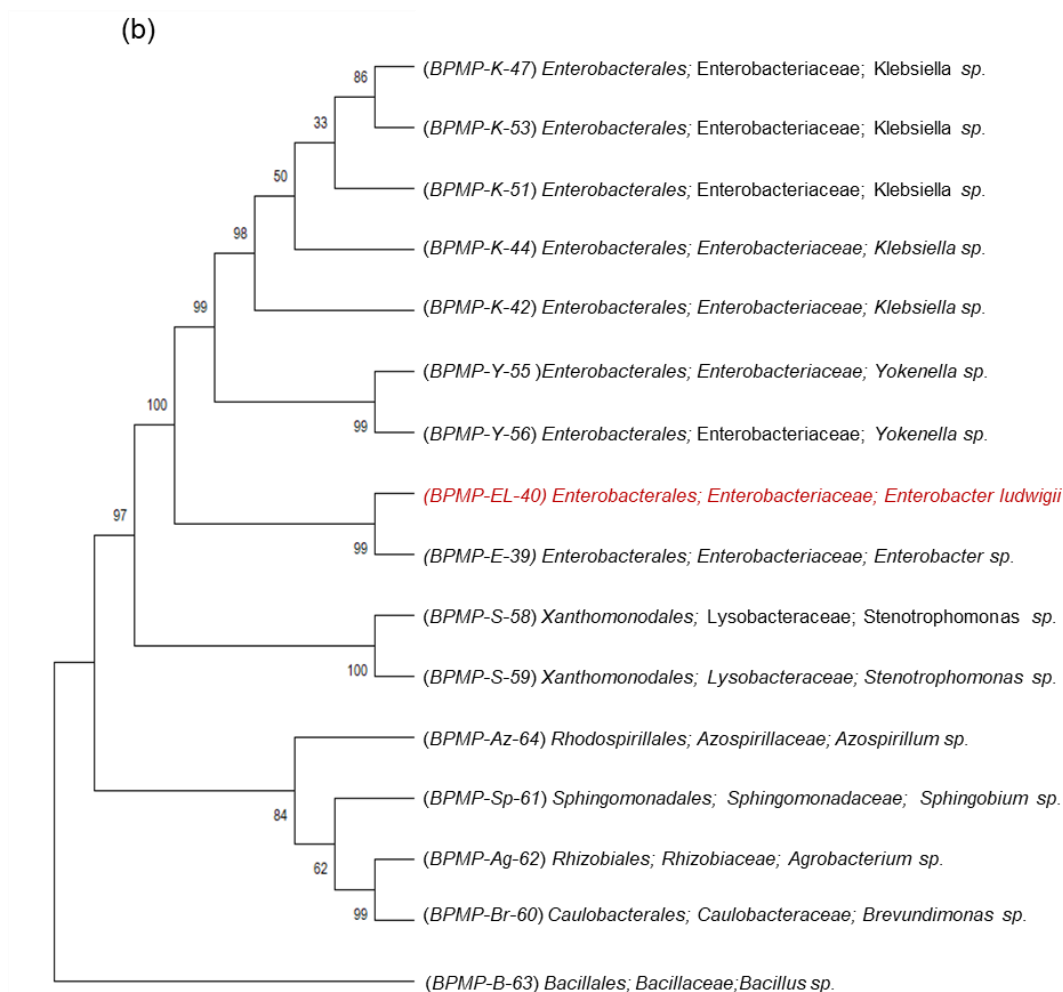


Figure 6.5. Dendrogramme des bactéries diazotrophes isolées de la rhizosphère de l'amidonner sauvage cultivé dans (a) le sol de Nabi-Chit (Liban) et (b) le sol de Mauguio (France) basé sur les séquences du gène ARNr 16S et la sélection d'après la comparaison des profils des amplicons *BOX-A1R* (Cf. Figure 6.2 et 6.3).

Les séquences d'ARNr 16S ont été analysées et comparées grâce à EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) et à BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'alignement des séquences et la construction des arbres phylogénétiques ont été effectués via « Neighbor-Joining method » en utilisant le logiciel bio-informatique « MEGA » version 10.

Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.3 et 2.10.4.

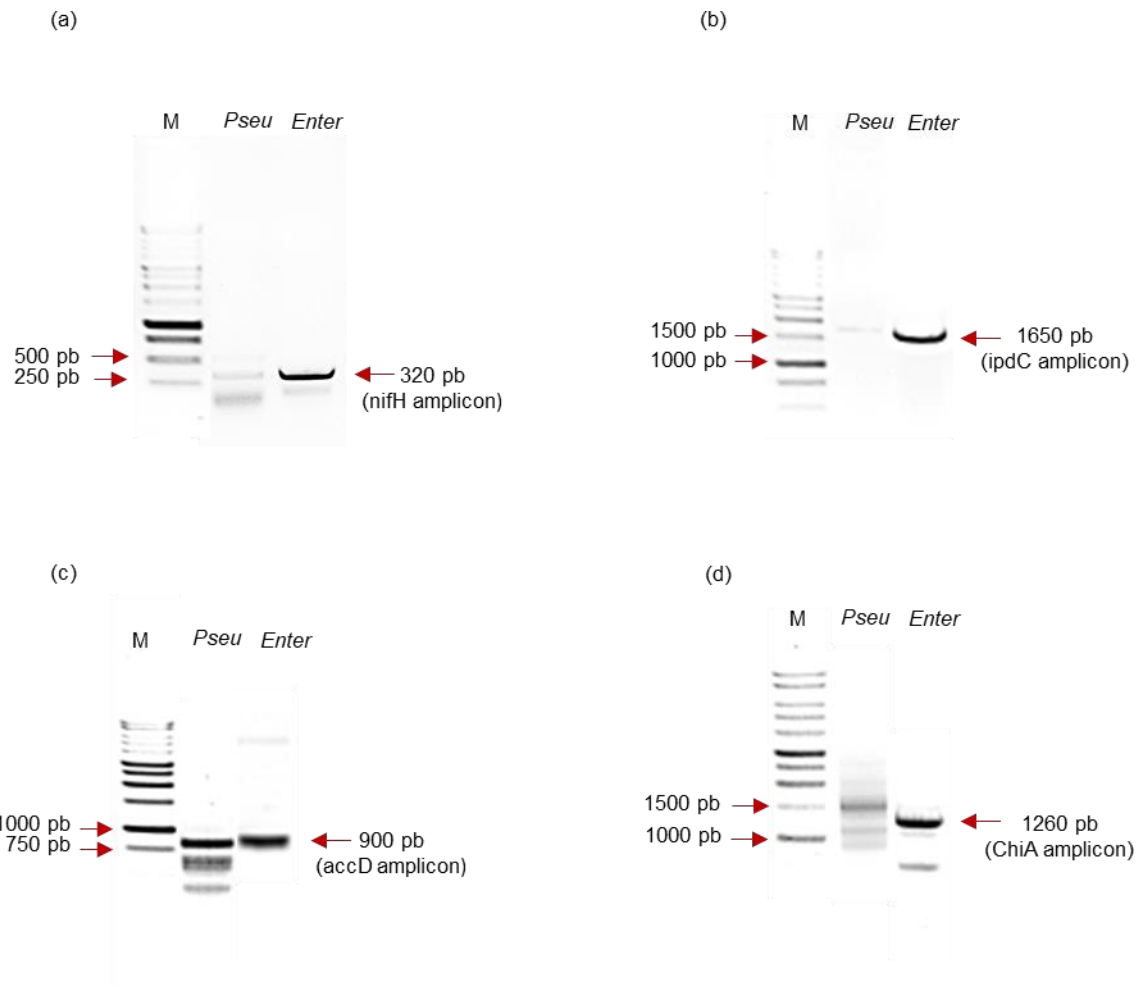


Figure 6.6. Caractérisation moléculaire de certains traits PGPR présents chez les souches diazotrophes *BPMP-PU-28* (*Pseu*) et *BPMP-EL-40* (*Enter*).

(a) *nifH* (320 pb), (b) *ipdC* (1600 pb), (c) *accD* (750 bp) et (d) *chiA* (1260 pb).

Ces quatre gènes sont impliqués respectivement dans la fixation de l'azote atmosphérique, la synthèse de l'auxine, la tolérance contre les stress abiotique et dans la synthèse de chitinase possédant une forte activité antifongique.

M : marqueur de longueur moléculaire de 1 kb.

Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.5.

L'indice de solubilisation calculé à partir du halo transparent apparaissant autour de la colonie et indiquant la solubilisation de la source minérale peu soluble ou du phytate (voir Figure 2.7) et forcément supérieur ou égal à 1 (1 correspond au diamètre de la colonie) varie sensiblement entre les souches. *BPMP-Bu-06*, *BPMP-Pa-34*, *BPMP-EL-40* sont des souches globalement peu solubilisatrices. Par opposition, *BPMP-E-39*, *BPMP-PU-28* sont de bonnes solubilisatrices pour les 3 sources utilisées mais certaines souches ne solubilisent qu'une seule source comme le phosphate tri-calcique pour *BPMP-S-59* ou seulement le phytate comme pour *BPMP-Ag-31*. Au niveau de la présence de certains gènes impliqués dans les effets PGPR, toutes les souches possèdent au moins un gène parmi ceux testés et 5 souches possèdent les 4 gènes (*BPMP-P-25*, *BPMP-C-29*, *BPMP-V-30*, *BPMP-Ag-31*, *BPMP-K-47*) (Annexe, Tableau 6.1). Pour la suite des expériences, une bactérie de chaque sol a été choisie pour une caractérisation plus approfondie (séquençage complet, effet PGPR, exsudation...). Ces 2 bactéries *Pseudomonas urmiensis* (*BPMP-PU-28*) (la souche de référence a été isolée à l'origine près d'Urmia en Iran) et *Enterobacter ludwigii* (*BPMP-EL-40*) (en hommage au microbiologiste allemand W. Ludwig) sont indiquées en rouge dans la Figure 6.5. Un dendrogramme a été réalisé avec les bactéries des 2 sols permettant de visualiser les relations de parenté entre les souches (Figure 6.5).

6.3.2. Caractérisation approfondie de 2 souches diazotrophes aux caractéristiques contrastées (Complément de chapitre 7)

Les deux bactéries ont été entièrement séquencées (voir chapitre 7, article). *P. urmiensis* ne contient pas de plasmide et 2 contigs ne matchent pas sur le chromosome de la souche présente dans les banques. Ces contigs matchent sur des parties chromosomiques d'autres souches de *Pseudomonas* donc ne font probablement pas partie d'un plasmide mais soit ils ont été perdus par la souche présente dans les banques (ou acquises par notre souche) ou plus probablement le séquençage de cette souche n'est pas complet. *E. ludwigii* possède quant à elle un plasmide. La Figure 6.6 reprend les caractéristiques moléculaires obtenues pour les 2 bactéries lors de la sélection initiale. *E. ludwigii* possède le gène *nifH* (nitrogénase), le gène *ipdC* (auxine), le gène *chiA* (chitinase) et le gène *accD* (ACC deaminase). L'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) est un précurseur de l'éthylène et l'ACC deaminase clive l'ACC en α -cetobutyrate et en ammonium s'en servant ainsi de source d'azote (Singh *et al.*, 2015). *P. urmiensis* ne possède quant à

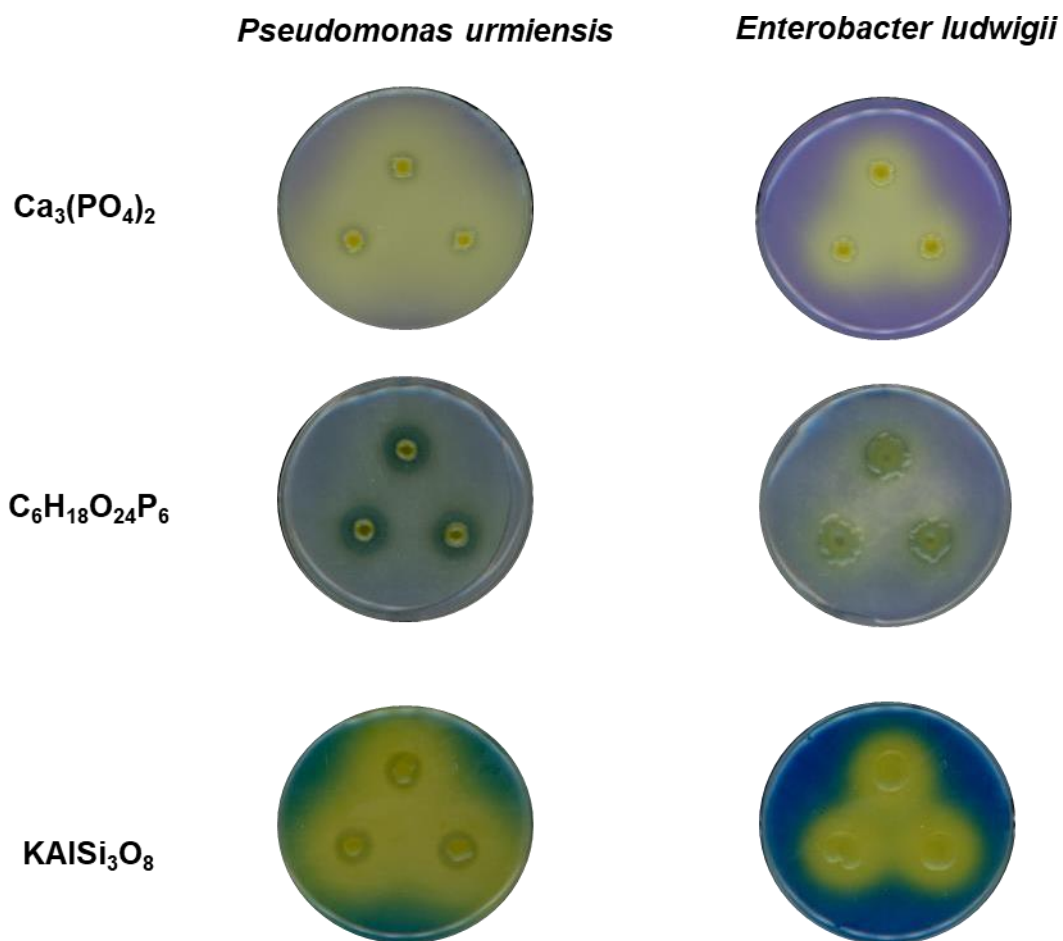


Figure 6.7. Évaluation de la capacité des deux souches sélectionnées *BPMP-PU-28* (*P. urmiensis*) et *BPMP-EL-40* (*E. ludwigii*) à utiliser une source peu soluble de Pi (le phosphate tricalcique ou phytate) ou Ki (feldspath).

Les bactéries se développent (tests en goutte) sur un milieu gélosé de Pikovskaya modifié, complétementé avec soit du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ou du phytate ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$) comme source de P peu soluble et additionné de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH. Le milieu d'Alexandrov modifié, complétementé avec du feldspath potassique (KAISi_3O_8) (potassium aluminosilicate, Potash Feldspar (Bath Potter's; Supplies, Somerset, UK) et du phosphate tricalcique comme sources de P et K, est quant à lui additionné de pourpre de bromothymol comme indicateur de pH (voir chapitre 2, Figure 2.7). Les bactéries sont cultivées pendant 5 jours à 28 °C. La croissance bactérienne entraîne une acidification du milieu, qui fait passer la couleur de l'indicateur de pH du violet au jaune.

elle probablement que le gène *AccD* parmi les 4 gènes testés. Nous avons donc vérifié la fixation de $^{15}\text{N}_2$ par ces souches et *E. coli* nous a servi de contrôle négatif (voir chapitre 7, article). *P. urmiensis* et *E. ludwigii* fixent le $^{15}\text{N}_2$ et la quantité de $^{15}\text{N}_2$ retrouvé chez *E. coli* provient probablement d'une fraction de gaz dissous dans le milieu (voir chapitre 7, article). La production d'auxine par les souches a été quantifiée en utilisant le protocole de (Gordon & Weber, 1951) et (Haque *et al.*, 2020) (voir chapitre 2.11.2). Sommairement, du tryptophane 0,2% est ajouté au milieu de culture et après 48H, du réactif de Salkowski (perchlorate et chlorure de fer) est mis en présence d'une aliquote de surnageant de culture. La production d'auxine a été quantifiée après une incubation de 45 min à l'obscurité et une lecture à 540 nm. Le réactif passe du jaune au rouge voire au brun pour les concentrations les plus fortes. Une courbe étalon a été réalisée en parallèle (Cf. Figure 5.4) Les résultats ont montré qu'*E. ludwigii* dans ces conditions produisait plus de 4 fois plus d'auxine que *P. urmiensis* (voir chapitre 7, Article). La production de cyanure d'hydrogène par certaines bactéries PGPR limite la croissance de champignons phytopathogènes, d'adventices, d'insectes et de nématodes (Sehrawat *et al.*, 2022). Les bactéries cyanogéniques sont retrouvées par exemple dans le genre *Pseudomonas* et la souche *P. urmiensis* synthétise du cyanure d'hydrogène alors qu'*E. ludwigii* n'en synthétise pas (voir chapitre 7, Article). Afin d'illustrer les capacités de solubilisation de sources de P et K insolubles ou difficilement accessibles (phytate), les souches ont été cultivées en présence de phosphate de calcium, de phytate ou de feldspath sur des milieux contenant un indicateur de pH. La Figure 6.7 illustre à la fois les différences de solubilisation et de stratégies de croissance des bactéries. L'indice de solubilisation étant le rapport du diamètre du halo transparent sur celui de la colonie, cette solubilisation est très visible sur phytate pour *P. urmiensis*. Par contre, sur feldspath, *E. ludwigii* acidifie le milieu mais sans réellement solubiliser le feldspath.

Chapitre 7

Wild Wheat Rhizosphere-Associated Plant Growth-Promoting Bacteria Exudates: Effect on Root Development in Modern Wheat and Composition

Article publié

<https://doi.org/10.3390/ijms232315248>



Article

Wild Wheat Rhizosphere-Associated Plant Growth-Promoting Bacteria Exudates: Effect on Root Development in Modern Wheat and Composition

Houssein Zhou^{1,2,3} , Fabrice Bray^{4,†} , Israa Dandache^{2,†} , Guillaume Marti^{5,6} , Stéphanie Flament⁴ , Amélie Perez^{5,6} , Maëlle Lis⁷ , Llorenç Cabrera-Bosquet⁷ , Thibaut Perez¹ , Cécile Fizames¹ , Ezekiel Baudoin⁸ , Ikram Madani¹ , Loubna El Zein² , Anne-Aliénor Véry¹ , Christian Rolando⁴ , Hervé Sentenac¹ , Ali Chokr^{2,3} and Jean-Benoît Peltier^{1,*}

- ¹ UMR IPSiM, Université de Montpellier, Institut Agro, CNRS, INRAE, 2 Place Pierre Viala, CEDEX 2, 34060 Montpellier, France
- ² Research Laboratory of Microbiology, Department of Life & Earth Sciences, Hadat Campus, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Beirut 1302, Lebanon
- ³ Platform of Research and Analysis in Environmental Sciences (PRASE), Doctoral School of Sciences and Technologies, Hadat Campus, Lebanese University, Beirut 1302, Lebanon
- ⁴ USR 3290, MSAP, Miniaturisation pour la Synthèse l'Analyse et la Protéomique, CNRS, Université de Lille, 59000 Lille, France
- ⁵ Metatoul-AgromiX Platform, LRSV, Université de Toulouse, CNRS, UT3, INP, 31030 Toulouse, France
- ⁶ MetaboHUB-MetaToul, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, 31077 Toulouse, France
- ⁷ LEPSE, Université de Montpellier, Institut Agro, INRAE 2 place Pierre Viala, CEDEX 2, 34060 Montpellier, France
- ⁸ LSTM, Université de Montpellier, Institut Agro, IRD, CIRAD, INRAE, 34730 Montpellier, France
- * Correspondence: jean-benoit.peltier@inrae.fr
- † These authors have contributed equally to this work.



Citation: Zhou, H.; Bray, F.; Dandache, I.; Marti, G.; Flament, S.; Perez, A.; Lis, M.; Cabrera-Bosquet, L.; Perez, T.; Fizames, C.; et al. Wild Wheat Rhizosphere-Associated Plant Growth-Promoting Bacteria Exudates: Effect on Root Development in Modern Wheat and Composition. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15248. <https://doi.org/10.3390/ijms232315248>

Academic Editor: Juan Manuel Ruiz Lozano

Received: 20 October 2022

Accepted: 28 November 2022

Published: 3 December 2022

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



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

Abstract: Diazotrophic bacteria isolated from the rhizosphere of a wild wheat ancestor, grown from its refuge area in the Fertile Crescent, were found to be efficient Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), upon interaction with an elite wheat cultivar. In nitrogen-starved plants, they increased the amount of nitrogen in the seed crop (per plant) by about twofold. A bacterial growth medium was developed to investigate the effects of bacterial exudates on root development in the elite cultivar, and to analyze the exo-metabolomes and exo-proteomes. Altered root development was observed, with distinct responses depending on the strain, for instance, with respect to root hair development. A first conclusion from these results is that the ability of wheat to establish effective beneficial interactions with PGPRs does not appear to have undergone systematic deep reprogramming during domestication. Exo-metabolome analysis revealed a complex set of secondary metabolites, including nutrient ion chelators, cyclopeptides that could act as phytohormone mimetics, and quorum sensing molecules having inter-kingdom signaling properties. The exo-proteome-comprised strain-specific enzymes, and structural proteins belonging to outer-membrane vesicles, are likely to sequester metabolites in their lumen. Thus, the methodological processes we have developed to collect and analyze bacterial exudates have revealed that PGPRs constitutively exude a highly complex set of metabolites; this is likely to allow numerous mechanisms to simultaneously contribute to plant growth promotion, and thereby to also broaden the spectra of plant genotypes (species and accessions/cultivars) with which beneficial interactions can occur.

Keywords: PGPR; diazotroph; bacterial exudate; metabolomics; proteomics; durum wheat; plant-microbiome communication

1. Introduction

Often rightly decried for the pollution and erosion of biodiversity it generates, the classic model of industrialized agriculture, based on unbridled use of inputs, is now widely

considered as unsustainable. The evolution towards alternative models aiming to maintain high yields while respecting the environment implies not only profound changes in mentality, but also the implementation of solutions that require global rethinking of the system; these solutions include the restoration of soil fertility (through better management of organic inputs) and biodiversity of agro-ecosystems, which requires time and the acquisition of new knowledge. Evidence has been obtained that the development of Nature-Based Solutions (NBS) can efficiently contribute to a strong reduction in agricultural inputs and pesticide use [1].

The use of PGPR as biofertilizers is seen as a way to reduce the present dependence on hazardous agrochemicals. PGPRs can promote plant, water, and mineral nutrition, plant health, and ultimately plant growth, through many different processes [2]. These processes include: atmospheric nitrogen fixation; solubilization of hard-to-access nutrients; modification of root system development, including stimulation of root hair production and elongation through the secretion of active compounds such as phytohormones or phytohormone mimetics [3]; induction of plant genes involved in nutrient acquisition or plant defense [4–7]; competition with soil pathogenic microorganisms for rhizosphere resources; and exudation of phytoalexins and compounds with antibiotic activities [8,9].

A meta-analysis based on 59 published papers to evaluate the overall contribution of *Azospirillum* strains, well-known PGPRs, on growth and yield of wheat, registered an increase in aerial dry weight and seed weight of about 18% and 9%, respectively [10]. In rice, in another type of approach, *Pseudomonas* PGPR strains allowed reduction of nitrogen fertilization by 25%, without affecting crop yield [11]. Similar observations were also reported in rapeseed using *Azotobacter* as a PGPR [12]. In maize, a yield increase of about 34% was observed after inoculation with a strain of *Herbaspirillum seropedicae*, which was found to supply 37% of the plant nitrogen content through biological nitrogen fixation [13].

The amplitude of growth promotion greatly varies according to the plant-PGPR duo, and both the plant and bacterial genotypes govern the specificity and efficiency of the interaction [14–17]. The molecular mechanisms that determine the levels of specificity and efficiency are still poorly known but are likely to be multiple and very complex. They can be classified chronologically as taking part in three successive sets of processes, which condition the effectiveness of the interaction and the promotion of plant growth [14]: (i) exchange of information between the two partners, signaling their presence and bacterial chemotaxis towards the roots; (ii) colonization of the roots by the bacterial partner, based on molecular interactions between plant and bacterial surface components; (iii) effective functioning of the associative symbiosis, which requires exudation of molecules that promote plant growth by the bacterial partner colonizing the root surface [14].

An important issue regarding this chronological model is that plant growth promotion does not always appear to be strictly dependent on root colonization. First, root colonization by a given PGPR strain does not systematically result in plant growth promotion [16]. Furthermore, PGPR species can produce volatile organic compounds (VOCs) that can diffuse within the soil, through both air-filled and water-filled pores, and thereby reach host roots and promote plant growth. For instance, *Bacillus* strains can produce VOCs such as 2,3-butanediol and acetoin, which trigger growth promotion in *Arabidopsis* through the activation of the cytokinin pathway. Exogenous application of these two VOCs showed a similar effect to bacterial inoculation, on plant growth, while mutant *Bacillus* strains, impaired in the synthesis of these VOCs, were devoid of the ability to promote plant growth [18]. On the other hand, *Bacillus* VOCs have also been shown to modulate root-system architecture in *Arabidopsis* [19], and 2,3-butanediol has been shown to also induce ISR (induced-systemic resistance) through an ethylene-activation pathway [20].

With respect to crops, there is another important issue regarding the consequences of domestication and selection on the plant ability to engage in symbiotic interactions with PGPR. In a meta-analysis, the composition of the root-associated microbiome was compared between domesticated and wild ancestor species in different plants (*Arabidopsis*, lettuce, sugar beet, barley, sunflower and common bean) and significant differences in bacterial

species abundance were observed between wild and modern varieties [21]. Likewise, a comparison of 199 ancient and modern wheat accessions, for their ability to interact with the model PGPR strain *Pseudomonas kilonensis* F113, has revealed that root colonization was lower in modern wheat, suggesting that recent wheat breeding strategies have affected PGPR symbiotic interactions in modern wheat cultivars [22]. This hypothesis was also proposed based on the observation that root microbiota diversity appears to be reduced in elite wheat cultivars, compared to ancestral forms. This led to the suggestion that introgression with ancestral species could restore the original diversity [23,24].

Wheat is an important staple crop, originating in the Middle East, and domesticated in the Fertile Crescent. The ancestor of wild wheat (*Triticum turgidum dicoccoides*) can still be found in the refuge areas of the Fertile Crescent. Studies on the microbiota of wild plants can provide information on the evolution of the relationship between wheat and its microbiota during domestication, as well as beneficial bacteria for modern crops [25].

At the molecular level, the selectivity and functioning of the symbiotic interactions are essentially dependent on exudation activities of both partners, since root exudates have to, at least, attract and feed the bacterial partner, and bacterial exudates have to trigger or mediate processes that lead to improved plant mineral nutrition and health. PGPR exudation has not yet received as much attention as root exudation [26–28]. Most exo-omics studies so far in PGPR have been focused on VOCs, revealing important roles played by such compounds in communication and interactions between soil microorganisms [29], as well as in plant health and growth promotion [30–33].

Apart from the information available on VOCs, the current knowledge on exo-metabolomes and exo-proteomes of PGPR species is still poor. More detailed “exo-omics” analyses are available for pathogenic bacterial species. For instance, in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*, exo-proteomics and metabolomics analysis allowed the identification of eight proteases, alongside a bunch of outer-membrane proteins, periplasmic proteins and adhesins. Metabolites identified with a confidence score (>0.5) were mainly fatty acids [34].

Here, two diazotrophic PGPR strains, isolated from the rhizosphere of a wild wheat ancestor, identified in a Fertile Crescent refuge area, are characterized and behave as effective PGPRs with an elite wheat cultivar. Bacteria-free supernatants obtained after filtration of cultures of these two diazotrophic PGPR strains are shown to affect wheat root development. Exo-metabolomics and exo-proteomics analyses have revealed constitutive exudation, in absence of a plant host, of a large diversity of compounds and peptides that may play a role in plant growth promotion, such as cyclic dipeptides mimicking phytohormones, proteases and antibiotics.

2. Results

2.1. Diazotrophic Bacteria: Origin and Characterization

Sixteen diazotrophic bacterial strains were selected using NFb medium, a standard medium free from assimilable nitrogen, from the rhizosphere of a wheat ancestor (wild emmer, *T. t. dicoccoides* accession Ttd-NC-2019) selected in a non-cultivated refuge area in Lebanon. Using the same procedure of selection on semi-solid NFb medium, another sixteen rhizospheric diazotrophic bacteria were selected from the rhizosphere of the wild emmer selected in Lebanon, but grown in a French soil with chemical and physical features close to those of the initial Lebanese soil (Table S1).

Two strains were selected from this bacterial collection, one from Lebanon and one from France. Whole genome sequencing and sequence analyses (Figure S1) revealed that the strain from Lebanon was a *Pseudomonas* species closely related to *P. urmiensis*, an Iranian strain isolated from Urmia. The other strain was identified as an *Enterobacter* species close to *E. ludwigii*. Many genes are not annotated in *P. urmiensis* and we found two unpaired contigs, suggesting differences between our strain and the reference strain present in the NCBI database, and/or incomplete sequencing of the reference strain. In this report, these two selected strains are named BPMP-PU-28 (or “Pseu” in figures) and BPMP-EL-40 (or “Enter” in figures), respectively.

The ability of these two bacterial strains to fix nitrogen was then evaluated using $^{15}\text{N}_2$ incorporation assays. *E. coli* was used as a negative control. The data shown in Figure 1 indicated that the two selected strains were actually able to fix nitrogen, as expected from their selection on NFb medium. Further biochemical characterization revealed that *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* strains differed in functional properties that may contribute to PGPR activity. The capacity to produce auxin (indole-3-acetic acid, IAA) in presence of tryptophan was found to be about five times larger in the latter species (Figure S2). In contrast, production of cyanide (which may contribute to defense against pathogens) was observed only in the former species (Figure S3). *BPMP-PU-28* also appeared more efficient in solubilizing and using hardly soluble sources of phosphate or K^+ (tri-calcium phosphate, phytate and feldspar; Figure S4).

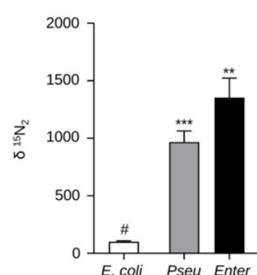


Figure 1. Nitrogen fixation ability of the selected diazotrophic bacterial strains. $^{15}\text{N}_2$ incorporation was used to assess the N_2 fixation capacity of *BPMP-PU-28* (*Pseu*: *Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enter*: *Enterobacter ludwigii*) strains. *E. coli* (5-alpha F'Iq *E. coli*, New England Biolabs) was used as the negative control. The gas phase (6 mL) above the bacterial suspension (3 mL) contained about 16% $^{15}\text{N}_2$, 65% $^{14}\text{N}_2$ and 18% O_2 . Cells were centrifuged after 5 days of incubation (at 37 °C and 200 rpm), and the $\delta^{15}\text{N}_2$ in the bacterial pellets was determined. Means \pm SE ($n = 3$). ** and *** above the bars indicate that the difference with the negative control (*E. coli*; #), is statistically significant (Student's *t*-Test, $p \leq 0.01$ and 0.001, respectively).

2.2. PGPR Effect on a Wheat Elite Cultivar

The PGPR ability of the two selected strains was evaluated on a widely used durum wheat elite/modern cultivar (cv. Anvergur) (56% of the total durum wheat cultivated area in France in recent years: https://www.arvalis-infos.fr/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.jsp?id=72353&prop=file) (accessed on 22 July 2022). Plants were grown on an artificial substrate (sterile peat/sand/vermiculite mixture; 1:1:1, *v/v/v*), ensuring that nutrients for plant growth were primarily provided by the watering solution. Plants were either inoculated or not, with *BPMP-PU-28* or *BPMP-EL-40*. The nutrient solution for the inoculated plants contained either 100 μM or 250 μM NO_3^- as the sole source of assimilable nitrogen. Uninoculated plants (controls) were watered with a solution containing either 11 mM of assimilable nitrogen (10 mM NO_3^- and 1 mM NH_4^+ ; complete control nutrient solution; positive control), or such as for the inoculated plants, 100 μM or 250 μM NO_3^- (negative controls).

When the watering solution contained 100 μM NO_3^- , no statistically significant difference, in terms of leaf surface area (LSA) recorded on a phenotyping platform (see experimental procedure), was observed between the inoculated plants and the uninoculated ones (Figure 2A). The plants were chlorotic and died 6 to 7 weeks after germination, revealing that below a certain amount of nitrogen in the medium in our experimental conditions, the plants could not survive even when inoculated with diazotrophic bacteria. In contrast, when watered with 250 μM NO_3^- , the plants stayed alive and completed a full life cycle with production of grains. Phenotyping revealed significant differences between the inoculated and uninoculated plants (watered with the same nutrient solution: 250 μM NO_3^-) in terms of leaf surface area and leaf sheath height at 5 weeks (Figure 2B,C); spikelet number per main shoot at 11 weeks (Figure 2D); thousand-seed mass and total seed mass per pot (Figure 2E,F); seed nitrogen content, and total seed nitrogen content

per pot (four plants per pot) (Figure 2G–I). The growth and yield parameters were always significantly higher in the inoculated plants than in the uninoculated ones, indicating that the bacteria actually promoted plant adaptation to the low availability of nitrogen in the nutrient solution. The largest beneficial effects on plant development were often observed with *BPMP-PU-28*.

