

**CONCEPTION ET CARACTÉRISATION DES COMMUNAUTÉS
MICROBIENNES SYNTHÉTIQUES CAPABLES D'AMÉLIORER LA
RÉSISTANCE DU BLÉ AU STRESS HYDRIQUE**

Par

Asmaâ Agoussar

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophie Doctor (Ph.D.)
En Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Philippe Constant
l'INRS, Centre Armand-Frappier Santé
et Biotechnologie

Examineur externe

Martin Fillion
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Examinatrice externe

Geneviève Lajoie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Étienne Yergeau
l'INRS, Centre Armand-Frappier Santé
et Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude envers moi-même pour ma passion, ma persévérance et ma fierté envers mon travail de thèse. J'ai consacré beaucoup d'efforts et de dévouement pour mener à bien ce projet, et je suis vraiment fière des résultats que j'ai obtenus. Je remercie également, mon petit trésor Soulaymane, et je souligne qu'il était super bien passion, Il a manqué de nombreux moments précieux parce que sa maman avait toujours des travaux à faire ou parce qu'elle était souvent fatiguée après avoir accompli ses tâches. J'ai commencé mon doctorat lorsque Soulaymane avait seulement 10 mois, et maintenant il a fêté ses 6 ans, Il a également montré sa curiosité scientifique dès son plus jeune âge et a aimé de partager avec moi des moments d'arrosage des plantes pendant la période de la pandémie. Ces années n'ont pas été faciles pour nous deux. Je tiens à remercier fort mon mari Amine pour son soutien inconditionnel tout au long de mes périodes de travail, d'examens, et de mes périodes d'échecs. Il a su faire preuve de patience et de compréhension face à mes moments de nervosité et de dépression sans jamais se plaindre. Sa présence et son soutien ont été précieux pour moi. Amine! tu es un amour. Sans vous deux je ne serai jamais capable de persévérer.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers mes parents et mes deux frères pour leur soutien quotidien, que ce soit à mes côtés ou à distance. Votre soutien constant m'a toujours rempli d'énergie et d'amour, même que c'est difficile d'être loin de vous. Vous avez toujours été présents malgré la distance, et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Un grand Merci à mon professeur Étienne Yergeau, pour son encadrement, son soutien et sa patience tout au long de ces années, je te suis extrêmement reconnaissante. Étienne! Sans toi, cette thèse n'aurait jamais pu aboutir. Merci pour tes précieux conseils, ton guidage et ton soutien. Tu es un professeur merveilleux et je suis honorée d'avoir pu bénéficier de ton expertise.

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir accepté de consacrer leur temps à la lecture et à la correction de cette thèse. J'espère que vous prendrez plaisir à lire mon travail, et je sais déjà que vos commentaires et suggestions contribueront à son amélioration. Votre engagement et votre expertise sont très appréciés. Merci infiniment!

AVANT PROPOS

Dans le but de répondre aux exigences du programme de doctorat en biologie à l'INRS, Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie. Ma thèse est conçue selon le guide de présentation de mémoires et thèses en sciences de la santé et en sciences pures et appliquées fournies par l'INRS, mise à jour en octobre 2021 en suivant une structure de « thèse par articles ».

Cette thèse est composée des sections suivantes : un résumé en français et en anglais, une introduction générale, des articles révisés par les pairs, une discussion générale, une conclusion, ainsi qu'une annexe contenant une liste des revues bibliographiques consultées.

Mon premier chapitre de thèse consiste en une introduction générale, qui comprend une revue de littérature pertinente décrivant la problématique et les principales hypothèses qui ont motivé la création de ce projet de thèse. Ce chapitre décrit également en détail les objectifs de recherche poursuivis pour ce programme de doctorat.

Le deuxième chapitre consiste en un article de revue de littérature publié dans un journal scientifique « *Current Opinion in Biotechnology* », qui vient pour compléter la revue de littérature.

Les deux chapitres suivants correspondent aux publications des articles de recherche communicants les résultats obtenus pour les objectifs de ma thèse. Plus spécifiquement, le troisième chapitre englobe les résultats de mon premier objectif de recherche révisé par des pairs et publiés en août 2021 dans le journal "*Fems Microbiology Ecology*". Tandis, que le quatrième chapitre regroupe les résultats des deux derniers objectifs de ma thèse, prêt pour publication.

Le cinquième chapitre est une discussion générale qui récapitule les résultats exposés dans les sections précédentes, et qui résume la contribution des travaux scientifiques réalisés dans le cadre de ce projet de recherche pour répondre à nos hypothèses scientifiques.

Enfin, une conclusion et perspective viennent pour conclure ce rapport de thèse avec une liste de références bibliographiques consultées et citées dans la thèse, suivi par une série de matériel supplémentaire lié aux articles dans les annexes.

RÉSUMÉ

La sécheresse est un facteur limitant de la production agricole et deviendra un problème majeur avec les changements climatiques prévus. Au Canada, cela sera particulièrement important dans les Prairies, une région importante contribuant à l'agriculture canadienne. Cela entraînera une réduction des rendements dans de nombreuses grandes cultures, y compris le blé. Une façon novatrice d'améliorer rapidement la résistance du blé aux stress environnementaux serait de modifier son microbiote. En effet, plusieurs études ont montré des liens entre différents microorganismes associés aux plantes et la résistance des plantes à la sécheresse. Néanmoins, il n'y a pas suffisamment d'éléments pour prouver un lien causal avec certitude ou encore de comprendre la manière dont les communautés microbiennes et le blé interagissent, et encore moins comment les modifier. Le but de ma thèse est de modifier le microbiote du blé pour améliorer sa résistance à la sécheresse. Ainsi, l'hypothèse principale suggère que l'ensemencement du blé par une communauté microbienne présélectionnée pour sa performance au laboratoire sera plus bénéfique pour le blé qu'une communauté naturellement existante ou aléatoirement sélectionnée. Pour répondre à cette hypothèse, ma thèse se compose de trois chapitres de recherche. Le premier a pour objectif d'étudier l'effet de la sécheresse sur le microbiote du blé cultivé au champ expérimental de l'INRS, ainsi que sur ses microorganismes isolés de la rhizosphère et de la plante de blé au laboratoire. Les résultats de ce premier objectif ont été publiés sous forme d'un article de recherche. Le deuxième chapitre consiste à concevoir différentes communautés microbiennes synthétiques (SynCom) et à tester leur effet sur la croissance de blé sous stress hydrique. Nous avons également suivi la présence ou la disparition des microorganismes ensemencés dans la plante et la rhizosphère du blé. Le troisième chapitre vise à étudier l'effet de l'ensemencement de la SynCom la plus efficace sur le microbiote du blé, ainsi que d'identifier les gènes microbiens clés qui pourraient coder des fonctions qui pourraient être impliqués dans l'amélioration de la résistance de l'holobionte du blé à la sécheresse. Les résultats de cet objectif complètent l'objectif précédent et sont communiqués dans le même article scientifique.

Les résultats de mon projet de thèse devraient clarifier les caractéristiques clés des communautés microbiennes nécessaires pour améliorer la tolérance du blé à la sécheresse. La stratégie utilisée permettra également d'évaluer le potentiel d'utiliser des SynComs comme inoculas pour créer rapidement des plantes de blé résistantes aux stress environnementaux, atténuant ainsi les pertes de rendement prévues suite aux changements climatiques.

Mots clés : Blé ; SynComs ; Stress hydrique ; Séquençage des amplicons ; Analyses génomiques.

ABSTRACT

Drought is a limiting factor for agricultural production and will become a major problem with predicted climate change. In Canada, this will be particularly important in the Prairies, one of the main regions contributing to Canadian agriculture. This will lead to a reduction in yields in many major crops, including wheat. An innovative way to quickly improve wheat's resistance to environmental stress would be to modify its microbiota. Indeed, several studies have shown links between different microbes and plants' resistance to drought. However, the available information does not allow for a causal link or even an understanding of how microbial communities interact with wheat, or how to modify them. The aim of my thesis is to modify the wheat microbiota to improve its resistance to drought. To do this, I studied the effect of water stress on wheat microbial communities, which I then used to construct inoculants capable of helping wheat better survive under water stress. Thus, the main hypothesis suggests that a pre-selected microbial community for its performance in laboratory will be more beneficial for wheat than a naturally existing or randomly selected community. To address this hypothesis, my thesis consists of three research chapters. The first chapter aims to study the effect of drought on the wheat microbiota grown in the INRS field. We compared these results with microorganisms isolated from the rhizosphere and wheat plant in the laboratory. The results of this first study were published as a research article. The second chapter is to design different SynComs (synthetic microbial communities) and test their effect on wheat growth under water stress. We also tracked the presence or disappearance of inoculated microorganisms in wheat plant and rhizosphere. The third chapter aims to study the effect of inoculating the winning SynCom on the wheat and rhizosphere microbiota, as well as the key microbial genes that may be responsible for improving wheat resistance to water stress. The results of this objective complement the previous objective and are communicated in the same scientific article.

The results of my thesis project should help improve the design of SynComs and clarify the key characteristics of microbial communities required to improve wheat tolerance to water stress. The strategy used will also assess the potential of using SynComs as biostimulants to quickly create wheat plants resistant to environmental stresses, thus mitigating the expected yield losses due to climate change.

Keywords: Wheat plant; SynComs; Drought stress; Amplicon sequencing; Genomic analysis.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
AVANT PROPOS.....	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
1 Introduction	1
1.1 Mise en contexte et problématique.....	1
1.2 L'importance du blé sur le plan agricole	2
1.3 Le stress hydrique et son impact sur le blé	3
1.4 L'équilibre et la complexité du système agricole.....	5
1.4.1 Le sol comme matrice vivante.....	5
1.4.2 La plante et son microbiote.....	6
1.5 La réponse de l'holobionte face au stress hydrique	10
1.5.1 Les réponses de la plante face au stress hydrique	10
1.5.2 Les réponses des microorganismes face au stress hydrique.....	13
1.5.3 Les interactions plante-microbes et leurs rôles dans la résistance de la plante au stress hydrique	17
1.6 Manipulation du microbiote des plantes	22
1.6.1 L'utilisation des communautés microbiennes synthétiques (SynComs) pour améliorer le rendement agricole	22
1.6.2 Les différentes approches de la conception des SynComs.....	23
1.6.3 Les différentes méthodes de traitements des plantes par des microorganismes bénéfiques.....	27
2 Engineering the plant microbiota in the context of the theory of ecological communities	30
2.1 Abstract	31
2.2 Introduction	32