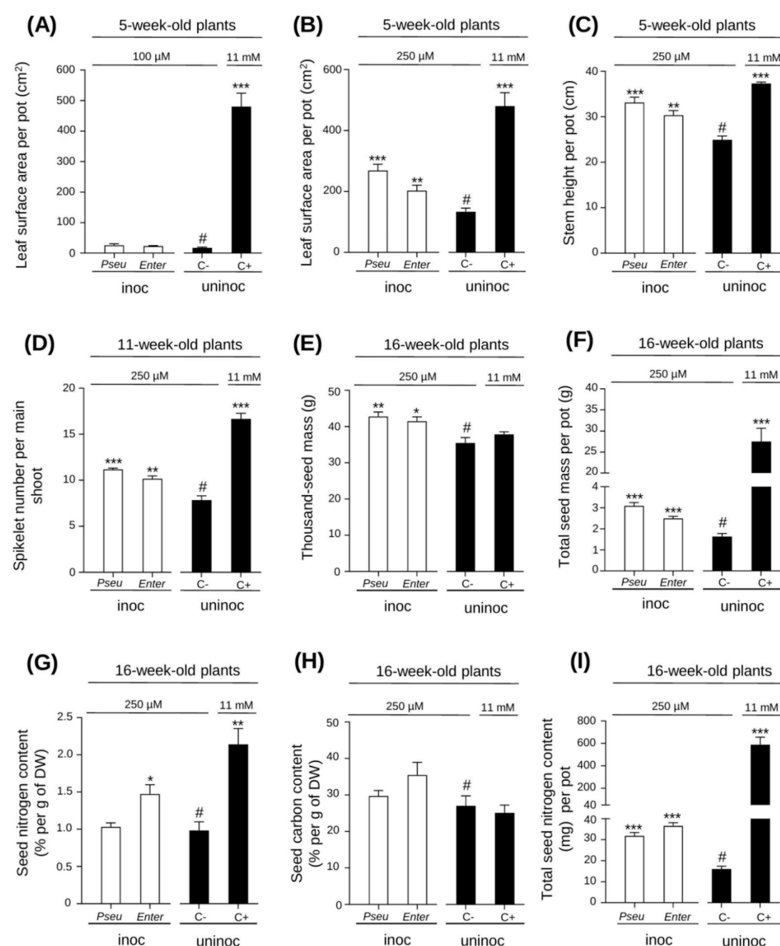


Figure 2. Effect of inoculation with *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*) on plant development under low assimilable nitrogen availability. Elite durum wheat cultivar Anvergur plants were grown in a greenhouse in pots on an artificial solid substrate (6 pots per condition, 4 plants per pot). They were inoculated with one of the two selected strains, *BPMP-PU-28* (Pseu: *Pseudomonas urmiensis*), *BPMP-EL-40* (Enter: *Enterobacter ludwigii*), or not inoculated (Uninoc). Nutrients necessary for plant growth were brought with 3 different watering solutions, all derived from Hoagland medium but containing either 100 or 250 μM of assimilable nitrogen (provided as NO₃) for inoculated plants (white bars) or non-inoculated “negative” control plants (C–, black bars), or containing 11 mM of assimilable nitrogen (10 mM NO₃ and 1 mM NH₄⁺) for uninoculated “positive” control plants (C+, black bars). Leaf surface area and leaf sheath height were measured by the Phenoarch phenotyping platform. (A,B) Leaf surface area of 5-week-old plants. The plants watered with 100 μM NO₃ (A) were chlorotic and died during the following week. The plants watered with 250 μM NO₃ (B) developed and produced seeds. (C) Leaf sheath height (5-week-old plants). (D) Spikelet number per main shoot (11-week-old plants). (E) Thousand-seed mass (16-week-old plants). (F) Total seed mass per pot. (G) Seed nitrogen content (% per g of DW). (H) Seed carbon content (% per g of DW). (I) Total seed nitrogen content (mg) per pot. (E–I): 16-week-old plants. Means ± SE (n = 6 pots). *, **, and *** above the bars indicate that the difference with the uninoculated condition under nitrogen limitation (#, negative control: C–) is statistically significant (Student’s *t*-Test, *p* ≤ 0.05, 0.01, 0.001, respectively).

2.3. Development of Culture Media Suitable for Metabolomics and Proteomics Analyses of Bacterial Exudates

In the absence of information on an optimized medium for bacterial metabolomics in the literature, experiments were undertaken to develop a “minimal” medium allowing for analyses of the exo-metabolome and exo-proteome (globally named “exudates”) of diazotrophic bacteria. An objective was also to develop a bacterial growth medium compatible with, and based on, conventional plant nutrient solution, in order to make it possible to study the exudation-based dialogue between bacteria and their root partners. Compounds with a molecular weight greater than 100 Da have to be excluded from such a bacterial minimal medium, as they would interfere with metabolomics analyses. Similarly, the bacterial minimal medium has to be free from amino acids, as these molecules are likely to be secreted by the bacteria, or during symbiotic interaction by the host plant. The bacterial culture medium we developed uses a Hoagland plant medium [35], which contains only inorganic salts, as a background, without addition of yeast extract, vitamins or amino acids. Different molecules were tested as carbon sources in this Hoagland background by following bacterial growth kinetics. Lactate (final concentration: 2%, *w/v*, i.e., about 220 mM) was finally selected because this substrate was found to allow most of the tested diazotrophic strains, including *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*, to grow quite rapidly. Typical growth curves of these two bacterial strains in this medium are shown in Figure S5A,D. Aliquots of the growth medium were taken during the exponential and stationary phases for lactate assays (Figure S5B,E) and pH measurements (Figure S5C,F). The concentration of lactate in the aliquots collected during the stationary phase was still high (about 40% of the initial amount, i.e., about 90 mM), suggesting that availability of the carbon source was not the limiting factor for bacterial growth at this time. The pH recordings indicated that, with lactate as the carbon source, both bacteria strongly alkalinized the medium to a pH of about 8.5 during the stationary phase. In some experiments, the buffering capacity of the growth medium was increased by adding phosphate buffer (150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8), which kept the pH of the medium close to the initial value (6.8) throughout the culture.

2.4. Bacterial Exudates Affect Root Development

Experiments were carried out to investigate the effects of the exudates of the two selected diazotrophic bacterial strains on wheat growth, in hydroponics on Hoagland solution. The bacterial culture medium was buffered with 150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 6.8. The cultures were collected during the stationary phase, after 48 h of growth for *BPMP-PU-28* and 40 h for *BPMP-EL-40*. Cultures were centrifuged and supernatants were filter sterilized (0.22 μm). The aliquots of the sterile supernatant thereby obtained were diluted (5%) into Hoagland solution used for wheat growth. As a control treatment, wheat growth solution without added bacterial culture medium was directly supplemented with lactate and $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ at concentrations similar to those that would have resulted from the addition (at 5%) of filtrated supernatant (final concentrations close to 4.5 mM and 7 mM, respectively).

When compared with the control treatment, addition of bacterial growth supernatant to the wheat growth solution was without any significant effect on shoot biomass production (Figure 3A), but significantly affected root growth and development within seven days. Furthermore, the culture supernatants of the two bacterial strains were found to have differentiated effects. Root system biomass was not affected by *BPMP-PU-28* culture supernatant, however it was increased by *BPMP-EL-40* culture supernatant (Figure 3B). Both bacterial exudates decreased total root length (Figure 3C) but increased the root diameter (strongest effect observed for the *BPMP-EL-40* culture supernatant; (Figure 3D)). Furthermore, a striking effect of *BPMP-PU-28* culture supernatant was observed on root hair density and length in root apical regions (Figure 4). Indeed, compared to the control plants and to the plants that had received *BPMP-EL-40* exudates, the plants that had received *BPMP-PU-28* exudates developed very long root hairs, which switched the root phenotype to a dauciform aspect [36], as shown in Figure 4B.

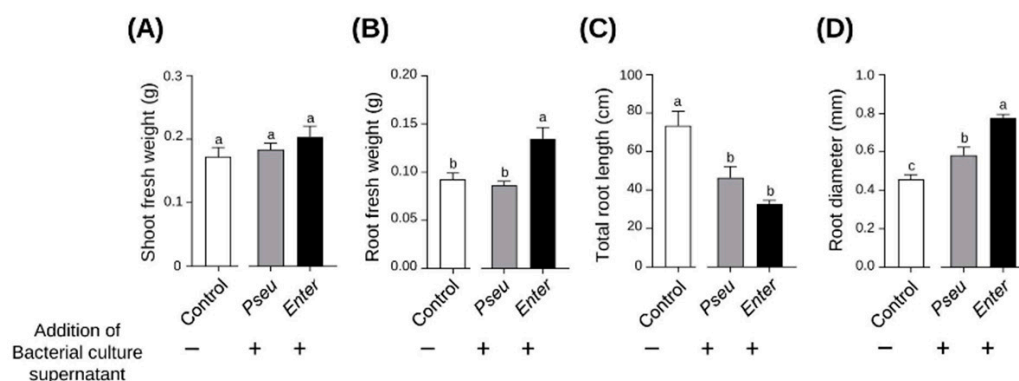


Figure 3. Effects of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) culture supernatants on root system development. Durum wheat cv. Anvergur was grown hydroponically in Hoagland solution under axenic conditions. The solution (initial volume: 38 mL) was supplemented with 2 mL of bacterial culture supernatant prepared (filtered to 0.22 μ m, thus without bacteria) from a culture (buffered growth medium collected during the stationary phase; see S arrows in Figure S5A,D) of BPMP-PU-28 (Pseu: *Pseudomonas urmiensis*) (gray bars) and BPMP-EL-40 (Enter: *Enterobacter ludwigii*) (black bars), or was supplemented with 2 mL of a mock medium (not used for bacterial growth: control; white bars). (A) Shoot fresh weight, (B) root fresh weight, (C) total root length and (D) root diameter after 7 days of growth. Total root length and diameter were determined using WinRHIZO. Means \pm SE (n = 5). Different letters indicate statistically significant differences (one-way ANOVA test, $p \leq 0.05$).

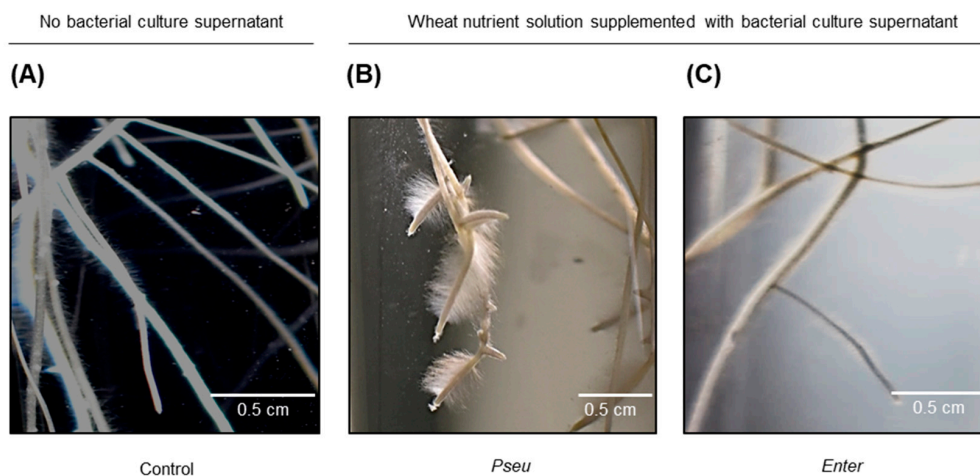


Figure 4. Root hair development induced by BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) culture supernatant in lateral roots of durum wheat seedlings cv. Anvergur grown in hydroponics. Durum wheat cv. Anvergur was grown hydroponically under axenic conditions in Hoagland solution, supplemented with bacteria culture supernatant, or mock medium as described in the legend to Figure 3. Representative images of root systems of plants grown for 7 days in the control solution (A), or in the solution supplemented with 5% of BPMP-PU-28 (Pseu: *Pseudomonas urmiensis*) culture supernatant (B) or supplemented with 5% of BPMP-EL-40 (Enter: *Enterobacter ludwigii*) culture supernatant (C).

Altogether, these results provide evidence that compounds impacting wheat root system development were present in the BPMP-PU-28 and BPMP-EL-40 growth supernatants.

2.5. Comparative Metabolomics Profiling of BPMP-PU-28 and BPMP-EL-40 Exudates

Untargeted metabolomics by UHPLC-MS/MS fragmentation was applied to identify primary and secondary metabolites present in the growth supernatants of BPMP-PU-28 and BPMP-EL-40. Each bacterial strain was grown in minimal buffered (150 mM phosphate buffer, pH 6.8) or unbuffered medium, and aliquots of culture supernatants were collected

for metabolomics analyses during the exponential and stationary phases of the culture (at the times indicated by the arrows in Figure S5). Only metabolites identified with a score equal to or above 6.5, in at least one condition, were considered after the separation step, processing, cleaning, and peak annotation [37–39].

This resulted in a list of about 108 compounds, of which about 25% did not correspond to known structures and 75% were known molecules (Figure 5, Table S2). Fatty acids and carboxylic acids together represent almost 20% of the identified compounds, and sugars represent about 5%. Some of these compounds may be involved in cell wall biosynthesis. While amino acids were not found in the bacterial growth supernatants, modified di- and tripeptides and cyclic peptides represented ca. 6.5% of the identified metabolites. It should be noted that a large percentage of metabolites (93%) are secondary metabolites, such as alkaloids and sesquiterpenoids. Overall, 18% of the metabolites identified in this study correspond to compounds that can be expected to have antibiotic effects (antimicrobial or nemato/entomopathogenic activity). For instance, columbianetin (metabolite number 528 in Table S2), a furanocoumarin, acts as a phytoalexin and antifungal molecule [40]. It is also worth noting that some of the detected metabolites could play a role in nutrient ion acquisition by the bacteria (and the associated plant roots), such as coproporphyrin III (metabolite number 59 in Figure 5, Table S2), which can display zincophore (Zn^{2+}) or chalkophore (Cu^{2+}) activity [41,42]. Moreover, N-tetradecenoyl-L-homoserine lactone (TDHL) was found in *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exudates (Figure 5, Tables S2 and S3; compound 341). TDHL is a quorum-sensing signaling molecule modulating cell density. It is also used as a signaling molecule in bacterial interactions with higher organisms [43].

(A) Global analysis		
Total number of matching compounds		108
Secondary metabolites		93 %
Fatty and carboxylic acids		15 %
Antibiotics		18 %

(B) Examples of remarkable compounds		
Name	Compound number	Activity/category
Terfestatin C	66	Specific inhibitor for Auxin Signaling
Cyclo-(Tyr-Ala-Leu-Ser)	425	Cyclo-peptides (phytohormone mimic)
Cyclo-(L-Pro-4-OH-L-Leu)	502	Cyclo-peptides (phytohormone mimic)
Xentrivalpeptide Q	476	Depsideptides (entomopathogenic)
Nikkomycin Wx	93	Chitin synthetase inhibitor
Hinduchelin D	375	Cathecol (antifungal, siderophore)
Linieodolide A	363	Antimicrobial
N-Tetradecenoyl-L-homoserine lactone	341	Quorum sensing
Coproporphyrin III	59	Zn binding

Figure 5. Summary of the metabolomics analysis. (A) Global analysis: Total number of matching compounds (from supplemental Table S2) and relative abundance (% with respect to the total number of compounds) of selected categories of compounds. (B) List of selected remarkable compounds and putative activities (from Table S2).

Principal components analysis (PCA) was performed to obtain an unsupervised overview of the metabolic profiles of the different *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exudates, produced in either buffered or unbuffered bacterial growth medium, and sampled during the exponential or the stationary phases (Figure S6). In multivariate analysis, this procedure groups the samples with similar chemical profiles together. The PCA displayed a clustering of the different replicates corresponding to the same bacterial species and the same experimental conditions (buffered or unbuffered medium, sampled during the exponential or stationary phase) (Figure S6). Altogether, these results provide evidence of the reproducibility of the experiments and the robustness of the data acquisition. Overall, the PCA analysis revealed that the bacterial species was the main driving component

(PC1: 35.2% of total variance) to explain the variance, as expected, but also with significant contributions from the buffered/unbuffered nature of the culture medium condition (PC2: 17%) and the phase (exponential/stationary) of the culture (PC3: 12%) (Figure S6A).

Heat map analysis was used to investigate the distribution of the most discriminating metabolites between the different bacterial exudates i.e., produced in buffered or unbuffered culture media and collected at exponential or stationary phase. Overall, a larger number of discriminating metabolites was found in *BPMP-EL-40* than in *BPMP-PU-28* exudates (Figure 6A and Table S3). This is especially shown in Figure 6B and Table S4, whose heat map compares the exo-metabolomes of the two bacterial species grown at the stationary phase in buffered medium, i.e., the exo-metabolomes present in the same culture supernatants previously tested for their effects on root development (Figures 3 and 4).

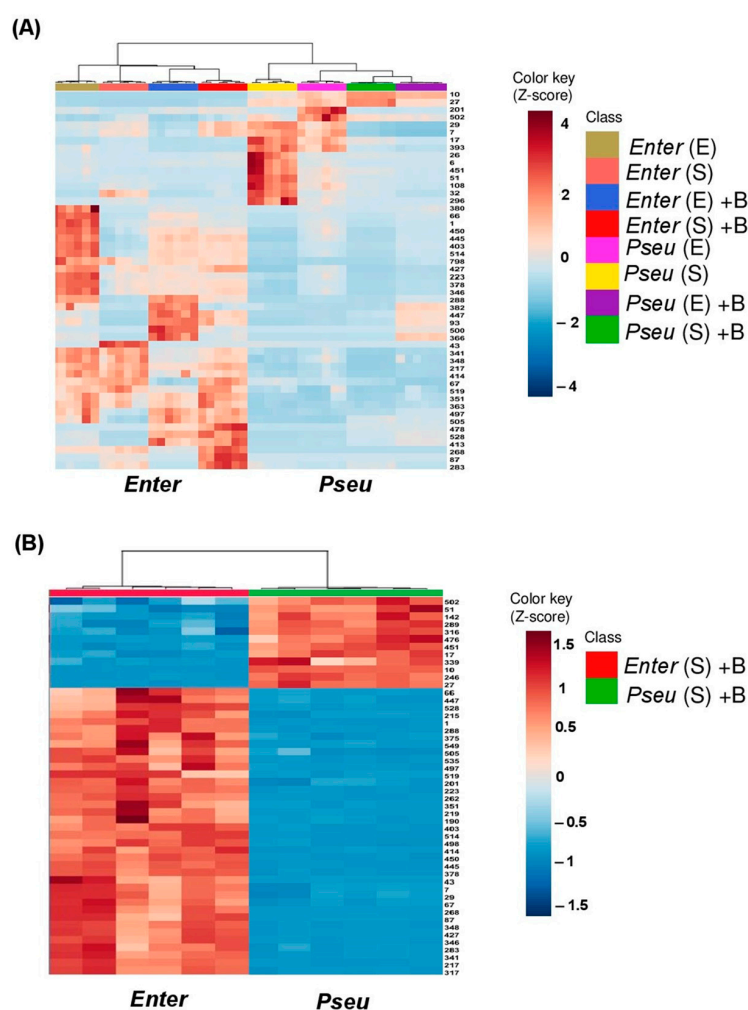


Figure 6. Heat map describing the distribution of the top 50 more discriminant metabolites, between *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*), according to culture conditions and growth stages. *Pseu* (*Pseudomonas urmiensis*) and *Enter* (*Enterobacter ludwigii*) were grown in minimal Hoagland medium supplemented with lactate (2%) (see Figure S5) and buffered (150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.7) (B) or unbuffered (U). Aliquots of culture supernatant were collected during the exponential and stationary phases (E and S, respectively; see arrows in Figure S5) and analyzed by LC-MS/MS. The heat map was generated by MetaboAnalyst 5.0 28 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) accessed on 15 January 2021. (A) Top 50 more discriminant metabolites between *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*. Numbers on the right refer to the metabolites, which are listed in Table S2. (B) Discriminant metabolites identified in the bacterial growth media (buffered and collected during the stationary phase) are shown to affect root system and root hair development in Figures 3 and 4. Numbers on the right: see Table S3.

2.6. Comparative Proteomics Profiling of BPMP-PU-28 and BPMP-EL-40 Exudates

A bottom-up approach using nanoLC-MS/MS fragmentation was performed to analyze bacterial sub-proteomes present in *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* growth supernatants.

The bacteria were grown in buffered growth medium, and their supernatants were collected during the stationary phase, alongside supernatants whose effects on root system development were previously studied (Figures 3 and 4). The collected samples were either digested or not for proteins or peptides, respectively, with trypsin and directly analyzed after a desalting step. The identified proteins/peptides, 124 for *BPMP-PU-28* and 259 for *BPMP-EL-40*, are listed in Table S5 (Data Sheet 1). After removing redundancy, about one-third of the identified peptides correspond to outer membrane proteins or periplasmic proteins, 6% belong to ABC transport systems, 6% to proteases, and 5% to redox and stress proteins. About 11% correspond to ribosomal proteins, and another 11% to hypothetical proteins or proteins with DUF (Domain of Unknown Function) domains. Such a composition, and in particular the presence of ribosomal proteins, provided evidence that endocellular proteins were released into the culture medium, at least in part, presumably as a result of cell death. To circumvent this problem, whole bacterial proteomes were analyzed in the same experimental conditions, resulting in the identification of 1664 proteins in *BPMP-PU-28* and 1718 in *BPMP-EL-40* (Table S5; Data Sheet 2). A list of proteins found in both the culture medium and the “whole proteome” was then compiled, which identified 41 proteins for *BPMP-PU-28* and 102 proteins for *BPMP-EL-40* (Table S5, Data Sheet 3), representing, respectively, 48% and 33% of the proteins initially identified in the growth supernatants.

The remaining proteins (present in the growth supernatants and not identified in the whole proteome), 83 for *BPMP-PU-28* and 157 for *BPMP-EL-40* (Table S5, Data Sheet 4), were considered to be more specifically present in the growth supernatant than inside the bacteria, and thus as potentially constituting (part of) the “exo-proteome” of the bacterial species. An overall comparison between this so-called exo-proteome and the entire bacterial proteome was performed by compiling the semantic terms overrepresented in each protein list using the web site (<https://www.nuagesdemots.fr/>) (online published since 2003). The results (Figure S7) provided evidence that the proteins present in the exo-proteome list constituted a truly specific sub-proteome, compared to the full bacterial proteome.

The proteins present in the exo-proteome list (Figure 7) could be classified into the same set of eight categories for both bacterial species, with the relative size of these categories being different between the two species. The presence of a surprisingly large “proteases” category, about 14% of the proteins in the *BPMP-PU-28* exoproteome and 6% in the *BPMP-EL-40* one, is worth noting, with the percentage of proteases in the total proteomes of these two bacterial species being about 3.5% and 4%, respectively. The “miscellaneous” category includes proteins that belong to various metabolic pathways (e.g., folding, redox . . .), or that cannot be easily classified. It comprises about half of the exo-proteome in both bacterial species. Within this category, only two common proteins are present in the two bacterial strains. The composition of this category seems, thus, to be “strain specific”.

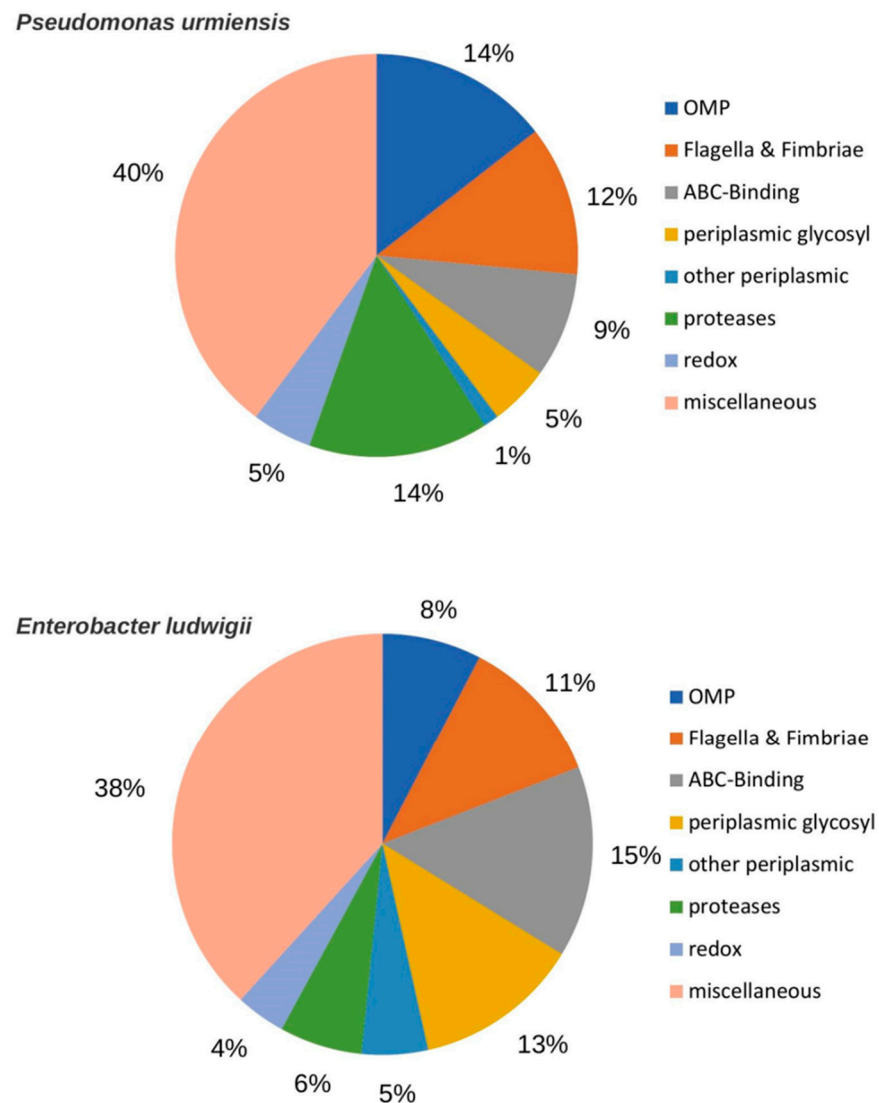


Figure 7. Comparative proteomics profiling of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) culture supernatant. *Pseudomonas urmiensis* and *Enterobacter ludwigii* were grown in minimal Hoagland medium supplemented with lactate (2%) and buffered (150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.7). Aliquots of culture supernatant were collected during the stationary phase. Proteins and peptides identified in the growth media and not found in the global proteome of the corresponding bacteria were sorted into 9 classes based on manual annotation (same classes and classification criteria for the two bacterial strains). OMP: outer membrane proteins. Flagella & Fimbriae: proteins belonging to flagella, and long filamentous polymeric protein structures present at the surface of bacterial cells and implicated in adhesion of the bacteria to surfaces, or to other bacteria. ABC substrate: substrate binding proteins of ABC transporters. Periplasmic glycosyl: periplasmic protein implicated in cell wall glycosylation. Other periplasmic: proteins located in the periplasmic space but not involved in glycosylation. Proteases: proteins involved in degradation or maturation of peptides and polypeptides. Redox: proteins involved in oxido-reduction processes. Miscellaneous: proteins with various enzymatic activities and likely to be located neither in the outer membrane, nor in the periplasmic space.

3. Discussion

3.1. Bacterial Strains Isolated from the Rhizosphere of a Wheat Ancestor Can Behave as Efficient PGPR in Modern Wheat Varieties

Different bacterial strains, belonging for example to the genera *Azospirillum* [44–46], *Bacillus* [47,48], *Pseudomonas* [49,50], or *Enterobacter* [48], have been identified as having PGPR effects on modern wheat varieties. The impact of a PGPR interaction on plant growth—in terms of biomass production or grain yield, either in the laboratory or in the field—depends on the plant species/genotype and bacterial strain [10,22,51–54], but also on biotic [55], and abiotic conditions, including soil pH, nutrient availability and fertilization levels [54–57].

In wheat, for example, field tests of a collection of *Azospirillum* strains (one of the best studied genera of plant growth promoting rhizobacteria) at 297 different experimental locations in Argentina showed a growth-promoting effect in about 70% of the cases, which resulted in an increase in grain yield from 13% to 25% for the most effective strains/interactions [57,58]. In Brazil, comparing nine *Azospirillum* strains has led to similar observations, with increases in grain yields most often in the range of 13–18%, and up to 31%, depending on the season and field location [59]. Likewise, a meta-analysis conducted on 59 available articles to evaluate the extent to which *Azospirillum* strains can contribute to wheat growth, revealed a mean increase of 8.9% in seed yield [10]. In plants grown in controlled conditions, in pots in a greenhouse, larger impacts of inoculation with PGPR have been reported. For instance, wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* (strain BNM-10), after soil sterilization, was found to result in about a 40% increase in biomass production and 60% increase in grain yield [55].

Our results indicate that the two bacterial strains that we have isolated can behave as *bona fide* PGPRs. These strains have been shown to stimulate plant growth when the availability of assimilable N in the soil is limiting for growth (when compared with growth in a nitrate-rich control soil), but still sufficient to allow uninoculated plants to complete their cycle from grain to grain. Under these conditions, *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* increased total grain mass (harvested per pot) by 90% and 53%, respectively, and the total amount of N in the produced grains (per pot) by about 98% and 128% for *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*, respectively (Figure 2). These results therefore indicate that both *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* can actually behave as efficient PGPRs in wheat. The increases in yield and total seed nitrogen content, resulting from inoculation with either *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*, are, however, far below those resulting from plant watering with nitrate-rich solution (Hoagland solution, 11 mM of NO_3^-) (Figure 2F,I). Similar differences in growth promotion were also observed between *Azospirillum lipoferum* (a well-known PGPR) and the nitrate-rich solution (Figure S8). Thus, high levels of fertilization with assimilable N sources were found to be much more efficient than PGPRs in terms of plant nutritional supply and plant growth, in our experimental conditions. These results suggest that diazotrophs are not as effective as high levels of nitrogen fertilizers in providing nitrogen and supporting plant growth. Of course, however, it can be assumed that under most environmental conditions, plant growth promotion by PGPR results from many diverse bacterial activities and not solely from improvement in plant nitrogen nutrition. Besides nitrogen fixation (Figure 1), properties classically proposed to contribute to plant growth and health promotion by PGPRs have been found in the two strains *BPMP-EL-40* and *BPMP-PU-28*. These properties include auxin production in the presence of tryptophan (larger in *BPMP-EL-40*; Figure S2), hydrogen cyanide production (in *BPMP-PU-28*; Figure S3), and the ability to solubilize poorly soluble sources of phosphate and potassium (larger in *BPMP-PU-28*; Figure S4).

There is evidence available proving that the process of crop domestication has affected root microbiome features in a plant genotype-dependent manner [22,60,61]. Millions of years of co-evolution between crop ancestors and their microbiota had favored the development of specific and beneficial interactions, which were then altered by domestication and selection. Especially, plant breeding for high yields in artificialized soil conditions, under high fertilizer inputs, is thought to have impacted plant traits involved in beneficial

plant–microbe interactions [61]. Wheat was domesticated in the Fertile Crescent area, which includes Lebanon. Our results show that a bacterial strain, *BPMP-PU-28*, isolated from the rhizosphere of a wheat ancestor spontaneously growing in a refuge area in Lebanon, and another strain *BPMP-EL-40*, isolated from the rhizosphere of the same species but grown far from the Fertile Crescent, in France, can interact with a modern wheat variety and behave as *bona fide* PGPRs. Altogether, these results indicate that the capacity of wheat to establish efficient beneficial interactions with PGPRs has not been profoundly and systematically modified by domestication and breeding.

3.2. *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* Exudates Modify Root System Development

Root system development over seven days was affected by supplementing the nutrient solution with *BPMP-PU-28* or *BPMP-EL-40* exudates (Figures 3 and 4). Plant inoculation with living PGPRs has been extensively reported to impact root system development, which is thought to contribute to improving plant hydro-mineral nutrition [2,62–64]. In *Arabidopsis*, inhibition of primary root growth, stimulation of lateral root production, increased length of lateral roots, and strong promotion of root hair elongation appear to be almost systematically induced [7] by very different PGPR strains [19,65–71] with exceptions since, for instance, a promotion of primary root growth has also been reported [47]. Less information is available on wheat and it mainly concerns bread wheat *T. aestivum*. Contrasting results have been reported in this species depending on the experimental conditions, especially the level of inoculation and possibly the PGPR strain. Indeed, inoculation with different PGPR species, including *A. brasilense* strains, has been reported to result in an increase in the total length of the root system [45,48], or in a strong decrease in root length, associated to thicker roots (larger root diameters), and a strong increase in root hair density and length [46]. The latter developmental responses of the root system, observed when the inoculation level was high, have been found to involve auxin production by the inoculated bacteria [46].

The present results indicate that adding aliquots of *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* culture supernatants into the wheat seedlings' nutrient solution resulted in altered root system development, with distinctive responses for the two strains (Figures 3 and 4). An increase in root system biomass in response to *BPMP-EL-40* exudates was observed, while *BPMP-PU-28* exudates were without significant effect on this parameter. A reduction in total root length and an increase in mean root diameter was observed in response to both culture supernatants, the latter response being, however, significantly larger in the case of *BPMP-EL-40* (Figure 3). Close to root apices, a strong increase in root hair length and density was observed in response to *BPMP-PU-28*, and not to *BPMP-EL-40* culture supernatant (Figure 4). Such root responses to the culture supernatant free from bacteria are reminiscent of the observations reported by [46] using living bacteria. The fact that responses to bacterial culture supernatants can be straightforwardly observed, may provide a way, by biochemical fractioning of the growth media, to identify bacterial metabolites and/or peptides that induce root system developmental changes. It is worth noting that, although both *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* can produce and secrete IAA when the growth medium is supplemented with tryptophan (Figure S2), the present metabolomics analyses have not identified any type of auxin (or any other kinds of phytohormone families such as cytokinins or gibberellins) in the culture supernatants (Table S2). This suggests that compounds other than auxin were responsible for the observed developmental responses of the root system to the bacterial exudates.

3.3. The High Complexity of the Exo-Metabolomes and Exo-Proteomes Offer Extensive Communication and Action Possibilities for Bacteria

Metabolomes and proteomes have been obtained on total extracts of PGPR bacteria [72–76] but very few data on exo-metabolomes [76], and none on exo-proteomes, have been reported. Our data show the presence of a large variety of metabolites and peptides in the exudates of *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*. The composition of these external

metabolomes and proteomes strongly depends on the bacterial species, of course, but also on the characteristics of the medium (pH) and the phase (exponential or stationary) of the culture. A total of 108 metabolites with a score equal to or higher than 6.5 were identified in the metabolomes of *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*. The corresponding values for the proteomes of *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* are 125 and 214 sequences, respectively, of which 110 and 84 appear to be found more specifically in the culture supernatants than in the total cellular proteomes—thus belonging to what we have operationally defined as the bacterial “exoproteomes”.

The PGPR exo-metabolome analysis reported by [76] concerns two different strains of *Pseudomonas*. For each strain, about 110 metabolites were found in the growth supernatant. This differed from our own minimal growth medium since it was supplemented with 15 different amino acids and contained fructose as a carbon source, which may hamper the identification of metabolites with a molecular weight below about 200 Da (molecular weight of fructose: 180 Da). The number of compounds (about 110) found in the growth media for each strain under these conditions is, however, quantitatively consistent with our own analyses. The lists of identified metabolites were not provided, but the authors mentioned the presence of N-acyl homoserine lactone (AHLs). Of particular note is that the AHL N-tetradecenoyl-L-homoserine lactone (TDHL) has also been found in *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exudates (Figure 5, Tables S2 and S3; compound 341). AHLs are amphiphilic molecules with a hydrophilic homoserine lactone ring and a hydrophobic side acyl chain [77]. The length of this acyl chain can vary from 4 to 18 carbon atoms and generates specificity between bacteria [43]. AHLs play a role in bacterial quorum sensing (QS) and in bacterial communication networks. They have also been shown to have inter-kingdom signaling properties. They have positive effects on plant growth [78,79], and could be recognized by plant receptors and lead to modifications of plant gene expression [80,81].

It should also be noted that while no amino acids were detected in the bacterial exudates under our experimental conditions, different cyclopeptides were present, namely the cyclodipeptide (CDP) cyclo(L-Pro-4-OH-L-Leu) (cycloHPL), a nucleoside peptide named Nikkomycin Wx (composed of L-tyrosine and 5-amino-5-deoxy-D-allo-furanuronic acid N-glycosidally bound to 4-formyl-4-imidazolin-2-one) [82], and the cyclic tetrapeptide Cyclo-(Tyr-Ala-Leu-Ser) (or brevibactin A) (Figure 5, Table S2). Together with AHLs, cyclic peptides have been shown to play a role in quorum sensing [83,84]. The higher abundance of AHLs and cyclic peptides in the exudates collected in stationary phase (Table S4) is consistent with the fact that part of the bacterial population was then engaged in a biofilm lifestyle, as also indicated by the presence of a veil on the walls of the Erlenmeyer flasks [85]. In addition to playing a role in quorum sensing, cyclic peptides can act as mimetics of phytohormones [79,86,87]. The CDP cyclo (L-Pro-4-OH-L-Leu) found in *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* growth supernatants is close to the CDP cyclo (L-Leu-L-Pro) identified in *Bacillus gaemokensis* and is shown to upregulate salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signaling [88]. It is also worth noting that the CDPs cyclo (L-Pro-L-Val), cyclo (L-Pro-L-Phe) and cyclo (L-Pro-L-Tyr), which are produced by different *Pseudomonas* strains (*P. aeruginosa*, *P. putida* and *P. fluorescens*), have been reported to have auxin-like activity in Arabidopsis, and to modulate auxin-responsive gene expression in roots, suggesting a role of bacterial cyclodipeptides as phytostimulants [3,89].

In addition to AHLs and cyclopeptides, many of the metabolites identified in *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exudates may play a role in plant growth promotion, for example by behaving as antibiotics (about 18% of the identified metabolites can be expected to have antibiotic effects), or by improving nutrient ion acquisition, such as coproporphyrin III which is one of the compounds identified in both strains (compound 59 in Table S4).

With respect to the proteomics data, the exo-proteomes identified in the present study highlight and confirm the routes and structural components of bacterial exudation. Indeed, many outer membrane proteins (OMPs) such as porins, Type I, IV, VI secretion system proteins, flagellar and fimbrial proteins, periplasmic proteins and lipoproteins have been identified, but no inner membrane proteins. More than a third of the bacterial

proteome is likely to be extra-cytoplasmic [90], located in membranes in the periplasmic space, or secreted. Different models have been proposed for bacterial exudation especially through outer-membrane vesiculation [91–94]. Production of outer-membrane vesicles (OMVs) underlies evolutionarily conserved mechanisms important in cell communication. OMVs can carry metabolites, enzymes, peptides and nucleic acids. They can deliver high concentrations of active compounds, allow protection of transported molecules [95,96], and have been shown to play a role in horizontal gene transfer, defense, virulence and intra- and inter-species communication [97,98]. It is interesting to note that the same categories of outer membrane components are found in both *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exudates (including proteases), revealing a common pathway for exudation. Besides these common OMPs, the remaining exo-proteome components, which are likely to be mainly transported in the lumen of OMVs, are species specific. A striking result is the overrepresentation of the category “peptidase”, which comprises 14% and 6% of the proteins in the *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exoproteomes, respectively. It is also interesting to note that, among the semantic terms describing the *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* exoproteomes (Figure S7 and Table S5), the presence of “Substrate Binding” indicates a type of membrane transport activity that is likely to contribute to solute exchange between the bacteria and the host plant roots.

3.4. Conclusions

Thus, our data provide evidence that PGPRs can constitutively produce very rich and complex exo-metabolomes and exo-proteomes, the composition of which is significantly dependent on the external environment and the bacterial lifestyle (planktonic phase or biofilm). The richness and complexity of these metabolomes and proteomes support the hypothesis that, in each PGPR strain, numerous and complex mechanisms can simultaneously contribute to plant growth promotion. Figure 8 provides a synoptic view of the diverse pathways and mechanisms that the exuded compounds could trigger, giving rise to beneficial interactions with the plant.

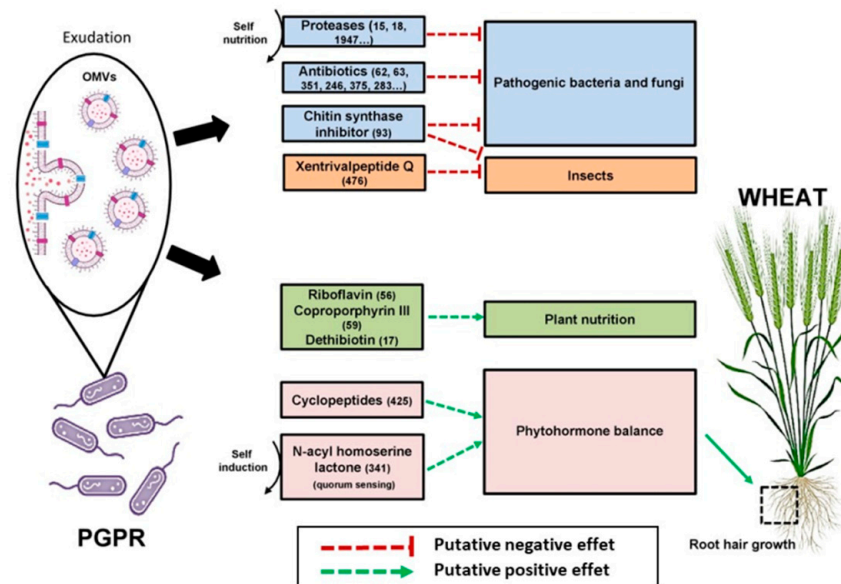


Figure 8. Exo-metabolites and exo-proteins constitutively exudated by *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*); diverse and complex pathways are likely to give rise to beneficial interactions with the plant.

Exudates are likely to be protected in outer-membrane vesicles, which allow long distance communication. Proteases and exo-metabolites, such as antibiotics or chitin synthase inhibitors, are potentially involved in defense against competitors, plant pathogens and

pests. Other exo-metabolites such as riboflavins, coproporphyrin and dethiobiotin are likely to be involved in plant nutrition, while specific cyclopeptides and N-acyl-homoserines lactones can potentially mimic phytohormones and affect root and root hair development.

All the exo-metabolites and proteins whose names are present in this figure can be retrieved with their number in Supplemental Tables S2 and S5, respectively.

This diversity is also likely to broaden the spectra of plant genotypes, cultivars, accessions and species with which beneficial interactions can be developed. It might contribute to the fact that PGPR strains isolated from the rhizosphere of a wheat ancestor growing in its refuge area in Lebanon, or far from this region in a west Europe soil, can display beneficial effects upon interactions with a modern wheat elite cultivar. It would be worth further deciphering and evaluating these mechanisms and pathways, by investigating the effects of host plant root exudates on the bacterial exoproteomes and metabolomes. Furthermore, the fact that collected bacterial exudates can, *in vitro*, affect the development of the root system, is likely to help, by biochemical fractionation, identify the mechanisms involved in root–PGPR communication and the resulting benefits for the plant.

4. Materials and Methods

4.1. Soil Sampling

Wild emmer (*T. t. dicoccoides*, accession Ttd-NC-2019), a wheat ancestor, was grown in two soils—one from a non-cultivated refuge area of the Fertile Crescent in Lebanon (latitude: 33°51'35.6'' N; longitude: 36°07'09.6'' E; altitude: 1220 m) near the town of Nabi Chit, and the other one from France (latitude: 43°37'11.0'' N; longitude: 3°58'45.2'' E; altitude: 12 m) near the town of Mauguio. The two soils were sampled in 2019 and had similar physical and chemical properties (Table S1) based on analyses carried out as described in [99].

4.2. Diazotrophic Bacteria Selection and Characterization

Bacteria were isolated from the entire rhizosphere (grinded soil + roots) of *T. t. dicoccoides* and grown for 6 weeks in both soils, in a growth chamber with a 16-h diurnal photoperiod, a day/night temperature of 22/20 °C, a light intensity of 150 µE, and a relative air humidity of 70%. Diazotrophic bacteria were isolated using semi-solid selective Nitrogen Free Bromothymol Blue (NFb) medium according to [100]. Briefly, rhizospheric samples (ca. 10 mg of soil) were surface-inoculated in semi-solid NFb tubes. About three days later, sub-surface veils were collected and inoculated again in new semi-solid NFb tubes to confirm bacterial growth in this N-free medium. The last sub-surface veils were then serially diluted and inoculated by spread-planting onto solid NFb medium, supplemented with 40 mg/L yeast extract. Diazotrophic strains were then individually identified amongst the colonies, as those able to form sub-surface veils in semi-solid NFb tubes. After extraction of genomic DNA (Neo-Biotech Quick Bacteria Genomic DNA Extraction Kit), bacterial isolates were first distinguished based on their BOX- profiles [101] and then further identified by 16S rRNA gene sequencing [102]. Assessment of bacterial ability to solubilize and use (i) poorly soluble sources of P (tri-calcium phosphate and phytate) was performed using Pikovskaya medium [103], and (ii) a poorly soluble source of K⁺ (feldspar, potassium aluminosilicate, potash feldspar, Bath Potters' Supplies, Somerset, UK) was performed using Alexandrov medium, according to [104]. The solubilization index (SI; (colony diameter + halo zone diameter) divided by colony diameter; [99,100]) was determined 5 days after the bacterial suspension was dropped on the agar medium (incubation at 28 °C). Indole-3-acetic acid production was determined according to [105] and [106]. Hydrogen cyanide production was tested according to [105] and [107].

Bacterial capacity to fix atmospheric nitrogen was assessed by injecting 2 mL of ¹⁵N₂ into a 9 mL tube (Vacuette[®] tube, 455001-Greiner Bio-One), through the septum of the tube, containing 3 mL of liquid NFb medium. After 5 days of culture at 37°C, the δ¹⁵N (¹⁵N/¹⁴N) was assayed in freeze-dried bacterial pellets obtained after centrifugation (10 min at 3220 rcf at room temperature) using isotopic mass spectrometry (Elemental Analyzer Vario-

PYROcube coupled to an IsoPrime Precision mass spectrometer, Elementar, Langensfeld, Germany).

From an initial collection of 32 diazotrophic bacterial strains (16 strains isolated from the Lebanese soil and another 16 strains from the French soil), two species displaying distinctive characteristics according to the tests described above, one from the Lebanese soil (LS) and the other from the French soil (FS), were selected for the present study. After genome sequencing, they were matched to *Pseudomonas urmiensis* (LS) and *Enterobacter ludwigii* (FS) and were named *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*, respectively, in this manuscript.

Bacterial whole-genome sequencing was performed at Beijing Genomics Institute (BGI, Hong Kong, China) using dnbseq sequencing technology [108]. Contigs assembly and gene and protein annotation were carried out at <https://galaxy.migale.inrae.fr/> (2018) and the genomic maps were built using the BLAST Ring Image Generator (BRIG software) [109].

4.3. PGPR Effect on Growth and Development of an Elite Wheat Cultivar

Seeds of an elite durum wheat (cv. Anvergur) were surface-sterilized (by soaking for 20 min in 4 % calcium hypochlorite) and rinsed 4 times for 5 min with sterile distilled water under a laminar flow hood. They were transferred onto sterile water-humidified filter paper in a Petri dish and kept in the dark at 26 °C for 2–3 days until they had a visible hypocotyl and roots 3–4 cm long. Seedlings were inoculated by immersion for 1 h in a bacterial suspension (10^7 CFU.mL⁻¹ in water; OD₆₀₀: 0.1). They were then immersed in sterile water and thereafter transferred onto a sterilized substrate (peat/sand/vermiculite mixture, 1:1:1 v:v:v, in 3 L pots; 4 seedlings per pot; 6 pots per condition, placed in a tray moved randomly every week in the greenhouse) in the greenhouse (16 h diurnal photoperiod, a day/night temperature of 21/17 °C). Uninoculated seedlings treated in a similar way were used as controls. The pots were watered with a Hoagland solution (1 mM NH₄NO₃, 5 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 0.1 mM NaFe(III) EDTA, 12.5 μM H₃BO₃, 2 μM MnCl₂, 3 μM ZnSO₄, 0.5 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 0.1 μM NiSO₄ and 25 μM KCl) as used by [35], or with modified Hoagland solutions containing a low concentration of nitrate, either 100 μM or 250 μM KNO₃ as a unique nitrogen source (no addition of NH₄NO₃ in the nutrient solutions, 2 mM Ca(NO₃)₂ being replaced with 2 mM CaCl₂, and the reduction of the concentration of KNO₃ being compensated for by addition of KCl).

The plants were phenotyped using the PhenoArch platform [110] hosted at M3P, Montpellier Plant Phenotyping Platforms (<https://www6.montpellier.inrae.fr/lepse/Plateformes-de-phenotypage/Montpellier-Plant-Phenotyping-Platforms-M3P>) (accessed on 11 June 2020). RGB images were taken for each plant from 13 views (12 side views with 30° rotational difference and one top view). Briefly, plant pixels were segmented from the background using a combination of thresholding and random forest algorithms, as described by [111], and available at (<https://github.com/openalea/phenomenal>) (accessed on 16 November 2020). The whole plant leaf area and shoot fresh weight were estimated using calibration curves built with multiple linear regression models, based on processed images against ground truth measurements of leaf area and fresh biomass.

The number of spikelets per rachis node on the main shoot was determined after 11 weeks of growth. Thousand-seed mass and the total seed mass per pot were determined at the end of the cycle. Seeds were harvested, shelled and then ground with a mortar. The seed nitrogen and carbon contents of the samples were determined using isotopic mass spectrometry (Elemental Analyzer Vario-PYROcube coupled to an IsoPrime Precision mass spectrometer, Elementar, UK).

4.4. Bacterial Culture Media for Metabolomic and Proteomic Profiling

Preliminary experiments were performed to develop a minimal medium containing a carbon source with a molecular mass below 100 Da, for the purpose of investigating the exo-metabolomes of PGPR strains. Lactic acid (molecular weight: 90 Da) was chosen because it was found to allow most of the tested PGPRs from our collection, including *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40*, to grow at a sufficiently rapid rate. Two types of bacterial

culture media were used, buffered and unbuffered. The basal medium was a Hoagland solution (composition detailed above) complemented with 2% lactic acid (approximately 220 mM) as the sole carbon source. It was either supplemented with 150 mM phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8) or not supplemented with buffer (pH adjusted in both cases to 6.8 with NaOH).

4.5. Bacterial Growth Curve in Minimal Media for Metabolomic and Proteomic Analyses

Half a loop of a bacterial colony, grown on LB medium in a Petri dish, was transferred into an Eppendorf tube containing 300 μL of either buffered or unbuffered minimal growth medium. A volume of 30 μL of the bacterial suspension thereby obtained was transferred into a pre-culture tube containing 3 mL of the corresponding minimal medium. Pre-culture was performed at 37 °C with gentle shaking at 200 rpm. After approximately 24 h, 300 μL of the bacterial pre-culture (approximately 10^9 colony-forming units, CFU) was transferred into a 200 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of the corresponding minimal growth medium. The inoculated medium in the Erlenmeyer was then incubated for approximately 60 h at 37 °C and 200 rpm. The bacterial growth curve was generated by measuring the optical density of the bacterial suspension at 600 nm every two hours (Spectrophotometer, SmartSpec™ 3000–BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

4.6. Metabolomics and Proteomics Profiling of Bacterial Exudates

Samples from the above-described bacterial cultures were taken during both the exponential and stationary phases of the growth, with respect to the growth curves, after 24 h and 48 h of culture for *BPMP-PU-28*, and 16 h and 40 h for *BPMP-EL-40*, respectively. After two successive centrifugations (3220 *rcf*, 15 min at 4 °C), supernatants were filtered (0.22 μm filter) and were either directly desalted using a C18 Sep Pak column (WAT036820-SPE Cartridge, SEP-PAK® TC18 Cart 1cc, Waters™, Milford, MA, USA) according to [112] for metabolomics analysis, or first reduced with 10 mM DTT (1,4-dithiothreitol), alkylated with 50 mM iodoacetamide, and then desalted using the same type of C18 Sep Pak column for proteomics analysis. Column eluents were lyophilized and stored at –20 °C before metabolomics and proteomics analyses.

For metabolomics, ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution MS (UHPLC–HRMS) analyses were performed on a Q Exactive Plus quadrupole mass spectrometer. Data processing and annotation were performed by MS-CleanR workflow [37]. See supplementary Information for details (Method S1).

For proteomics, the samples were either digested or not with trypsin. They were analyzed online using nanoHPLC (NCS3000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), with a gradient of 140 min, coupled to a mass spectrometer having the nano electrospray source Q-Exactive plus (Thermo Fisher Scientific). Database-dependent search algorithms and de novo sequencing were performed using the PEAKS X plus software (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada) [113]. The database of peptides, deduced from the 6 reading frames generated from each bacterium genome, was used for peptide and protein identifications. Cysteine carbamidomethylation (+57.02 Da) was set as a static modification, and methionine oxidation (+15.99 Da) and deamidation (+0.98 Da), as a variable modification. The parent mass error tolerance was set to 10 ppm, and the fragment mass error tolerance was set to 0.05 Da. For trypsin digestion, maximum missed cleavages were set at 3 and for non-digestion, no enzyme and unspecific digestion were used. The false discovery rate (FDR) threshold was set to 1%. Peptides identified by de novo sequencing were blasted (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (2009). Raw data were deposited on PRIDE-Proteomics Identification Database (PXD034914).

4.7. Effects of Bacterial Growth Supernatants on Wheat Development in Hydroponics Condition

Young, sterilized seedlings of the elite durum wheat (cv. Anvergur) were obtained according to the protocol described above. After excision of the seeds, they were transferred onto 40 mL of sterile Hoagland solution supplemented with sterile (0.22 μm -filtered) growth

supernatants taken during the stationary phase of the bacterial growth (final dilution: 5%). The final pH of the solution was adjusted to 6 with HCl. For mock treatment, seedlings were grown in the same hydroponic conditions using a Hoagland solution supplemented with 5% of a solution containing 0.8% of lactic acid, the Hoagland salts listed above, and 150 mM phosphate buffer. The growth solution was contained in 50 mL glass tubes. One seedling was introduced per tube, and a piece of sterile cotton was arranged around the coleoptile and pressed into the tube (without contact with the hydroponics solution), in order to preserve the sterility of the solution while allowing gas exchanges with the atmosphere. The entire procedure was carried out under a laminar flow hood. The tubes were wrapped in aluminum foil (to protect the growing roots against light) and placed in the culture chamber for 7 days. The sterility of the hydroponics solution at the end of the 7-day growth was tested using LB agar plates, and detection of microorganisms on the plate after 48 h of incubation at 37 °C led to discarding the corresponding plant. Plant root systems were scanned (Epson Perfection V850 Pro Scanner, Epson, Nagano, Japan). The resulting images were analyzed to measure root system parameters using the WinRHIZO™ software (V.2009 Pro, Regent Instruments, Montreal, QC, Canada), as indicated (http://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.html (released in 1996) for “Analysis of washed root systems”).

4.8. Statistical Analysis

For biochemical and physiological tests, data are mean values of independent experimental repetitions. Depending on the experiments, differences among treatments were analyzed by unpaired t-test or one-way ANOVA, followed by Tukey’s multiple range, using GraphPad Prism 8 version 8.3.0 (San Diego, CA, USA) and taking $p \leq 0.0001$, $p \leq 0.001$, $p \leq 0.01$ or $p \leq 0.05$, based on unpaired experimental design, as significant.

For metabolomics data, statistical analyses were performed with metaboanalyst 5.0 web interface [114]. All data were normalized to total ion chromatogram (TIC) and were UV (unit variance) scaled before multivariate analysis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232315248/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, H.S. and J.-B.P.; Data curation, H.Z., F.B., G.M., S.F., A.P., L.C.-B., T.P., C.F., E.B., I.M., C.R. and J.-B.P.; Formal analysis, H.Z. and G.M.; Investigation, H.Z.; Methodology, H.Z., F.B., G.M., S.F., A.P., M.L., T.P., C.F., E.B., I.M. and C.R.; Project administration, A.-A.V. and A.C.; Software, F.B. and C.F.; Supervision, I.D., L.E.Z., A.C. and J.-B.P.; Validation, G.M., S.F., M.L., L.C.-B., E.B., I.M. and C.R.; Visualization, A.P.; Writing—original draft, H.S., J.-B.P. and H.Z.; Writing—review and editing, A.-A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by doctoral grants (2937, 2018–2021) (to H.Z.) from the National Council for Scientific Research of Lebanon (CNRS-L), the Francophone University Agency (AUF) and the Lebanese University (UL), and through LabEx AGRO 2011-LABX-002 (under I-Site Muse framework) coordinated by Agropolis Fondation (2100–016) (to A.-A.V.). This work was also supported by grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 (to G.M. and A.M.) from the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics and by grant SCOOP-ANR-19-CE32-0011 (to J.-B.P. and H.Z.) from the French National Research Agency.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Raw proteomics data and Scaffold file containing all peptide information and spectra are available from the PRIDE repository with accession no. PXD034914. Raw metabolomics data are available from the Zenodo repository (DOI: 10.5281/zenodo.6799532).

Acknowledgments: The authors thank Ahmad Bitar, Ali Chehade, Joelle Breidy and Marie Nabhan for their help in identifying the study area, botanical and soil analyses, and Doan Trung Luu and Jean-Christophe Boyer for their review of the article before submission.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Álvarez-Rogel, J.; Barberá, G.; Maxwell, B.; Guerrero-Brotons, M.; Díaz-García, C.; Martínez-Sánchez, J.; Sallent, A.; Martínez-Ródenas, J.; González-Alcaraz, M.; Jiménez-Cárceles, F.; et al. The case of Mar Menor eutrophication: State of the art and description of tested Nature-Based Solutions. *Ecol. Eng.* **2020**, *158*, 106086. [[CrossRef](#)]
2. Vacheron, J.; Desbrosses, G.; Bouffaud, M.-L.; Touraine, B.; Moëgne-Loccoz, Y.; Muller, D.; Legendre, L.; Wisniewski-Dyé, F.; Prigent-Combaret, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 356. [[CrossRef](#)]
3. Ortiz-Castro, R.; Campos-García, J.; López-Bucio, J. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* Influence Arabidopsis Root System Architecture Through an Auxin Response Mediated by Bioactive Cyclodipeptides. *J. Plant Growth Regul.* **2020**, *39*, 254–265. [[CrossRef](#)]
4. Annapurna, K.; Kumar, A.; Kumar, L.V.; Govindasamy, V.; Bose, P.; Ramadoss, D. *PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management*; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 405–425. [[CrossRef](#)]
5. Rosier, A.; Medeiros, F.H.V.; Bais, H.P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant Soil* **2018**, *428*, 35–55. [[CrossRef](#)]
6. Calvo, P.; Zebelo, S.; McNear, D.; Kloepper, J.; Fadamiro, H. Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *J. Plant Interactions* **2019**, *14*, 224–231. [[CrossRef](#)]
7. Grover, M.; Bodhankar, S.; Sharma, A.; Sharma, P.; Singh, J.; Nain, L. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *4*, 618230. [[CrossRef](#)]
8. Etesami, H.; Maheshwari, D.K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *156*, 225–246. [[CrossRef](#)]
9. Wang, H.; Liu, R.; You, M.P.; Barbetti, M.J.; Chen, Y. Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1988. [[CrossRef](#)]
10. Veresoglou, S.D.; Meneses, G. Impact of inoculation with *Azospirillum spp.* on growth properties and seed yield of wheat: A meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil* **2010**, *337*, 469–480. [[CrossRef](#)]
11. Etesami, H.; Alikhani, H.A. Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. *Rhizosphere* **2016**, *2*, 5–12. [[CrossRef](#)]
12. Naseri, R.; Azadi, S.; Rahimi, M.J.; Maleki, A.; Mirzaei, A. Effects of inoculation with *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas putida* on yield and some of the important agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int. J. Agron. Plant Prod.* **2013**, *4*, 1602–1610.
13. Alves, G.C.; Videira, S.S.; Urquiaga, S.; Reis, V.M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant Soil* **2015**, *387*, 307–321. [[CrossRef](#)]
14. Drogue, B.; Doré, H.; Borland, S.; Wisniewski-Dyé, F.; Prigent-Combaret, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* **2012**, *163*, 500–510. [[CrossRef](#)]
15. Chamam, A.; Sanguin, H.; Bellvert, F.; Meiffren, G.; Comte, G.; Wisniewski-Dyé, F.; Bertrand, C.; Prigent-Combaret, C. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum–Oryza sativa* association. *Phytochemistry* **2013**, *87*, 65–77. [[CrossRef](#)]
16. Amaral, F.P.D.; Pankievicz, V.C.S.; Arisi, A.C.M.; de Souza, E.M.; Pedrosa, F.; Stacey, G. Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Mol. Biol.* **2016**, *90*, 689–697. [[CrossRef](#)]
17. Pankievicz, V.C.S.; Amaral, F.P.D.; Ané, J.-M.; Stacey, G. Diazotrophic Bacteria and Their Mechanisms to Interact and Benefit Cereals. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **2021**, *34*, 491–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ryu, C.-M.; Farag, M.A.; Hu, C.-H.; Reddy, M.S.; Wei, H.-X.; Paré, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4927–4932. [[CrossRef](#)]
19. Gutiérrez-Luna, F.M.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Valencia-Cantero, E.; De La Cruz, H.R.; Macías-Rodríguez, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **2010**, *51*, 75–83. [[CrossRef](#)]
20. Ryu, C.-M.; Farag, M.A.; Pare, P.W.; Kloepper, J.W. Invisible Signals from the Underground: Bacterial Volatiles Elicit Plant Growth Promotion and Induce Systemic Resistance. *Plant Pathol. J.* **2005**, *21*, 7–12. [[CrossRef](#)]
21. Pérez-Jaramillo, J.E.; Carrion, V.J.; De Hollander, M.; Raaijmakers, J.M. The wild side of plant microbiomes. *Microbiome* **2018**, *6*, 143. [[CrossRef](#)]
22. Valente, J.; Gerin, F.; Le Gouis, J.; Moëgne-Loccoz, Y.; Prigent-Combaret, C. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant, Cell Environ.* **2020**, *43*, 246–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Spor, A.; Roucou, A.; Mounier, A.; Bru, D.; Breuil, M.-C.; Fort, F.; Vile, D.; Roumet, P.; Philippot, L.; Violle, C. Domestication-driven changes in plant traits associated with changes in the assembly of the rhizosphere microbiota in tetraploid wheat. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ezgi Özkurt, M.; Hassani, A.; Sesiz, U.; Künzel, S.; Dagan, T.; Özkan, H.; Stukenbrock, E.H. Higher stochasticity of microbiota composition in seedlings of domesticated wheat compared to wild wheat. *bioRxiv* **2019**. [[CrossRef](#)]

25. Martínez-Romero, E.; Aguirre-Noyola, J.L.; Taco-Taype, N.; Martínez-Romero, J.; Zuñiga-Dávila, D. Plant microbiota modified by plant domestication. *Syst. Appl. Microbiol.* **2020**, *43*, 126106. [[CrossRef](#)]
26. Miller, S.B.; Heuberger, A.L.; Broeckling, C.D.; Jahn, C.E. Non-Targeted Metabolomics Reveals Sorghum Rhizosphere-Associated Exudates are Influenced by the Belowground Interaction of Substrate and Sorghum Genotype. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 431. [[CrossRef](#)]
27. Casas, M.E.; Matamoros, V. Analytical challenges and solutions for performing metabolomic analysis of root exudates. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2021**, *31*, e00130. [[CrossRef](#)]
28. Williams, A.; Langridge, H.; Straathof, A.L.; Muhamadali, H.; Hollywood, K.A.; Goodacre, R.; de Vries, F.T. Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species. *J. Ecol.* **2022**, *110*, 21–33. [[CrossRef](#)]
29. Tyc, O.; Zweers, H.; de Boer, W.; Garbeva, P. Volatiles in Inter-Specific Bacterial Interactions. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1412. [[CrossRef](#)]
30. Kanchiswamy, C.N.; Malnoy, M.; Maffei, M. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 151. [[CrossRef](#)]
31. Tahir, H.A.S.; Gu, Q.; Wu, H.; Raza, W.; Hanif, A.; Wu, L.; Colman, M.V.; Gao, X. Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 171. [[CrossRef](#)]
32. Wu, Y.; Zhou, J.; Li, C.; Ma, Y. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *MicrobiologyOpen* **2019**, *8*, e00813. [[CrossRef](#)]
33. Yasmin, H.; Rashid, U.; Hassan, M.N.; Nosheen, A.; Naz, R.; Ilyas, N.; Sajjad, M.; Azmat, A.; Alyemeni, M.N. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* alleviated drought stress by modulating defense system in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* **2020**, *172*, 896–911. [[CrossRef](#)]
34. Feitosa-Junior, O.R.; Stefanello, E.; Zaini, P.A.; Nascimento, R.; Pierry, P.M.; Dandekar, A.M.; Lindow, S.E.; da Silva, A.M. Proteomic and Metabolomic Analyses of *Xylella fastidiosa* OMV-Enriched Fractions Reveal Association with Virulence Factors and Signaling Molecules of the DSF Family. *Phytopathology* **2019**, *109*, 1344–1353. [[CrossRef](#)]
35. Shavrukov, Y.; Genc, Y.; Hayes, J. The use of hydroponics in abiotic stress tolerance research. In *Hydroponics—A Standard Methodology for Plant Biological Researches*, 1st ed.; Toshiki, A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 39–66. [[CrossRef](#)]
36. Shane, M.W.; Dixon, K.W.; Lambers, H. The occurrence of dauciform roots amongst Western Australian reeds, rushes and sedges, and the impact of phosphorus supply on dauciform-root development in *Schoenus unispiculatus* (Cyperaceae). *New Phytol.* **2004**, *165*, 887–898. [[CrossRef](#)]
37. Fraiser-Vannier, O.; Chervin, J.; Cabanac, G.; Puech-Pages, V.; Fournier, S.; Durand, V.; Amiel, A.; André, O.; Benamar, O.A.; Dumas, B.; et al. MS-CleanR: A Feature-Filtering Workflow for Untargeted LC–MS Based Metabolomics. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 9971–9981. [[CrossRef](#)]
38. Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ikeda, K.; Kanazawa, M.; VanderGheynst, J.; Fiehn, O.; Arita, M. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 523–526. [[CrossRef](#)]
39. Tsugawa, H.; Kind, T.; Nakabayashi, R.; Yukihira, D.; Tanaka, W.; Cajka, T.; Saito, K.; Fiehn, O.; Arita, M. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7946–7958. [[CrossRef](#)]
40. Afek, U.; Carmeli, S.; Aharoni, N. Columbiametin, a phytoalexin associated with celery resistance to pathogens during storage. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1347–1350. [[CrossRef](#)]
41. Anttila, J.; Heinonen, P.; Nenonen, T.; Pino, A.; Iwai, H.; Kauppi, E.; Soliymani, R.; Baumann, M.; Saksi, J.; Suni, N.; et al. Is coproporphyrin III a copper-acquisition compound in *Paracoccus denitrificans*? *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 311–318. [[CrossRef](#)]
42. Cleary, J.L.; Kolachina, S.; Wolfe, B.E.; Sanchez, L.M. Coproporphyrin III Produced by the Bacterium *Glutamicibacter arilaitensis* Binds Zinc and Is Upregulated by Fungi in Cheese Rinds. *mSystems* **2018**, *3*, e00036-18. [[CrossRef](#)]
43. Schikora, A.; Schenk, S.T.; Hartmann, A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol. Biol.* **2016**, *90*, 605–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jain, D.K.; Patriquin, D.G. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 1208–1213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kapulnik, Y.; Okon, Y.; Henis, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* **1985**, *31*, 881–887. [[CrossRef](#)]
46. Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Broek, A.V.; Vanderleyden, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **1999**, *212*, 153–162. [[CrossRef](#)]
47. Zhou, C.; Ma, Z.; Zhu, L.; Xiao, X.; Xie, Y.; Zhu, J.; Wang, J. Rhizobacterial Strain *Bacillus megaterium* BOFC15 Induces Cellular Polyamine Changes that Improve Plant Growth and Drought Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 976. [[CrossRef](#)]
48. Jochum, M.; McWilliams, K.; Borrego, E.J.; Kolomiets, M.V.; Niu, G.; Pierson, E.A.; Jo, Y.-K. Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2106. [[CrossRef](#)]
49. Mazzola, M.; Funnell, D.; Raaijmakers, J. Wheat Cultivar-Specific Selection of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* Species from Resident Soil Populations. *Microb. Ecol.* **2004**, *48*, 338–348. [[CrossRef](#)]
50. Maketon, C.; Fortuna, A.-M.; Okubara, P.A. Cultivar-dependent transcript accumulation in wheat roots colonized by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 wild type and mutant strains. *Biol. Control.* **2012**, *60*, 216–224. [[CrossRef](#)]