2.3	Engineering the plant microbiota	32
2.3.1	Selection	32
2.3.2	Dispersal	35
2.3.3	Speciation	37
2.4	Conclusion	39
2.5	Acknowledgements.....	39
2.6	References	39
	<i>Hypothèses et Objectifs de recherche</i>	<i>40</i>
2.7	Objectifs de recherche.....	40
2.8	Hypothèses de recherche	40
3	<i>The resistance of the wheat microbial community to water stress is more influenced by plant compartment than reduced water availability.....</i>	<i>42</i>
3.1	Abstract	43
3.2	Introduction	44
3.3	Materials and methods	46
3.3.1	Experimental design	46
3.3.2	Isolation media	47
3.3.3	Surface sterilization and microbial isolation	47
3.3.4	Screening of the isolates for growth in polyethylene-glycol	48
3.3.5	DNA extraction	48
3.3.6	PCR amplification and library preparation	49
3.3.7	Bioinformatic analyses	50
3.3.8	Statistical analysis.....	50
3.3.9	Data availability	51
3.4	Results	52
3.4.1	Bacterial community structure, composition and diversity	52
3.4.2	Microbial isolation and screening	58
3.4.3	OTUs corresponding to the PEG 30% isolates	62
3.5	Discussion	63
3.6	Acknowledgments.....	66
3.7	Conflicts of interest	66

3.8	References	66
4	<i>Deciphering the genomic factors governing wheat holobiont's resistance to water stress using a synthetic microbial community design</i>	67
4.1	Abstract	68
4.2	Introduction	69
4.3	Material and methods.....	71
4.3.1	SynComs preparation	71
4.3.2	Plant growth experiment	72
4.3.3	DNA extraction and sequencing	73
4.3.4	Bioinformatic analyses	73
4.3.5	Statistical analysis and data visualization.....	74
4.4	Results	76
4.4.1	Plant leaves biomass	76
4.4.2	Microbial community structure, composition and diversity following inoculation	77
4.4.3	Genomic analysis of the inoculated microbes.....	85
4.4.4	Genomic analysis of the inoculated microorganisms.....	87
4.5	Discussion	93
4.6	Conclusion	96
4.7	References	96
5	<i>Discussion générale et conclusion</i>	97
5.1	Discussion	97
5.2	Conclusion	104
6	BIBLIOGRAPHIE	106
7	ANNEXE I	127

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1. ANALYSE DE DIFFÉRENTS TYPES DE SÉCHERESSE : MÉTÉOROLOGIQUE, HYDROLOGIQUE ET AGRICOLE (ADAPTÉE DE (NDMC 2023)).....	4
FIGURE 1-2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES INTERACTIONS PLANTE-MICROORGANISMES DANS DES CONDITIONS DE STRESS HYDRIQUE, ADAPTÉE DE (YANG, KLOEPFER, AND RYU 2009) REPRODUIT AVEC PERMISSION DE ELSEVIER.....	19
FIGURE 1-3 LES DIFFÉRENTES APPROCHES DE LA CONCEPTION DES SYNCOMS, DAPTÉE DE (ENG AND BORENSTEIN 2019), REPRODUIT AVEC PERMISSION DE ELSEVIER	24
FIGURE 2-1 ILLUSTRATION OF PRINCIPAL PROCESSES BY WHICH COMMUNITIES CAN CHANGE IN THE THEORY OF ECOLOGICAL COMMUNITIES	31
FIGURE 3-1 ILLUSTRATION OF THE METHODOLOGY USED TO SUBJECT WHEAT PLANT TO DROUGHT IN THE FIELD AND THE TEST OF MICROBIAL GROWTH IN OSMOTIC STRESS IN LABORATORY.....	47
FIGURE 3-2 PRINCIPAL COORDINATES ANALYSIS OF BRAY–CURTIS DISSIMILARITIES CALCULATED FROM THE BACTERIAL 16S rRNA GENE OTUs RELATIVE ABUNDANCE FOR LEAF, ROOT AND RHIZOSPHERE SAMPLES FROM TWO WHEAT CULTIVARS (DROUGHT-TOLERANT AND DROUGHT-SENSITIVE) GROWING IN THE FIELD UNDER TWO PRECIPITATION LEVELS (25% AND 100%).	53
FIGURE 3-3 RELATIVE ABUNDANCE OF THE PHYLA/CLASSES THAT ACCOUNTED FOR, ON AVERAGE, MORE THAN 1% OF THE BACTERIAL 16S rRNA GENE READS RETRIEVED FROM LEAF, ROOT AND RHIZOSPHERE SAMPLES FROM TWO WHEAT CULTIVARS (DROUGHT-TOLERANT AND DROUGHT-SENSITIVE) GROWING IN THE FIELD UNDER TWO PRECIPITATION LEVELS (25% AND 100%).	56
FIGURE 3-4 NUMBER OF MICROBIAL ISOLATES FROM LEAVES, RHIZOSPHERE, ROOTS AND SEEDS THAT COULD GROW IN LIQUID MEDIA SUPPLEMENTED WITH 0%, 10%, 20% OR 30% OF POLYETHYLENE GLYCOL (PEG-600).	59
FIGURE 4-1 BOXPLOTS FOR WHEAT LEAVES WEIGHT FOLLOWING SYNCOM INOCULATION AFTER TWO WEEKS OF GROWTH UNDER NORMAL IRRIGATION OR DROUGHT.....	76
FIGURE 4-2 : PRINCIPAL COORDINATES ANALYSIS OF BRAY–CURTIS DISSIMILARITIES, CALCULATED FROM THE BACTERIAL 16S rRNA (A) AND THE FUNGAL ITS rRNA (B) GENES ASVs RELATIVE ABUNDANCE, FOR SHOOT ROOT AND RHIZOSPHERE SAMPLES FROM WHEAT INOCULATED OR NOT WITH THE SCREENING SYNCOM AND GROWING IN THE GROWTH CHAMBERS IN CONTROLLED CONDITIONS UNDER TWO DIFFERENT IRRIGATION REGIMES (15% AND 50% SWHC).....	78
FIGURE 4-3 : RELATIVE ABUNDANCE OF THE DOMINANT GENERA (ON AVERAGE, MORE THAN 1% OF THE BACTERIAL 16S rRNA GENE READS) RETRIEVED FROM SHOOT, ROOT AND RHIZOSPHERE SAMPLES FROM WHEAT INOCULATED OR NOT WITH THE SCREENING-SYNCOM AND GROWING IN THE GROWTH CHAMBERS IN CONTROLLED CONDITIONS UNDER TWO DIFFERENT IRRIGATION REGIMES (15% AND 50% SWHC).....	81

FIGURE 4-4 : RELATIVE ABUNDANCE OF THE FAMILY/GENUS THAT ACCOUNTED FOR, ON AVERAGE, MORE THAN 1% OF THE FUNGAL ITS REGION READS RETRIEVED FROM SHOOT, ROOT AND RHIZOSPHERE SAMPLES FROM WHEAT INOCULATED OR NOT (WITH THE SCREENING-SYNCOM) AND GROWING IN THE GROWTH CHAMBERS IN CONTROLLED CONDITIONS UNDER TWO DIFFERENT IRRIGATION REGIMES (15% AND 100%)..... 84

FIGURE 4-5 : PHYLOGENOMIC TREE ILLUSTRATING GENETIC RELATIONSHIPS AMONG THE 23 BACTERIAL ISOLATES. THE TREE GRAPH IS VISUALIZED USING NEWICK DISPLAY, UTILIZING AMINO ACID ANNOTATIONS FOR THE 23 BACTERIAL GENOMES. THE TREE IS ROOTED WITH A DISTANT OUTGROUP, WHILE THE BRANCH LENGTHS SIGNIFY THE GENETIC DISTANCES BETWEEN THE ISOLATES. BOOTSTRAP VALUES ARE REPRESENTED AS N NUMBERS AS A LEVEL OF SUPPORT FOR BRANCHES. BACTERIAL ISOLATES HIGHLIGHTED IN BLUE SIGNIFY NON-PERSISTERS..... 88

FIGURE 4-6 : HEATMAP VISUALIZATION OF KEY GENES SHARED AMONG AT LEAST 50% OF WITHIN THE PERSISTENT BACTERIAL GROUP THAT WERE COMPLETELY ABSENT IN THE DISAPPEARED BACTERIA..... 89

FIGURE 4-7 : NUMBER OF BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS OF SPECIALIZED METABOLITES THAT HAVE BEEN PREDICTED USING *ANTI*SMASH FOR THE 23 BACTERIAL ISOLATES OF THE “SCREENING” INOCULUM. 90

FIGURE 4-8 : HEATMAP VISUALIZATION OF SPECIALIZED SECONDARY METABOLITE GENE CLUSTERS IN THE GENOMES OF PERSISTER AND NON-PERSISTER BACTERIAL GROUPS. ANALYSIS WAS PERFORMED USING THE ANTI*SMASH* PLATFORM AND ONLY METABOLITES THAT EXHIBITED MORE THAN 80% SIMILARITY TO KNOWN METABOLITES WERE SELECTED FOR THIS ANALYSIS. 91

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1	EXEMPLES DES GÈNES BACTÉRIENS CONNUS IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE DE LA PLANTE AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX	16
TABLEAU 1-2	EXEMPLE DES MICROORGANISMES QUI AIDENT LA PLANTE À TOLÉRER LE STRESS HYDRIQUE 20	
TABLEAU 1-3	TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE TRAITEMENTS DES PLANTES PAR DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES SYNTHÉTIQUES (ADAPTÉ DE (MAHMOOD ET AL. 2016; O'CALLAGHAN 2016) 28	
TABLEAU 3-1	PERMANOVA TESTS FOR THE EFFECTS OF PRECIPITATION MANIPULATION, GENOTYPE, COMPARTMENTS AND THEIR INTERACTIONS ON THE BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE BASED ON BRAY-CURTIS DISSIMILARITIES.	54
TABLEAU 3-2	PERMANOVA TESTS FOR THE EFFECTS OF PRECIPITATION AND GENOTYPE ON RHIZOSPHERE, ROOT AND LEAF-ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE BASED ON BRAY-CURTIS DISSIMILARITIES. 54	
TABLEAU 3-3	KRUSKAL-WALLIS AND POST-HOC MANN-WHITNEY U TESTS FOR THE EFFECTS OF PRECIPITATION, GENOTYPE, AND COMPARTMENTS ON THE RELATIVE ABUNDANCE OF THE BACTERIAL PHYLA/CLASSES THAT REPRESENTED, ON AVERAGE, OVER 1% OF THE READS IN THE 16S rRNA GENE AMPLICON DATASET. 57	
TABLEAU 3-4	TAXONOMICAL ASSIGNMENT AND SOURCE OF ISOLATION OF BACTERIAL AND FUNGAL ISOLATES THAT GREW IN MEDIA SUPPLEMENTED WITH 30% PEG BASED ON BLAST SEARCHED IN NCBI.	60
TABLEAU 3-5	PERMANOVA TEST FOR THE EFFECTS OF PRECIPITATION MANIPULATION, GENOTYPE, COMPARTMENTS, AND THEIR INTERACTIONS ON THE COMMUNITY STRUCTURE OF THE OTUs THAT MATCHED THE 16S rRNA GENE OF THE BACTERIAL ISOLATES GROWING IN TSB SUPPLEMENTED WITH 30% PEG.....	62
TABLEAU 4-1 :	PERMANOVA TESTS FOR THE EFFECTS OF INOCULATIONS, PLANT COMPARTMENT, IRRIGATION AND THEIR INTERACTIONS ON THE BACTERIAL AND FUNGAL COMMUNITY STRUCTURE BASED ON BRAY-CURTIS DISSIMILARITIES.	79
TABLEAU 4-2 :	THE EFFECTS OF IRRIGATION, PLANT COMPARTMENT AND INOCULATION ON THE DOMINANT GENERA FOUND IN THE AMPLICON SEQUENCING DATASETS BASED ON KRUSKAL-WALLIS TEST WITH BENJAMINI-HOCHBERG ADJUSTED P-VALUES	82
TABLEAU 4-3 :	IDENTIFICATION OF THE ISOLATES USED TO PREPARE TO SCREENING-SYNCOM BASED ON THEIR AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY (ANI) COMPARED TO GENBANK GENOMES AND THEIR ISOLATION ORIGIN (AGOUSSAR ET AL. 2021)	85
TABLEAU 7-1	INDICATOR OTUs FOR THE 25% AND 100% PRECIPITATION TREATMENTS FROM THE 16S rRNA GENE AMPLICON DATASET	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