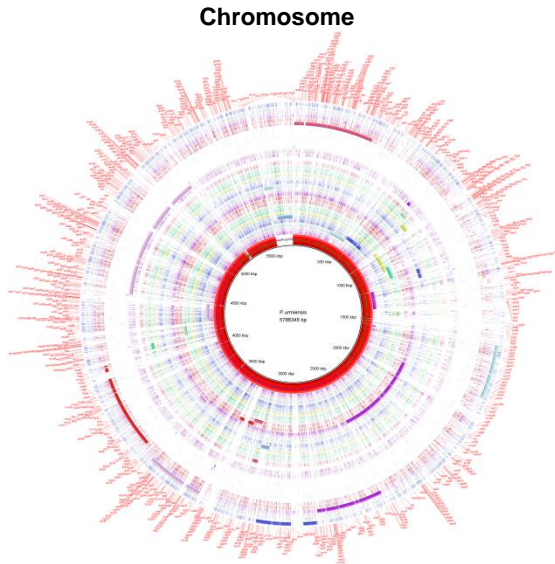
51. Sasaki, K.; Ikeda, S.; Eda, S.; Mitsui, H.; Hanzawa, E.; Kisara, C.; Kazama, Y.; Kushida, A.; Shinano, T.; Minamisawa, K.; et al. Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2010**, *56*, 636–644. [[CrossRef](#)]
52. Peiffer, J.A.; Spor, A.; Koren, O.; Jin, Z.; Tringe, S.G.; Dangl, J.L.; Buckler, E.S.; Ley, R.E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6548–6553. [[CrossRef](#)]
53. Wintermans, P.C.A.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Mol. Biol.* **2016**, *90*, 623–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zuluaga, M.Y.A.; de Oliveira, A.L.M.; Valentinuzzi, F.; Tiziani, R.; Pii, Y.; Mimmo, T.; Cesco, S. Can Inoculation With the Bacterial Biostimulant *Enterobacter* sp. Strain 15S Be an Approach for the Smarter P Fertilization of Maize and Cucumber Plants? *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 719873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Saubidet, M.I.; Fatta, N.; Barneix, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* **2002**, *245*, 215–222. [[CrossRef](#)]
56. New, P.B.; Kennedy, I.R. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol.* **1989**, *17*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cassán, F.; Diaz-Zorita, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol. Biochem.* **2016**, *103*, 117–130. [[CrossRef](#)]
58. Diaz-Zorita, M.; Fernández-Canigia, M.V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* **2009**, *45*, 3–11. [[CrossRef](#)]
59. Hungria, M.; Campo, R.J.; Souza, E.M.; Pedrosa, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* **2010**, *331*, 413–425. [[CrossRef](#)]
60. Bulgarelli, D.; Garrido-Oter, R.; Münch, P.C.; Weiman, A.; Dröge, J.; Pan, Y.; McHardy, A.C.; Schulze-Lefert, P. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 392–403. [[CrossRef](#)]
61. Pérez-Jaramillo, J.E.; Mendes, R.; Raaijmakers, J.M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol. Biol.* **2016**, *90*, 635–644. [[CrossRef](#)]
62. Cummings, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environ. Biotechnol.* **2009**, *5*, 43–50.
63. Sharafzadeh, S. Effects of pgpr on growth and nutrients uptake of tomato. *Int. J. Adv. Eng. Technol.* **2012**, *2*, 27–31.
64. Verbon, E.H.; Liberman, L.M. Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 218–229. [[CrossRef](#)]
65. Zhang, H.; Kim, M.-S.; Krishnamachari, V.; Payton, P.; Sun, Y.; Grimson, M.; Farag, M.A.; Ryu, C.-M.; Allen, R.; Melo, I.S.; et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* **2007**, *226*, 839–851. [[CrossRef](#)]
66. Contesto, C.; Milesi, S.; Mantelin, S.; Zancarini, A.; Desbrosses, G.; Varoquaux, F.; Bellini, C.; Kowalczyk, M.; Touraine, B. The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* **2010**, *232*, 1455–1470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Zamioudis, C.; Mastranesti, P.; Dhonukshe, P.; Blilou, I.; Pieterse, C.M. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 304–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Wang, J.; Zhang, Y.; Li, Y.; Wang, X.; Nan, W.; Hu, Y.; Zhang, H.; Zhao, C.; Wang, F.; Li, P.; et al. Endophytic microbes *Bacillus* sp. LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Rep.* **2015**, *34*, 1075–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Asari, S.; Tarkowska, D.; Rolcik, J.; Novak, O.; Palmero, D.V.; Bejai, S.; Meijer, J. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* **2016**, *245*, 15–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Poitout, A.; Martinière, A.; Kucharczyk, B.; Queruel, N.; Silva-Andia, J.; Mashkoo, S.; Gamet, L.; Varoquaux, F.; Paris, N.; Sentenac, H.; et al. Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 1199–1211. [[CrossRef](#)]
71. Dahmani, M.A.; Desrut, A.; Moumen, B.; Verdon, J.; Mermouri, L.; Kacem, M.; Coutos-Thévenot, P.; Kaid-Harche, M.; Bergès, T.; Vriet, C. Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Front. Plant Sci.* **2020**, *27*, 124. [[CrossRef](#)]
72. Lery, L.M.S.; Hemery, A.S.; Nogueira, E.M.; von Krüger WM, A.; Bisch, P.M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *APS* **2011**, *24*, 562–576. [[CrossRef](#)]
73. Kierul, K.; Voigt, B.; Albrecht, D.; Chen, X.-H.; Carvalhais, L.C.; Borriss, R. Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology* **2015**, *161*, 131–147. [[CrossRef](#)]
74. Alberton, D.; Valdameri, G.; Moure, V.R.; Monteiro, R.A.; Pedrosa, F.D.O.; Müller-Santos, M.; De Souza, E.M. What Did We Learn From Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Grass Associations Studies Through Proteomic and Metabolomic Approaches? *Front. Sustain. Food Syst.* **2020**, *4*, 607343. [[CrossRef](#)]
75. Mashabela, M.D.; Piater, L.A.; Dubery, I.A.; Tugizimana, F.; Mhlongo, M.I. Rhizosphere Tripartite Interactions and PGPR-Mediated Metabolic Reprogramming towards ISR and Plant Priming: A Metabolomics Review. *Biology* **2022**, *11*, 346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Rieusset, L.; Rey, M.; Wisniewski-Dyé, F.; Prigent-Combaret, C.; Comte, G. Wheat Metabolite Interferences on Fluorescent *Pseudomonas* Physiology Modify Wheat Metabolome through an Ecological Feedback. *Metabolites* **2022**, *12*, 236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Babenko, L.M.; Kosakivska, I.V.; Romanenko, K.O. Molecular mechanisms of N-acyl homoserine lactone signals perception by plants. *Cell Biol. Int.* **2022**, *46*, 523–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Moshynets, O.V.; Babenko, L.M.; Rogalsky, S.P.; Iungin, O.S.; Foster, J.; Kosakivska, I.V.; Potters, G.; Spiers, A.J. Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0209460. [[CrossRef](#)]
79. Hartmann, A.; Klink, S.; Rothballer, M. Importance of N-Acyl-Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing and Quorum Quenching in Pathogen Control and Plant Growth Promotion. *Pathogens* **2021**, *10*, 1561. [[CrossRef](#)]
80. Wood, D.W.; Gong, F.; Daykin, M.M.; Williams, P.; Pierson, L.S. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 7663–7670. [[CrossRef](#)]
81. Mathesius, U.; Mulders, S.; Gao, M.; Teplitski, M.; Caetano-Anollés, G.; Rolfe, B.G.; Bauer, W.D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1444–1449. [[CrossRef](#)]
82. Decker, H.; Walz, F.; Bormann, C.; Zahner, H.; Fiedler, H.P. Nikkomycins W_z and W_x, new chitin synthetase inhibitors from *Streptomyces tendae*. *J. Antibiot.* **1990**, *1*, 43–48. [[CrossRef](#)]
83. Donabedian, H. Quorum Sensing and its Relevance to Infectious Diseases. *J. Infect.* **2003**, *46*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Coquant, G.; Grill, J.-P.; Seksik, P. Impact of N-Acyl-Homoserine Lactones, Quorum Sensing Molecules, on Gut Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Constantin, O.E. Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* **2009**, *5*, 18–22.
86. Ortiz-Castro, R.; López-Bucio, J. Review: Phytostimulation and root architectural responses to quorum-sensing signals and related molecules from rhizobacteria. *Plant Sci.* **2019**, *284*, 135–142. [[CrossRef](#)]
87. Zaytseva, Y.V.; Sidorov, A.V.; Marakaev, O.A.; Khmel, I.A. Plant-Microbial Interactions Involving Quorum Sensing Regulation. *Microbiology* **2019**, *88*, 523–533. [[CrossRef](#)]
88. Song, G.C.; Choi, H.K.; Kim, Y.S.; Choi, J.S.; Ryu, C.-M. Seed defense biopriming with bacterial cyclodipeptides triggers immunity in cucumber and pepper. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14209. [[CrossRef](#)]
89. Ortiz-Castro, R.; Díaz-Pérez, C.; Martínez-Trujillo, M.; del Río, R.E.; Campos-García, J.; López-Bucio, J. Trans kingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7253–7258. [[CrossRef](#)]
90. Smets, D.; Loos, M.S.; Karamanou, S.; Economou, A. Protein Transport Across the Bacterial Plasma Membrane by the Sec Pathway. *J. Protein Chem.* **2019**, *38*, 262–273. [[CrossRef](#)]
91. Qing, G.; Gong, N.; Chen, X.; Chen, J.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, R.; Zhang, S.; Zhang, Z.; Zhao, X.; et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys. Rep.* **2019**, *5*, 184–198. [[CrossRef](#)]
92. Dineshkumar, K.; Aparna, V.; Wu, L.; Wan, J.; Abdelaziz, M.H.; Su, Z.; Wang, S.; Xu, H. Bacterial bug-out bags: Outer membrane vesicles and their proteins and functions. *J. Microbiol.* **2020**, *58*, 531–542. [[CrossRef](#)]
93. Furuyama, N.; Sircili, M.P. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: Structure, Functions, Biogenesis, and Vaccine Application. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Mozaheb, N.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Membrane Vesicle Production as a Bacterial Defense against Stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 600221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Avila-Calderón, E.D.; Ruiz-Palma, M.D.S.; Aguilera-Arreola, M.G.; Velázquez-Guadarrama, N.; Ruiz, E.A.; Gomez-Lunar, Z.; Witonsky, S.; Contreras-Rodríguez, A. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 557902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Toyofuku, M.; Nomura, N.; Eberl, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 13–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Berleman, J.; Auer, M. The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 347–354. [[CrossRef](#)]
98. Dell'Annunziata, F.; Folliero, V.; Giugliano, R.; De Filippis, A.; Santarcangelo, C.; Izzo, V.; Daglia, M.; Galdiero, M.; Arciola, C.; Franci, G. Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5985. [[CrossRef](#)]
99. Estefan, G.; Sommer, R.; Ryan, J. *Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A Manual for the West Asia and North Africa Region*, 3rd ed.; International Center for Agricultural Research in the Dry Areas: Aleppo, Syria, 2013.
100. Baldani, J.I.; Reis, V.M.; Videira, S.S.; Boddey, L.H.; Baldani, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant Soil* **2014**, *384*, 413–431. [[CrossRef](#)]
101. Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T.; de Bruijn, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2286–2295. [[CrossRef](#)]
102. Reinhardt, L.; Ramos, P.L.; Manfio, G.P.; Barbosa, H.R.; Pavan, C.; Moreira-Filho, C.A. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 414–422. [[CrossRef](#)]
103. Pande, A.; Pandey, P.; Mehra, S.; Singh, M.; Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2017**, *15*, 379–391. [[CrossRef](#)]

104. Rajawat, M.V.S.; Singh, S.; Tyagi, S.P.; Saxena, A.K. A Modified Plate Assay for Rapid Screening of Potassium-Solubilizing Bacteria. *Pedosphere* **2016**, *26*, 768–773. [[CrossRef](#)]
105. Haque, M.; Mosharaf, K.; Khatun, M.; Haque, A.; Biswas, S.; Islam, S.; Islam, M.; Shozib, H.B.; Miah, M.U.; Molla, A.H.; et al. Biofilm Producing Rhizobacteria with Multiple Plant Growth-Promoting Traits Promote Growth of Tomato under Water-Deficit Stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 542053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Gordon, A.; Weber, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* **1951**, *26*, 192–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Lorck, H. Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiol. Plant.* **1948**, *1*, 142–146. [[CrossRef](#)]
108. Chen, Y.; Chen, Y.; Shi, C.; Huang, Z.; Zhang, Y.; Li, S.; Li, Y.; Ye, J.; Yuxin, C.; Li, Z.; et al. SOAPnuke: A Map Reduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience* **2018**, *7*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Alikhan, N.-F.; Petty, N.K.; Ben Zakour, N.L.; Beatson, S.A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 402. [[CrossRef](#)]
110. Cabrera-Bosquet, L.; Fournier, C.; Brichet, N.; Welcker, C.; Suard, B.; Tardieu, F. High-throughput estimation of incident light, light interception and radiation-use efficiency of thousands of plants in a phenotyping platform. *New Phytol.* **2016**, *212*, 269–281. [[CrossRef](#)]
111. Brichet, N.; Fournier, C.; Turc, O.; Strauss, O.; Artzet, S.; Pradal, C.; Welcker, C.; Tardieu, F.; Cabrera-Bosquet, L. A robot-assisted imaging pipeline for tracking the growths of maize ear and silks in a high-throughput phenotyping platform. *Plant Methods* **2017**, *13*, 96. [[CrossRef](#)]
112. Lehmann, S.; Vialaret, J.; Séveno, M.; Tiers, L.; Hirtz, C.; Lehmann, S.; Vialaret, J.; Séveno, M.; Tiers, L.; Gabelle, A.; et al. Comparison of hydrophobic, lipophilic and immunodepletion pre-fractionation methods for label-free LC-MS/MS identification of biomarkers in human cerebrospinal fluid. *J. Proteomics Bioinform.* **2021**, S5. [[CrossRef](#)]
113. Zhang, J.; Xin, L.; Shan, B.; Chen, W.; Xie, M.; Yuen, D.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Lajoie, G.A.; Ma, B. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, M111.010587. [[CrossRef](#)]
114. Pang, Z.; Zhou, G.; Ewald, J.; Le Chang, L.; Hacariz, O.; Basu, N.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat. Protoc.* **2022**, *178*, 1735–1761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary data

(A) *BPMP-PU-28*



(B) *BPMP-EL-40*

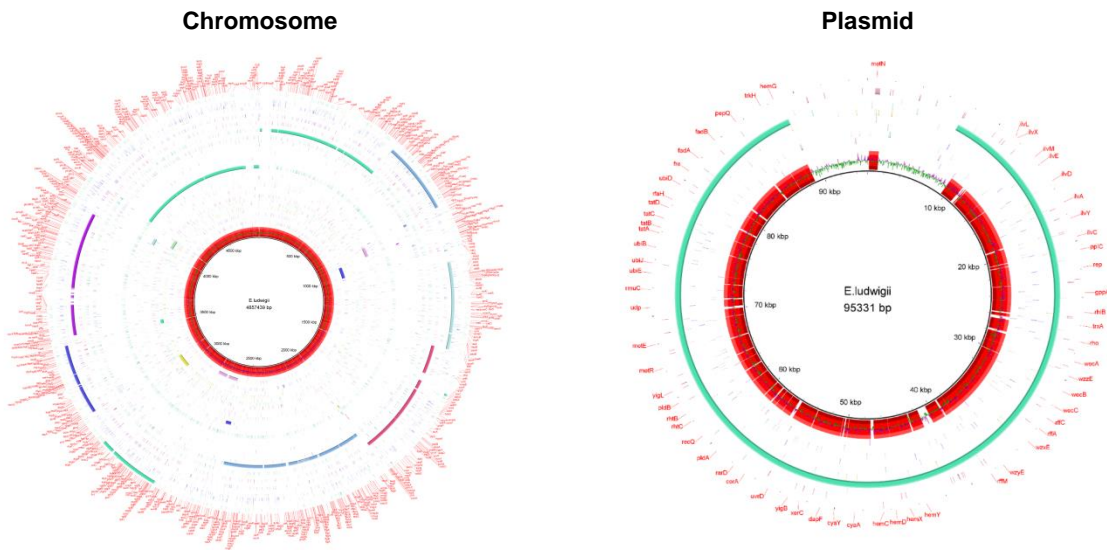


Figure S1. Genome maps of *BPMP-PU-28* and *BPMP-EL-40* bacterial strains.

Blast Ring Image Generator (BRIG) diagram showing homologous chromosome and plasmid segments resulting from the sequencing of the *BPMP-PU-28* (A) and *BPMP-EL-40* (B) genomes. The genomic sequences were blasted against the reference genome of *Pseudomonas urmiensis* (JABWRE020000001.1) and *Enterobacter ludwigii* (CP017279.1, CP017280.1) of the NCBI.

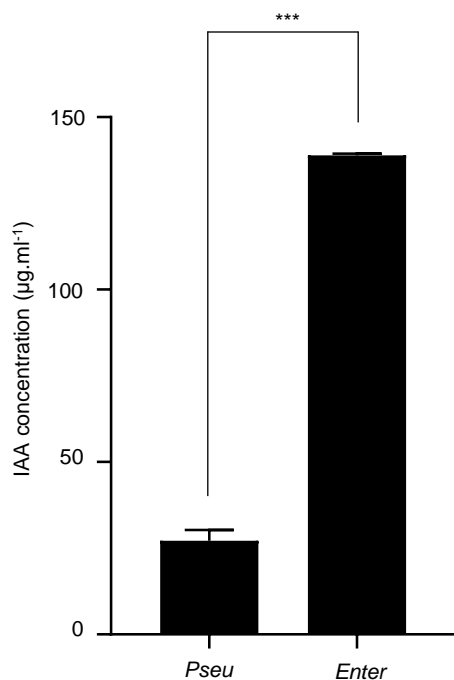


Figure S2. Indole-3-acetic acid (IAA) production by BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*).

The bacteria were grown for 48 h in LB medium supplemented with tryptophan (0.2%). IAA was assayed in the media as described in [105,106]. Means \pm SE (n = 3). *** above the bars indicate that the difference between BPMP-PU-28 (Pseu: *Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (Enter: *Enterobacter ludwigii*) is statistically significant (Student's t-Test, $P \leq 0.001$).

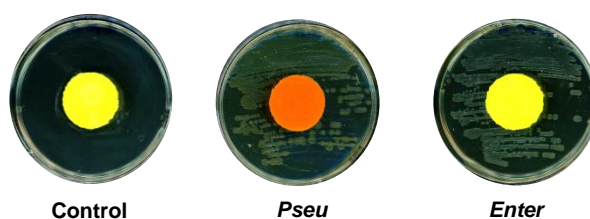


Figure S3. Hydrogen cyanide production ability of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*). Both BPMP-PU-28 (*Pseu*: *Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enter*: *Enterobacter ludwigii*) were grown on agar plates (LB medium supplemented with 0.25% glycine). A change in color from yellow to orange of a piece of filter paper soaked in alkaline picrate solution and adhering to the inside of the Petri dish lid indicates hydrogen cyanide production capacity. Control: agar plate without bacteria.

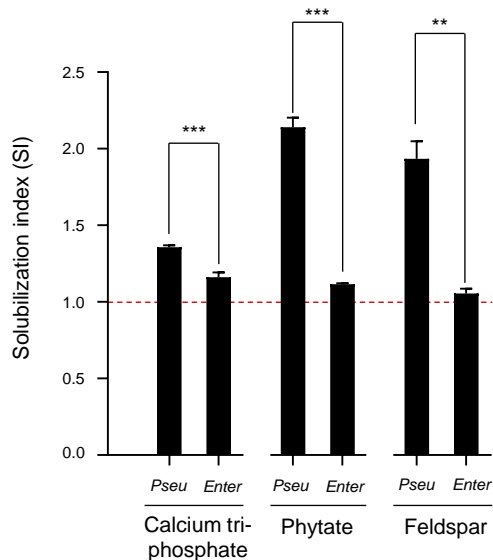
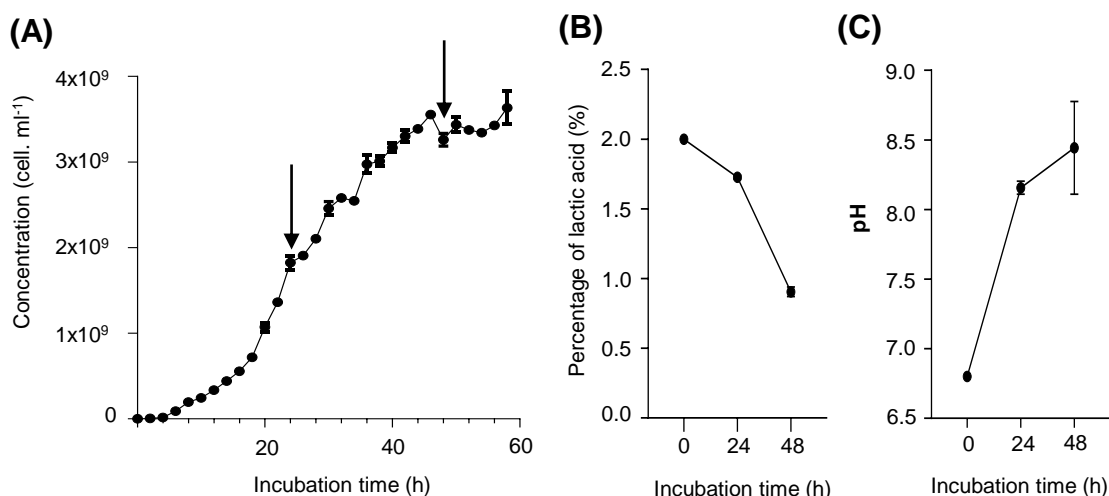


Figure S4. Ability of *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*) to use poorly available sources of phosphorus and potassium.

The two bacterial strains were grown on agar plates containing a poorly available source of P, either tri-calcium phosphate or phytate, in Pikovskaya medium, or a poorly soluble source of K⁺, feldspar (potassium aluminosilicate, Potash Feldspar, Bath Potters' Supplies, Somerset, UK) in Alexandrov medium. Bacterial ability to use these nutrient sources was assessed by determining the so-called solubilisation index (SI), based on measurement of the diameter of the bacterial colony and of the diameter of the halo zone around the colony (at 5 days of growth after the drop of the bacterial suspension on the agar plate). A SI value higher than 1 indicates the ability of bacteria to solubilize the nutrient source. Means \pm SE (n = 3). ** and *** above the bars indicate that the difference between the bacterial strains *BPMP-PU-28* (*Pseu*: *Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enter*: *Enterobacter ludwigii*) is statistically significant (Student's t-Test, $P \leq 0.01$ and 0.001 respectively).

Pseudomonas urmiensis



Enterobacter ludwigii

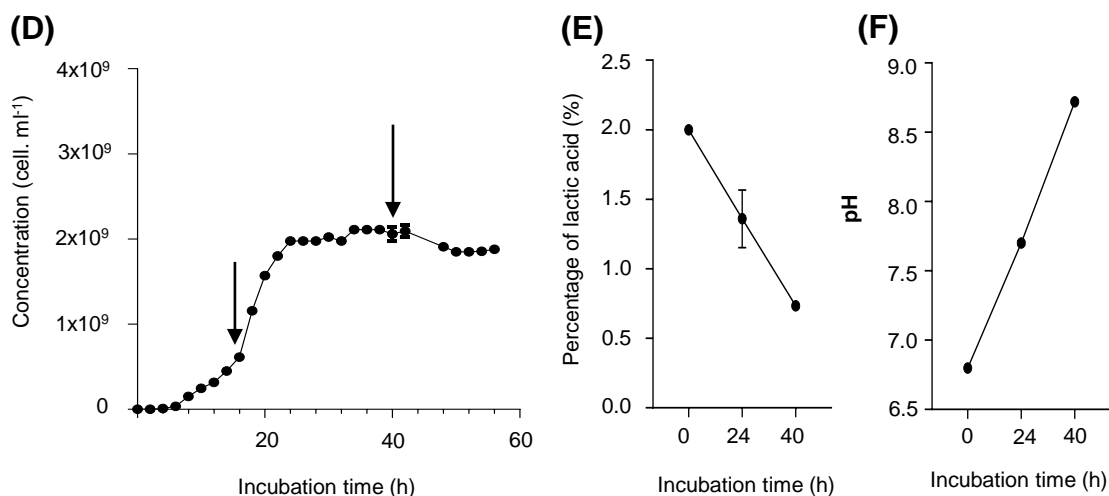


Figure S5. Growth of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) in a minimal medium supplemented with lactate as carbon source.

Composition of the growth medium: Hoagland solution supplemented with 2% (ca. 220 mM) lactate, pH 6.8. Bacteria were grown for 60 hours at 37°C and 200 rpm.

(A) and (D) Typical growth kinetics of *Pseudomonas urmiensis* and *Enterobacter ludwigii*. The arrows above the kinetics indicate the times at which aliquots of culture media were taken in similar experiments (during the exponential and stationary phases, E and S, respectively) for lactate concentration, pH measurement, and for metabolomics and proteomics analyses of bacterial culture supernatants (see Figures 5 and 6) and tests of their effects on root system and root hair development (Figures 3 and 4).

(B) and (E) Decrease in the percentage of lactate of the culture medium of *Pseudomonas urmiensis* (B) and *Enterobacter ludwigii* (E).

(C) and (F) Evolution of the pH in the *Pseudomonas urmiensis* (C) and *Enterobacter ludwigii* (F) culture medium.

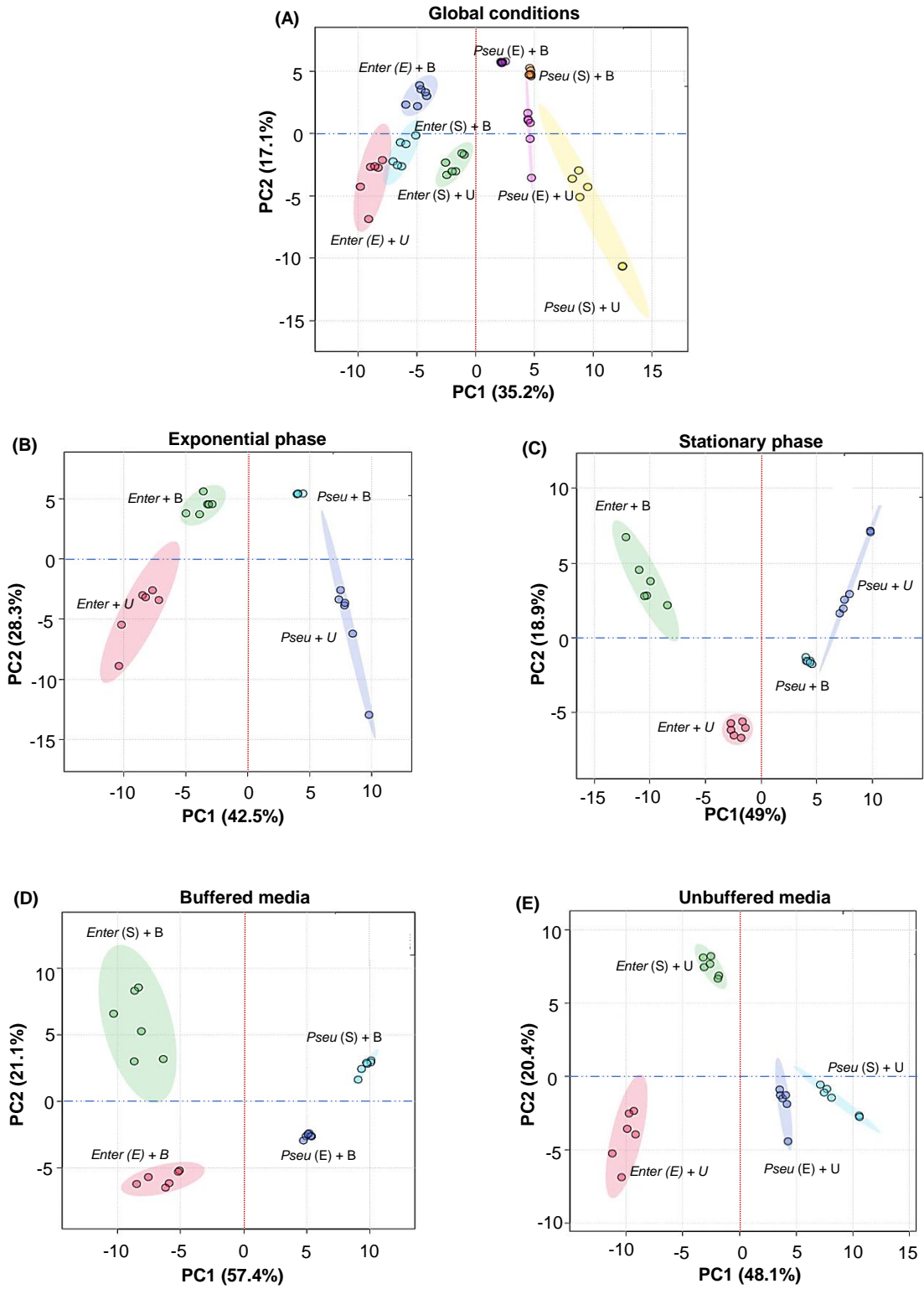


Figure S6. Comparative metabolomics profiling of supernatants of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) culture media: principal component analysis (PCA) of the metabolites identified in the culture supernatant of the two bacterial strains.

BPMP-PU-28 and BPMP-EL-40 bacteria (*Pseu*: *Pseudomonas urmiensis* and *Enter*: *Enterobacter ludwigii*, respectively) were grown (6 biological replicates per condition) in a minimal Hoagland medium complemented with 2% lactate (as carbon source) and buffered with phosphate buffer (150 mM, pH 6.8) or unbuffered (B and U, respectively). Aliquots of culture media were collected during the exponential (E) or stationary phases (S) (as indicated by the arrows in Figure S5 A and D). Untargeted metabolomics analyses of the collected culture supernatant were performed via UHPLC-MS/MS fragmentation. Score plots were generated using MetaboAnalyst software. (A) Global PCA compiling both strains at two different stages (E and S) and in the two culture media (B and U). (B) and (C) PCA analysis of the growth media collected during the exponential (B) and stationary phase (C) of the two strains in presence of buffered or unbuffered media. (D) and (E) PCA analysis of the buffered (D) and unbuffered (E) culture media collected for each of the two strains during the exponential and stationary phases (E and S).

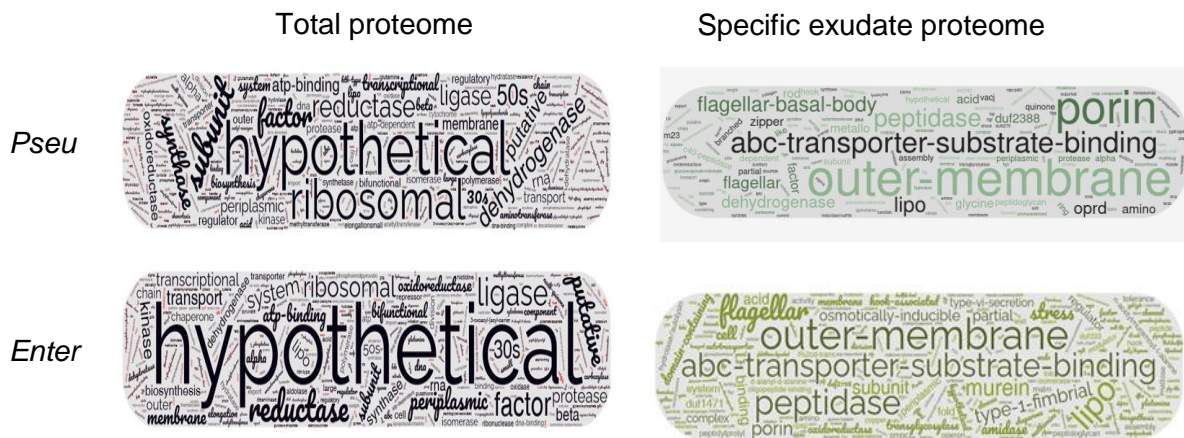


Figure S7. Tag cloud comparison between the total proteome and exudate-specific proteome in *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*).

BPMP-PU-28 (*Pseu*: *Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enter*: *Enterobacter ludwigii*) were grown in minimal buffered medium. Culture samples (bacteria and culture supernatants isolated by centrifugation) were collected during the stationary phase (see Figure S5) for proteomics analyses (total bacterial proteomes and exudate-specific proteomes, respectively). Lists of proteins: see Table S5. The annotations of the proteins found in the total proteomes and in the exudate-specific proteomes of the two bacterial strains were used to generate tag clouds (<https://www.nuagesdemots.fr/>)

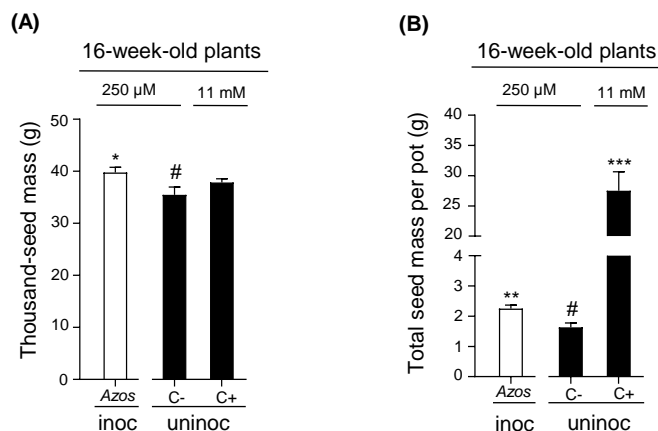


Figure S8. Effect of inoculation with *Azospirillum sp. (Azos)* on seed yield of wheat plants grown under low assimilable nitrogen availability.

Elite durum wheat (cv. Anvergur) plants were grown in greenhouse in pots on an artificial solid substrate (6 pots per condition, 4 plants per pot). They were inoculated with *Azospirillum sp. (Azos)* or not inoculated. Nutrients necessary for plant growth were brought with 2 different watering solutions, all derived from Hoagland medium but containing either 250 µM assimilable nitrogen (provided as NO_3^-) for inoculated plants (white bars) and for non-inoculated "negative" control plants (C-, black bars), or containing 11 mM assimilable nitrogen (10 mM NO_3^- and 1 mM NH_4^+) for non-inoculated "positive" control plants (C+, black bars). Thousand-seed mass (A) and total seed mass per pot (B) of 16-week-old plants. Means \pm SE (n = 6 pots). *, ** and *** above the bars indicate that the difference with the uninoculated condition under nitrogen limitation (#) is statistically significant (Student's t-Test, $P \leq 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively).

Table S1. Physicochemical properties of the soil from the Lebanon refuge area where the endemic wild emmer was selected, and from the French soil where we grew this wheat ancestor.

We isolated diazotrophic bacteria from the rhizospheric soil of this wild emmer growing in the Lebanon refuge area and in the French soil.

Physical properties

	Lebanese soil	French soil
Sand (%)	41	33
Silt (%)	39	40
Clay (%)	20	27
Soil textural class	Alluvial clay	Alluvial clay

Parameters	Lebanese soil		French soil	
	Values	Remarque	Values	Remarque
pH (H₂O)	7	Neutral	7.5	Basic
EC (ds.m⁻¹)	0.13	Low	0.2	Low
Organic matter (%)	2.1	Medium	1.76	Medium
Total limestone (%)	8	Medium	3	Medium
Active limestone (%)	2.7	Low	1	Low
Organic nitrogen (%)	0.13	Low	0.11	Low
Available P (ppm)	51.2	Medium	104	Medium
Available K (ppm)	544	High	413	High
Exchangeable Na (ppm)	118	Low	165	Low
Exchangeable Mg (ppm)	665	High	468	High
Exchangeable Ca (ppm)	10126	High	7502	High

Table S2. (Data sheet)

List of metabolites identified in *BPMP-PU-28* (*Pseudomonas urmiensis*) and *BPMP-EL-40* (*Enterobacter ludwigii*) culture supernatants.

Both bacteria were grown in buffered minimal medium and aliquots of bacterial culture supernatant were collected during the stationary phase.

Table S3. Global comparative metabolomics profiling of *BPMP-PU-28 (Pseudomonas urmiensis)* and *BPMP-EL-40 (Enterobacter ludwigii)* culture supernatants: top 50 more discriminating metabolites in buffered or unbuffered culture media collected during the exponential or stationary phases.

For the complete list of metabolites, see Table S2. Corresponding heat map: see Figure 6A. As described in the legends to Figure S5 and Figure 6A, the bacteria were grown either in buffered (B) or unbuffered (U) minimal medium and aliquots of bacterial culture supernatant were collected either during the exponential (E) or stationary (S) phase (see Figure S5) for metabolomics analysis. Numbers on the left refer to the metabolites whose distribution and abundance are reported in the heat map shown in Figure 5a. Annotations were performed using MSCleanR workflow. N°: metabolite number; Rt min: retention time in min; m/z[M+H]⁺: mass/charge; bank: bank used to identify the metabolite; total score: score of the fragmented metabolite (only metabolites identified with scores equal to or higher than 6.5 were selected). Three biological replicates, each one being used for two technical replicates.