ABA : Acide abscissique

ASV : Amplicon Sequence Variant

ANI : Average Nucleotide Identity

AMF: Arbuscular Mycorrhiza Fungi

DT: Drought tolerant (*Triticum turgidum* subsp. *durum* cv. Strongfield (durum wheat))

DS: Drought sensitive (*Triticum aestivum* cv AC Nass (spring wheat))

HGT: Horizontal Gene Transfer

IAA : Acide indole-3-acétique

miPEPs : microRNA-encoded Peptides

OUT : operational taxonomic unit

PBS : Phosphate-buffered saline

PCOa: Principal coordinate analysis

PDA : Potato Dextrose Agar

PEG: PolyEthylen Glycol

PGPB : Plant Growth Promoting Bacteria

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

R2A: Reasoner's 2A agar

SPS: Sucre Phosphate Synthase

SWC : Soil Water Content

SWHC: Soil Water Holding Capacity

SynCom : Synthetic microbial Community

TSA : Tryptic-Soy Agar

TWYE : Tap-Water Yeast Extract media

VOCs: Volatile Organic Compounds

1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte et problématique

La sécheresse est l'un des problèmes alarmants qui continue de progresser dans le monde entier, et c'est l'un des défis les plus graves et les plus imprévisibles associés à l'agriculture moderne. Si on prend en considération que l'agriculture consomme près des deux tiers de la réserve hydrique mondiale (Martins et al. 2018), il faut savoir que le stress hydrique affecte négativement la qualité et la quantité des rendements agricoles (Qi et al., 2021 ; Radhouane, 2008). Cependant, la croissance de la population implique une demande croissante en nourriture pour répondre aux besoins de tous.

Lorsqu'une plante perd par transpiration, via ses feuilles, une quantité d'eau supérieure à celle absorbée par ses racines, elle subit un stress hydrique ou osmotique en raison des déséquilibres entre l'apport d'eau aux racines et les taux de transpiration (Kavroulakis et al. 2018). Ce stress peut également perturber l'équilibre de l'écosystème, incluant les microorganismes qui entourent la plante, ce qui influence son développement et sa santé.

Les interactions entre plantes-microbes et les interactions entre les microbes ont un rôle déterminant dans la pérennité des différents écosystèmes (Kumar et al., 2016). Ces interactions constituent l'ensemble des échanges et des communications permettant à la plante de sélectionner et d'enrichir sa rhizosphère en microbes bénéfiques et/ou de supprimer et d'éloigner les agents pathogènes. Cependant, il est difficile de déterminer quels microbes ou groupes de microorganismes auront un effet utile ou nuisible dans le microbiote.

La manipulation du microbiote du sol et de la plante pour améliorer la qualité et la durabilité des rendements agricoles est devenue une nécessité, et plusieurs études ont été réalisées dans ce but. Les microorganismes peuvent être utilisés pour décomposer les composés toxiques et résidus de culture, acheminer et faciliter l'accessibilité des nutriments pour les plantes, ou aider la plante à mieux résister et croître dans des conditions de stress biotiques et abiotiques. Ainsi, la manipulation du microbiome des cultures est une stratégie émergente pour surmonter la sécheresse ou augmenter la tolérance à des périodes de stress dans les systèmes agricoles (Camaille et al., 2021 ; Xu et al., 2018).

L'ensemencement des semences par des microorganismes bénéfiques est l'une des solutions les plus prometteuses et les moins coûteuses. Ainsi, le traitement des semences par des communautés synthétiques conçues pour leur effet bénéfique sur les plantes pourrait être une solution facilement utilisable par les agriculteurs. Cependant, pour transférer les connaissances actuelles vers des applications biotechnologiques telles que les probiotiques

protecteurs des plantes, il faut comprendre les complexes réseaux régulateurs hôte-microbe-microbe (Chaudhry et al. 2021).

Le but de ce projet de thèse est d'étudier la réponse du microbiote du blé au stress hydrique et de déterminer la meilleure méthode pour concevoir des communautés microbiennes synthétiques afin d'améliorer la résistance de l'holobionte du blé au stress hydrique. L'holobionte fait référence à l'organisme hôte, dans ce cas le blé, ainsi qu'à l'ensemble des microorganismes qui l'habitent. De plus, nous voulons étudier l'effet de l'ensemencement sur le microbiote du blé et d'identifier les caractéristiques génomiques clés des microbes impliquées dans cette résistance.

1.2 L'importance du blé sur le plan agricole

Le blé figure parmi les céréales les plus largement consommées par les êtres humains à l'échelle planétaire. C'est l'une des cultures les plus demandées et utilisées en raison de sa valeur économique et sociale (Sallam et al. 2019), et qui nourrit environ un cinquième de la population mondiale (Camaille et al. 2021).

Le blé appartient à la famille des graminées, genre *Triticum*. Le blé tendre (*T. aestivum*) et le blé dur (*T. turgidum*) sont les espèces les plus importantes en termes de production et de commercialisation. Cependant, les formes de blé les plus cultivées proviennent de croisements naturels d'espèces sauvages, qui ont été sélectionnées et domestiquées par les êtres humains (Campbell 2013). Ainsi, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est considéré comme l'aliment de base dans plus de 40 pays (Kamran, Iqbal, and Spaner 2014).

À l'échelle mondiale, le Canada occupe la sixième place en termes de production de blé et est classé parmi les plus grands exportateurs mondiaux avec une production annuelle de plus de 25 millions de tonnes, occupant 10 millions d'hectares de terres agricoles canadiennes (Erin 2013). La production mondiale de blé a connu une augmentation significative en 2022, se hissant au troisième rang des niveaux les plus élevés jamais enregistrés. Elle a enregistré une croissance de 51,7 % pour atteindre un total de 33,8 millions de tonnes (Government of Canada 2022b). En Saskatchewan, les rendements ont augmenté de 47,3 % pour atteindre 41,4 boisseaux à l'acre, tandis qu'en Alberta, la production a grimpé de 76,7 % pour s'établir à 11,3 millions de tonnes. Et au Manitoba, les rendements ont augmenté de 21,3 % pour atteindre 58,1 boisseaux à l'acre (Government of Canada 2022b).

Le blé tendre est plus sensible à la sécheresse que le blé dur, sa température de germination optimale se situe entre 3 et 4 °C, et sa floraison commence lorsque la température dépasse 14 °C (Gouvernement du Canada 2012), ainsi, sa croissance est optimale à 25 °C, avec des rendements satisfaisants obtenus à des températures allant de 3 à 32 °C (Curtis 2022). Quant au blé dur, il est classé au deuxième rang pour la production commerciale et l'alimentation humaine et sa culture est répandue dans les régions les plus sèches du centre-sud des Prairies (Gouvernement du Canada 2012).

1.3 Le stress hydrique et son impact sur le blé

La sécheresse est un facteur limitant pour la plupart des plantes et peut être causée par le manque d'eau suite à des périodes de chaleur, les chocs thermiques, le gel, la salinité, la diminution de la quantité de précipitations annuelles et la détérioration progressive des ressources en eau. Ainsi, sa fréquence et sa gravité devraient augmenter à l'avenir (Xu et al. 2018), et peuvent avoir des effets drastiques sur le développement et le fonctionnement de plusieurs cultures, y compris le blé.

À la base, la sécheresse peut être définie par un bilan hydrique déficitaire dont la quantité d'eau disponible est inférieure au niveau de la demande domestique ou agricole (Kusuma and Adi Kuntoro 2013), ou simplement comme une pénurie d'eau qui peut avoir des impacts sur la morphologie, la biochimie, la physiologie et la biologie moléculaire des plantes (Sallam et al. 2019). Différentes définitions de la sécheresse ont été proposées, soit du point de vue météorologique, hydrologique et agricole, mais dans tous les cas cela peut avoir des impacts économiques, sociaux et environnementaux (Fig. 1.1).

La sécheresse peut survenir à n'importe quel stade de croissance de la plante. Son impact sur le développement de l'apex des plantes est direct, surtout en période de début de déficit hydrique (Rassaa, Ben Haj Salah, and Latiri 2008). Cependant, des observations ont montré que ce développement peut partiellement reprendre lorsque les conditions hydriques reviennent à la normale (Rassaa, Ben Haj Salah, and Latiri 2008). Cette reprise suggère que certaines plantes peuvent s'adapter légèrement au stress hydrique ou retrouver leur croissance optimale après l'arrosage, ce qui diminue la différence entre les plantes stressées et non stressées.