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Bank	Formula	Compound annotated	Total score
10	6.124	275.10382	Pseudo	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	Tryptophan; N?-Methoxycarbonyl, Me ester	6.935
27	6.232	216.12376	Generic	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	(2S)-5-acetamidopentyl 2-hydroxypropanoate	7.2705
201	9.614	185.11804	Generic	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	8-methyl-5-oxo-nonanoic acid	7.2146
502	5.374	227.1393	Generic	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	Cyclo-(L-Pro-4-OH-L-Leu)	7.0225
29	9.028	187.13348	Pseudo	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	?-hydroxydecanoic acid	6.842
7	7.053	159.10223	Pseudo	C ₈ H ₁₆ O ₃	(+/-)-3-hydroxyoctanoic acid	8.3247
17	5.511	215.1394	Generic	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	Dethiobiotin	7.3222
393	9.14	160.07588	Pseudo	C ₁₀ H ₉ NO	2-methyl-1H-quinolin-4-one	6.513
26	8.504	183.10196	Pseudo	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	[2-(5-Oxo-1-cyclopenten-1-yl)methyl]butanoic acid	7.2577
6	11.626	351.21487	Generic	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	6.6124
451	8.338	506.25381	Generic	C ₂₇ H ₃₉ NO ₆ S	9-Oxoepothilone D	6.794
51	11.688	310.14432	Generic	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	CJ 16171	7.077
108	9.168	468.27307	Generic	C ₂₈ H ₃₇ NO ₅	Pyxipyrrolone B	6.9859
32	4.006	405.10495	Pseudo	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₈	1,2,3,4,7,8-Hexahydro-6-(4-hydroxyphenyl)-8-(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-2,4,7-pteridinetriene	6.5099
296	10.344	312.16003	Generic	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	CJ 16170	7.5184
380	8.095	357.11646	Generic	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Pestalotiopyrone K	7.3357
66	6.534	435.11423	Generic	C ₂₄ H ₂₀ O ₈	Terfestatin C	6.8471
1	7.555	275.11386	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₇	Methyl (3r)-3-(((3r)-3-((3r)-3-hydroxybutanoyl[oxy]butanoyl[oxy]butanoate	7.058
450	9.711	501.1954	Generic	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	Talapolyster D	7.2782
445	9.075	487.17969	Generic	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₂	Talapolyster A	7.0784
403	7.653	387.1636	Generic	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	Macrosphelide K	7.1868
514	7.244	245.13892	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₅	Phomolide G	7.2239
498	6.141	217.10753	Generic	C ₁₀ H ₁₆ O ₅	Aspyronol	7.0509
427	6.836	437.14267	Generic	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	Daldinin D	6.9164
223	7.286	217.10777	Pseudo	C ₁₀ H ₁₈ O ₅	3-hydroxysebacate	7.5995
378	6.782	357.1163	Generic	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Pestalotiopyrone K	7.4888
346	8.306	313.12631	Generic	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	Cyclocalopin A-15-OL	7.7123
288	5.4	305.08792	Pseudo	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Galactose; 1,2,6-Tri-Ac	6.6442
382	5.596	359.10474	Generic	C ₁₁ H ₂₃ N ₂ O ₇ PS	Pantetheine 4'-phosphate	6.7873
447	9.718	487.14368	Generic	C ₂₈ H ₂₂ O ₈	Streptoantraquinone A	6.7253
93	8.262	473.12738	Generic	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₉	Nikkomyacin Wx	6.862
500	3.716	259.07953	Pseudo	C ₉ H ₁₆ O ₇	Caryose	6.6703
366	7.956	343.10049	Pseudo	C ₁₃ H ₂₀ O ₉	Methyl ?-D-glucopyranoside; 2,4,6-Tri-Ac	7.609
43	11.924	243.19626	Pseudo	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	(+/-)-3-hydroxymyristic acid	6.9071
341	9.204	310.23834	Generic	C ₁₈ H ₃₁ NO ₃	N-Tetradecenoyl-L-homoserine lactone	6.5151
348	7.213	313.12659	Generic	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	Cyclocalopin A-15-OL	6.746
217	10.189	211.16957	Pseudo	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	2,4-Tridecadienoic acid	6.5514
414	10.748	415.21228	Generic	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	Chaetopenoid A	7.1278
67	6.062	245.09293	Pseudo	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	N-acetyl-D-tryptophan	6.7931
519	5.952	273.16797	Pseudo	C ₁₄ H ₂₄ O ₅	Mupirocin H	6.8823
351	7.624	315.17844	Generic	C ₁₆ H ₂₆ O ₆	Isoaigialone A	6.5883
363	6.861	331.2099	Generic	C ₁₇ H ₃₀ O ₆	Linieodolide A	7.3222
497	9.597	214.25349	Generic	C ₁₄ H ₃₁ N	Medelamine A;NK 148198A	7.3576
505	5.302	118.08648	Generic	C ₁₁ H ₁₉ NO ₈	N-Acetylmuramate	6.5535
478	4.047	111.08068	Generic	C ₇ H ₁₀ O	2-Isopropylfuran	6.751
528	5.263	269.06424	Generic	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₃	Not named	7.3162
413	8.949	415.1221	Pseudo	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	Dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone; O-[4-Hydroxy-3-methoxybenzoyl-(?6)-?-D-glucopyranoside]	7.785
268	6.175	271.16681	Generic	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₄	Elaiomycin D	6.9345
87	4.633	107.05003	Pseudo	C ₇ H ₈ O	o-cresol	6.9966
283	4.932	292.08313	Generic	C ₁₄ H ₁₅ NO ₆	Alkaloid AM 6201;Reductiomycin	6.5359

Table S4. Comparative metabolomics profiling of BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) buffered minimal culture media collected during the stationary phase: top 50 more discriminating metabolites between the two bacterial strains.

For the complete list of metabolites, see Table S2. Corresponding heat map: see Figure 6B. As described in the legends to Figure S5 and Figure 6B, the bacteria were grown in buffered (B) minimal medium, and aliquots of bacterial culture supernatant were collected during the stationary (S) phase (see Figure S5). Numbers at the left refer to the metabolites whose distribution and abundance are reported in the heat map shown in Figure 5B. Annotations were performed using MSCleanR workflow. N°: metabolite number; Rt min: retention time in min; m/z[M+H]⁺: mass/charge; bank: bank used to identify the metabolites; total score: score of the fragmented metabolite (only metabolites identified with scores equal to or higher than 6.5 were selected for BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) (A) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) (B). Data from three biological replicates, each one being used for two technical replicates.

(A)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Bank	Formula	Compound annotated	Total score
502	5.374	227.1393	Generic	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	Cyclo-(L-Pro-4-OH-L-Leu)	7.0225
51	11.688	310.14432	Generic	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	CJ 16171	7.077
142	9.482	534.2851	Generic	C ₃₂ H ₃₉ NO ₆	SMTP 4D	6.587
289	11.524	312.16	Generic	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	CJ 16170	6.8153
316	6.881	348.10229	Generic	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	Cephalexin	6.7342
476	5.584	761.42029	Generic	C ₄₁ H ₅₆ N ₆ O ₈	Xentrivalpeptide Q	6.6381
451	8.338	506.25381	Generic	C ₂₇ H ₃₉ NO ₆ S	9-Oxoepothilone D	6.794
17	5.511	215.1394	Generic	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	Dethiobiotin	7.3222
339	1.624	308.09189	Generic	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	Glutathione	7.4493
10	6.124	275.10382	Pseudo	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	Tryptophan; N?-Methoxycarbonyl, Me ester	6.935
246	5.88	280.06161	Generic	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	Exopisiod B	6.6339
27	6.232	216.12376	Generic	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	(2S)-5-acetamidopentyl 2-hydroxypropanoate	7.2705

(B)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Bank	Formula	Compound annotated	Total score
66	6.534	435.11423	Generic	C ₂₄ H ₂₀ O ₈	Terfestatin C	6.8471
447	9.718	487.14368	Generic	C ₂₈ H ₂₂ O ₈	Streptoanthraquinone A	6.7253
528	5.263	269.06424	Generic	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₃	Columbianetin	7.3162
215	6.794	203.12857	Pseudo	C ₁₀ H ₂₀ O ₄	(3R,9R)-3,9-dihydroxydecanoic acid	6.9589
1	7.555	275.11386	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₇	Methyl (3r)-3-(((3r)-3-(((3r)-3-hydroxybutanoyl)oxy)butanoyl)oxy)butanoate	7.058
288	5.4	305.08792	Pseudo	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Galactose; 1,2,6-Tri-Ac	6.6442
375	6.546	353.15024	Generic	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	Hinduchelin D	6.6095
549	10.456	295.15237	Generic	C ₁₆ H ₂₂ O ₅	(1R,2R,3S,8aR)-7-Acetyl-1,2,3,4,8,8a-hexahydro-3,6-dihydroxy-1,8a-dimethylnaphthalen-2-yl acetate	7.0529
505	5.302	118.08648	Generic	C ₁₁ H ₁₉ NO ₈	N-Acetylmuramate	6.5535
535	12.035	277.18051	Generic	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	Acremeremophilane H	7.634
497	9.597	214.25349	Generic	C ₁₄ H ₃₁ N	Medelamine A;NK 148198A	7.3576
519	5.952	273.16797	Pseudo	C ₁₄ H ₂₄ O ₅	Mupirocin H	6.8823
201	9.614	185.11804	Generic	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	8-methyl-5-oxo-nonanoic acid	7.2146
223	7.286	217.10777	Pseudo	C ₁₀ H ₁₈ O ₅	3-hydroxysebacate	7.5995
262	10.193	259.19156	Pseudo	C ₁₄ H ₂₈ O ₄	(3R)-3,14-dihydroxytetradecanoic acid	6.9651
351	7.624	315.17844	Generic	C ₁₆ H ₂₆ O ₆	Isoaigialone A	6.5883
219	10.574	211.13373	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	Herbarumin III;(+)Herbarumin III	6.9954
190	5.581	173.08153	Generic	C ₉ H ₁₄ O ₄	6-Hydroxy-4-oxohexyl acetate	7.1942
403	7.653	387.1636	Generic	C ₁₈ H ₂₆ O ₉	Macrosphelide K	7.1868
514	7.244	245.13892	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₅	Phomolide G	7.2239
498	6.141	217.10753	Generic	C ₁₀ H ₁₆ O ₅	Aspyronol	7.0509
414	10.748	415.21228	Generic	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	Chaetopenoid A	7.1278
450	9.711	501.1954	Generic	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	Talapolyester D	7.2782
445	9.075	487.17969	Generic	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₂	Talapolyester A	7.0784
378	6.782	357.1163	Generic	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Pestalotiopyrone K	7.4888

43	11.924	243.19626	Pseudo	$C_{14}H_{28}O_3$	(+/-)-3-hydroxymyristic acid	6.9071
7	7.053	159.10223	Pseudo	$C_8H_{16}O_3$	(+/-)-3-hydroxyoctanoic acid	8.3247
29	9.028	187.13348	Pseudo	$C_{10}H_{20}O_3$? -hydroxydecanoic acid	6.842
67	6.062	245.0929	Pseudo	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	N-acetyl-D-tryptophan	6.7931
268	6.175	271.1668	Generic	$C_{13}H_{24}N_2O_4$	Elaiomycin D	6.9345
87	4.633	107.05	Pseudo	C_7H_8O	o-cresol	6.9966
348	7.213	313.1266	Generic	$C_{15}H_{20}O_7$	Cyclocalopin A-15-OL	6.746
427	6.836	437.1427	Generic	$C_{21}H_{24}O_{10}$	Daldinin D	6.9164
346	8.306	313.1263	Generic	$C_{15}H_{20}O_7$	Cyclocalopin A-15-OL	7.7123
283	4.932	292.0831	Generic	$C_{14}H_{15}NO_6$	Alkaloid AM 6201;Reductiomycin	6.5359
341	9.204	310.2383	Generic	$C_{18}H_{31}NO_3$	N-Tetradecenoyl-L-homoserine lactone	6.5151
217	10.18	211.1696	Pseudo	$C_{13}H_{22}O_2$	2,4-Tridecadienoic acid	6.5514
317	7.017	371.0959	Pseudo	$C_{14}H_{20}O_{10}$	Mannose; 1,2,3,4-Tetra-Ac	7.2938

Table S5. (Data sheets) List of peptides identified in BPMP-PU-28 (*Pseudomonas urmiensis*) and BPMP-EL-40 (*Enterobacter ludwigii*) or their culture supernatant.

Pseudomonas urmiensis and *Enterobacter ludwigii* were grown in minimal Hoagland medium supplemented with lactate (2%) and buffered with phosphate buffer (150 mM, pH 6.7). Aliquots of culture supernatant or bacteria pellet were collected during the stationary phase.

Data sheet 1: Peptides without digestion

Data sheet 2: Whole bacterial proteome

Data sheet 3: Common culture supernatant and the whole proteome

Data sheet 4: Specifically, protein present in the culture supernatant

Chapitre 8

Conclusion générale et perspectives

Nos objectifs au départ de la thèse étaient i) de caractériser les exsudats racinaires d'une série de sous-espèces de blé récapitulant les grandes étapes de la domestication du blé dur pour déterminer l'impact de cette dernière sur les profils d'exsudation, ii) de caractériser les bactéries diazotrophes présentes dans la rhizosphère d'un blé ancestral et d'évaluer l'effet PGPR de ces souches sur la série de domestication, iii) de caractériser les exsudats bactériens des souches PGPR isolées et de tester l'effet de ces exsudats sur les blés (croissance et exsudation) et enfin iv) de tester l'effet des exsudats racinaires sur la croissance et les profils d'exsudation des bactéries diazotrophes isolées.

Dans une première partie, nous avons testé un système de récolte des exsudats racinaires directement à partir de la solution nutritive puis en la dessalant et nous avons comparé les profils métabolomiques avec le système le plus commun d'exsudation à savoir l'exsudation dans l'eau pure. Les deux systèmes ont montré des différences sensibles dans leur profil et une reproductibilité plus aléatoire pour l'exsudation dans l'eau. Les micro-blessures lors du lavage des explants avant l'exsudation dans l'eau sont peut-être un des facteurs difficiles à maîtriser. D'autres systèmes de récolte existent comme un lessivage rapide sous vide avec solvant (méthanol 70%) en milieu acide (Petriacq *et al.*, 2017) mais chaque système impose des compromis. Le système Sep Pak C18 de dessalage est efficace pour retenir les molécules organiques mais certaines molécules non retenues (flow through) pourraient être analysées après extraction à l'acétate d'éthyle.

Les plantes montrent aussi une évolution de l'exsudation au cours du temps et nous avons choisi le temps court de 7 jours car les profils métabolomiques semblaient plus complexes. Des analyses plus poussées sur des temps plus longs permettraient de distinguer les molécules exsudées au cours de la croissance du blé. La contrainte sur les temps longs est l'évapo-transpiration importante des plantules dès que le nombre de feuilles augmente.

Concernant l'analyse métabolomique, le challenge le plus important reste l'interrogation des banques avec une limite très forte sur l'identification des composés. Les banques sont en effet très pauvres en composés comparativement à la multitude des composés potentiellement présents. Une contrainte de moindre importance existe aussi au niveau protéomique et pour pallier aux erreurs d'annotation, nous avons

combiné la banque annotée avec la traduction dans les 6 cadres de lecture du génome entier digéré virtuellement à la trypsine et avons retenu les peptides tryptiques supérieurs à 6 acides aminés. Un complément avec une banque d'ADNc/données transcriptomiques permettrait de restituer dans la banque par exemple les épissages alternatifs non détectés par l'annotation automatique.

Parmi les composés détectés dans les exsudats racinaires, certains sont remarquables car impliqués dans certaines fonctions connues comme l'implication des benzoxazinoïdes dans l'allélopathie et la sélection du microbiote. Certains de ces benzoxazinoïdes sont plus présents chez les formes ancestrales que chez les blés élites et ont pu être contre-sélectionnés avec l'augmentation de la densité de semis. Nous avons essentiellement détecté ces molécules sous forme glycosylées et très peu de formes aglycones ce qui suggère une bonne préservation de ces molécules dans le milieu sans doute facilitée par l'asepsie du milieu. Ces molécules pourraient potentiellement être des marqueurs de la bonne préservation des échantillons et de l'absence de contamination. Au niveau bactérien, les exsudats sont enfermés dans des vésicules libérées à partir de la membrane externe assurant protection, concentration élevée et fusion potentielle avec certaines membranes. Comme chez les plantes, les exsudats bactériens sont composés essentiellement de métabolites secondaires comprenant, entre autres, des antibiotiques, des molécules impliquées dans la signalisation (quorum sensing) et des peptides dont certains sont cycliques. De façon remarquable, l'ajout d'exsudats bactériens modifie le développement racinaire en augmentant longueur et densité des poils absorbants pour la souche *BPMP-PU-28*. Cette caractéristique phénotypique pourrait être utilisée pour identifier la(les) molécule(s) responsable(s) de cette croissance après séparation des exsudats sur colonne chromatographique.

Dans les exsudats racinaires, de nombreux petits peptides ont été détectés avec des compositions particulières comme la présence de proline en position terminale pour la stabilité, la présence d'acides aminés chargés ou aromatiques et aliphatiques apolaires. Aucun de ces peptides ne contient de cystéine, résidu rencontré fréquemment chez les défensines. L'analyse protéomique de ces échantillons n'a été que superficielle mais elle a permis de mettre en évidence des enzymes comme la DIMBOA glycosidase dont les substrats, de façon remarquable, ont été identifiés en métabolomique. Le protéome des exsudats bactériens comporte des protéines de la

membrane externe et de l'espace périplasmique ainsi que de nombreuses protéases confirmant la nature vésiculaire de ces exsudats. L'analyse des exsudats bactériens et racinaires illustre la complémentarité des analyses métabolomiques et protéomiques dans ce genre d'échantillons.

Bien que ces analyses des exsudats ne soient pas encore terminées et qu'elles doivent être étendues à d'autres représentants des différentes sous-espèces, elles ont montré la complexité de la composition des exsudats en particulier ceux de dicoccum. De ce point de vue, il est intéressant de noter que de nombreuses résistances sont présentes chez les dicoccum et que cette sous-espèce a voyagé de par le monde depuis les débuts de la domestication s'adaptant à différents environnements et contraintes. C'est peut-être ce qui la distingue des autres sous-espèces et lui a permis d'acquérir ces résistances. Parmi ces sous-espèces, le blé ancestral *T. t. dicoccoides* de Nabi Chit a montré une réponse très forte aux conditions de serre avec apport de solution nutritive contenant de forte concentration en azote (Hoagland). En effet, dans ces conditions, la plante émet un nombre de thalle très important (>50) et ne semble pas être en mesure de fleurir correctement ce qui a limité fortement l'utilisation de cette accession dans l'étude de l'effet PGPR des bactéries sélectionnées dans sa rhizosphère.

L'isolement des bactéries diazotrophes présentes dans la rhizosphère du blé ancestral de Nabi Chit nous a permis, sans l'avoir planifié dans le projet au départ, d'isoler des bactéries endophytes du blé présentes dans les graines. La localisation précise de ces bactéries dans la graine permettra d'identifier le/les tissu(s) impliqués. Ces bactéries peuvent permettre potentiellement de renforcer la défense des plantes en leur incorporant des gènes impliqués dans l'effet PGPR comme les glucanases et les chitinases.

Enfin, certains volets, planifiés à l'origine, n'ont pas été abordés dans la thèse comme l'effet des exsudats racinaires sur la croissance et l'exsudation bactérienne et feront l'objet d'études ultérieures. Un autre volet concernant l'analyse métagénomique de la rhizosphère des blés du transect de domestication cultivés dans la zone refuge au Liban n'a pas permis une récolte suffisante de matériel pour le séquençage. Un dernier projet a été initié tout en sachant qu'il dépassait la durée de la thèse. En effet, la core collection de l'EPO (Evolutionary Pre-breeding pOpulation), réalisée par nos

collègues d'AGAP et regroupant des croisements entre sous-espèces de blés tétraploïdes, a été semée à la fois à l'IRAL au Liban et à Mauguio. Chaque année pendant six ans et sans traitement, la collection est re-semée (4 placettes de 20 m², densité 300 plantes/m²) à partir d'une aliquote de la récolte de l'année précédente. La dérive des génotypes semés à l'origine en proportion équivalente (1 :1 :1 ...) devrait permettre de repérer les génotypes les mieux adaptés à chacune de ces deux localisations et pourront être utilisés comme géniteurs potentiels pour l'amélioration des variétés de blé dur. Trois cycles annuels ont pour le moment été récoltés.

L'ensemble de ces données montre la richesse et la complexité des molécules exsudées par les plantes et les micro-organismes et le dialogue sophistiqué intervenant entre la plante et son environnement. De nombreuses perspectives s'ouvrent pour déterminer par exemple les cibles moléculaires des exsudats chez la plante et la bactérie ce qui pourrait permettre d'utiliser plus efficacement les micro-organismes dans les nouveaux modèles agricoles.

Annexe

Tableau 3.1. Marqueurs métaboliques principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans la variété de blé dur élite (Zagharine) récoltés par deux méthodes différentes, suivant les analyses de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 3.3.

Les exsudats racinaires ont été récoltés après 7 jours soit (a) directement à partir de la solution nutritive (Hoagland complet) (MD : méthode de dessalage) ou (b) après trempage dans l'eau distillée pendant 2 heures (MEE : méthode d'exsudation dans l'eau). La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
361	4.898	258.17	Generic	C ₁₃ H ₂₃ NO ₄	2-Hexenoylcarnitine	7.3555
781	3.547	324.2167	Triticum	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄	(2S,3S)-2-({1-hydroxy-2-[(1R,2S)-3-oxo-2-[(2E)-pent-2-en-1-yl]cyclopentyl]ethylidene)amino)-3-methylpentanoic acid	6.4795
716	4.287	209.126	Generic	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pilocarpine	6.2231
185	10.174	297.1333	Poaceae	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	3',10'-dihydroxy-2'-(hydroxymethyl)-1',5'-dimethyl-8'-oxaspiro[oxirane-2,12'-tricyclo[7.2.1.0?,?]dodecan]-5'-en-4'-one	6.5149
877	4.697	286.2014	Generic	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	2-Octenoylcarnitine	7.219
491	8.673	387.2742	Generic	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₃	Unknown	6.2007
558	6.553	469.3268	Generic	C ₂₅ H ₄₄ N ₂ O ₆	Acremolide C	6.8851
234	4.783	315.2039	Generic	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₂	Rhazidigenine Nb-oxide	6.8392
325	4.917	360.2379	Generic	C ₁₈ H ₃₃ NO ₆	Broussonetine G	6.8133
682	5.618	372.2199	Generic	C ₃₈ H ₅₈ N ₆ O ₉	Unknown	6.1524
442	4.331	402.2118	Generic	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₂	Celabenzine	6.1809
634	1.703	165.0546	Poaceae	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tyrosin	6.4686
799	7.771	228.1592	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃	N-Decanoylglycine	6.6121
870	7.012	214.1437	Generic	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	N-Nonanoylglycine	6.7155
88	10.273	395.2421	Generic	C ₂₂ H ₃₆ O ₆	ent-13R,15-Dihydroxy-14S-acetoxy-1(10)-halimen-18-oic acid	6.6187
159	6.209	200.1281	Triticum	C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	2-Amino-8-oxodecanoic acid	6.1873
9	6.321	245.1383	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₅	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(3E)-hex-3-en-1-yloxy]-6-methyloxane-3,4,5-triol	6.2361

859	9.125	295.2269	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	(9E)-11-{3-[(2E)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}undec-9-enoate	6.9785
57	9.268	329.2319	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(9E)-12,13,17-trihydroxyoctadec-9-enoate	7.1213
227	9.364	295.2268	Triticum	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	(9E,15E)-12,13-dihydroxyoctadeca-9,15-dienoate	6.9336
858	11.489	277.2164	Triticum	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	cis-parinarate	6.3974
741	8.483	226.1802	Generic	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	N-Undecanoylglycine	6.2263
184	10.648	295.1904	Generic	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Gingerol	6.8847
29	9.773	285.2072	Triticum	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	Hexadecanedioate	6.1085
382	5.66	377.2146	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
13	5.736	259.1552	Poaceae	C ₁₃ H ₂₄ O ₅	Narbosine A; Me glycoside	6.971
8	6.92	245.1382	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₅	Narbosine A	6.9367
55	10.093	327.2163	Poaceae	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	(10E,15E)-9,12,13-trihydroxyoctadeca-10,15-dienoic acid	6.6863

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
744	5.952	261.1346	Poaecea	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	3-Hexen-1-ol; O-?-D-Glucopyranoside	6.8072
126	4.528	472.1453	Poaecea	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₂	2-(4-hydroxyphenyl)-2-[[3,4,5-trihydroxy-6-({[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy)methyl]oxan-2-yl]oxy]acetone nitrile	6.3484
72	4.604	352.1023	Generic	C ₁₆ H ₁₉ NO ₈	2-(2-ketoindolin-3-yl)acetic acid [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-methylol-tetrahydropyran-2-yl] ester	6.4878
544	4.306	458.2609	Generic	C ₂₃ H ₃₉ NO ₆ S	10,11-Dihydro-12R-hydroxy-leukotriene E4	6.5686
274	4.636	330.239	Generic	C ₁₆ H ₃₁ N ₃ O ₄	1-[[4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-(4-methylpiperidin-1-yl)oxolan-2-yl]methyl]-3-(propan-2-yl)urea	6.4655

774	5.383	813.2109	Triticum	C ₃₄ H ₄₀ O ₂₀	Isorhamnetin 3-glycosides; 3-O-[-L-Rhamnopyranosyl-(1?2)-[3S-hydroxy-3-methylglutaroyl-(?6)]-?-D-glucopyranoside]	6.2884
635	4.662	547.1442	Triticum	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	1-methyl 3-(3,4,5-trihydroxy-6-[[5-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-7-yl]oxy]oxan-2-yl)methyl propanedioate	6.0307
121	6.505	459.1281	Triticum	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	6-C-?-D-Glucopyranosyl-4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone; 4'-Me ether	6.3699
122	6.565	459.1281	Triticum	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-({4-[(2S)-7-hydroxy-4-oxo-2,3-dihydro-1-benzopyran-2-yl]phenylidene)oxy}oxan-2-yl)methyl acetate	6.27
836	5.807	245.0918	Triticum	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	(2S)-2-({[1-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethylidene]amino}propanoic acid	6.3219
204	4.317	306.1447	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₇ O ₄	N3-(2-oxopiperidin-3-yl)-N1-phenyl-4-(pyrimidine-5-carbonyl)piperazine-1,3-dicarboxamide	6.5556
138	7.038	537.1773	Poaceae	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₀	8-Glucosyl-7-hydroxy-5-methyl-2-(1-propenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; 7-Me ether, 2'-O-(4-hydroxy-E-cinnamoyl)	6.1968
699	7.178	293.2111	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	(9E,11Z,13S,15E)-13-hydroperoxyoctadeca-9,11,15-trienoate	6.7117
797	3.764	205.097	Poaceae	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Tryptophane	7.2705
183	4.344	295.1653	Generic	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Leucine	7.1238
554	8.062	464.2862	Generic	C ₂₉ H ₃₇ NO ₄	Cytochalasin Z1	6.417
791	4.71	243.1702	Poaceae	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	Lysine; 6-N-Hexanoyl	6.5534
376	5.849	376.2229	Generic	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂	3-[(2-oxocyclohexyl)(phenyl)methyl]-1-phenylazepan-2-one	6.2538
817	3.409	279.1338	Generic	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Proline	7.7655
231	3.87	314.2074	Generic	C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₄	N-[[4-(cyclopentylamino)-3-hydroxyoxolan-2-yl]methyl]morpholine-4-carboxamide	6.6197

83	4.383	384.1413	Generic	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₈	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronide	6.2058
291	4.649	342.2388	Generic	C ₂₈ H ₄₁ NO ₇	9-hydroxy-1,1,4a,8-tetramethyl-7-[2-[2-(N-methylacetamido)ethoxy]-2-oxoethylidene]-10-oxo-1,2,3,4,4a,6,7,8,8a,9,10,10a-dodecahydrophenanthren-2-yl propanoate	6.2062

Tableau 4.1. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans les différentes accessions qui résume les grandes étapes de la domestication du panel A

« *dicoccoides* », « *dicoccum* » et « *durum* ». Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) *Ttd. N-C 2019* (amidonniér sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicoccoides*), (b) Escandia (*T. t. dicoccum*) et (c) Zagarine (*T. t. durum*) ont été générés suivant les analyses globales de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 4.2. La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
200	4.738	303.14133	Generic	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	Methyl 2-[(3-formyl-2,2-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-yl)formamido]-3-methylbutanoate	6.2243
620	6.424	531.33716	Generic	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	7.2269
777	6.582	592.38995	Triticum	C ₃₀ H ₅₈ NO ₆ P	(2-[(2R)-2-(butanoyloxy)-3-[(9E)-octadec-9-enoyloxy]propyl	6.4653
627	6.303	567.29565	Triticum	C ₂₈ H ₄₈ O ₈ S	phosphonato]oxy)ethyl)trimethylazanium (1R,3aS,3bS,5aS,7S,8R,9aS,9bS,11aR)-7,8-dihydroxy-1-[(2S,3R,4R,5S)-4-hydroxy-5,6-dimethyl-3-(sulfonatooxy)heptan-2-yl]-9a,11a-dimethyl-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-5-one	6.114
654	6.692	619.38947	Poaceae	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	3-Hydroxy-12-oleanene-23,28-dioic acid; 3-O-?-D-Xylopyranoside	6.7024
596	6.291	509.29276	Poaceae	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	2,3,23-Trihydroxy-30-nor-12,20(29)-oleanadien-28-oic acid; 23-Carboxylic acid	6.5092
466	5.153	347.16772	Generic	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	2-[6-(1-acetylpiperidin-4-yl)-3-oxo-octahydropyrrolo[3,4-b][1,4]oxazin-4-yl]acetamide	6.6731
773	6.112	465.26636	Poaceae	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	Arieianal; 9'Z-Isomer, 18'-alcohol	6.4895
607	6.356	501.28986	Generic	C ₂₉ H ₄₀ O ₇	14 beta-acetoxy-3beta-benzoyloxy-7beta,9alpha,15beta trihydroxyjatropa-5E,11E-diene	7.3399
631	6.514	567.29822	Triticum	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₄	Mesoporphyrin IX (MPIX)	6.3022
382	5.66	377.21457	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
663	6.801	354.19406	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
648	6.455	611.3194	Generic	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	BQ 123	7.1319

32	8.946	290.03394	Generic	C ₁₀ H ₁₃ NO ₇ S	(2S)-2-amino-3-[4-hydroxy-3-(sulfooxy)phenyl]-2-methylpropanoic acid	6.191
873	8.245	529.26544	Generic	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₁	Pharboside E;(-)-Pharboside E	7.2983
624	7.802	558.34747	Generic	C ₃₂ H ₄₇ NO ₇	2-(1,10-dihydroxy-9a,11a-dimethyl-7-oxo-1H,2H,3H,3aH,3bH,4H,5H,7H,8H,9H,9aH,9bH,10H,11H,11aH-cyclopenta[a]phenanthren-1-yl)-2-oxoethyl 3-[(cyclohexylmethyl)carbamoyl]propanoate	6.9431
49	7.81	317.10495	Triticum	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	3-(3,4-Dihydroxybenzyl)-3,4,7-chromantriol; 3'-Me ether	6.3828
606	7.709	519.2771	Generic	C ₂₅ H ₄₂ O ₁₁	Blumenol C O-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	6.3576
292	7.254	342.26407	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	Trans-2-Dodecenoylcarnitine	6.4149
554	8.062	464.28622	Generic	C ₂₉ H ₃₇ NO ₄	Cytochalasin Z1	6.417
318	6.515	358.25885	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₅	(9Z)-3-hydroxydodecenoylcarnitine	6.4828
524	4.981	300.21674	Generic	C ₂₂ H ₃₉ NO ₈	6-[4-[6-(2,3-dihydroxypentan-2-yl)-2-hydroxy-5-methyl-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazin-4-yl]-2-hydroxypentan-2-yl]-4-hydroxy-3,5-dimethyloxan-2-one	6.9577

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] +	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
817	4.738	303.14133	Generic	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	methyl 2-[(3-formyl-2,2-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-yl)formamido]-3-methylbutanoate	6.2243
818	6.424	531.33716	Generic	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	7.2269
867	6.582	592.38995	Triticum	C ₃₀ H ₅₈ NO ₈ P	(2-[[[(2R)-2-(butanoyloxy)-3-[(9E)-octadec-9-enoyloxy]propyl phosphonato]oxy]ethyl]trimethylazanium	6.4653

795	6.303	567.29565	Triticum	C ₂₈ H ₄₈ O ₈ S	(1R,3aS,3bS,5aS,7S,8R,9aS,9bS,11aR)-7,8-dihydroxy-1-[(2S,3R,4R,5S)-4-hydroxy-5,6-dimethyl-3-(sulfonatooxy)heptan-2-yl]-9a,11a-dimethyl-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-5-one	6.114
797	6.692	619.38947	Poaceae	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	3-Hydroxy-12-oleanene-23,28-dioic acid; 3-O-?-D-Xylopyranoside	6.7024
231	6.291	509.29276	Poaceae	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	2,3,23-Trihydroxy-30-nor-12,20(29)-oleanadien-28-oic acid; 23-Carboxylic acid	6.5092
791	5.153	347.16772	Generic	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	2-[6-(1-acetylpiperidin-4-yl)-3-oxo-octahydropyrrolo[3,4-b][1,4]oxazin-4-yl]acetamide	6.6731
183	6.112	465.26636	Poaceae	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	Arieianal; 9'Z-Isomer, 18'-alcohol	6.4895
780	6.356	501.28986	Generic	C ₂₉ H ₄₀ O ₇	14beta-acetoxy-3beta-benzoyloxy-7beta,9alpha,15beta trihydroxyjatropa-5E,11E-diene	7.3399
699	6.514	567.29822	Triticum	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₄	MPIX	6.3022
836	5.66	377.21457	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
310	6.801	354.19406	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
652	6.455	611.3194	Generic	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	BQ 123	7.1319
701	8.946	290.03394	Generic	C ₁₀ H ₁₃ NO ₇ S	(2S)-2-amino-3-[4-hydroxy-3-(sulfooxy)phenyl]-2-methylpropanoic acid	6.191
768	8.245	529.26544	Generic	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₁	Pharboside E; (-)-Pharboside E	7.2983
190	7.802	558.34747	Generic	C ₃₂ H ₄₇ NO ₇	2-{1,10-dihydroxy-9a,11a-dimethyl-7-oxo-1H,2H,3H,3aH,3bH,4H,5H,7H,8H,9H,9aH,9bH,10H,11H,11aH-cyclopenta[a]phenanthren-1-yl}-2-oxoethyl 3-[(cyclohexylmethyl)carbamoyl]propanoate	6.9431
847	7.81	317.10495	Triticum	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	3-(3,4-Dihydroxybenzyl)-3,4,7-chromantriol; 3'-Me ether	6.3828
274	7.709	519.2771	Generic	C ₂₅ H ₄₂ O ₁₁	Blumenol C O-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	6.3576

722	7.254	342.26407	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	trans-2-Dodecenoylcarnitine	6.4149
656	8.062	464.28622	Generic	C ₂₉ H ₃₇ NO ₄	Cytochalasin Z1	6.417
744	6.515	358.25885	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₅	(9Z)-3-hydroxydodecenoylcarnitine	6.4828
493	4.981	300.21674	Generic	C ₂₂ H ₃₉ NO ₈	6-{4-[6-(2,3-dihydroxypentan-2-yl)-2-hydroxy-5-methyl-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazin-4-yl]-2-hydroxypentan-2-yl}-4-hydroxy-3,5-dimethyloxan-2-one	6.9577

(c)

N°	Rt.min	m/z [M+H] +	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
799	7.771	228.15923	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃	N-Decanoylglycine	6.6121
870	7.012	214.14371	Generic	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	N-Nonanoylglycine	6.7155
716	4.287	209.12596	Generic	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pilocarpine	6.2231
491	8.673	387.2742	Generic	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₃	CNP0446420	6.2007
88	10.273	395.2421	Generic	C ₂₂ H ₃₆ O ₆	Ent-13R,15-Dihydroxy-14S-acetoxy-1(10)-halimen-18-oic acid	6.6187