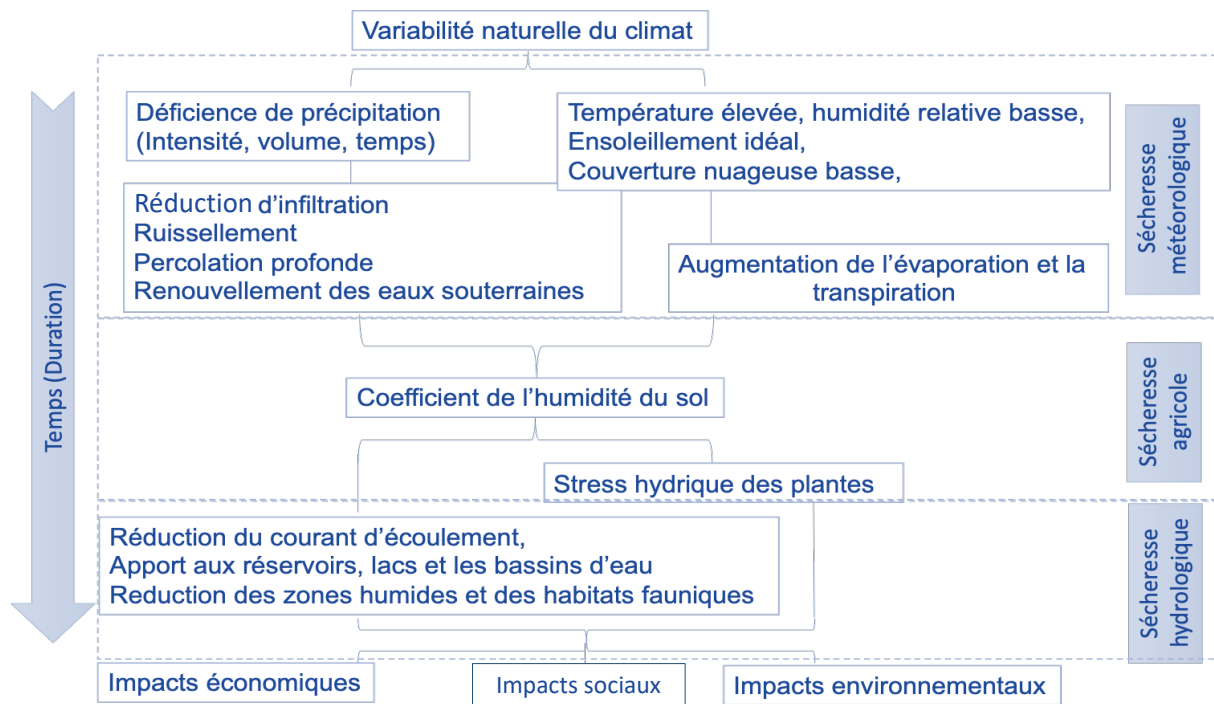


Figure 1-1. Analyse de différents types de sécheresse : météorologique, hydrologique et agricole (adaptée de (NDMC 2023))

En ce qui concerne le blé, il est à souligner que l'augmentation de la température moyenne peut influencer la durée des stades de croissance et avoir un impact sur son développement phénologique (Rassaa, Ben Haj Salah, and Latiri 2008). Cela peut réduire la durée de la floraison, la biomasse totale et le rendement du blé (Asseng et al. 2004). Toutefois, il est important de noter que la réponse du blé au stress hydrique peut varier selon les génotypes. Certains génotypes peuvent tolérer la sécheresse lors de la germination ou du stade plantule, mais ils peuvent montrer une certaine sensibilité lors de la floraison, alors que d'autres peuvent résister au manque d'eau dans des stades de croissance plus avancés, mais pas dans des stades précoces (Sallam et al. 2019). En outre, la tolérance à la déshydratation chez le blé dur dans des conditions de sécheresse est liée non seulement à la précocité de son cycle mais également à sa capacité d'ajustement osmotique (Radhouane 2008). L'accumulation des solutés osmotiques contribue à maintenir une pression osmotique élevée à l'intérieur des cellules, ce qui aide à retenir l'eau et à éviter sa perte excessive par transpiration.

Dans certaines régions de l'ouest canadien, le stress hydrique a entravé la production de blé, entraînant une chute des stocks en 2021 à leur plus bas niveau depuis 2002 (Government of Canada 2022). Cela a conduit à une augmentation significative des prix des céréales sur le marché canadien, y compris pour le blé (Government of Canada 2022).

1.4 L'équilibre et la complexité du système agricole

1.4.1 Le sol comme matrice vivante

Le sol représente la partie vivante de la géosphère, il est constitué de plusieurs couches, dont la plus superficielle est la partie la plus aérée qui abrite la majorité des animaux et des plantes vivantes. En dessous, se trouve une deuxième couche riche en petits animaux décomposeurs et en microorganismes responsables de la dégradation et la décomposition de la matière organique brute comme les feuilles et les branches accumulées à la surface du sol. Cette composition en matières organiques influence considérablement ses propriétés biologiques, chimiques et physiques (Ray et al. 2020).

La porosité du sol influence son aération, sa rétention d'eau, les échanges gazeux, la séquestration du carbone, sa teneur en matière organique (Faucon, Houben, and Lambers 2017), sa température, son humidité, sa structure et l'abondance de sa communauté microbienne (Sheik et al. 2011). Ce sont autant de caractéristiques déterminantes pour définir la qualité d'un sol et la dynamique des nutriments (Faucon, Houben, and Lambers 2017). Ainsi, les traits biochimiques, physiologiques et morphologiques de la litière aérienne et souterraine sont aussi importants pour la dynamique et la disponibilité des nutriments dans les agroécosystèmes et doivent être pris en compte dans plusieurs contextes pédoclimatiques pour effectuer une fertilisation durable (Faucon, Houben, and Lambers 2017). En conséquence, cela permet de trancher entre un sol vivant ou cultivé dont les processus écologiques influencent ses propriétés, ou bien, un sol dégradé qui se caractérise par une biodiversité réduite qui compromet la fourniture des services écosystémiques. (Adhikari and Hartemink 2016).

Le microbiome du sol peut jouer un rôle crucial dans la santé des plantes, comme en témoigne le fait que certaines zones produisent des plantes moins sensibles aux maladies grâce à l'effet suppressif de leur microbiome sur la santé des plantes (Bulgarelli 2018). En effet, l'historique du sol peut influencer la composition, la diversité et les fonctions des communautés microbiennes du sol, ainsi que la biomasse racinaire des plantes, surtout dans des conditions de stress abiotique telles que la sécheresse (Azarbad et al. 2018; Azarbad et al. 2020). Ces effets liés au site et à son historique reflètent probablement l'influence du pH du sol, des profils de nutriments distincts, la disponibilité en eau et du rayonnement ultraviolet sur les communautés bactériennes locales (Wagner et al. 2016). L'historique du sol, et le stade de développement de la plante peuvent avoir des impacts directs significatifs sur les profils bactériens et fongiques dans tous les compartiments de la plante, à l'exception des graines (Azarbad et al. 2022).

Les signaux biochimiques échangés à l'interface racine-rhizosphère peuvent jouer un rôle clé dans ces fluctuations microbiennes. Il est important de souligner que les plantes provenant de champs ayant subi un stress hydrique à long terme peuvent ne pas être toutes au même stade physiologique, probablement en raison du niveau de stress subi (Azarbad et al. 2022). Ceci peut influencer indirectement les exsudats racinaires de chaque plante selon l'historique hydrique du site. Une compréhension approfondie des interactions plante-microbe à différents stades de développement ouvre la voie à des stratégies novatrices pour améliorer la santé et la résilience des cultures face à des contraintes abiotiques telles que la sécheresse.

1.4.2 La plante et son microbiote

La plante et sa communauté microbienne associée sont souvent considérées comme un métabolisme dont les différentes entités sont indissolublement liées sous le nom de l'holobionte. Les caractéristiques fonctionnelles des plantes peuvent avoir un impact sur leur microbiote ainsi que sur les pathogènes microbiens transmis par le sol, et peuvent influencer l'agrégation et la stabilité du sol (Faucon, Houben, and Lambers 2017).

Par ailleurs, les traits fonctionnels de la plante qui sont définis comme étant les caractéristiques physiologiques, morphologiques ou phénologiques, peuvent influencer les traits fonctionnels des communautés fauniques du sol ainsi que sa composition en communautés bactériennes et fongiques (Faucon, Houben, and Lambers 2017). Cependant, une compréhension plus approfondie des processus indirects impliqués dans la dynamique des nutriments est nécessaire (Faucon, Houben, and Lambers 2017).

Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont mis en évidence l'impact des différents compartiments de la plante de blé sur la composition des communautés microbiennes associées (Quiza et al. 2022; Agoussar et al. 2021a; Azarbad et al. 2020). Il reste donc nécessaire de poursuivre les investigations pour mieux appréhender ces interactions complexes et les mécanismes sous-jacents.

Le microbiome de la plante est composé de différents types de microorganismes dont les endophytes, qui sont définis comme étant des bactéries et des champignons vivant dans les tissus végétaux (Figure 1.3). On trouve également des microorganismes phyllosphériques qui peuvent être présents à la surface de la phyllosphère, sur les bourgeons, les feuilles ou bien les fleurs (anthosphère), ainsi que des microorganismes de la rhizosphère (Berendsen, Pieterse, and Bakker 2012). La diversité et la composition de ce microbiome de la plante hôte connaissent des changements notables au cours des différentes étapes de sa vie (Wagner et al. 2016). Ces interactions complexes entre la plante et ses microorganismes associés jouent un rôle essentiel dans la santé et le développement de la plante, et sont d'un grand intérêt pour la recherche en agronomie et en biologie végétale.

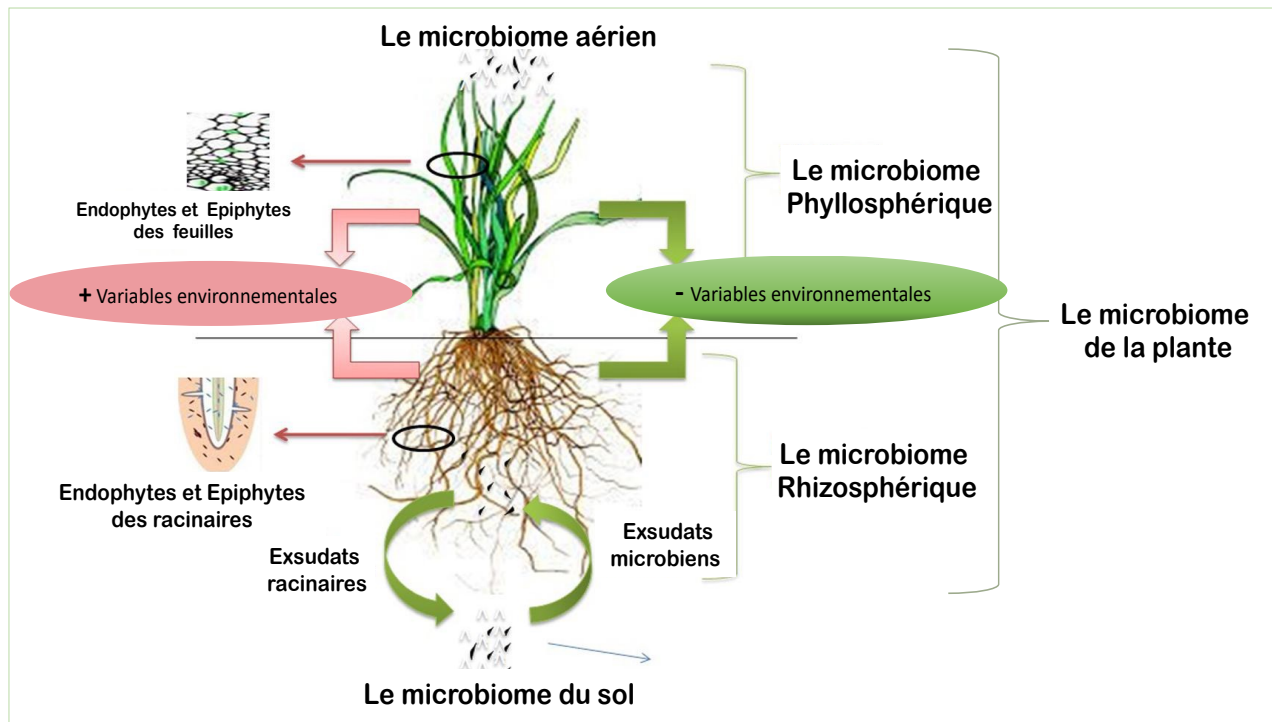


Figure 1-2 Représentation schématique des microorganismes colonisant les différents compartiments de la plante (adaptée de (Kumar et al., 2016) avec accès libre)

1.4.2.1 La rhizosphère

La rhizosphère, ou interface racine-sol, est un réservoir clé pour la plupart des réactions biologiques et chimiques dans le sol, créant un milieu d'échange métabolique pour les organismes vivants, tels que les insectes, les plantes, la faune du sol et les microorganismes. Ces derniers sécrètent des acides organiques et des enzymes pour décomposer la matière organique en formes nutritives qui peuvent être utilisées par d'autres microbes et les plantes (Ray et al. 2020). En conséquence, les microorganismes de la rhizosphère peuvent améliorer la disponibilité des nutriments pour les plantes et agir comme des biofertilisants (Vessey 2003). De plus, ils peuvent rendre des phytohormones et des nutriments physiologiquement accessibles pour améliorer la croissance des plantes et renforcer leur résistance aux conditions environnementales difficiles telles que la chaleur, le sel et la sécheresse (Firáková, Šturdíková, and Múčková 2007).