Tableau 4.2. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans les deux premières étapes de domestication du blé dur du panel A « dicoccoides » et « dicoccum ». Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) *Ttd. N-C 2019* (amidonier sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicoccoides*) et (b) Escandia (*T. t. dicoccum*) ont été générés suivant les analyses de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 4.3. La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
606	7.709	519.2771	Generic	C ₂₅ H ₄₂ O ₁₁	Blumenol C O-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	6.3576
49	7.81	317.105	Triticum	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	3-(3,4-Dihydroxybenzyl)-3,4,7-chromantriol; 3'-Me ether	6.3828
620	6.424	531.3372	Generic	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	7.2269
777	6.582	592.39	Triticum	C ₃₀ H ₅₈ NO ₈ P	(2-[[{(2R)-2-(butanoyloxy)-3-[(9E)-octadec-9-enoyloxy]propyl phosphonato]oxy}ethyl)trimethylzanium	6.4653
627	6.303	567.2957	Triticum	C ₂₈ H ₄₈ O ₈ S	(1R,3aS,3bS,5aS,7S,8R,9aS,9bS,11aR)-7,8-dihydroxy-1-[[{(2S,3R,4R,5S)-4-hydroxy-5,6-dimethyl-3-(sulfonatoxy)heptan-2-yl]-9a,11a-dimethyl-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-5-one	6.114
596	6.291	509.2928	Poaceae	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	2,3,23-Trihydroxy-30-nor-12,20(29)-oleanadien-28-oic acid; 23-Carboxylic acid	6.5092
654	6.692	619.3895	Poaceae	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	3-Hydroxy-12-oleanene-23,28-dioic acid; 3-O-?-D-Xylopyranoside	6.7024
607	6.356	501.2899	Generic	C ₂₉ H ₄₀ O ₇	14beta-acetoxy-3beta-benzoyloxy-7beta,9alpha,15beta trihydroxyjatropa-5E,11E-diene	7.3399
466	5.153	347.1677	Generic	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	Quinine	6.6731
382	5.66	377.2146	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
631	6.514	567.2982	Triticum	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₄	MPIX	6.3022

200	4.738	303.1413	Generic	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	methyl 2-[(3-formyl-2,2-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-yl)formamido]-3-methylbutanoate	6.2243
648	6.455	611.3194	Generic	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	BQ 123	7.1319
663	6.801	354.1941	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
318	6.515	358.2589	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₅	(9Z)-3-hydroxydodecenoylcarnitine	6.4828
159	6.209	200.1281	Triticum	C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	2-Amino-8-oxodecanoic acid	6.1873
624	7.802	558.3475	Generic	C ₃₂ H ₄₇ NO ₇	2-{1,10-dihydroxy-9a,11a-dimethyl-7-oxo-1H,2H,3H,3aH,3bH,4H,5H,7H,8H,9H,9aH,9bH,10H,11H,11aH-cyclopenta[a]phenanthren-1-yl}-2-oxoethyl 3-[(cyclohexylmethyl)carbamoyl]propanoate	6.9431
799	7.771	228.1592	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃	N-Decanoylglycine	6.6121
870	7.012	214.1437	Generic	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	N-Nonanoylglycine	6.7155
873	8.245	529.2654	Generic	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₁	Pharboside E;(-)-Pharboside E	7.2983
710	4.755	356.0974	Triticum	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	HMBOA-Glc	6.4723

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
320	6.307	150.0549	Triticum	C ₈ H ₇ NO ₂	Dioxindole	6.3683
57	9.268	329.2319	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(9E)-12,13,17-trihydroxyoctadec-9-enoate	7.1213
867	7.199	281.0657	Poaceae	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	2,3,4-Trihydroxybutanoic acid; 1,4-Lactone, 2-O-(3,4-dihydroxycinnamoyl)	6.4165
768	6.541	238.18	Generic	C ₁₄ H ₂₃ NO ₂	2-hydroxy-N-(2-methylpropyl)deca-4,6,8-trienamide	6.1256

795	5.164	565.1547	Triticum	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-6-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one	6.647
183	4.344	295.1653	Generic	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Leucine	7.1238
846	6.404	293.211	Triticum	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	(9E)-11-[(2E,3S)-3-[(2E)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-ylidene]undec-9-enoate	6.5755
184	10.648	295.1904	Generic	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Gingerol	6.8847
647	4.307	239.1503	Generic	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	3-amino-5-[(4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]cyclopentane-1,2-diol	6.5679
406	8.496	211.1329	Triticum	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	(9E)-12-oxododec-9-enoate	7.6519
743	6.48	227.0588	Generic	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	3-(9H-purin-6-ylsulfanyl)propane-1,2-diol	6.1015
493	5.121	428.2045	Generic	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	YM-215343;(-)-YM-215343	6.4112
50	6.196	317.1593	Generic	C ₁₅ H ₂₆ O ₇	Kankanoside D;(-)-Kankanoside D	6.244
744	5.952	261.1346	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	3-Hexen-1-ol; O-?-D-Glucopyranoside	6.8072
355	10.823	313.2378	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	8-[3-(8-hydroxyoctyl)oxiran-2-yl]octanoic acid	6.9708
863	10.748	279.2319	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid	6.678
220	9.147	211.1329	Triticum	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	(+)-7-isojasmonic acid	6.366
634	1.703	165.0546	Poaceae	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tyrosin	6.4686
699	7.178	293.2111	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	(9E,11Z,13S,15E)-13-hydroperoxyoctadeca-9,11,15-trienoate	6.7117
656	4.317	185.1285	Generic	C ₁₆ H ₂₂ N ₆ O ₂	1-(1-methylpiperidin-4-yl)-5-[3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]pyrrolidin-3-ol	7.2328
869	10.098	282.2794	Triticum	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	3-dehydro-D-sphinganine	6.2678

705	7.536	198.185	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO	N-(2-methylpropyl)oct-2-enamide	6.283
639	5.261	230.1386	Generic	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	Butyrylcarnitine	6.8437
315	4.119	355.1972	Generic	C ₁₆ H ₂₈ N ₄ O ₅	Leu-Gln-Pro	6.5402
722	5.411	213.1596	Generic	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	1,4'-Bipiperidine-1'-carboxylic acid	6.6209
701	4.821	340.2225	Generic	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	Diprotin A	6.8327
774	5.383	813.2109	Triticum	C ₃₄ H ₄₀ O ₂₀	Isorhamnetin 3-glycosides; 3-O- [?-L-Rhamnopyranosyl-(1?2)-[3S- hydroxy-3-methylglutaroyl-(?6)]-?- D-glucopyranoside]	6.2884
122	6.565	459.1281	Triticum	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5- trihydroxy-6-({4-[(2S)-7-hydroxy-4- oxo-2,3-dihydro-1-benzopyran-2- yl]phenylidene}oxy)oxan-2- yl)methyl acetate	6.27

Tableau 4.3. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans les deux variétés du panel A représentant les deux étapes de la domestication « dicoccum » et « durum ». Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) Escandia (*T. t. dicoccum*) et (b) Zagharine (*T. t. durum*) ont été générés suivant les analyses de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 4.4. La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] +	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
836	5.807	245.0918	Triticum	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	(2S)-2-[[1-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethylidene]amino]propanoic acid	6.3219
754	3.67	231.1704	Generic	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	CNP0432335	6.6557
432	3.239	398.1417	Generic	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₆ S	Kanamycin A2	6.0099
310	7.981	354.1337	Griticum	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	Protopine	6.0331
791	4.71	243.1702	Poaceae	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	Lysine; 6-N-Hexanoyl	6.5534
183	4.344	295.1653	Generic	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Leucine	7.1238
795	5.164	565.1547	Triticum	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₄	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-6-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one	6.647
204	4.317	306.1447	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₇ O ₄	N3-(2-oxopiperidin-3-yl)-N1-phenyl-4-(pyrimidine-5-carbonyl)piperazine-1,3-dicarboxamide	6.5556
818	4.252	262.1187	Generic	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₅	3-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-1-yl)-2-hexanamidopropanoic acid	6.1526
190	8.557	298.2739	Poaceae	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	(2S,3S,4Z,6Z)-2-aminooctadeca-4,6-diene-1,3-diol	6.6838
274	4.636	330.239	Generic	C ₁₆ H ₃₁ N ₃ O ₄	1-[[4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-(4-methylpiperidin-1-yl)oxolan-2-yl]methyl]-3-(propan-2-yl)urea	6.4655
763	3.587	242.1498	Generic	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	Leuhistin;Leuhistine	7.4342
867	7.199	281.0657	Poaceae	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	2,3,4-Trihydroxybutanoic acid; 1,4-Lactone, 2-O-(3,4-dihydroxycinnamoyl)	6.4165
847	8.356	512.2976	Generic	C ₃₀ H ₄₁ NO ₆	Cytochalasin Ppho	6.6626
481	3.782	422.2032	Generic	C ₂₂ H ₃₁ NO ₅ S	latrunculin A	6.5717
437	4.567	276.1583	Generic	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	1-(3,4-Dimethoxycinnamoyl) piperidine	6.4087

376	5.849	376.2229	Generic	C ₂₅ H ₂₉ NO ₂	3-[(2-oxocyclohexyl)(phenyl)methyl]-1-phenylazepan-2-one	6.2538
231	3.87	314.2074	Generic	C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₄	N-[[4-(cyclopentylamino)-3-hydroxyoxolan-2-yl]methyl]morpholine-4-carboxamide	6.6197
797	3.764	205.097	Poaceae	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Tryptophane	7.2705
699	7.178	293.2111	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	(9E,11Z,13S,15E)-13-hydroperoxyoctadeca-9,11,15-trienoate	6.7117
817	3.409	279.1338	Generic	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Proline	7.7655
83	4.383	384.1413	Generic	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₈	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronide	6.2058
725	4.38	214.1437	Poaceae	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	N-heptanoylhomoserine lactone	6.2073
745	4.073	227.1756	Generic	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	4,6-bis(propan-2-yl)-octahydropyrrolo[3,4-b][1,4]oxazin-3-one	6.3396
23	6.779	275.1863	Poaceae	C ₁₄ H ₂₈ O ₅	Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1-(11-hydroxyundecanoate)	6.3042
780	4.956	197.1284	Triticum	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	6-(2-hydroxy-5-methyl-4,5-dihydro-3H-imidazol-4-yl)hexanoate	6.8191
768	6.541	238.18	Generic	C ₁₄ H ₂₃ NO ₂	2-hydroxy-N-(2-methylpropyl)deca-4,6,8-trienamide	6.1256
701	4.821	340.2225	Generic	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	Diprotin A	6.8327
493	5.121	428.2045	Generic	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	YM-215343;(-)-YM-215343	6.4112
524	4.981	300.2167	Generic	C ₂₂ H ₃₉ NO ₆	6-{4-[6-(2,3-dihydroxypentan-2-yl)-2-hydroxy-5-methyl-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazin-4-yl]-2-hydroxypentan-2-yl}-4-hydroxy-3,5-dimethyloxan-2-one	6.9577
286	5.495	336.1916	Poaceae	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₄	Oryzamutaic acid B; 8,9-Dihydro	6.0682
291	4.649	342.2388	Generic	C ₂₈ H ₄₁ NO ₇	9-hydroxy-1,1,4a,8-tetramethyl-7-[2-[2-(N-methylacetamido)ethoxy]-2-oxoethylidene]-10-oxo-1,2,3,4,4a,6,7,8,8a,9,10,10a-dodecahydrophenanthren-2-yl propanoate	6.2062
872	10.625	302.3054	Triticum	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	sphinganine(1+)	6.3821
679	5.423	470.2967	Generic	C ₂₂ H ₃₉ N ₅ O ₆	Gln-Leu-Leu-Pro	6.7073
544	4.306	458.2609	Generic	C ₂₃ H ₃₉ NO ₆ S	10,11-Dihydro-12R-hydroxy-leukotriene E4	6.5686

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
159	6.209	200.1281	Triticum	C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	2-Amino-8-oxodecanoic acid	6.1873
799	7.771	228.1592	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃	N-Decanoylglycine	6.6121
870	7.012	214.1437	Generic	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	N-Nonanoylglycine	6.7155
491	8.673	387.2742	Generic	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₃	CNP0446420	6.2007
716	4.287	209.126	Generic	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pilocarpine	6.2231
681	5.997	371.1976	Generic	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	11-Hydroxyyohimbine	6.7171
858	11.489	277.2164	Triticum	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Cis-parinarate	6.3974
51	6.229	317.1954	Triticum	C ₁₆ H ₃₀ O ₆	9,10-Dihydroxyhexadecanoic acid	6.7796
65	8.628	339.2524	Poaceae	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	(11E,13Z,15S)-15-Hydroperoxyicosa-11,13-dienoic acid	6.443
176	6.378	229.1433	Triticum	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	Dodecanedioate	6.3425
382	5.66	377.2146	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
741	8.483	226.1802	Generic	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	N-Undecanoylglycine	6.2263
184	10.648	295.1904	Generic	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Gingerol	6.8847
47	11.415	315.2528	Triticum	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	(9S,10R)-9,10-Dihydroxyoctadecanoate	7.1662
29	9.773	285.2072	Triticum	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	Hexadecanedioate	6.1085

Tableau 4.4. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans les deux variétés du panel A représentant les deux étapes extrêmes de la domestication « dicoccoides » et « durum ».

Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) *Ttd. N-C 2019* (amidonner sauvage identifiée au Liban, *T. t. dicoccoides*) et (b) Zagharine (*T. t. durum*) ont été générés suivant les analyses de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 4.5. La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
710	4.755	356.0974	Triticum	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	HMBOA-Glc	6.4723
873	8.245	529.2654	Generic	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₁	Pharboside E,(-)-Pharboside E	7.2983
468	3.899	417.2121	Generic	C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O ₅	N-[(5R,6S,9R)-5-methoxy-3,6,9-trimethyl-2-oxo-11-oxa-3,8-diazabicyclo[10.4.0]hexadeca-1(12),13,15-trien-14-yl]-1,2-oxazole-5-carboxamide	6.4142
309	9.532	353.2802	Generic	C ₂₆ H ₄₆ N ₂ O ₈	Serratamolide A	6.1339
292	7.254	342.2641	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	trans-2-Dodecenoylcarnitine	6.4149
138	7.038	537.1773	Poaceae	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₀	8-Glucosyl-7-hydroxy-5-methyl-2-(1-propenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; 7-Me ether, 2'-O-(4-hydroxy-E-cinnamoyl)	6.1968
209	4.323	307.1765	Triticum	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₃	(2E)-N-(4-carbamimidamidobutyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enimidic acid	6.1932
394	8.284	379.2953	Generic	C ₂₂ H ₃₈ N ₂ O ₃	N-{8-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-[1-oxo-1-(piperidin-1-yl)propan-2-yl]-decahydronaphthalen-2-yl}acetamide	6.2636
624	7.802	558.3475	Generic	C ₃₂ H ₄₇ NO ₇	2-{1,10-dihydroxy-9a,11a-dimethyl-7-oxo-1H,2H,3H,3aH,3bH,4H,5H,7H,8H,9H,9aH,9bH,10H,11H,11aH-cyclopenta[a]phenanthren-1-yl}-2-oxoethyl 3-[(cyclohexylmethyl)carbamoyl]propanoate	6.9431
524	4.981	300.2167	Generic	C ₂₂ H ₃₉ NO ₈	6-{4-[6-(2,3-dihydroxypentan-2-yl)-2-hydroxy-5-methyl-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazin-4-yl]-2-hydroxypentan-2-yl}-4-hydroxy-3,5-dimethyloxan-2-one	6.9577

606	7.709	519.2771	Generic	C ₂₅ H ₄₂ O ₁₁	Blumenol C O-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	6.3576
49	7.81	317.105	Triticum	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	3-(3,4-Dihydroxybenzyl)-3,4,7-chromantriol; 3'-Me ether	6.3828
554	8.062	464.2862	Generic	C ₂₉ H ₃₇ NO ₄	Cytochalasin Z1	6.417
777	6.582	592.39	Triticum	C ₃₀ H ₅₈ NO ₈ P	(2-[[[(2R)-2-(butanoyloxy)-3-[(9E)-octadec-9-enoyloxy]propyl phosphonato]oxy]ethyl]trimethylazanium	6.4653
620	6.424	531.3372	Generic	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	7.2269
627	6.303	567.2957	Triticum	C ₂₈ H ₄₈ O ₈ S	(1R,3aS,3bS,5aS,7S,8R,9aS,9bS,11aR)-7,8-dihydroxy-1-[(2S,3R,4R,5S)-4-hydroxy-5,6-dimethyl-3-(sulfonatoxy)heptan-2-yl]-9a,11a-dimethyl-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-5-one	6.114
596	6.291	509.2928	Poaceae	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	2,3,23-Trihydroxy-30-nor-12,20(29)-oleanadien-28-oic acid; 23-Carboxylic acid	6.5092
654	6.692	619.3895	Poaceae	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	3-Hydroxy-12-oleanene-23,28-dioic acid; 3-O-?-D-Xylopyranoside	6.7024
773	6.112	465.2664	Poaceae	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	Arieianal; 9'Z-Isomer, 18'-alcohol	6.4895
607	6.356	501.2899	Generic	C ₂₉ H ₄₀ O ₇	14beta-acetoxy-3beta-benzoyloxy-7beta,9alpha,15beta trihydroxyjatropa-5E,11E-diene	7.3399
466	5.153	347.1677	Generic	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	Quinine	6.6731
382	5.66	377.2146	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
631	6.514	567.2982	Triticum	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₄	Mesoporphyrin IX (MPIX)	6.3022
200	4.738	303.1413	Generic	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	methyl 2-[(3-formyl-2,2-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-yl)formamido]-3-methylbutanoate	6.2243
648	6.455	611.3194	Generic	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	BQ 123 (Cyclo(D-trp-D-asp-pro-D-val-leu)	7.1319

663	6.801	354.1941	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
404	4.358	387.1915	Generic	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₅	1-[3-(7-methoxy-4,8-dimethyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)propanoyl]piperidine-4-carboxamide	6.6821
211	7.349	308.2219	Generic	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	Viriditin;(-)-Viriditin	6.61
563	6.305	474.269	Generic	C ₂₄ H ₃₅ N ₅ O ₅	1-[[[(2S,3R)-10-(dimethylamino)-5-[(2S)-1-hydroxypropan-2-yl]-3-methyl-6-oxo-3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxazocin-2-yl]methyl]-3-(3,5-dimethyl-4-isoxazolyl)-1-methylurea	6.7524
318	6.515	358.2589	Generic	C ₁₉ H ₃₅ NO ₅	(9Z)-3-hydroxydodecenoylcarnitine	6.4828
866	9.879	280.2638	Generic	C ₁₈ H ₃₃ NO	Linoleamide	7.0162

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H]⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
744	5.952	261.1346	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	3-Hexen-1-ol; O-?-D-Glucopyranoside	6.8072
227	9.364	295.2268	Triticum	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	(9E,15E)-12,13-dihydroxyoctadeca-9,15-dienoate	6.9336
863	10.748	279.2319	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	15-Hydroxy-9,12-octadecadienoic acid; Lactone	6.678
184	10.648	295.1904	Generic	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Gingerol	6.8847
555	6.203	465.2481	Generic	C ₂₃ H ₃₈ O ₆	Prostaglandin G2 2-glyceryl Ester	7.0541
634	1.703	165.0546	Poaceae	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tyrosin	6.4686
315	4.119	355.1972	Generic	C ₁₆ H ₂₈ N ₄ O ₅	Leu-Gln-Pro	6.5402
859	9.125	295.2269	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	(9E)-11-{3-[(2E)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}undec-9-enoate	6.9785
57	9.268	329.2319	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(9E)-12,13,17-trihydroxyoctadec-9-enoate	7.1213
810	10.729	258.2793	Generic	C ₁₆ H ₃₅ NO	N,N-dimethyltetradecylamine N-oxide	6.0419

355	10.823	313.2378	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	8-[3-(8-hydroxyoctyl)oxiran-2-yl]octanoic acid	6.9708
47	11.415	315.2528	Triticum	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	(9S,10R)-9,10-dihydroxyoctadecanoate	7.1662
491	8.673	387.2742	Generic	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₃	CNP0446420	6.2007
754	3.67	231.1704	Generic	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	CNP0432335	6.6557
88	10.273	395.2421	Generic	C ₂₂ H ₃₆ O ₆	ent-13R,15-Dihydroxy-14S-acetoxy-1(10)-halimen-18-oic acid	6.6187
797	3.764	205.097	Poaceae	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Tryptophane	7.2705
217	9.023	310.2373	Generic	C ₁₈ H ₃₁ NO ₃	CNP0440117	6.9904
406	8.496	211.1329	Triticum	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	(9E)-12-oxododec-9-enoate	7.6519
716	4.287	209.126	Generic	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pilocarpine	6.2231

Tableau 4.5. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis dans les deux variétés du panel B représentant les deux étapes extrêmes de la domestication « dicoccoides » et « durum ».

Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) Dicoccoides 70 (amidonner sauvage) et (b) Durum 411 (élite) ont été générés suivant les analyses de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 4.9. La classe de composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
6	6.945	243.12256	Generic	C ₁₂ H ₂₀ O ₅	Polyethylene, oxidized	7.2824
8	6.92	245.13823	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₅	Narbosine A	6.9367
12	8.857	257.17465	Triticum	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	Tetradecanedioate	6.5419
13	5.736	259.15524	Poaceae	C ₁₃ H ₂₄ O ₅	Narbosine A; Me glycoside	6.971
29	9.773	285.20715	Triticum	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	Hexadecanedioate	6.1085
45	9.474	313.23785	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	(9E)-12,13-dihydroxyoctadec-9-enoate	6.5745
46	6.822	315.14444	Generic	C ₁₅ H ₂₄ O ₇	Glucosyl (E)-2,6-Dimethyl-2,5-heptadienoate	6.8069
47	11.415	315.25278	Triticum	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	(9S,10R)-9,10-dihydroxyoctadecanoate	7.1662
51	6.229	317.1954	Triticum	C ₁₆ H ₃₀ O ₆	9,10-Dihydroxyhexadecanoic acid	6.7796
55	10.093	327.21628	Poaceae	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	(10E,15E)-9,12,13-trihydroxyoctadeca-10,15-dienoic acid	6.6863
65	8.628	339.25235	Poaceae	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	(11E,13Z,15S)-15-hydroperoxyicosa-11,13-dienoic acid	6.443
75	7.243	355.24728	Generic	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	13,14-Dihydro PGE1	7.1642
176	6.378	229.14328	Triticum	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	Dodecanedioate	6.3425
177	8.755	291.26831	Triticum	C ₂₀ H ₃₄ O	8(17),12-Labdadien-3-ol	7.1789
184	10.648	295.19037	Generic	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Gingerol	6.8847

185	10.174	297.1333	Poaceae	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	3',10'-dihydroxy-2'-(hydroxymethyl)-1',5'-dimethyl-8'-oxaspiro[oxirane-2,12'-tricyclo[7.2.1.0?,?]dodecan]-5'-en-4'-one	6.5149
188	3.543	297.17392	Generic	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O	{{5H,6H,8H-imidazo[2,1-c][1,4]oxazin-6-yl)methyl}[(1-methyl-1H-indol-3-yl)methyl]amine	6.4599
210	9.49	307.26312	Triticum	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	8(14)-Abietene-2,13-diol	7.1844
219	10.09	311.22165	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	(9R,10Z,12E,15E)-9-hydroperoxyoctadeca-10,12,15-trienoate	6.9588
228	2.845	140.07066	Generic	C ₇ H ₉ NO ₂	Deferiprone	6.0121
249	7.224	321.24237	Poaceae	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	7,15-Pimaradiene-3,6,19-triol	6.9603
343	2.996	152.10706	Poaceae	C ₉ H ₁₃ NO	N-methyltyramine	6.4321
345	9.23	369.19455	Generic	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	Punctaporonin C	6.1008
355	10.823	313.23776	Triticum	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	8-[3-(8-hydroxyoctyl)oxiran-2-yl]octanoic acid	6.9708
404	4.358	387.19147	Generic	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₅	1-[3-(7-methoxy-4,8-dimethyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)propanoyl]piperidine-4-carboxamide	6.6821
406	8.496	211.13286	Triticum	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	(9E)-12-oxododec-9-enoate	7.6519
416	7.662	337.1619	Generic	C ₁₆ H ₂₆ O ₆	(-)-trans-Carveol glucoside	6.4515
421	9.794	391.20908	Triticum	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	3,4-Epoxy-5,14-dihydroxy-7,11,15(17)-cembratrien-16,2-olide; 5-Ac	6.0013
456	8.755	411.24185	Generic	C ₂₂ H ₃₄ O ₇	Coleonol;Forskolin	7.0868
483	6.226	423.20615	Generic	C ₁₇ H ₂₆ N ₈ O ₅	Blasticidin S	6.9347
561	10.051	172.16963	Generic	C ₁₀ H ₂₁ NO	2-amino-1-cyclooctylethanol	6.4585
647	4.307	239.15028	Generic	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	3-amino-5-[(4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]cyclopentane-1,2-diol	6.5679

663	6.801	354.19406	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
738	1.637	224.12811	Generic	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃	(4-Hydroxybenzoyl)choline	6.0117
740	5.966	273.16705	Generic	C ₁₄ H ₂₄ O ₅	(E)-5-hydroxy-3-isobutyl-6-(3-methylbenzylidene)-1,6-dihydropyrazin-2(3H)-one	6.7587
741	8.483	226.18015	Generic	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	N-Undecanoylglycine	6.2263
743	6.48	227.05878	Generic	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	3-(9H-purin-6-ylsulfanyl)propane-1,2-diol	6.1015
749	9.618	230.24794	Poaceae	C ₁₄ H ₃₁ NO	lauryl dimethylamine-N-oxide	6.6605
799	7.771	228.15923	Generic	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃	N-Decanoylglycine	6.6121
826	10.535	371.32669	Triticum	C ₂₆ H ₄₂ O	9a,11a-dimethyl-1-[(3Z)-5-methylhex-3-en-2-yl]-1H,2H,3H,3aH,5H,5aH,6H,7H,8H,9H,9bH,10H,11H-cyclopenta[a]phenanthren-7-ol	6.1705
837	4.097	273.13464	Generic	C ₉ H ₁₆ N ₆ O ₄	Decarbamoylneosaxitoxin	6.626
858	11.489	277.2164	Triticum	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Cis-parinarate	6.3974
863	10.748	279.23193	Triticum	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	15-Hydroxy-9,12-octadecadienoic acid; Lactone	6.678

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
121	6.505	459.1281	Triticum	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	6-C-?-D-Glucopyranosyl-4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone; 4'-Me ether	6.3699
122	6.565	459.1281	Triticum	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-({4-[(2S)-7-hydroxy-4-oxo-2,3-dihydro-1-benzopyran-2-yl]phenylidene}oxy)oxan-2-yl]methyl acetate	6.27
259	10.788	324.1228	Triticum	C ₁₉ H ₁₇ N ₀₄	11-hydroxy-3,10-dimethoxy-4-oxo-7,8-dihydro-6H-6-azatetraphen-6-ium	6.7659
268	8.134	328.154	Triticum	C ₁₉ H ₂₁ N ₀₄	2-(4-Methoxyphenyl)ethylamine; N-(4-Hydroxy-3-methoxy-Z-cinnamoyl)	7.1717

310	7.981	354.1337	Triticum	$C_{20}H_{19}NO_5$	Protopine	6.0331
866	9.879	280.2638	Generic	$C_{18}H_{33}NO$	Linoleamide	7.0162

Tableau 5.1. Marqueurs principaux des exsudats racinaires spécifiquement enrichis chez l'amidonniér sauvage traité ou non traité par la tétracycline (Cf. § 2.7).

Les métabolites présentés dans les exsudats racinaires de (a) *Ttd-NC-2019 (+T)*, (b) *Ttd-NC-2019 (-T)* ont été générés suivant les analyses globales de cartes de chaleur obtenues d'après la Figure 5.9. La classe des composés a été annotée à l'aide du logiciel de flux MSCleanR.

(a)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
607	6.356	501.28986	Generic	C ₂₉ H ₄₀ O ₇	14beta-acetoxy-3beta-benzoyloxy-7beta,9alpha,15beta trihydroxyjatropa-5E,11E-diene	7.3399
620	6.424	531.33716	Generic	C ₃₁ H ₄₆ O ₇	Acinospesigenin B	7.2269
777	6.582	592.38995	Triticum	C ₃₀ H ₅₈ NO ₈ P	(2-[[[(2R)-2-(butanoyloxy)-3-[(9E)-octadec-9-enoyloxy]propyl	6.4653
654	6.692	619.38947	Poaceae	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	phosphonato]oxy)ethyl)trimethylazanium 3-Hydroxy-12-oleanene-23,28-dioic acid; 3-O-?-D-Xylopyranoside	6.7024
596	6.291	509.29276	Poaceae	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	2,3,23-Trihydroxy-30-nor-12,20(29)-oleanadien-28-oic acid; 23-Carboxylic acid	6.5092
773	6.112	465.26636	Poaceae	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	Arieianal; 9'Z-Isomer, 18'-alcohol	6.4895
382	5.66	377.21457	Generic	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₄	1-[(2R,3S,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl]-3-propylurea	6.5543
631	6.514	567.29822	Triticum	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₄	Mesoporphyrin IX (MPIX)	6.3022
466	5.153	347.16772	Generic	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	Quinine	6.6731
663	6.801	354.19406	Generic	C ₂₂ H ₂₅ N ₃	N-(1-cyclohexylethyl)-4-phenylphthalazin-1-amine	6.7103
200	4.738	303.14133	Generic	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	methyl 2-[(3-formyl-2,2-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-yl)formamido]-3-methylbutanoate	6.2243
458	11.009	412.32068	Generic	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	Cyclopamine	6.4779
648	6.455	611.3194	Generic	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	BQ 123 (Cyclo(D-trp-D-asp-pro-D-val-leu)	7.1319

627	6.303	567.29565	Triticum	C ₂₈ H ₄₈ O ₈ S	(1R,3aS,3bS,5aS,7S,8R,9aS,9bS,11aR)-7,8-dihydroxy-1-[(2S,3R,4R,5S)-4-hydroxy-5,6-dimethyl-3-(sulfonatoxy)heptan-2-yl]-9a,11a-dimethyl-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-5-one	6.114
8	6.92	245.13823	Poaceae	C ₁₂ H ₂₂ O ₅	Narbosine A	6.9367
49	7.81	317.10495	Triticum	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	3-(3,4-Dihydroxybenzyl)-3,4,7-chromantriol; 3'-Me ether	6.3828
873	8.245	529.26544	Generic	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₁	Pharboside E;(-)-Pharboside E	7.2983

(b)

N°	Rt.min	m/z [M+H] ⁺	Banque	Formule	Composé annoté	Score total
847	8.356	512.29755	Generic	C ₃₀ H ₄₁ NO ₆	Cytochalasin Ppho	6.6626
725	4.38	214.14365	Poaceae	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	N-heptanoylhomoserine lactone	6.2073
83	4.383	384.1413	Generic	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₈	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronide	6.2058
768	6.541	238.18001	Generic	C ₁₄ H ₂₃ NO ₂	2-hydroxy-N-(2-methylpropyl)deca-4,6,8-trienamide	6.1256
462	10.53	414.3728	Generic	C ₂₈ H ₄₇ NO	UCA-1064-B	7.1733
241	10.06	317.24762	Triticum	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	9(11),15-Isopimaradien-19-ol; 19-Carboxylic acid, Me ester	6.6748
742	5.737	120.08069	Generic	C ₈ H ₉ N	CNP0440871	6.2073
508	5.926	481.19211	Generic	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₇	(2S)-2-[[[(2S)-2-[4-(4-carbamimidoylphenoxy)butanoylamino]-3-carboxypropanoyl]amino]-3-methylbutanoic acid	6.3109
61	6.051	333.15408	Generic	C ₁₅ H ₂₆ O ₈	1,5-Dibutyl methyl hydroxycitrate	6.6861
745	4.073	227.17564	Generic	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	4,6-bis(propan-2-yl)-octahydropyrrolo[3,4-b][1,4]oxazin-3-one	6.3396

795	5.164	565.15466	Triticum	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-6-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one	6.647
23	6.779	275.18634	Poaceae	C ₁₄ H ₂₈ O ₅	Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1-(11-hydroxyundecanoate)	6.3042
517	3.692	443.22903	Generic	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₃	13-(3-methoxyphenyl)-8-methyl-5-(3-phenylpropyl)-2-oxa-5,8-diazatricyclo[8.4.0.0?,?]tetradeca-1(14),10,12-trien-9-one	6.2106
493	5.121	428.2045	Generic	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	YM-215343;(-)-YM-215343	6.4112
432	3.239	398.14169	Generic	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₆ S	Kanamycin A2	6.0099
217	9.023	310.23727	Generic	C ₁₈ H ₃₁ NO ₃	CNP0440117	6.9904
653	6.516	633.33319	Generic	C ₃₄ H ₄₈ O ₁₁	Dinoxin B	6.7387
763	3.587	242.14981	Generic	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	Leuhistin;Leuhistine	7.4342
316	6.082	357.25369	Generic	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₂	U69593	6.2382
464	6.551	397.30597	Poaceae	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	15-(7-hydroxy-6-methylhept-1-en-2-yl)-16-methylpentacyclo[9.7.0.0?,?.0?,?.0?,?.0?,?.0?]?octadec-10-ene-6,12-diol	6.2217
437	4.567	276.15826	Generic	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	1-(3,4-Dimethoxycinnamoyl)piperidine	6.4087
882	4.329	288.20374	Generic	C ₁₂ H ₂₅ N ₅ O ₃	Leucyl-Arginine	7.3474
244	6.525	142.15892	Generic	C ₉ H ₁₉ N	(+)-N-methylconiine	6.6501
872	10.625	302.30536	Triticum	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	sphinganine(1+)	6.3821
821	4.416	249.15735	Generic	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	(3S,6S)-3,6-di-sec-butylpiperazine-2,5-dione	7.1828
475	5.667	417.33252	Triticum	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	Cholesta-9(11),24-diene-3,6,20-triol	6.4557
274	4.636	330.23904	Generic	C ₁₆ H ₃₁ N ₃ O ₄	1-[[4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-(4-methylpiperidin-1-yl)oxolan-2-yl]methyl]-3-(propan-2-yl)urea	6.4655
183	4.344	295.16528	Generic	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₄	Tyrosyl-Leucine	7.1238

656	4.317	185.12851	Generic	C ₁₆ H ₂₂ N ₆ O ₂	1-(1-methylpiperidin-4-yl)-5-[3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]pyrrolidin-3-ol	7.2328
722	5.411	213.15964	Generic	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	1,4'-Bipiperidine-1'-carboxylic acid	6.6209
587	3.998	472.23959	Generic	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	(2R,3R,3aS,9bS)-7-(cyclohexen-1-yl)-3-(hydroxymethyl)-1-(2-methoxyacetyl)-2-(morpholine-4-carbonyl)-3,3a,4,9b-tetrahydro-2H-pyrrolo[2,3-a]indolizin-6-one	6.6841
852	4.117	277.1658	Poaceae	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	Coumarylagmatine	6.1035
701	4.821	340.2225	Generic	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	Diprotin A	6.8327

Tableau 6.1. Caractérisation moléculaire et biochimique de souches bactériennes isolées de la rhizosphère de blé sauvage cultivées dans (a) le sol du Nabi-Chit (Liban), (b) le sol de Mauguio (France) et sélectionnées suivant les séquences du gène codant pour *ARNr 16S* et la sélections d'après la comparaison des profils des amplicons *BOX-A1R* (Cf. Figure 6.1 et 6.2) et (C) la souche bactérienne endophyte isolées de *Ttd-NC-2019* (Cf. § 2.8).