Les interactions microbe-microbe et microbe-plante créent une différenciation du microbiote à l'interface racine-sol (Bulgarelli et al. 2015), qui peut affecter les cycles biogéochimiques du sol et ainsi influencer la productivité de la plante (Malchair et al. 2010).

En réponse à la sécheresse, la plante libère des composés organiques dans la rhizosphère, affectant la concentration et la disponibilité de l'azote total et du carbone organique dissous (Chong et al. 2020). Cela est connu sous le nom de la rhizodéposition, c'est donc un facteur clé pour peupler et maintenir le microbiome dans la rhizosphère (Bulgarelli 2018). En outre, la structure de la communauté microbienne de la rhizosphère affecte les métabolomes et les transcriptomes des feuilles et des racines systémiques (Korenblum et al. 2020). Ainsi, on assiste à l'augmentation de l'activité de certaines enzymes dans la rhizosphère, telles que l'amylase, β -glucosidase, cellulase, phénol-oxydase, invertase, uréase et L-asparaginase (Jia et al. 2015), la leucine aminopeptidase et de la chitinase en réponse à la sécheresse (Xuechen Zhang et al. 2021). Cependant, cette augmentation peut être due aux interactions entre les bactéries et à leur structure de réseau stable, plutôt qu'à des changements majeurs dans leur composition ou dans les gènes codant pour les enzymes (Xuechen Zhang et al. 2021). Par ailleurs, cela peut être expliqué par une augmentation de genres bactériens spécifiques, tels que *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Marmoricola* et *Knoellia*, capables de produire ces enzymes, ainsi qu'une augmentation du nombre de copies de gènes codant pour ces enzymes en période de sécheresse (Xuechen Zhang et al. 2021).

1.4.2.2 Les racines

Les racines sont l'organe crucial des plantes, responsables de l'absorption de l'eau et des nutriments dans le sol (Wu et al. 2022). Elles agissent également comme pont de communication direct entre la plante et son environnement, facilitant ainsi l'assimilation des nutriments et de l'eau, ainsi que la sécrétion des exsudats racinaires (Wu et al. 2022). Elles jouent également un rôle clé dans l'amélioration de la résistance des plantes en créant des cavités d'air dans l'aérenchyme, empêchant ainsi l'entrée de toxines du sol (Wu et al. 2022). En outre, une étude de résolution spatiale a identifié trois compartiments distincts associés aux racines dont l'endosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface de la racine) et la rhizosphère (sol proche de la surface de la racine), chacun hébergeant un microbiome spécifique (Edwards et al. 2015).

Les communautés microbiennes des racines des plantes sont très impliquées dans les échanges entre la plante et sa rhizosphère. Elles peuvent également offrir une protection indirecte contre les agents pathogènes (Bulgarelli et al. 2013). De plus, les racines peuvent modifier la structure de leur communauté microbienne dans la rhizosphère par la sécrétion des acides aminés, des acides organiques, des vitamines et des sucres (Haichar et al. 2008).

Des études antérieures ont révélé que les communautés microbiennes des racines plus âgées sont plus similaires à celles des plantes endogènes, suggérant ainsi un remplacement des microorganismes du sol par des microorganismes naturels présents dans la plante (Wagner et al. 2016). Ce processus de remplacement et d'échange de microorganismes soulève des questions intéressantes sur la dynamique des communautés microbiennes des racines au cours du développement de la plante et sur l'influence de cette transition sur la santé et la performance de la plante.

Sous stress hydrique, certaines communautés microbiennes des racines peuvent changer d'abondance, telles que les bactéries appartenant aux familles des actinobactéries qui ont augmenté leur abondance dans des champs exposés à la sécheresse (Xu et al. 2018). Les racines peuvent être aussi stimulées pour augmenter la production de certaines phytohormones telles que l'acide abscissique (ABA), qui peut atteindre les feuilles et moduler la transpiration (Wu et al. 2022). Cependant, l'augmentation de la production de la plupart des autres acides aminés ou des sucres face au manque d'eau n'explique pas l'augmentation spécifique des bactéries appartenant aux familles des actinobactéries (Xu et al. 2018).

1.4.2.3 Les feuilles

Les feuilles constituent la surface végétale aérienne, un habitat connu sous le nom de la phyllosphère. La diversité bactérienne de la phyllosphère contribue à plusieurs processus écosystémiques importants, ainsi qu'au comportement de l'hôte (Lindow and Brandl 2003). Une variété de bactéries, de levures et de champignons vit à la surface des feuilles (épiphytes), tandis que peu d'espèces microbiennes se retrouvent à l'intérieur (endophytes) (Lindow and Brandl 2003). Cette diversité microbienne au niveau des feuilles est très pertinente de point de vue fonctionnel, et joue un rôle important dans les interactions d'alimentation croisée entre les microbes. De même, les ressources foliaires peuvent contribuer à façonner ces interactions en ayant une rétroaction sur la diversité bactérienne (Murillo-Roos et al., 2022). Le microbiote foliaire contient des bactéries qui assurent une protection indirecte contre les agents pathogènes (Bulgarelli et al. 2013). Ce microbiote peut coloniser les sites de fixation disponibles sur les feuilles, empêchant ainsi les pathogènes potentiellement nuisibles de s'établir. Cette compétition pour les ressources et l'espace crée une barrière qui entrave le développement et la prolifération des agents pathogènes. De plus, le microbiote foliaire a la capacité de produire des composés antibactériens ou antifongiques, contribuant ainsi à inhiber la croissance des agents pathogènes. Ainsi, le microbiote foliaire peut renforcer la protection des plantes en stimulant leur système immunitaire, jouant ainsi un rôle crucial dans la défense et la santé globale des plantes.

L'environnement des feuilles est souvent instable et fluctuant, exposé à divers stress environnementaux et ayant des sources de nutriments limités, ce qui rend les feuilles parmi les niches les plus sélectives. Souvent, un déficit hydrique et nutritionnel peut entraîner une réduction de la capacité photosynthétique (Wu et al. 2022) et une perte de turgescence au niveau des feuilles (Radhouane 2008). Ceci peut ensuite exercer une pression de sélection sur les interactions nutritionnelles entre les microorganismes des feuilles, ce qui varie selon les souches bactériennes (Murillo-Roos et al., 2022).

Cependant, les souches colonisatrices des feuilles sont souvent plus adaptées à au stress environnementaux et présentent une meilleure tolérance aux stress abiotiques tels que les rayons UV nocifs (Kamo et al. 2018). Certaines de ces souches, comme *Magnaporthe oryzae*, possèdent différents gènes impliqués dans leur adaptation à la surface végétale. Ces gènes participent à la défense contre les rayons UV, le stress oxydatif, la dessiccation ainsi que la carence en nutriments (Kwak et al. 2014). De plus, ces souches possèdent un groupe diversifié de gènes impliqués dans des voies métaboliques spécifiques, contribuant ainsi à favoriser la croissance des plantes, notamment la biosynthèse de l'auxine et des cytokinines, la production de vitamine B12, ainsi que le métabolisme de l'urée. Elles sont également associées à des processus tels que la biosorption des métaux lourds, la réduction de la toxicité des métaux, la désamination du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, la solubilisation du phosphate et l'oxydation du thiosulfate (Kwak et al. 2014).

1.5 La réponse de l'holobionte face au stress hydrique

1.5.1 Les réponses de la plante face au stress hydrique

La réponse d'une plante soumise à des stress environnementaux, tels que le stress hydrique a fait l'objet d'une revue de littérature approfondie. Des études ont démontré que ces stress peuvent entraîner des modifications dans la morphologie des plantes, leur activité photosynthétique, leur système enzymatique antioxydant, voire même leurs niveaux de production d'hormones (Wu et al. 2022). Cependant, l'adaptation au déficit hydrique peut varier d'une plante à l'autre et peut se manifester soit par l'échappement à la sécheresse, l'évitement et/ou la tolérance à la déshydratation (Sallam et al. 2019). L'échappement à la sécheresse implique une accélération du cycle de vie pour éviter les périodes de sécheresse, tandis que l'évitement de la sécheresse consiste en des ajustements comportementaux et morphologiques pour réduire la perte d'eau, et la tolérance à la déshydratation englobe les mécanismes internes qui permettent aux plantes de survivre et de fonctionner malgré les conditions de sécheresse. Ainsi, pour éviter cette déshydratation, la plante peut réagir en fermant ses stomates pour éviter la perte de sa réserve en eau (Camaille et al., 2021 ; Osakabe

et al., 2014) ou en réduisant le nombre de feuilles pour diminuer la surface de contact (Rassaa, Ben Haj Salah, and Latiri 2008).

Généralement, l'effet de la sécheresse se traduit par une diminution significative de la disponibilité en eau des feuilles, reflétant ainsi une baisse de la turgescence cellulaire et la présence d'un ajustement osmotique adaptatif (Radhouane 2008). Ainsi, la sécheresse peut entraîner une réduction de la sénescence des feuilles (Senapati and Semenov 2020), une modification de la structure racinaire, des poils absorbants et de la densité des racines afin d'améliorer l'absorption d'eau (Senapati and Semenov 2020; Wu et al. 2022). À long terme, la diminution du potentiel hydrique de la plante finit par affecter sa santé et son rendement (Radhouane 2008), ce qui donne des valeurs de potentiel hydrique plus négatives chez les plantes moins résistantes à la sécheresse que celles qui ont une meilleure capacité de résistance (Radhouane 2008). Le potentiel hydrique reflète l'état hydrique global de la plante et est déterminé par des facteurs tels que la disponibilité en eau dans le sol, la capacité de la plante à absorber l'eau et la résistance à la perte d'eau par transpiration. Ainsi, les plantes moins résistantes à la sécheresse ont des valeurs de potentiel hydrique plus négatives que celles qui ont une meilleure capacité de résistance (Radhouane 2008).

Au fond, une plante peut, face au stress hydrique, ajuster plusieurs de ses mécanismes adaptatifs, parmi lesquels la production de plusieurs molécules signal telles que les radicaux superoxyde (O_2^-), les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle (HO^\bullet), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sont responsables des dommages oxydatifs (Sallam et al. 2019) et le 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) (Camaille et al. 2021).

D'autres mécanismes peuvent entrer en jeu tels que l'augmentation significative de la production des produits photosynthétiques, les sucres réducteurs, l'amidon, les sucres solubles et totaux, les protéines solubles et les acides aminés (Jia et al., 2015). Il y a également une augmentation de la concentration de tréhalose sécrétée pour ses effets xéroprotecteurs et modulateurs des phytohormones (Lunn et al., 2014; Rodríguez-Salazar et al., 2009), ainsi qu'une accumulation de molécules antioxydantes, afin de maintenir la pression de turgescence cellulaire et la protection des biomolécules de la cellule contre les dommages oxydatifs, y compris les membranes et les enzymes (Gill & Tuteja, 2010; Krasensky & Jonak, 2012).

Sur le plan hormonal, on assiste à l'interférence entre l'acide abscissique et d'autres phytohormones, comme l'éthylène et les jasmonates (Penrose and Glick 2003). Ces interactions peuvent ainsi donner lieu à des réponses croisées entre les hormones. Ainsi, chez le blé, la réponse au stress hydrique peut se traduire par une augmentation de l'activité de la sucrose-phosphate synthase (SPS), qui pourrait être liée à la signalisation basée sur l'acide abscissique en réponse au stress hydrique (Fresneau, Ghashghaie, and Cornic 2007). La

figure (1.2) résume ainsi la production de certaines phytohormones dans des conditions de stress hydrique, ainsi que leurs impacts sur la photosynthèse, la croissance et le rendement des plantes.

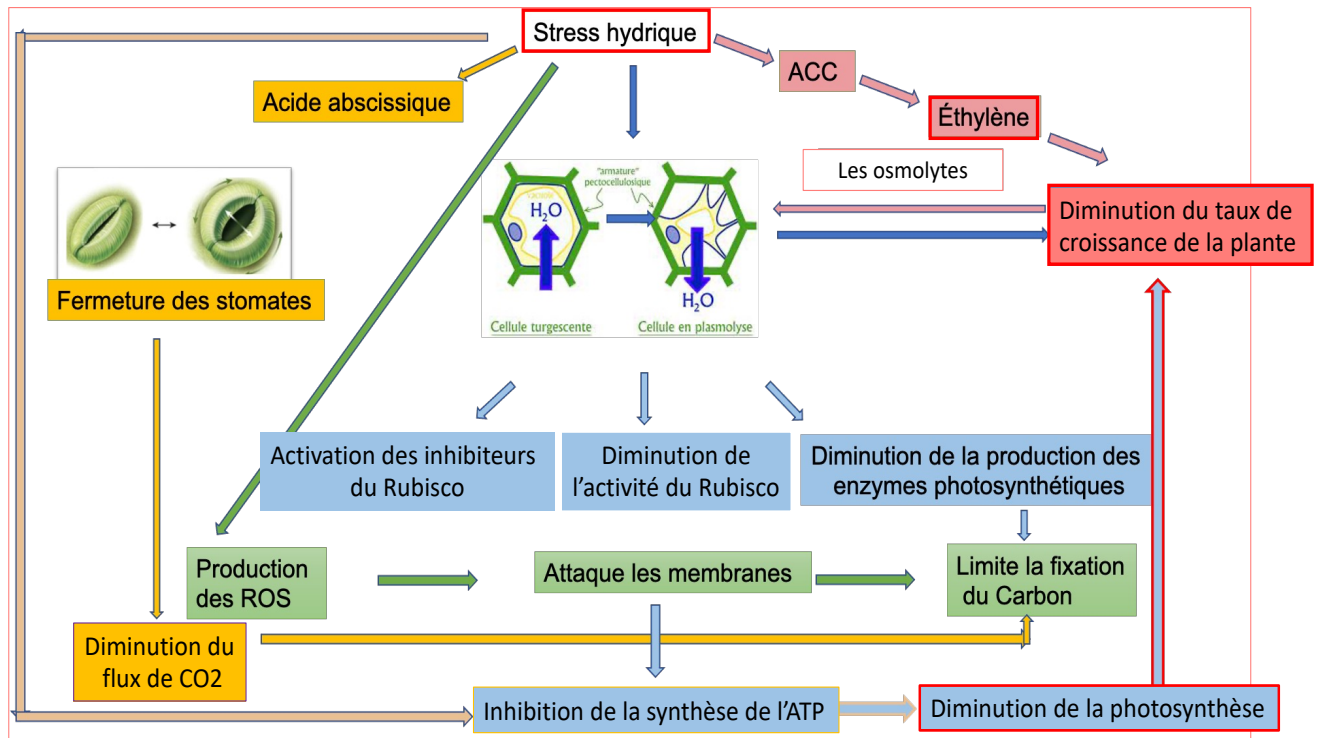


Figure 1-3 L'impact du stress hydrique sur la photosynthèse, la croissance et le rendement des plantes (adaptée de (Camaille et al. 2021) avec accès libre)

L'éthylène, est produit par la synthèse de son précurseur ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) par l'enzyme ACC synthase (Penrose and Glick, 2003), avec l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxydase qui catalyse l'étape finale de sa biosynthèse (Zhang et al., 1995). Cette phytohormone régule de manière endogène l'homéostasie des plantes et entraîne une réduction de la croissance des racines et des pousses (Ravanbakhsh et al. 2018). Il convient de noter que les microorganismes peuvent moduler la réponse de la plante en abaissant son taux d'éthylène, et pour que cette réponse soit mesurable et observable, le taux de l'enzyme ACC désaminase doit être au moins 100 à 1000 fois supérieur à celui de l'ACC oxydase, ce qui est susceptible de se produire si l'expression de l'ACC oxydase n'a pas été induite (Glick, Penrose, and Li 1998).

L'acide abscissique, qui est également une phytohormone isoprénoïde, est un médiateur de signalisation régulant la réponse adaptative des plantes à différentes conditions de stress

environnemental telles que la sécheresse, le sel et le froid (Anderberg & Walker-Simmons, 1992 ; Mudgett & Clarke, 1994).

Chez le blé, la réponse au stress hydrique peut se traduire par une augmentation de l'activité de la sucrose-phosphate synthase (SPS), qui pourrait être liée à la signalisation basée sur l'acide abscissique en réponse au stress hydrique (Fresneau, Ghashghaie, and Cornic 2007). De même, la plante de blé peut également ajuster sa machinerie enzymatique en augmentant la production de superoxyde dismutase, de glutathion réductase, de glutathion peroxydase, d'ascorbate peroxydase, de monodéhydrosacrobate réductase, de déhydroascorbate réductase, de catalase et de gaïacol peroxydase en réponse au stress hydrique (Sallam et al. 2019). Il régule divers processus physiologiques allant de l'ouverture des stomates à l'accumulation des protéines (Sah et al., 2016). Il est ainsi impliquée dans le développement des graines et la tolérance à la sécheresse chez les semis de blé (Mudgett and Clarke 1994).

1.5.2 Les réponses des microorganismes face au stress hydrique

Le stress hydrique dans le sol et les racines induit une réduction de la croissance bactérienne (Sheik et al. 2011), et affecte la diversité et la composition des communautés microbiennes du sol, même suite à de légères fluctuations dans l'eau du sol (Bouskill et al. 2016). Des études ont montré que le stress hydrique peut réduire de 50 à 80 % la taille des populations bactériennes (Sheik et al. 2011). Par ailleurs, certains microorganismes tels que les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) peuvent diminuer l'effet du stress salin sur la croissance de certaines plantes, telles que les bananiers, par rapport aux plantes non mycorhizées qui présentent une croissance réduite et un faible nombre de feuilles (Yano-Melo, Saggin, and Costa Maia 2003).

Toutefois, dans des conditions environnementales optimales, il est impossible d'identifier les microorganismes qui jouent un rôle important dans des conditions stressantes. Par exemple, les bactéries fixatrices d'azote peuvent ne présenter aucun avantage dans un sol riche en azote, et celles qui favorisent la croissance de la plante dans des conditions de stress pourraient ne pas être avantagées lorsque les conditions environnementales sont optimales (Glick, Todorovic, et al. 2007). Les prochaines sous-sections détailleront les impacts des conditions environnementales stressantes sur les microorganismes du sol.

1.5.2.1 Des changements dans les communautés microbiennes

Face à des contraintes environnementales qui limitent la disponibilité des ressources ou à des facteurs abiotiques (température, humidité) conduisant à un stress environnemental, on constate un changement dans les communautés microbiennes dans le sol, dont la plupart

utilisent des stratégies adaptatives, car celles mieux adaptés aux nouvelles conditions ont un avantage compétitif (Balsler, Kinzig, and Firestone 2002). Certaines bactéries peuvent, par exemple, produire des osmolytes (Schimel, Balsler, and Wallenstein 2007) former des endospores, telles que celles appartenant au genre *Bacillus* (Timmusk and Behers 2012), acquérir de nouveaux gènes par le transfert horizontal de gènes (HGT) ou bien aider à recruter de nouveaux membres microbiens dans l'environnement (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2021).

Face à des périodes d'alternance entre sécheresse et arrosage on assiste à des réponses inégales de différents taxons microbiens, dont les bactéries et les archées du sol qui démontrent plus de sensibilité que les champignons (Wang et al. 2022). Ainsi, la distribution des précipitations peut avoir un impact plus important sur les communautés microbiennes du sol que de petites variations dans la quantité totale de précipitation (Wang et al. 2022). Toutefois, face à une période prolongée de sécheresse, le potentiel fonctionnel de la communauté microbienne du sol peut être modifié considérablement provoquant ainsi une réponse plus significative de ces communautés par rapport à celles exposés à un stress hydrique de bref délai (Bouskill et al. 2016). Ces microorganismes montrent des changements spécifiques dans leur fonctionnement, leur métabolisme ou leur composition. Ils peuvent ainsi ajuster leurs mécanismes d'absorption d'eau, produire des métabolites spécifiques ou bien modifier leurs interactions avec différentes espèces microbiennes. En somme, ces microorganismes présentent des adaptations spécifiques en réponse à ces conditions de sécheresse prolongée, ce qui peut influencer leur rôle et leur fonctionnement dans leur écosystème.