- Informations des données de la caractérisation biochimique :

Moyenne des indices de solubilisation (IS) de P (phosphate tricalcique, phytate) et K (Feldspath potassique). Le cycle et le protocole de purification des bactéries : voir Chapitre 2, Figure 2.6. Les indices de solubilisation (IS) sont calculés comme suit à partir des photos présentées par la Figure 2.7 (Chapitre 2) : diamètre de la zone jaune induite par la colonie tachetée rapporté au diamètre de la colonie tachetée. "1" indique qu'aucune zone jaune n'est apparue autour de la colonie.

- Informations des données de la caractérisation moléculaire :

Quatres gènes *nifH*, *ipdC*, *accD* et *ChiA* choisis sont impliqués respectivement dans la fixation de l'azote atmosphérique, la synthèse de l'auxine AIA « acide indole acétique », la tolérance contre les stress abiotique tels que la sécheresse et dans la production de la chitinase qui possède une forte activité antifongique.

Séquences d'amorces : voir tableau 2.3. Protocoles PCR : voir § 2.10.5.

+ : Présence

- : Absence

^aRésultats: Moyennes de trois répliquats suivies de l'erreur standard (Moyens \pm SE (n = 3)).

Codes des bactéries	Indices de solubilisation (IS) ^a			Gènes			
	Phosphate tri-calcique	Phytate	Feldspath	<i>NifH</i>	<i>lpdC</i>	<i>AccD</i>	<i>ChiA</i>
(a)							
<i>BPMP-Bu-01</i>	1.189 ± 0.04573	1.13 ± 0.005655	1.696 ± 0.09484	+	+	-	-
<i>BPMP-Bu-06</i>	1.058 ± 0.01998	1.133 ± 0.02112	1.137 ± 0.04191	+	-	+	+
<i>BPMP-L-07</i>	1.288 ± 0.04328	1.163 ± 0.05484	1.181 ± 0.006165	+	-	+	-
<i>BPMP-E-12</i>	1.353 ± 0.09275	1.059 ± 0.00579	1.113 ± 0.02839	+	+	-	-
<i>BPMP-E-15</i>	1.085 ± 0.05974	1.159 ± 0.07864	1.071 ± 0.04049	+	+	-	-
<i>BPMP-K-16</i>	1.082 ± 0.007046	1.172 ± 0.05762	1.138 ± 0.05666	+	-	+	+
<i>BPMP-H-22</i>	1.267 ± 0.02583	2.173 ± 0.05633	1.688 ± 0.04546	+	+	+	-
<i>BPMP-R-23</i>	1.612 ± 0.08078	1.552 ± 0.299	2.069 ± 0.204	+	+	-	-
<i>BPMP-P-25</i>	1.106 ± 0.06203	1.021 ± 0.00751	1.019 ± 0.008021	+	+	+	+
<i>BPMP-P-26</i>	1.322 ± 0.03399	1.061 ± 0.02533	1.79 ± 0.06742	+	+	+	-
<i>BPMP-PU-28</i>	2.14 ± 0.06218	1.357 ± 0.01266	1.935 ± 0.1145	-	-	+	-
<i>BPMP-C-29</i>	1.938 ± 0.201	1.093 ± 0.02632	1.706 ± 0.1188	+	+	+	+
<i>BPMP-V-30</i>	1.208 ± 0.04421	2.356 ± 0.06575	1.381 ± 0.09952	+	+	+	+
<i>BPMP-Ag-31</i>	1.103 ± 0.002176	2.181 ± 0.2061	1.175 ± 0.0701	+	+	+	+
<i>BPMP-X-33</i>	1.305 ± 0.06893	1.073 ± 0.03237	1.172 ± 0.05196	+	-	-	-
<i>BPMP-Pa-34</i>	1.126 ± 0.005501	1.044 ± 0.02311	1.101 ± 0.005138	+	-	-	-
(b)							
<i>BPMP-E-39</i>	2.799 ± 0.2561	2.71 ± 0.06808	2.776 ± 0.3376	+	+	-	-
<i>BPMP-EL-40</i>	1.116 ± 0.005783	1.162 ± 0.03098	1.056 ± 0.03065	+	+	-	+
<i>BPMP-K-42</i>	2.239 ± 0.018	2.498 ± 0.1224	1.029 ± 0.01057	+	-	+	+
<i>BPMP-K-44</i>	2.682 ± 0.1934	1.201 ± 0.02906	1.178 ± 0.02691	+	+	-	-
<i>BPMP-K-47</i>	2.069 ± 0.03205	2.384 ± 0.147	1.095 ± 0.02135	+	+	+	+
<i>BPMP-K-51</i>	2.875 ± 0.1152	1.059 ± 0.0203	1.034 ± 0.01933	+	-	+	-
<i>BPMP-K-53</i>	2.562 ± 0.0686	1.038 ± 0.00575	1.054 ± 0.0183	+	-	+	-
<i>BPMP-Y-55</i>	1.14 ± 0.01903	1.029 ± 0.01608	1.203 ± 0.004977	+	+	-	+
<i>BPMP-Y-56</i>	2.254 ± 0.3075	1.05 ± 0.01565	1.071 ± 0.02505	+	-	-	+
<i>BPMP-S-58</i>	1.277 ± 0.04901	2.188 ± 0.04884	1.048 ± 0.00619	+	+	-	+
<i>BPMP-S-59</i>	2.294 ± 0.1907	1.135 ± 0.0478	1.071 ± 0.02505	+	+	-	+
<i>BPMP-Br-60</i>	2.274 ± 0.05546	1.113 ± 0.02205	1.051 ± 0.02054	+	+	-	+
<i>BPMP-Sp-61</i>	1.028 ± 0.01433	1.005 ± 0.043	1.018 ± 0.007957	+	+	-	+
<i>BPMP-Ag-62</i>	1.128 ± 0.06567	1.234 ± 0.07492	1.121 ± 0.02517	+	+	-	-
<i>BPMP-B-63</i>	1.554 ± 0.05743	1.03 ± 0.01636	1.81 ± 0.04719	+	-	+	-
<i>BPMP-Az-64</i>	1.078 ± 0.01781	1.907 ± 0.1768	1.049 ± 0.009451	+	-	+	+

Références

- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L., and Tack, A.** (2021) Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental microbiology*, 23, 2199–2214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15392>.
- Abdullaeva, Y., Ambika Manirajan, B., Honermeier, B., Schnell, S., and Cardinale, M.** (2020). Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota. *Journal of advanced research*, 31, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.12.008>.
- Afek, U., Carmeli, S. and Aharoni N.** (1995) Columbianetin, a phytoalexin associated with celery resistance to pathogens during storage. *Phytochemistry*, 39, 1347-1350.
- Afzal, M., Khan, Q. M. and Sessitsch, A.** (2014). Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>.
- Agarwal, V.K. and Sinclair, J.B.** (1997) Principles of Seed Pathology, 2nd ed.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, USA, ISBN 978-0-87371-670-3.
- Alberton, D., Valdameri, G., Moure, V., Monteiro, R., Pedrosa, F., Müller-Santos, M. and Maltempo de Souza, E.** (2020) What did We learn from plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-grass associations studies through proteomic and metabolomic approaches?. *Front. Sustain. Food Syst*, 4, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.607343>.
- Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L. and Beatson, S. A.** (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genom*, 12, 402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>.
- Alves, G. C., Videira, S. S., Urquiaga, S. and Reis, V. M.** (2015) Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant Soil*, 387, 307-321. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>.
- Alzate Zuluaga, M. Y., Martinez de Oliveira, A. L., Valentinuzzi, F., Tiziani, R., Pii, Y., Mimmo, T. and Cesco, S.** (2021). Can inoculation with the bacterial biostimulant *enterobacter ludwigii* strain 15S be an approach for the smarter P fertilization of maize and cucumber plants?. *Front. Plant Sci*, 12, 719873. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719873>.
- Amtmann, A., Troufflard, S., and Armengaud, P.** (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*. 133, 682-691. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01075.x>.
- Andrews, M., Raven, J.A. and Lea, P.J.** (2013) Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of applied biology*, 163, 174-199. <https://doi.org/10.1111/aab.12045>.
- Andria, V., Reichenauer, T. G., and Sessitsch, A.** (2009) Expression of alkane monooxygenase (alkB) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium*

multiflorum L.) grown in diesel contaminated soil. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 157, 3347-3350. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.023>.

Anjanadevi, I. P., John, N. S., John, K. S., Jeeva, M. L. and Misra, R. S. (2016) Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution. *Journal of basic microbiology*, 56, 67-77. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500139>.

Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L. V., Govindasamy, V., Bose, P. and Ramadoss, D. (2013) PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. In *Bacteria in Agrobiology: Disease Management* (Maheshwari, D.K., ed). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 405-25. DOI: 10.1007/978-3-642-33639-3_15.

Anttila, J., Heinonen, P., Nenonen, T., Pino, A., Iwai, H., Eeva, K., Soliymani, R., Baumann, M., Saksi, J., Suni, N. and Haltia, T. (2011) Is Coproporphyrin III a copper-acquisition compound in *Paracoccus denitrificans*?. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1807, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.014>.

Arbona, V., and Gómez-Cadenas, A. (2016) Metabolomics of Disease Resistance in Crops. *Current issues in molecular biology*, 19, 13-30.

Armbruster, C. R., Lee, C. K., Parker-Gilham, J., de Anda, J., Xia, A., Zhao, K., Murakami, K., Tseng, B. S., Hoffman, L. R., Jin, F., Harwood, C. S., Wong, G. C. and Parsek, M. R. (2019) Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *elife*, 10, e45084. <https://doi.org/10.7554/eLife.45084>.

Asari, S., Tarkowska, D., Rolcik, J., Novak, O., Palmero, D. V., Bejai, S. and Meijer, J. (2016) Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245, 15-30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>.

Ashley, M. K., Grant, M., and Grabov, A. (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of experimental botany*, 57(2), 425-436. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj034>.

Avila-Calderón, E. D., Ruiz-Palma, M. S., Aguilera-Arreola, M. G., Velázquez-Guadarrama, N., Rui, E. A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S. and Contreras-Rodríguez, A. (2021) Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis. *Front. Microbiol.* 12, 557902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>.

Azevedo, J.L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J.O. and De Araújo, W.L. (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 15-16. <https://10.2225/vol3-issue1-fulltext-4>.

Babenko, L. M., Kosakivska, I. V. and Romanenko, K. O. (2022) Molecular mechanisms of N-acyl homoserine lactone signals perception by plants. *Cell Biol. Int*, 46, 523-534. <https://doi.org/10.1002/cbin.11749>.

- Badri, D. V. and Vivanco, J. M.** (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment*, 32, 666-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x>.
- Baetz, U. and Martinoia, E.** (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in plant science*, 19, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>.
- Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C. and Pieterse, C. M.** (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*, 4, 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>.
- Baldani, I., Reis, V. M., Videira, S., Boddey, L. H. and Baldani, V. L. D.** (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384, 413-431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>.
- Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V.L.D., R. Goi, S. and Döbereiner J.** (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants, *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 911-922, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00218-0).
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P. and Jacquesa, M. A.** (2015) Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 81, 1257-1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>.
- Bartholomew, R.P. and Janssen, G.** (1929). Luxury consumption of potassium by plants and its significance. *Journal of the American Society of Agronomy*.
- Beleggia, R., Omranian, N., Holtz, Y., Gioia, T., Fiorani, F., Nigro, F. M., Pecchioni, N., De Vita, P., Schurr, U., David, J. L., Nikoloski, Z., and Papa, R.** (2021). Comparative Analysis Based on Transcriptomics and Metabolomics Data Reveal Differences between Emmer and Durum Wheat in Response to Nitrogen Starvation. *International journal of molecular sciences*, 22, 4790. <https://doi.org/10.3390/ijms22094790>.
- Ben Farhat, M., Taktek, S., and Chouayekh, H.** (2014) Encapsulation in alginate enhanced the plant growth promoting activities of two phosphate solubilizing bacteria isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Net Journal of Agricultural Science*, 2, 131-139.
- Ben-Abu, Y., and Itsko, M.** (2021) Changes in "natural antibiotic" metabolite composition during tetraploid wheat domestication. *Scientific reports*, 11, 20340. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98764-5>
- Ben-Abu, Y., and Itsko, M.** (2022) Metabolome dynamics during wheat domestication. *Scientific reports*, 12, 8532. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11952-9>.
- Berleman, J. and Auer, M.** (2013) The role of bacterial outer membrane vesicles for intraand interspecies delivery. *Environ. Microbiol*, 15, 347-354. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12048>.

Bever, J. D., Westover, K. M., and Antonovics, J. (1997) Incorporating the Soil Community into Plant Population Dynamics: The Utility of the Feedback Approach. *Journal of Ecology*, 85, 561-573. <https://doi.org/10.2307/2960528>.

Bez, C., Javvadi, S. G., Bertani, I., Devescovi, G., Guarnaccia, C., Studholme, D. J., Geller, A. M., Levy, A. and Venturi, V. (2020) AzeR, a transcriptional regulator that responds to azelaic acid in *Pseudomonas nitroreducens*. *Microbiology (Reading, England)*, 166, 73-84. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000865>.

Bi, Q. F., Li, K. J., Zheng, B. X., Liu, X. P., Li, H. Z., Jin, B. J., Ding, K., Yang, X. R., Lin, X. Y., & Zhu, Y. G. (2020) Partial replacement of inorganic phosphorus (P) by organic manure reshapes phosphate mobilizing bacterial community and promotes P bioavailability in a paddy soil. *The Science of the total environment*, 703, 134977. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134977>.

Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti Zeuli, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L., and Papa, R. (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *The New phytologist*, 197(1), 300–313. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>.

Bitto, N. J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., D’Cruze, T., Reynolds, E. C., Dashper, S. G., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Stinear, T. P., Stacey, K. J. and Ferrero, R. L. (2017) Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>.

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Sofie, G. and Giraud, E. (2011) Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS285: The Nod-dependent versus the Nod-independent symbiotic interaction. *MPMI*, 24,1359–1371. <https://doi.org/10.1094 / MPMI -04-11-0093>.

Bonnin T., Bonneuil, C., Goffaux, R., Montalent, P. and Goldringer, I. (2014) Explaining the decrease in the genetic diversity of wheat in France over the 20th century. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 195, 183-192, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.06.003>.

Bonnington, K. E. and Kuehn, M. J. (2014) Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et biophysica acta*, 1843, 1612-1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.011>.

Bradley, R., Burt, A.M., and Read, D.J. (1981) Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature*, 292, 335-337. <https://doi.org/10.1038/292335a0>.

Brichet, N., Fournier, C., Turc, O., Strauss, O., Artzet, S., Pradal, C., Welcker, C., Tardieu, F. and Cabrera-Bosquet, L. (2017) A robot-assisted imaging pipeline for tracking the growths of maize ear and silks in a high-throughput phenotyping platform. *Plant Methods*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0246-7>.

Brinker, P., Fontaine, M. C., Beukeboom, L. W. and Falcao Salles, J. (2019) Host, Symbionts, and the Microbiome: The Missing Tripartite Interaction. *Trends in microbiology*, 27, 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.002>.

Bucher, R. (2016) Mass-Spectrometry based Metabolomic Approach to Characterize Plant Pathogen Resistance in Cereals and the Flavonols Modifying Development in *Arabidopsis thaliana* (thesis) <https://doi.org/10.5167/uzh-133703>.

Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P.C., Weiman, A., Droge, J., Pan, Y., McHardy, A. C. and Schulze-Lefert, P. (2015) Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe*, 17, 392-403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T. and Schulze-Lefert, P. (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488, 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. and Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106.4>.

Cabrera-Bosquet, L., Fournier, C., Brichet, N., Welcker, C., Suard, B. and Tardieu, F. (2016) High-throughput estimation of incident light, light interception and radiation-use efficiency of thousands of plants in a phenotyping platform. *New Phytol*, 212, 269-281. <https://doi.org/10.1111/nph.14027>.

Calvo, P., Zebelo, S., McNear, D., Kloepper, J. and Fadamiro, H. (2019) Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *J. Plant Interact.*, 14, 224-231. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1602887>.

Caruana, J. C. and Walper, S. A. (2020) Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe - Microbe and Microbe - Host Community Interactions. *Frontiers in microbiology*, 11, 432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>.

Cassán, F. and Diaz-Zorita, M. (2016) *Azospirillum spp.* in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol. Biochem*, 103, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

Cecchini, N. M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., Konstantinoff, K., Jung, H. W., Engle, N. L., Tschaplinski, T. J. and Greenberg, J. T. (2019) Underground Azelaic Acid-Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 32, 86-94. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0185-R>.

Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., Bertrand, C. and Prigent-Combaret, C. (2013). Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent

effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87, 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>.

Chang, X., Kingsley, K. L. and White, J. F. (2021) Chemical Interactions at the Interface of Plant Root Hair Cells and Intracellular Bacteria. *Microorganisms*, 9, 1041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051041>.

Chen, Y. H., Hu, L., Punta, M., Bruni, R., Hillerich, B., Kloss, B., Rost, B., Love, J., Siegelbaum, S. A. and Hendrickson, W. A. (2010) Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature*, 467, 1074-1080. <https://doi.org/10.1038/nature09487>.

Chen, Y., Chen, Y., Shi, C., Huang, Z., and Zhang, Y., Shengkang Li, S., Li, Y., Ye, J., Yu, C., Li, Z., Zhang, X., Wang, J., Yang, H., Fang, L. and Chen, Q. (2018) SOAPnuke: a MapReduce acceleration supported Software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix120/4689118>.

Cipriano, M.A.P.; Freitas-lório, R.d.P.; Dimitrov, M.R.; de Andrade, S.A.L.; Kuramae, E.E.; Silveira, A.P.D.d. (2021) Plant-Growth Endophytic Bacteria Improve Nutrient Use Efficiency and Modulate Foliar N-Metabolites in Sugarcane Seedling. *Microorganisms*, 9, 479. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030479>.

Clarkson D. T. (1985) Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 36, 77-115. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.36.060185.000453>.

Cleary, J. L., Kolachina, S., Wolfe, B. E. and Sancheza., L. M. (2018) Coproporphyrin III produced by the bacterium *Glutamicibacter Arilaitensis* binds zinc and is upregulated by fungi in cheese rinds. 3, e00036-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00036-18>

Combarnous, Y. and Nguyen, T. (2020) Cell Communications among Microorganisms, Plants, and Animals: Origin, Evolution, and Interplays. *International journal of molecular sciences*, 21, 8052. <https://doi.org/10.3390/ijms21218052>.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., and Ait Barka, E. (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, 71, 1685–1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>.

Constantin, O. E. (2009) Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* 5, 18-22.

Contesto, C., Milesi, S., Mantelin, S., Zancarini, A., Desbrosses, G., Varoquaux, F., Bellini, C., Kowalczyk, M. and Touraine, B. (2010) The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, 232, 1455-1470. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1264-0>.

Coombs, J. T. and Franco, C. M. (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and environmental microbiology*, 69, 5603-5608. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003>.

Coquant, G., Grill, J. P. and Seksik, P. (2020) Impact of N-acyl-homoserine lactones, quorum sensing molecules, on gut immunity, *Front. Immunol*, 11, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01827>.

Cotton, T., Petriacq, P., Cameron, D. D., Meselmani, M. A., Schwarzenbacher, R., Rolfe, S. A. and Ton, J. (2019) Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *The ISME journal*, 13, 1647-1658. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0375-2>.

Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T. W. and Swings, J. (2001) Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, 91, 282-292. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.3.282>.

Cummings, S. P. (2009) The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems, *Environ. Biotechnol*, 5, 43-50.

Czarnota, M. A., Paul, R. N., Dayan, F. E., Nimbal, C. I. and Weston, L. A. (2001). Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII Inhibitor in Sorghum spp. Root Exudates. *Weed Technology*, 15, 813-825. doi:10.1614/0890-037X(2001)015[0813:MOALOP]2.0.CO;2

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B. and Esen, A. (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in beta -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize beta -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13555-13560. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13555>.

Da Silva Lima, L., Olivares, F.L., De Oliveira, R.R., Vega, M.R., Aguiar, N.O., Canellas, L. P. (2014) Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>.

Dahmani, M. A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., Coutos-Thévenot, P., Kaid-Harche, M., Bergès, T. and Vriet, C. (2020) Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Front. Plant Sci*, 27, 124. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00124>.

Dalbey, R. E. and Kuhn, A. (2012). Protein traffic in Gram-negative bacteria how exported and secreted proteins find their way. *FEMS microbiology reviews*, 36, 1023-1045. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00327.x>.

- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M. N., Durand, K. and Jacques, M. A.** (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and environmental microbiology*, 76, 6787-6796. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-10>.
- David, J., Holtz, Y., Ranwez, V., Santoni, S., Sarah, G., Ardisson, M., Poux, G., Choulet, F., Genthon, C., Roumet, P. and Tavaud-Pirra, M.** (2014) Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Mol Breeding* 34, 1531-1548. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0179-z>.
- Dayan, F. E., Rimando, A. M., Pan, Z., Baerson, S. R., Gimsing, A. L. and Duke, S. O.** (2010) Sorgoleone. *Phytochemistry*, 71,1032-1039. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.011>.
- De Bruijn, W., Gruppen, H., and Vincken, J. P.** (2018) Structure and biosynthesis of benzoxazinoids: Plant defence metabolites with potential as antimicrobial scaffolds. *Phytochemistry*, 155, 233-243. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.005>.
- Deakin, W. J. and Broughton, W. J.** (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 312-320. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2091>.
- Decker, H., Walz, F., Bormann, C., Zahner, H. and Fiedler, HP.** (1990) Nikkomycins wz and wx, new chitin synthetase inhibitors from *streptomyces tendae*. *J. Antibiot*, 1, 43-48.
- De-la-Peña, C., Lei, Z., Watson, B. S., Sumner, L. W. and Vivanco, J. M.** (2008) Root-microbe communication through protein secretion. *The Journal of biological chemistry*, 283, 25247-25255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801967200>.
- Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero M., Arciola, C. R. and Franci, G.** (2021) Gene transfer potential of outer membrane vesicles of gram-negative bacteria. *Bacteria. Int. J. Mol. Sci*, 22, 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>.
- Díaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M., and Groppa, M. D.** (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological research*, 186-187, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>.
- Díaz-Zorita, M. and Fernández-Canigia, M. V.** (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol*, 45, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.07.001>.
- Dineshkumar, K., Aparna, V., Wu, L., Wan, J., Abdelazi, M. H., Su, Z., WangS. and Xu, H.** (2020) Bacterial bug-out bags: outer membrane vesicles and their proteins and functions. *J. Microbiol*, 58, 531-542. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0026-3>.

Ding, B., Zhang, X., Xu, Y., An, L., Liu, X., and Su, Q. (2020) The bacterial potassium transporter gene MbtrkH improves K⁺ uptake in yeast and tobacco. *PLoS one*, 15, e0236246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236246>.

Do Amaral, F. P., Pankievicz, V. C., Arisi, A. C., de Souza, E. M., Pedrosa, F. and Stacey, G. (2016) Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *Plant molecular biology*, 90, 689-697. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0449-8>.

Do Amaral, F. P., Tuleski, T. R., Pankievicz, V., Melnyk, R. A., Arkin, A. P., Griffiths, J., Tadra-Sfeir, M. Z., Maltempi de Souza, E., Deutschbauer, A., Monteiro, R. A. and Stacey, G. (2020) Diverse Bacterial Genes Modulate Plant Root Association by Beneficial Bacteria. *mBio*, 11, e03078-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03078-20>.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. and Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212, 153-162. <https://doi.org/10.1023/A:1004658000815>.

Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M. C., Lester, R. N., and Tanksley, S. D. (2002). Conservation of gene function in the solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics*, 161, 1713-1726. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.4.1713>.

Donabedian, H. (2003) Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Int. J. Infect*, 46, 207-214. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1120>.

Dos Santos, S. G., da Silva Ribeiro, F., da Fonseca, C. S., Pereira, W., Santos, L. A. and Reis, V. M. (2017) Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. *Archives of microbiology*, 199, 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>.

Dos Santos, S.G., da Silva Ribeiro, F., Alves, G.C., Santos, L.A. and Reis, V.M. (2020) Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. *Plant and Soil*, 451, 25-44. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>.

Dower, W. J., Miller J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>

Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-Combaret, C. (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. *Research in microbiology*, 163(8), 500-510. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.006>.

Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V. and Lemanceau, P. (1997). Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *The New Phytologist*, 135, 325-334.

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. and Milanowski, J. (2016). Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 23(2), 206–222. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203879>.

Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V. and Pugsley, A. P. (2006) Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 62, 308-319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05377.x>.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A. and Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E911–E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>.

Eljounaidi, K., Lee, S.K. and Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*. 103, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>.

Escolà Casas, M. and Matamoros V. (2021) Analytical challenges and solutions for performing metabolomic analysis of root exudates. *Trends Environ Anal Chem*, 31, 2214-1588. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00130>.

Estefan, G., Sommer, R. and Ryan, J. (2013) Methods of soil, plant, and water analysis: A manual for the West Asia and North Africa region. 3rd edn. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).

Etesami, H. and Alikhani, H. A. (2016) Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. *Rhizosphere*, 2, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.09.003>.

Etesami, H. and Maheshwari, D. K. (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.

Etesami, H., Alikhani, H.A. (2017) Evaluation of Gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 147, 7-14. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0981-z>

Faris, J. (2014) Wheat Domestication: Key to Agricultural Revolutions Past and Future. In: Tuberosa, R., Graner, A., Frison, E. (eds) Genomics of Plant Genetic Resources. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7572-5_18

Feitosa-Junior, O. R., Stefanello, E., Zaini, P. A., Nascimento, R., Pierry, P. M., Dandekar, A. M., Lindow, S. E. and Da Silva, A. M. (2019) Proteomic and Metabolomic Analyses of *Xylella*

fastidiosa OMV-Enriched Fractions Reveal Association with Virulence Factors and Signaling Molecules of the DSF Family. *Phytopathology*, 109, 1344-1353. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0083-R>.

FIPKE, G. M., Conceicao, G. M., Teleken, L. F., Grando, Ludwig, R. L., Nunes, U. R., Martin, T. N. (2016) Co-inoculation with diazotrophic bacteria in soybeans associated to urea topdressing. *Ciência e Agrotecnologia*, 40, 522-533. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016405001316>.

Fraisier-Vannier, O., Chervin, J., Cabanac, G., Puech, V., Fournier, S., Durand, V., Amiel, A., André, O., Benamar, O.A., Dumas, B., Tsugawa, H. and Marti, G. (2020) MS-CleanR: a feature-filtering workflow for untargeted LC-MS based metabolomics. *Anal. Chem*, 92, 9971-9981. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01594>.

Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P. and Shay, J. E. (2017). Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*, 5, 70. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>.

Furuyama, N. and Sircili, M. P. (2021) Outer membrane vesicles (omvs) produced by gram-negative bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application. *Biomed Res. Int*, 2021, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>.

Gao, Y., Faris, J.D., Liu, Z., Kim, Y.M., Syme, R.A., Oliver, R.P., Xu, S.S. and Friesen, T.L. (2015). Identification and characterization of the SnTox6-Snn6 interaction in the *Parastagonospora nodorum*–wheat pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 615-625. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0396-R>.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A., Romeis, T. and Hedrich, R. (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 21425-21430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912021106>.

Germida, J.J., and Siciliano, S.D. (2001) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 410-415.

Ghadam Khani, A., Enayatizamir, N., and Norouzi Masir, M. (2019) Impact of plant growth promoting rhizobacteria on different forms of soil potassium under wheat cultivation. *Letters in applied microbiology*, 68, 514–521. <https://doi.org/10.1111/lam.13132>.

Giles, C. D., Hsu, P. C., Richardson, A. E., Hurst, M. R. and Hill, J. E. (2015) The role of gluconate production by *Pseudomonas* spp. in the mineralization and bioavailability of calcium-phytate to *Nicotiana tabacum*. *Canadian journal of microbiology*, 61, 885-897. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0206>.

Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 48, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

- Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., Ficco, D. B., Pieruschka, R., De Vita, P., Fiorani, F., and Papa, R.** (2015) Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under contrasting nitrogen fertilization. *Journal of experimental botany*, 66, 5519-5530. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv289>.
- Golan, G., Hendel, E., Méndez Espitia, G. E., Schwartz, N., and Peleg, Z.** (2018) Activation of seminal root primordia during wheat domestication reveals underlying mechanisms of plant resilience. *Plant, cell & environment*, 41, 755-766. <https://doi.org/10.1111/pce.13138>.
- Gordon, A. and Weber, R. P.** (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol*, 26, 192-195. <http://doi:10.1104/pp.26.1.192>.
- Gottel, N. R., Castro, H. F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D. A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G. A., Vilgalys, R., Doktycz, M. J. and Schadt, C. W.** (2011). Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and environmental microbiology*, 77, 5934-5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.05255-11>.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S. and Patra, J. K.** (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.
- Green, E. R. and Mecsas, J.** (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology spectrum*, 4, VMBF-0012-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>.
- Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J. and Nain, L.** (2021) PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. *Front. Sustain. Food Syst*, 4, 618230. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.618230>.
- Gruet, C., Muller, D. and Moëne-Loccoz, Y.** (2022) Significance of the Diversification of Wheat Species for the Assembly and Functioning of the Root-Associated Microbiome. *Frontiers in microbiology*, 12, 782135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.782135>.
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A. and Castro-Escarpulli, G.** (2017) The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 18, 425-432. <https://doi.org/10.1111/tra.12488>.
- Guo, B., Zhang, Y., Li, S., Lai, T., Yang, L., Chen, J. and Ding, W.** (2016) Extract from Maize (*Zea mays* L.): Antibacterial Activity of DIMBOA and Its Derivatives against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21, 1397. <https://doi.org/10.3390/molecules21101397>.

Gutiérrez-Gamboa, G., Mateluna-Cuadra, R., Díaz-Gálvez, I., Mejía, N. and Verdugo-Vásquez, N. (2021) Methyl jasmonate applications in viticulture: A tool to increase the content of flavonoids and stilbenes in grapes and wines. *Horticulturae*, 7, 133. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7060133>.

Gutiérrez-Luna, F., López-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Valencia-Cantero, E., Reyez, H. and Macías-Rodríguez, L. (2010) Plant growth- promoting rhizobacteria modulate root- system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 51, 75-83. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0066-2>.

Guzevatykh, L. S., Voronina, T. A., Emel'ianova, T. G., Andreeva, L. A., Alfeeva, L., Seredenin, S. B. and Miasoedov, N. F. (2008) Analgesic activity of dipeptide Tyr-Pro. *Biol Bull Russ Acad Sci*, 35, 50–55. <https://doi.org/10.1134/S1062359008010081>.

Haas, M., Schreiber, M., and Mascher, M. (2019) Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *Journal of integrative plant biology*, 6, 204-225. <https://doi.org/10.1111/jipb.12737>.

Hallmann, A., Kloepper, J. and Benhamou, N. (1997). Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Can J Microbiol*, 43, 577-582.

Haque, M., Mosharaf, K., Khatun, M., Haque, A., Biswas, S., Islam, S., Islam, M., Shozib, H. B., Miah, U., Molla, AH. and Siddiquee, MA. (2020) Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth-promoting traits promote growth of tomato under water-deficit stress. *Front. Microbiol*, 11, 542053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.542053>.

Hardoim, P. R., Hardoim, C. C., van Overbeek, L. S. and van Elsas, J. D. (2012) Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PloS one*, 7, e30438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 79, 293-320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.

Harlan, J. R., de Wet, J., and Price, E. G. (1973) comparative evolution of cereals. *Evolution; international journal of organic evolution*, 27, 311–325. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1973.tb00676.x>

Hartmann, A., Klink, S. and Rothballer, M. (2021) Importance of N-acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching in pathogen control and plant growth promotion. *Pathogens*, 10, 1561. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121561>.

Haudry, A., Cenci, A., Ravel, C., Bataillon, T., Brunel, D., Poncet, C., Hochu, I., Poirier, S., Santoni, S., Glémin, S., and David, J. (2007) Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since

domestication. *Molecular biology and evolution*, 24, 1506-1517.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm077>.

Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T., Gill, B. S. and Cox, T. S. (1995) Chromosome location of mycorrhizal responsive genes in wheat. *Canadian Journal of Botany*. **73**, 891-897. <https://doi.org/10.1139/b95-097>.

Hickman, D. T., Rasmussen, A., Ritz, K., Birkett, M. A. and Neve, P. (2021) Review: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach. *Pest management science*, 77, 1121-1131. <https://doi.org/10.1002/ps.6076>.

Hungria, M., Campo, J., Souza, E. M. and Pedrosa, F. O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil*, 331, 413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

Inui, M., Roh, J. H., Zahn, K., and Yukawa, H. (2000) Sequence analysis of the cryptic plasmid pMG101 from *Rhodospseudomonas palustris* and construction of stable cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 54–63. <https://doi.org/10.1128/aem.66.1.54-63.2000>.

Jain, DK. and Patriquin, D. G. (1984) Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-azospirillum associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1208-13
<https://doi.org/10.1128/aem.48.6.1208-1213>.

Jan, A. T. (2017) Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Frontiers in microbiology*, 8, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>.

Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A. and Jo, YK. (2019) Bioprospecting plant growth-promoting rhizobacteria that mitigate drought stress in grasses. *Front. microbiol*, 10, 2106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>.

Johnson, R., Vishwakarma, K., Hossen, M. S., Kumar, V., Shackira, A. M., Puthur, J. T., Abdi, G., Sarraf, M. and Hasanuzzaman, M. (2022) Potassium in plants: Growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 172, 56-69.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.001>.

Johnston-Monje, D. and Raizada, M. N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS one*, 6, e20396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.

Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J. and Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 324, 89-91.
<https://doi.org/10.1126/science.1170025>.

Kalayu, G. (2019) Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M. and Maffei, M. E. (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>.

Kanegawa, N., Suzuki, C. and Ohinata, K. (2010) Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D₁ and GABA_A receptors in mice. *FEBS letters*, 584, 599-604. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.008>.

Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y. and Martinoia, E. (2011) Plant ABC Transporters. *The arabidopsis book*, 9, e0153. <https://doi.org/10.1199/tab.0153>.

Kapulnik, Y., Okon, Y. and Henis, Y. (1985) Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol*, 31, 881-887. <https://doi.org/10.1139/m85-165>.

Kawasaki, A., Okada, S., Zhang, C., Delhaize, E., Mathesius, U., Richardson, A. E., Watt, M., Gilliam, M. and Ryan, P. R. (2018) A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants. *Plant methods*, 14, 114. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0380-x>.

Kierul, K., Voigt, B., Albrecht, D., Xiao-Hua Chen, X., Carvalhais, L. C. and Borriss., R. (2015) Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology*, 161, 131-147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083576-0>.

Kim, K. H., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2009) Diterpene glycosides from the seeds of *Pharbitis nil*. *Journal of natural products*, 72, 1121-1127. <https://doi.org/10.1021/np900101t>.

Kim, O. Y., Hong, B. S., Park, K. S., Yoon, Y. J., Choi, S. J., Lee, W. H., Roh, T. Y., Lötvall, J., Kim, Y. K. and Gho, Y. S. (2013) Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 4092-4102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200742>.

Kim, Y. K., Kwon, K. H., Kim, K. P. and Yong, S. G. (2007) Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, 7, 3143-3153. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700196>.

Korenblum, E., Dong, Y., Szymanski, J., Panda, S., Jozwiak, A., Massalha, H., Meir, S., Rogachev, I. and Aharoni, A. (2020) Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 3874-3883. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912130117>.

Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., and Sorrells, M. E. (2015). A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 14, 285-302. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12129>

Kudjordjie, E. N., Sapkota, R., Steffensen, S. K., Fomsgaard, I. S. and Nicolaisen, M. (2019) Maize synthesized benzoxazinoids affect the host associated microbiome. *Microbiome*, 7, 59. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0677-7>.

Kulkarni, H. M. and Jagannadham, M. V. (2014). Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 160, 2109-2121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>.

Kulp, A. and Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, 64, 163-184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>.

Laouressgues, D., Couzigou, J. M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G. and Combier, J. P. (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520, 90-93. <https://doi.org/10.1038/nature14346>.

Lee, E. Y., Joo, Y. B., Gun, W. P., Choi, D. S., Ji, S. K., Kim, H. J., Park, K. S., Lee, J. O., Lee, J., Kim, O. Y. and Gho, Y. S. (2016) Proteomic profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives. *Proteomics. Clinical applications*, 10, 897-909. <https://doi.org/10.1002/prca.201600032>.

Lee, J.E., Vogt, T., Schmidt, J., Parthier, B. and Löbler, M. (1997). Methyljasmonate-induced accumulation of coumaroyl conjugates in barley leaf segments. *Phytochemistry*, 44, 589-592. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00562-6).

Lee, S., Oh, C., Suh, J.P., Mccouch, S., and Ahn, S. (2005) Identification of QTLs for domestication-related and agronomic traits in an *Oryza sativa* × *O. rufipogon* BC1F7 population. *Plant Breeding*, 124, 209-219. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01092.x>.

Lehmann, S., Vialaret, J., Séveno, M., Tiers, L., and Gabelle, A. and Hirtz, C. (2021) Comparison of hydrophobic, lipophilic and immunodepletion pre-fractionation methods for label-free LC-MS / MS identification of biomarkers in human cerebrospinal fluid. *J. Proteomics Bioinform*, S5, <https://doi.org/10.4172/0974-276X.S5-003>.

Leoni, F., Hazrati, H., Fomsgaard, I. S., Moonen, A. C. and Kudsk, P. (2021) Determination of the Effect of Co-cultivation on the Production and Root Exudation of Flavonoids in Four Legume Species Using LC-MS/MS Analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69, 9208-9219. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02821>.

- Lery, L. M. S., Hemerly, A. S., Nogueira, E. M., von Krüger, W. M. A. and Bisch, P. M.** (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *APS*, 24, 562-576. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0178>.
- Li, Z., Chang, S., Ye, S., Chen, M., Lin, L., Li, Y., Li, S., and An, Q.** (2015) Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC deaminase. *FEMS microbiology ecology*, 91, fiv112. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv112>.
- Lim, G. H., Shine, M. B., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A. G., Lee, J. Y., Kachroo, A. and Kachroo, P.** (2016) Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell host & microbe*, 19, 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.006>.
- Liu, B., Fujita, T., Yan, Z. H., Sakamoto, S., Xu, D., and Abe, J.** (2007) QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). *Annals of botany*, 100, 1027-1038. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm149>.
- Liu, Y. C., Chan, K. G. and Chang, C. Y.** (2015). Modulation of Host Biology by *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecules: Messengers or Traitors. *Frontiers in microbiology*, 6, 1226. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01226>.
- Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y., Wang, J. and Song, W.** (2012) Investigation on diversity and population succession dynamics of indigenous bacteria of the maize spermosphere. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28, 391-396. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0822-3>.
- Llorens, E., Sharon, O., Camañes, G., García-Agustín, P. and Sharon, A.** (2019). Endophytes from wild cereals protect wheat plants from drought by alteration of physiological responses of the plants to water stress. *Environmental microbiology*, 10.1111/1462-2920.14530. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14530>.
- Lopez-Guerrero, M. G., Wang, P., Phares, F., Schachtman, D. P., Alvarez, S. and Van Dijk, K.** (2022) A glass bead semi-hydroponic system for intact maize root exudate analysis and phenotyping. *Plant methods*, 18, 25. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00856-4>.
- Lorck, H.** (1948) Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*, 1, 142-146. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x>.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and De Bruijn, F. J.** (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 2286-2295. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994>.

Lu, C., Liu, X., Xu, J., Dong, F., Zhang, C., Tian, Y. and Zheng, Y. (2012) Enhanced Exudation of DIMBOA and MBOA by Wheat Seedlings Alone and in Proximity to Wild Oat (*Avena fatua*) and Flixweed (*Descurainia sophia*). *Weed Science*, 60, 360-365. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00119.1>.

Lucke, M., Correa, M. G. and Levy, A. (2020) The Role of Secretion Systems, Effectors, and Secondary Metabolites of Beneficial Rhizobacteria in Interactions With Plants and Microbes. *Frontiers in plant science*, 11, 589416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589416>.

Lynch, J. P. (2007) Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, 55, 493-512. <https://doi.org/10.1071/BT06118>.

Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A. and Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 17, 2337-2342. <https://doi.org/10.1002/rcm.1196>

Ma, Z. L., Hou, T., Shi, W., Liu, W. W., Ibrahim, S. A. and He, H. (2016) Purification and identification of corn peptides that facilitate alcohol metabolism by semi-preparative high-performance liquid chromatography and nano liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 39, 4234-4242. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600554>.

Mahaffe, W.F., Kloepper J.W., VAN Vuurde, J.W.L., VAN Der Wolf, J.M. and VAN Den Brink, M. 1997. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen (eds), *Improving Plant Productivity in Rhizosphere Bacteria*. CSIRO, Melbourne, Australia, 180.

Mahmood, A. and Kataoka, R. (2020) Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria. *Microbiological research*, 234, 126421. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126421>.

Maketon, C., Fortuna, A. M., and Okubara, P. A. (2012) Cultivar-dependent transcript accumulation in wheat roots colonized by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 wild type and mutant strains. *Biol. Control*, 60, 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.11.002>.

Manning, A. J. and Kuehn, M. J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC microbiology*, 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>.

Mariappan, V., Vellasamy, K. M., Hashim, O. H. and Vadivelu, J. (2011) Profiling of *Burkholderia cepacia* secretome at mid-logarithmic and early-stationary phases of growth. *PloS one*, 6, e26518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026518>.

Mashabela, M. D., Piater, L. A., Dubery, I. A., Tugizimana, F., and Mhlongo, M. I. (2022) Rhizosphere tripartite interactions and PGPR-mediated metabolic: A metabolomics review, *Biology*, 11, 346. <https://doi.org/10.3390/biology11030346>.

Mastretta, C., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Barac, T., Boulet, J., Weyens, N. and Vangronsveld, J. (2009) endophytic bacteria from seeds of nicotiana tabacum can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*, 11, 251 – 267. <https://doi.org/10.1080/15226510802432678>.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anollés, G., Rolfe, B., and D.Bauer, W. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 1444-1449. <https://doi.org/10.1073/pnas.262672599>.

Mazzola, M., Funnell, D. L. and Raaijmakers, JM. (2004) Wheat cultivar-specific selection of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microb. Ecol*, 48, 338-348. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1067-y>.

Meena, V. S., Maurya, B. R. and Verma, J. P. (2014) Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils?. *Microbiological research*, 169, 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>.

Mercado-Blanco, J. and JJ Lugtenberg, B. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotechnology*, 3, 60-75. DOI: 10.2174/22115501113026660038.

Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Labuschagne, N. and Dubery, I. A. (2020) Metabolic profiling of PGPR-treated tomato plants reveal priming-related adaptations of secondary metabolites and aromatic amino acids. *Metabolites*, 10, 1-24. <https://doi.org/10.3390/metabo10050210>.

Middleton, H., Yergeau, É., Monard, C., Combier, J. P. and El Amrani, A. (2021) Rhizospheric plant-microbe interactions: miRNAs as a key mediator. *Trends. Plant Sci.* 26, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.005>.

Mikić, S. and Ahmad, S. (2018) Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: The role and application. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 55, 49-57. <https://doi.org/10.5937/ratpov55-12211>.

Miller, S. B., Heuberger, A. L., Broeckling, C. D. and Jahn, C. E. (2019) Non-Targeted Metabolomics Reveals Sorghum Rhizosphere-Associated Exudates are Influenced by the Belowground Interaction of Substrate and Sorghum Genotype. *International journal of molecular sciences*, 20, 431. <https://doi.org/10.3390/ijms20020431>.

Mizushige, T., Uchida, T. and Ohinata, K. (2020) Dipeptide tyrosyl-leucine exhibits antidepressant-like activity in mice. *Scientific reports*, 10, 2257. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59039-7>.

Mohamad, O., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J. W., Rasulov, B. A., Liu, Y. H., Hedlund, B. P., and Li, W. J. (2018) Evaluation of the Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations From Chinese Traditional Medicinal Plant Licorice and Characterization of the Bioactive Secondary

Metabolites Produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in microbiology*, 9, 924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00924>.

Moshynets, O. V., Babenko, L. M., Rogalsky, S. P., Lungin, O. S., Foster, J., Kosakivska, I. V., Potters, G., and Spiers, A. J. (2019) Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield, *PLoS One*, 14, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209460>.

Motoi, H. and Kodama, T. (2003) Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Die Nahrung*, 47, 354-358. <https://doi.org/10.1002/food.200390081>.

Mozaheb, N. and Mingeot-Leclercq, M. P. (2020) Membrane vesicle production as a bacterial defense against stress. *Front. Microbiol*, 11, 600221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>.

Mukhopadhyay, K., Garrison, N. K., Hinton, D. M., Bacon, C. W., Khush, G. S., Peck, H. D. and Datta, N. (1996) Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia*, 134, 151-159. <https://doi.org/10.1007/BF00436723>.

Munif, A., Hallmann, J. and Sikora, R.A. (2000) Evaluation of the biocontrol activity of endophytic bacteria from tomato against *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen-Faculiteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent*, 65, 471-480.

Naseri R., Azadi S., Rahimi, M. J., Maleki, A. and Mirzaei, A. (2013) Effects of inoculation with *Azotobacter Chroococcum* and *Pseudomonas putida* on yield and some of the important agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4, 1602-1610.

Neal, A. L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R. and Ton, J. (2012) Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS one*, 7, e35498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035498>.

Nehl, D.B., Allen, S.J., Brown, J.F. (1997) Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 5, 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00124-2).

New, P. B. and Kennedy, I. R. (1989) Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol*, 17, 299-309. <https://doi.org/10.1007/BF02012842>.

Nongonierma, A. B. and FitzGerald, R. J. (2014) Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis. *Food chemistry*, 145, 845-852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.097>.

- Oburger, E. and Jones, D.L.** (2018) Sampling root exudates—mission impossible?. *Rhizosphere*, 6, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004>.
- Okada, K., Abe, H., and Arimura, G.** (2015) Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant & cell physiology*, 56, 16-27. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu158>.
- Olanrewaju, O. S., Ayangbenro, A. S., Glick, B. R., and Babalola, O. O.** (2019) Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1155-1166. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9556-6>.
- Olsen, J. V., Ong, S. E. and Mann, M.** (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 3, 608-614. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>.
- Orench-Rivera, N. and Kuehn, M. J.** (2016) Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular microbiology*, 18, 1525-1536. <https://doi.org/10.1111/cmi.12676>.
- Ortiz-Castro, R. and López-Bucio, J.** (2019) Phytostimulation and root architectural responses to quorum-sensing signals and related molecules from rhizobacteria. *Plant Sci*, 284, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.04.010>.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J. and López-Bucio, J.** (2020) *Pseudomonasputida* and *Pseudomonas fluorescens* Influence *Arabidopsis* Root System Architecture Through an Auxin Response Mediated by Bioactive Cyclodipeptides. *J Plant Growth Regul*, 39, 254–265. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, R. E., Campos-García, J. and López-Bucio, J.** (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 7253-7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>.
- Otanga, R.R., Yobo, K.S. and Laing, M.D.** (2018) Response of two wheat cultivars to inoculation of diazotrophic bacteria in combination with reduced nitrogen fertilisation under field conditions. *South African journal of plant and soil*, 35, 343-350. <https://doi.org/10.1080/02571862.2017.1419387>.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S.** (2017) Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol*, 15, 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>.
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., and Xia, J.** (2022) Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature protocols*, 10.1038/s41596-022-00710-w. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>

- Pankievicz, V., Do Amaral, F. P., Ané, J. M. and Stacey, G.** (2021) Diazotrophic Bacteria and Their Mechanisms to Interact and Benefit Cereals. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 34, 49-498. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-20-0316-FI>.
- Pantigoso, H. A., He, Y., DiLegge, M. J and Vivanco, J. M.** (2021) Methods for Root Exudate Collection and Analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2232, 291-303. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4_22.
- Paterson, A. H., Lin, Y. R., Li, Z., Schertz, K. F., Doebley, J. F., Pinson, S. R., Liu, S. C., Stansel, J. W., and Irvine, J. E.** (1995) Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic Loci. *Science (New York, N.Y.)*, 269, 1714-1718. <https://doi.org/10.1126/science.269.5231.1714>.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, G. S., Dangl, J. L., Buckler, E. S. and Ley, R. E.** (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 6548-6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>.
- Peleg, Z., Fahima, T., Korol, A. B., Abbo, S., and Saranga, Y.** (2011) Genetic analysis of wheat domestication and evolution under domestication. *Journal of experimental botany*, 62, 5051-5061. <https://doi.org/10.1093/jxb/err206>.
- Pérez-Jaramillo, E., Mendes, R. and Raaijmakers, M.** (2016) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol. Biol.* 90, 635-644. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0337-7>.
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M. and Raaijmakers, J. M.** (2018) The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6, 143. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>.
- Petriacq, P., Williams, A., Cotton, A., McFarlane, A. E., Rolfe, S. A., and Ton, J.** (2017) Metabolite profiling of non-sterile rhizosphere soil. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 92, 147-162. <https://doi.org/10.1111/tpj.13639>.
- Pham, V. T., Rediers, H., Ghequire, M. G., Nguyen, H. H., De Mot, R., Vanderleyden, J., & Spaepen, S.** (2017) The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of microbiology*, 199, 513-517. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1332-3>.
- Pitzschke A.** (2016) Developmental Peculiarities and Seed-Borne Endophytes in Quinoa: Omnipresent, Robust Bacilli Contribute to Plant Fitness. *Frontiers in microbiology*, 7, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00002>.
- Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkooor, S., Gamet, L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., Touraine, B. and Desbrosses, G.** (2017) Local signalling pathways regulate the Arabidopsis root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *Journal of experimental botany*, 68, 1199-1211. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw502>.

- Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoor, S., Gamet, L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., Touraine, B. and Desbrosses, G.** (2017) Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J. Exp. Bot*, 68, 1199-1211. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw502>.
- Poly, F., Monrozier, L. J., and Bally, R.** (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in microbiology*, 152, 95-103. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)01172-4).
- Pramanik, P., Goswami, A. J., Ghosh, S., and Kalita, C.** (2019) An indigenous strain of potassium-solubilizing bacteria *Bacillus pseudomycoloides* enhanced potassium uptake in tea plants by increasing potassium availability in the mica waste-treated soil of North-east India. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 215–222. <https://doi.org/10.1111/jam.14130>.
- Qing, G., Gong, N., Chen, X., Chen, J., Zhang, H., Wang, Y., Wang, R., Zhang, S., Zhang, Z., Zhao, X., Luo, Y. and Liang, X. J.** (2019) Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys Rep*, 5, 184-198. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00095-6>.
- Rajawat, M. V. S., Singh, S., Tyagi, P. and Saxena, A. K.** (2016) A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere*, 26, 768-773. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60080-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60080-7).
- Ram, S. G., Thiruvengadam, V., and Vinod, K. K.** (2007) Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. *Journal of applied genetics*, 48, 337-345. <https://doi.org/10.1007/BF03195230>.
- Razaq, M., Zhang, P., Shen, H. L. and Salahuddin** (2017). Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono*. *PloS one*. 12, e0171321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171321>.
- Reinhardt, E. L., Ramos, P. L., Manfio, G. P., Barbosa, H. R., Pavan, C. and Moreira-Filho, C. A.** (2008) Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Braz. J. Microbiol*, 39, 414-422. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300002>.
- Reinhardt, E. L., Ramos, P. L., Manfio, G. P., Barbosa, H. R., Pavan, C. and Moreira-Filho, C. A.** (2008) Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Braz. J. Microbiol*, 39, 414-422. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300002>.
- Reiss, A., Fomsgaard, I.S., Mathiassen, S.K. and Kudsk, P.** (2018) Silicone tube microextraction for repeated sampling of benzoxazinoids in the root zone and analysis by HPLC/MS-MS. *J Allelochem Interact*, 4,27-37.

Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M., Nazir, M.Z. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers and Biopesticides. In: Hakeem, K.R., Dar, G.H., Mehmood, M.A., Bhat, R.A. (eds) *Microbiota and Biofertilizers*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11.

Rice, C. P., Cai, G. and Teasdale, J. R. (2012) Concentrations and allelopathic effects of benzoxazinoid compounds in soil treated with rye (*Secale cereale*) cover crop. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 4471-4479. <https://doi.org/10.1021/jf300431r>.

Rieusset, L., Rey, M., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C. and Comte, G. (2022) Wheat metabolite interferences on fluorescent *pseudomonas* physiology modify wheat metabolome through an ecological feedback, *Metabolites*, 12, 236. <https://doi.org/10.3390/metabo12030236>.

Rongsawat, T. (2019) Root developmental responses to nutrient shortage and biotic conditions in wheat: identification of beneficial bacteria from wheat rhizosphere and new procedures for phenotyping root and root hair development. (thesis).

Rongsawat, T., Peltier, J. B., Boyer, J. C., Véry, A. A., and Sentenac, H. (2021). Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. *Trends in plant science*, 26, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.001>.

Rosier, A., Medeiros, F. H. V. and Bais, H.P. (2018) Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant Soil*, 428, 35-55. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3679-5>.

Roucou, A., Violle, C., Fort, F., Roumet, P., Ecarnot, M. and Vile, D. (2018) Shifts in plant functional strategies over the course of wheat domestication. *J Appl Ecol.*, 55, 25-37. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13029>.

Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W. and Bais, H. P. (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148, 1547-1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>.

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Snchez, M., Rocha, D., Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W. and Kloepper, J. W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 492-4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. and Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36, 146-167. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>.

- Ryu, C. M., Farag, M. A., Pare, P. W. and Kloepper, J. W.** (2005) Invisible Signals from the Underground: Bacterial Volatiles Elicit Plant Growth Promotion and Induce Systemic Resistance. *The Plant Pathology Journal. Korean Society of Plant Pathology*, 21, 7-12. <https://doi.org/10.5423/ppj.2005.21.1.007>.
- Salavati, A., Shafeinia, A., Klubicova, K., Bushehri, A. A. and Komatsu, S.** (2013) Proteomic insights into intra- and intercellular plant-bacteria symbiotic association during root nodule formation. *Frontiers in plant science*, 4, 28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00028>.
- Sanchez, S. and Demain, A. L.** (2008) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial Biotechnology*, 1, 283–319. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00015.x>.
- Saravanakumar, K., Dou, K., Lu, Z., Wang, X., Li, Y. and Chen, J.** (2018) Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.004>.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Eda, S., Mitsui, H., Hanzawa, E., Kisara, C., Kazama, Y., Kushida, A., Shinano, T., Minamisawa, K. and Sato, T.** (2010) Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 636-644. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00499.x>.
- Saubidet, M. I., Fatta, N. and Barneix, A. J.** (2002) The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil*, 245, 215-222. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.607262>.
- Schandry, N. and Becker, C.** (2020) Allelopathic Plants: Models for Studying Plant-Interkingdom Interactions. *Trends in plant science*, 25, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.11.004>.
- Schikora, A., Schenk, S. T. and Hartmann, A.** (2016) Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol*, 90, 605-612. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0457-8>.
- Schiltz, S., Gaillard, I., Pawlicki-Jullian, N., Thiombiano, B., Mesnard, F. and Gontier, E.** (2015) A review: what is the spermosphere and how can it be studied?. *Journal of applied microbiology*, 119, 1467-1481. <https://doi.org/10.1111/jam.12946>.
- Schulz, B., Boyle, C.** (2006) What are Endophytes? In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (eds) Microbial Root Endophytes. *Soil Biology*, 9. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_1.

Schütz, V., Bigler, L., Girel, S., Laschke, L., Sicker, D., Schulz, M.(2019) Conversions of benzoxazinoids and downstream metabolites by soil microorganism. *Front Ecol Evol.*, 7, 238. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00238>.

Schwechheimer, C., Sullivan, C. J. and Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52, 3031-3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>.

Seal, A. N., Pratley, J. E., Haig, T. and An, M. (2004) Identification and quantitation of compounds in a series of allelopathic and non-allelopathic rice root exudates. *Journal of chemical ecology*, 30, 1647-1662. <https://doi.org/10.1023/b:joec.0000042074.96036.14>.

Seghers, D., Wittebolle, L., Top, E. M., Verstraete, W. and Siciliano, S. D. (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and environmental microbiology*, 70, 1475-1482. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1475-1482.2004>.

Sehrawat, A., Sindhu, S.S. and Glick, B.R. (2022) Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32, 15-38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9).

Seifert, G. J., Xue, H. and Acet, T. (2014). The *Arabidopsis thaliana* FASCICLIN LIKE ARABINO GALACTAN PROTEIN 4 gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth. *Annals of botany*, 114, 1125-1133. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu010>.

Shade, A., Jacques, M. A. and Barret, M. (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current opinion in microbiology*, 37, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010>.

Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L.A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J. and Smith, D.L. (2021) PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 211. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>.

Shane, M. W., Dixon, K. W. and Lambers., H. (2004) The occurrence of dauciform roots amongst Western Australian reeds, rushes and sedges, and the impact of phosphorus supply on dauciform-root development in *Schoenus unispiculatus* (Cyperaceae). *New Phytol.* 165: 887-898. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01283.x>.

Sharafzadeh, S. (2012) Effects of pgpr on growth and nutrients uptake of tomato. *Int. J. Adv. Eng. Technol*, 2, 27-31.

- Sharma, T., Dreyer, I., Kochian, L. and Piñeros, M. A.** (2016) The ALMT Family of Organic Acid Transporters in Plants and Their Involvement in Detoxification and Nutrient Security. *Frontiers in plant science*, 7, 1488. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01488>.
- Sharrar, A. M., Crits-Christoph, A., Méheust, R., Diamond, S., Starr, E. P. and Banfield, J. F.** (2020) Bacterial Secondary Metabolite Biosynthetic Potential in Soil Varies with Phylum, Depth, and Vegetation Type. *mBio*, 11, e00416-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00416-20>.
- Shavrukov, Y., Genc, Y. and Hayes, J.** (2012) The use of hydroponics in abiotic stress tolerance research. 7th edn. <https://doi.org/10.5772/35206>.
- Shi, W., Xing, Y., Zhu, Y., Gao, N., & Ying, Y.** (2022) Diverse responses of pqqC- and phoD-harboring bacterial communities to variation in soil properties of Moso bamboo forests. *Microbial biotechnology*, 15, 2097-2111. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14029>.
- Shin, W., Islam, R., Benson, A., Joe, M.M., Kim, K., Gopal, S., Samaddar, S., Banerjee, S. and Sa, T.,** (2016) Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean journal of soil science and fertilizer*, 49, 17-29. <https://doi.org/10.1111/aab.12045>.
- Shrivastava, R. and Miller, J. F.** (2009) Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Current opinion in microbiology*, 12, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.001>.
- Singh VK, Singh AK, Singh PP, Kumar A.** (2018) Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: a review. *Agric Ecosyst Environ*, 267, 129-40. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.020>.
- Singh, D. and Mathur, S.B.** (2004). Histopathology of Seed-Borne Infections (1st ed.), Boca Raton, *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/9781420038170>.
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A. and Jha, P. N.** (2015) Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to "stress ethylene" produced in plants. *Frontiers in microbiology*, 6, 937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>.
- Sinha, A., Lulu, S., S, V., and Osborne, W. J.** (2019) Reactive green dye remediation by *Alternanthera philoxeroides* in association with plant growth promoting *Klebsiella* sp. VITAJ23: A pot culture study. *Microbiological research*, 220, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.12.004>.
- Smets, D., Loos, M. S., Karamanous. and Economou, A.** (2019) Protein transport across the bacterial plasma membrane by the sec pathway. *Protein J*, 38, 262-273. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09841-8>.

- Soluch, R., Hülter, N. F., Romero Picazo, D., Özkurt, E., Stukenbrock, E. H. and Dagan, T.** (2021) Colonization dynamics of *Pantoea agglomerans* in the wheat root habitat. *Environmental microbiology*, 23, 2260–2273. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15430>.
- Song, G. C., Choi, H. K., Kim, Y. S., Choi, J. S. and Ryu, C. M.** (2017) Seed defense biopriming with bacterial cyclodipeptides triggers immunity in cucumber and pepper, *Sci. Rep.*, 7, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14155-9>.
- Spor, A., Roucou, A., Mounier, A., Bru, D., Breuil, M. C., Fort, F., Vile, D., Roumet, P., Philippot, L., and Violle, C.** (2020) Domestication-driven changes in plant traits associated with changes in the assembly of the rhizosphere microbiota in tetraploid wheat. *Scientific reports*, 10, 12234. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69175-9>.
- Srivastava, A. K., Shankar, A., Nalini Chandran, A. K., Sharma, M., Jung, K. H., Suprasanna, P., and Pandey, G. K.** (2020) Emerging concepts of potassium homeostasis in plants. *Journal of experimental botany*, 71, 608-619. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz458>.
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S. and Scheel, D.** (2014) Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 108, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.003>.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., Berendsen, R. L., Bakker, P., Feussner, I. and Pieterse, C.** (2018) MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E5213-E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J.** (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*, 67, 257-268. <https://doi.org/10.1021/np030397v>.
- Sturz, A.V., Matheson, B.G.** (1996) Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant Soil*, 184, 265-271. <https://doi.org/10.1007/BF00010455>.
- Sue, M., Ishihara, A. and Iwamura, H.** (2000) Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta*, 210, 432-438. <https://doi.org/10.1007/s004250050029>.
- Sun, X., Kosman, E., and Sharon, A.** (2020). Stem Endophytic Mycobiota in Wild and Domesticated Wheat: Structural Differences and Hidden Resources for Wheat Improvement. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6, 180. <https://doi.org/10.3390/jof6030180>.
- Sunita, K., Mishra, I., Mishra, J., Prakash, J. and Arora, N. K.** (2020) Secondary Metabolites from Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Ameliorating Salinity Stress in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567768>.

- Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V. and Gao, X.** (2017) Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in microbiology*, 8, 171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>.
- Tanaka, N., Okuda, M., Nishigaki, T., Tsuchiya, N., Kobayashi, Y., Uemura, T., Kumo, S., Sugimoto, H., Miyata, S. and Waku, T.** (2020) Development of a brain-permeable peptide nanofiber that prevents aggregation of Alzheimer pathogenic proteins. *PLoS one*, 15, e0235979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235979>.
- Tilman, D.** (1999) the ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology*, 80, 1475-1494. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[1475:SDNAFP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[1475:SDNAFP]2.0.CO;2).
- Times, A.** (1916). a History of the Early World. *Boston: Ginn*.
- Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M. and Oda, M.** (2008) Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *The Journal of dairy research*, 75, 284-290. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003452>.
- Toyofuku, M., Nomura, N. and Eberl, L.** (2019) Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature reviews. Microbiology*, 17, 13-24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vandergheynst, J., Fiehn, O. and Arita, M.** (2015) MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods*, 12, 523-526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.
- Tsugawa, H., Kind, T., Nakabayashi, R., Yukihiro, D., Tanaka, W., Cajka, T., Saito, K., Fiehn, O. and Arita, M.** (2016) Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. *Anal. Chem*, 88, 7946-7958. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>.
- Tyc, O., Zweers, H., de Boer, W. and Garbeva, P.** (2015) Volatiles in Inter-Specific Bacterial Interactions. *Frontiers in microbiology*, 6, 1412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01412>.
- Ur Rehman, F., Kalsoom, M., Nasir, T.A., Adnan, M., Anwar, S. and Zahra, A.** (2020) Chemistry of plant-microbe interactions in rhizosphere and rhizoplane. *Ind. J. Pure App. Biosci*, 8, 11-19. <http://dx.doi.org/10.18782/2582-2845.8350>.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyéand, F. and Prigent-Combaret, C.** (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front. Plant Sci*, 4, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.

- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyéand, F. and Prigent-Combaret, C.** (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front. Plant Sci*, 4, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- Valente, J., Gerin, F., Le Gouis, J., Moëgne-Loccoz, Y. and Prigent-Combaret, C.** (2020) Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell Environ*, 43, 246-260. <https://doi.org/10.1111/pce.13652>.
- Van Wees, S. C., de Swart, E. A., van Pelt, J. A., van Loon, L. C. and Pieterse, C. M.** (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 of the United States of America*, 97, 8711-8716. <https://doi.org/10.1073/pnas.130425197>.
- Vance, R., Ambrose, R., Anderson, S., MacNeil, S., McPherson, T., Beers, I., Keeney, T.** (2003) Effects of sewage sludge on the growth of potted salt marsh plants exposed to natural tidal inundation. *Restor. Ecol.* 11, 155-167. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1526-100X.2003.09983.x>.
- Velichko, N.S., Bagavova, A.R., Burygin, G.L., Baymiev, A.K., Pylaev, T.E. and Fedonenko, Y.P.** (2022) In situ localization and penetration route of an endophytic bacteria into roots of wheat and the common bean. *Rhizosphere*, 23, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100567>.
- Verbon, E. H. and Liberman, L. M.** (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci*, 21, 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>.
- Veresoglou, S. D. and Menexes, G.** (2010) Impact of inoculation with *Azospirillum spp.* on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil*, 337, 469-480. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0543-7>.
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A. and Pérez-Clemente, R. M.** (2020) Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant cell reports*, 39, 3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>.
- Waines, J. G., and Ehdaie, B.** (2007) Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Annals of botany*, 100, 991-998. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm180>.
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J. and Chen, Y.** (2021) Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms*, 9, 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>.
- Wang, J., Zhang, Y., Li, Y., Wang, X., Nan, W., Hu, Y., Zhang, H., Zhao, C., Wang, F., Li, P., Shi, H. and Bi, Y.** (2015) Endophytic microbes *Bacillus sp.* LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Rep*, 34, 1075-1087. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1766-0>.

- Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J. E., Hersh, H. L., Zienkiewicz, A., Howe, G. A. and Benning, C.** (2018) Two Abscisic Acid-Responsive Plastid Lipase Genes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 30, 1006-1022. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00250>.
- Wang, M., Shao, M., Chen, W., Yuan, B., Lu, S., Zhang, Q., Zeng, L. and Wang, Q.** (2014) A temporally and spatially resolved validation of emission inventories by measurements of ambient volatile organic compounds in Beijing, China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 14, 5871-5891. <https://doi.org/10.5194/acp-14-5871-2014>.
- Wang, P., Chai, Y. N., Roston, R., Dayan, F. E. and Schachtman, D. P.** (2021). The Sorghum bicolor Root Exudate Sorgoleone Shapes Bacterial Communities and Delays Network Formation. *mSystems*, 6, e00749-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00749-20>.
- Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J. and Puschenreiter, M.** (2001) Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant and Soil*, 237, 37-45. <https://doi.org/10.1023/A:1013395122730>.
- Weston, L. A., Ryan, P. R. and Watt, M.** (2012) Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 63, 3445-3454. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers054>.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., and Vangronsveld, J.** (2009). Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current opinion in biotechnology*, 20, 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.012>.
- White, S., and Doebley, J.** (1998) Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends in genetics : TIG*, 14, 327-332. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01524-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01524-8).
- Williams, A., Langridge, H., Straathof, A. L., Muhamadali, H., Hollywood K. A., Goodacre, R. and Franciska T. D. V.** (2022) Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species. *Journal of Ecology*, 110, 21-33. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13630>.
- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J.** (2016) Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Mol Biol*, 90, 623-634. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0442-2>.
- Wipf, H., and Coleman-Derr, D.** (2021) Evaluating domestication and ploidy effects on the assembly of the wheat bacterial microbiome. *PloS one*, 16, e0248030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248030>.
- Wood, DW., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. and Pierson, L. S.** (1997) N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol*, 179, 7663-7670. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7663-7670.1997>.

- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. and An, M.** (2001) Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): cultivar difference in the exudation of phenolic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 3742-3745. <https://doi.org/10.1021/jf010111x>.
- Wu, X., Rensing, C., Han, D., Xiao, K. Q., Dai, Y., Tang, Z., Liesack, W., Peng, J., Cui, Z., & Zhang, F.** (2022) Genome-Resolved Metagenomics Reveals Distinct Phosphorus Acquisition Strategies between Soil Microbiomes. *mSystems*, 7, e0110721. <https://doi.org/10.1128/msystems.01107-21>.
- Wu, X., Wang, Z., Zhang, R., Xu, T., Zhao, J. and Liu, Y.** (2022) Diversity of endophytic bacteria in hybrid maize seeds and *Bacillus mojavensis* J2416-7 may be capable of vertical transmission. *Archives of microbiology*, 204, 213. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02824-x>.
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C. and Ma, Y.** (2019) Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Open*, 8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>.
- Xia, Y., Liu, J., Chen, C., Mo, X., Tan, Q., He, Y., Wang, Z., Yin, J. and Zhou, G.** (2022) The Multifunctions and Future Prospects of Endophytes and Their Metabolites in Plant Disease Management. *Microorganisms*, 10, 1072. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051072>.
- Yang, X., Scheffler, B. E. and Weston, L. A.** (2004) SOR1, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. *Journal of experimental botany*, 55, 2251-2259. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh252>.
- Yasmin, H., Rashid, U., Hassan, M. N., Nosheen, A., Naz, R., Ilyas, N., Sajjad, M., Azmat, A. and Alyemeni, M. N.** (2021) Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* alleviated drought stress by modulating defense system in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia plantarum*, 172, 896–911. <https://doi.org/10.1111/ppl.13304>.
- Yeoh, Y. K., Dennis, P. G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M. A., Schmidt, S. and Hugenholtz, P.** (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nature communications*, 8, 215. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00262-8>.
- You, C. and Zhou, F.** (1989) Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Canadian journal of microbiology*, 35, 403-408. <https://doi.org/10.1139/m89-062>.
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I. and Pieterse, C. M. J.** (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiol.* 162, 304-318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>.
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., and Bahadar, K.** (2018) Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 124, 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>.

Zaytseva, Y. V., Sidorov, A. V., Marakaev, O. A. and Khmel, I. A. (2019) Plant-microbial interactions involving quorum sensing regulation, *Microbiology*, 88, 523-533. <https://doi.org/10.1134/S0026261719040131>.

Zhang, C., Feng, C., Zheng, Y., Wang, J. and Wang, F. (2020) Root Exudates Metabolic Profiling Suggests Distinct Defense Mechanisms Between Resistant and Susceptible Tobacco Cultivars Against Black Shank Disease. *Frontiers in plant science*, 11, 559775. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559775>.

Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, CM., Allen, R., Melo, I. S. and Paré, P. W. (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 839-851. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>.

Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. A. and Ma, B. (2012) PEAKS DB: *de novo* sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 11, M111.010587. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010587>.

Zhou, C., Ma, Z., Zhu, L., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, J. and Wang, J. (2016) Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *Int. J. Mol. Sci*, 17, 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>.