1.5.2.2 Des réponses fonctionnelles

La réponse primaire des bactéries à l'exposition à un environnement hautement osmotique est l'accumulation de certains solutés, tels que le K⁺, le glutamate, le tréhalose, la proline, la glycine et la bétaine, à des concentrations proportionnelles à l'osmolarité du milieu. Cela permet de maintenir l'osmolarité du cytoplasme à une valeur supérieure à celle du milieu et de fournir une pression de turgescence dans les cellules (Csonka 1989). Une osmolarité élevée provoque des flux rapides d'eau cellulaire hors de la cellule, entraînant une réduction de la turgescence et une déshydratation du cytoplasme. Pour contrecarrer cet écoulement d'eau, les microorganismes augmentent leur groupe de solutés intracellulaires en accumulant de grandes quantités d'osmolytes organiques, généralement absorbés ou synthétisés (Kempf and Bremer 1998). Cependant, la production de solutés compatibles par les microorganismes augmente la demande intracellulaire en carbone (Bouskill et al. 2016). Ainsi, ces microbes peuvent consommer jusqu'à 5% de la production primaire nette annuelle totale de C et N dans

leurs écosystèmes pour synthétiser les osmolytes dont ils ont besoin pour survivre à une seule période de sécheresse (Schimel, Balser, and Wallenstein 2007).

Les microorganismes peuvent également s'adapter au stress hydrique par divers autres mécanismes tels que l'accumulation de solutés, la production d'exopolysaccharides, le stockage de ribosomes ou la sporulation (Ngumbi and Kloepper 2016). Cette production constitutive d'osmolytes, associée à une paroi cellulaire épaisse en peptidoglycane chez les bactéries Gram-positives, leur permet de rester actives en cas de faible disponibilité en eau, contrairement aux bactéries qui évitent la sécheresse par dormance ou sporulation (Vries et al. 2020). Ils peuvent également, moduler les voies de signalisation hormonale afin d'aider à l'élongation racinaire (Emami et al. 2020) dans le but de réduire la sévérité du stress hydrique ou salin (Rawat et al. 2011; Shukla N. et al. 2014) ou de favoriser la résistance de la plante stressée et la colonisation des microorganismes bénéfiques (Hardoim, van Overbeek, and Elsas 2008). Plus de détails sont fournis ci-dessous dans la section sur l'interaction plante-microbes et leur rôle dans la résistance des plantes au stress hydrique.

1.5.2.3 Des réponses génomiques

Toutes les réponses adaptatives, que ce soit pour les échanges nutritionnels ou pour faire face à des stress rencontrés dans diverses conditions, impliquent une série de commutations génétiques qui contrôlent les changements métaboliques de base. Un mécanisme régulateur commun implique la modification des facteurs sigma (σ) chez les bactéries, dont le rôle principal est de se lier à l'ARN polymérase centrale, conférant ainsi la spécificité du promoteur dirigeant l'expression des régulons impliqués dans la réponse au choc thermique, la réponse chimiotactique, la sporulation et la réponse générale au stress (Abee and Wouters 1999).

Lorsque les conditions environnementales changent brusquement, les microorganismes doivent rapidement ajuster leur programme d'expression génomique pour s'adapter aux nouvelles conditions. Cette adaptation commence par la modulation de l'expression de certains gènes qui jouent un rôle similaire dans la réponse microbienne face à la plupart des conditions stressantes (Gasch et al. 2000). Sous un régime de précipitation réduit de 75%, de nombreux gènes surexprimés dans la rhizosphère et les racines du blé ont été liés au métabolisme ou le transport des acides aminés, des glucides et des protéines liés au choc thermique (Pande et al. 2023). D'autres gènes sous-exprimés étaient liés à la formation de pilus et de flagelles, ce qui pourrait indiquer une transition d'un mode de vie libre à un mode de vie sessile (Pande et al. 2023). Le tableau 1-1 présente quelques gènes bactériens trouvés chez de nombreuses bactéries associées aux plantes, dont l'expression peut être régulée en réponse à divers stress environnementaux.

Tableau 1-1 Exemples des gènes bactériens connus impliqués dans la résistance de la plante aux stress environnementaux

Gènes	Rôles	Références
<i>Acds</i> (ACC deaminase structural gene)	Codant pour l'enzyme ACC désaminase précurseur de l'éthylène chez les bactéries	(Glick, Penrose, and Li 1998)
<i>MtAA03</i>	Impliqué dans la biosynthèse de la phytohormone ABA chez la plante	(Defez et al., 2017)
<i>ACC oxydase</i>	Catalyse l'étape finale de la biosynthèse de l'hormone végétale éthylène	(Silva et al., 2014).
<i>betA</i>	Impliqué dans la biosynthèse de l'osmo-protecteurs 'glycinebétaine'	(Bhattacharya et al. 2004)
<i>KatE</i>	Catalase impliquée dans la résistance des bactéries au stress oxydatif, et améliore la résistance des plantes contre des pathogènes fongiques	(Tondo et al. 2020; Moghaieb et al. 2021)
<i>gshA</i>	Code pour l'enzyme de la première étape de la biosynthèse du glutathion. Un antioxydant essentiel dans la croissance de quelques PGPB lors des interactions avec la plante partenaire	(Harrison et al. 2005)
<i>otsA</i> (tréhalose-6-phosphate)	Impliqué dans la biosynthèse de tréhalose. Augmenter l'accumulation de triacylglycérol dans les graines de plantes et les tissus végétatifs	(Zhai et al. 2021)

La production des métabolites spécifiques par les plantes induit l'expression des gènes de transporteurs bactériens ce qui peut conduire à des avantages de croissance compétitifs pour certains genres bactériens, tels que les monodermes, qui regroupent les bactéries à Gram + caractérisées par leur structure de paroi cellulaire composée d'une seule membrane externe (Xu and Coleman-Derr 2019).

1.5.3 Les interactions plante-microbes et leurs rôles dans la résistance de la plante au stress hydrique

Les microorganismes présents dans le sol peuvent fournir de nombreux services écosystémiques et peuvent devenir des endophytes en se multipliant dans les racines des plantes (Hardoim, van Overbeek, and Elsas 2008). Ces microorganismes peuvent ainsi vivre dans le tissu végétal sans compétition ni aucun dommage majeur à la cellule hôte (Kumar et al., 2016). Ils sont beaucoup plus dynamiques et plastiques et peuvent ainsi améliorer la défense de la plante face aux stress environnementaux par plusieurs mécanismes, notamment en modifiant les niveaux d'hormones végétales et la production d'exopolysaccharides bactériens (Kaushal and Wani 2016). Cependant, leur perturbation peut avoir un impact majeur sur la santé de la plante (Xu and Coleman-Derr 2019).

Certaines bactéries peuvent aussi exprimer des caractéristiques PGPB communes telles que la production d'IAA, sidérophores et la solubilisation du phosphate, impliquées dans l'amélioration de la croissance de leur plante hôte aux stress environnementaux comme l'exposition aux métaux lourds (Tirry et al. 2018). Par ailleurs, il convient de noter que pas toutes les souches d'une même espèce peuvent jouer le même rôle dans des conditions stressantes tel qu'observé chez les souches de *Pseudomonas fluorescens* (C. H. Huang, Hsiang, and Trevors 2013).

Les interactions entre les microorganismes et la plante hôte sont responsables de l'équilibre de l'holobionte, et se présentent sous différentes formes telles que l'amensalisme (neutre-négatif), l'antagonisme (négatif-positif), le commensalisme (neutre-positif), la concurrence (négatif-négatif), le mutualisme (positif-positif) et le neutralisme (neutre-neutre) (Kumar et al., 2016).

1.5.3.1 Les changements dans la communauté microbienne

Afin de mieux s'adapter à des conditions stressantes, les plantes peuvent communiquer avec leur environnement via leurs racines. Il est important de noter que les racines végétales ont un effet sélectif sur les microorganismes rhizosphériques endophytiques (Hardoim et al., 2008 ; Xu et al., 2018). Grâce à leurs exsudats racinaires, les plantes peuvent recruter des microbes bénéfiques qui facilitent leur repousse après une période de stress, en gérant ainsi leurs abondances, leurs assemblages et leurs fonctions (Koprivova et al., 2019 ; Voges et al., 2019 ; Williams & Vries, 2020). En effet, face à un stress environnemental, il est observé un enrichissement des bactéries Gram + dans les racines de nombreuses plantes dans différents environnements (Xu and Coleman-Derr 2019). Cependant, l'effet sélectif est beaucoup plus important dans l'endosphère (racines internes), en raison de la spécificité et de la complexité des interactions

plantes-microbes et des réponses du système immunitaire végétal (Hardoim, van Overbeek, and Elsas 2008).

Ainsi, dans le contexte de l'adaptation de l'holobionte aux stress environnementaux, différentes réponses sont observées, telles que les changements génétiques dans l'holobionte qui peuvent être liés à l'acquisition de nouveaux microbes de l'environnement, l'amplification et/ou la réduction de certains microbes de l'holobionte ou encore le transfert horizontal de gènes entre les microbes (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2021). Dans ce même contexte, les plantes contrôlent directement leur communauté microbienne et peuvent affecter la composition et la fonction du microbiome en libérant diverses molécules dans le rhizoplan (Jacoby et al., 2021 ; Nunan et al., 2005). Ces molécules peuvent jouer un rôle direct dans la sélection des microorganismes de la plante et de sa rhizosphère.

1.5.3.2 Les communications moléculaires

Sur le plan hormonal, la plante peut agir par abaissement de la production d'ABA (voir Figure 1.4) en réponse à la production de cytokinine par les microorganismes qui colonisent ses racines et sa rhizosphère (Yang, Kloepper, and Ryu 2009). Les kinases des récepteurs de la cytokinine (AHK2 et AHK3) régulent négativement l'ABA ainsi que toute autre expression génique sensible au stress osmotique (Tran et al. 2007). Ainsi, l'un des principaux mécanismes utilisés par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) pour faciliter la croissance et le développement des plantes est l'abaissement des niveaux d'éthylène (Figure 1.4) par la désamination de l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) (Glick, Todorovic, et al. 2007). L'enzyme qui catalyse cette réaction est l'ACC désaminase, qui hydrolyse l'ACC (le précurseur immédiat de l'éthylène) en α -cétobutyrate et en ammoniac (Z. Zhang et al. 1995).

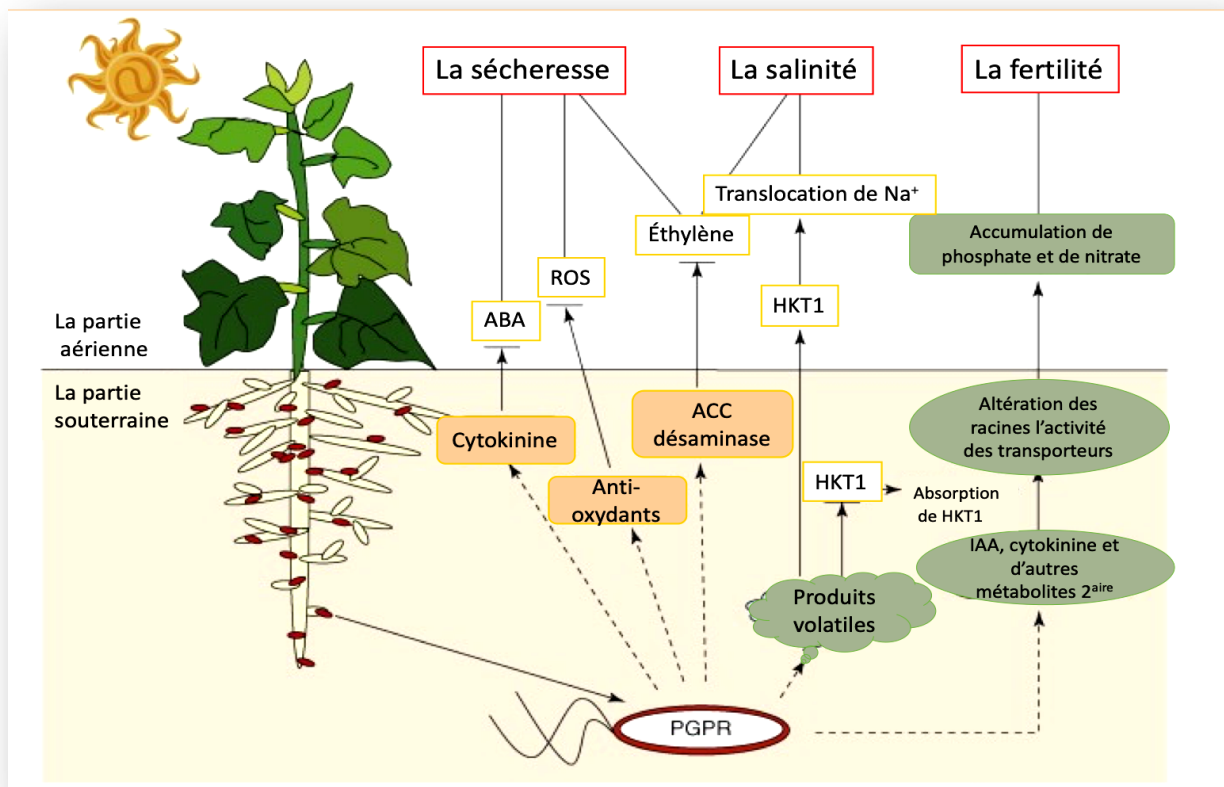


Figure 1-2 Représentation schématique des interactions plante-microorganismes dans des conditions de stress hydrique, adaptée de (Yang, Kloepper, and Ryu 2009) reproduit avec permission de ELSEVIER

Certaines bactéries, soumises à un stress hydrique, produisent et fournissent de l'acide indole-3-acétique (IAA) à l'hôte, ce qui augmente la surface, le volume et l'extension du système racinaire. Cela permet aux plantes d'accéder à davantage de phosphore dans le sol (Emami et al. 2020). D'autres bactéries peuvent moduler les niveaux d'éthylène des plantes, soit par clivage de l'ACC (Glick, Cheng, et al. 2007), soit par inhibition des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, notamment la β -cystathionase et l'ACC synthase (Sugawara et al. 2006). L'éthylène est également un régulateur clé de la persistance de la plante stressée ainsi que de la colonisation bactérienne. Par conséquent, la régulation de la production d'éthylène est probablement liée à son effet sur les voies de signalisation végétale (Hardoim, van Overbeek, and Elsas 2008). Cette voie de signalisation de l'éthylène est nécessaire pour que les microorganismes endophytes confèrent une résistance à la plante (Kavroulakis et al. 2018).

Les plantes augmentent leur production d'éthylène pour déclencher des mécanismes de défense en réponse au stress (Ravanbakhsh et al. 2018). Ainsi, toute espèce bactérienne capable de produire l'enzyme ACC désaminase sera également capable de se lier aux graines

ou aux racines des plantes dans le sol et devrait être en mesure de favoriser l'élongation des racines et d'aider la plante à mieux résister sous stress hydrique (Glick, Penrose, and Li 1998). Ainsi, en réponse à un stress hydrique, la plante peut surexprimer la 9-cis-époxydioxygénase et l'acétaldéhyde déshydrogénase, des enzymes clés de la biosynthèse de l'ABA. Cela permet de forcer la fermeture des stomates des feuilles en réponse aux signaux chimiques (Wu et al. 2022). Enfin, pour faire face à un stress environnemental, la plante a besoin d'ajuster sa machinerie génomique pour déclencher des réponses. Toutes ces réponses, et d'autres dans le cadre des interactions plantes-microbes, ont un rôle décisif dans l'équilibre des écosystèmes et sont souvent façonnées en fonction des variables et des conditions environnementales. Dans ce contexte, une approche intéressante consiste à manipuler rationnellement la chimie des racines en modifiant la voie de biosynthèse requise pour produire un métabolite secondaire ciblé, dans le but de recruter une souche bénéfique ou de dissuader un agent pathogène (Jacoby, Koprivova, and Kopriva 2021).

1.5.3.3 Exemples des microorganismes connus pour leur rôle bénéfique dans des conditions de stress hydrique

Dans les dernières décennies, différents genres microbiens ont été identifiés comme des agents biologiques aidant à la tolérance des plantes hôtes aux différents stress abiotiques. L'utilisation de ces microorganismes a démontré des effets favorables sur la croissance des plantes et a augmenté leur tolérance au stress hydrique (Martins et al. 2018; Qi et al. 2021; Xu et al. 2018; Camaille et al. 2021). Le tableau 1-2 présente des exemples de ces microorganismes isolés et caractérisés pour leur pouvoir à améliorer la résistance des plantes au stress hydrique.

Tableau 1-2 Exemple des microorganismes qui aident la plante à tolérer le stress hydrique

Microorganismes	Rôles	Références
<i>Pseudomonas putida</i>	Colonisation du rhizoplan et des racines des plantes à faible potentiel d'humidité du sol (ex. plante de tournesol).	(Sandhya et al. 2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Réduction de la sévérité du stress chez le blé (<i>T. aestivum</i> L) en augmentant sa tolérance la salinité et la sécheresse, le pourcentage de germination, la longueur des racines et des feuilles, la teneur en chlorophylle avec un indice de stabilité membranaire plus élevée.	(Rawat et al. 2011 ; Shukla N. et al. 2014)

<i>Pantoea aglomerans</i>	Augmentation de la teneur en eau du sol de la rhizosphère du blé	(Amellal et al. 1998)
<i>B. subtilis</i> et <i>B. cereus</i>	Augmentation la croissance des plantes de Soja dans des milieux où l'activité de l'eau est réduite.	(Martins et al. 2018)
<i>B. subtilis</i>	Diminution de la peroxydation lipidique et de la fuite d'électrolyte de tissus chez le blé en réponse à la sécheresse.	(Lastochkina et al. 2020)
<i>Bulkholderia cepacia</i>	Augmentation de la tolérance des plantes de pigment (<i>Capsicum annuum</i>) à la sécheresse et le stress salin par production de l'ACC désaminase.	(Maxton, Singh, and Masih 2018)
<i>Microbacterium</i> sp.	Augmentation de la teneur relative en eau dans les plantes de poire inoculées en augmentant la production de tréhalose.	(Vílchez et al., 2018)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Augmentation de la tolérance des plantes de maïs à la sécheresse par accumulation du tréhalose.	(Rodríguez-Salazaral., et 2009)
<i>Fusarium solani</i>	Amélioration du stress physiologique chez les plantes de tomate cultivées en tourbe dans des conditions d'irrigation déficitaire en eau.	(Kavroulakis et al., 2018)
<i>Achromobacter piechaudii</i>	Production de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase pour surmonter le stress hydrique chez les plants de poivron(<i>Capsicum annuum</i> L.) et de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	(Mayak et al., 2004)
<i>Variovorax</i> sp.	Amélioration de la croissance des plantes d' <i>Arabidopsis</i> et le sorgho contre la sécheresse et l'inhibition de la croissance des racines causée par <i>Arthrobacter</i> .	(Vílchez et al. 2018).
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	Améliore la tolérance des plantes de tomates à des températures élevées.	(Issa et al. 2018)

1.6 Manipulation du microbiote des plantes

Les microorganismes dont le pouvoir PGPB a été confirmé peuvent être utilisés pour ensemercer les plantes ou le sol en monoculture ou en mélange de cultures sous forme d'un consortium. Dans cette section, nous allons nous concentrer sur les méthodes de la préparation et de l'ensemencement des SynComs. Les autres approches et les théories écologiques derrière cela soient discutées plus en détail dans le chapitre (2) de cette thèse. La meilleure approche de préparation de SynComs pour améliorer la tolérance du blé au stress hydrique est testée et discutée dans le chapitre (3) de cette thèse. Ici, nous explorons les étapes clés de la création d'une SynCom, ainsi que les considérations importantes à prendre en compte lors de son ensemencement dans un environnement donné.

1.6.1 L'utilisation des communautés microbiennes synthétiques (SynComs) pour améliorer le rendement agricole

L'utilisation de SynComs est une approche récemment introduite, qui combine des concepts de l'écologie microbienne et de la génétique pour concevoir des inoculums (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020). Les SynComs sont basées sur le pouvoir bénéfique des interactions microbe-microbe, notamment l'alimentation croisée qui peut soutenir des taxons bactériens qui n'ont pas de source de carbone directement utilisable et qui peuvent seulement survivre en utilisant des métabolites sécrétés par d'autres bactéries (Murillo-Roos et al. 2022). Cependant, la diversité des SynComs nécessite des collections de souches qui représentent la diversité phylogénétique et fonctionnelle du microbiote de l'hôte (Müller et al. 2016).

L'utilisation des SynComs a suscité l'attention des chercheurs en tant qu'approche prometteuse pour améliorer les pratiques agricoles. Les SynComs, composés d'isolats provenant de différents compartiments de la même plante (feuilles, racines, graines ou rhizosphère) peuvent former des communautés ressemblant au microbiote naturel de leur plante hôte, et des expériences sur la compétition des SynComs dérivées de feuilles et de racines ont mis en évidence leur spécificité et leur adaptation à leur niche respective (Bai et al. 2015).

Certaines bactéries peuvent s'adapter après leur ensemencement et être isolées du sol 15 ans après leur introduction (Perrineau et al. 2014). Elles établissent un lien fonctionnel avec leurs hôtes et expriment des traits bénéfiques capables d'améliorer les performances des plantes et la productivité agricole (Mahmood et al. 2016). Cependant, leur adaptation peut varier en fonction de l'environnement, que ce soit d'un point de vue symbiotique ou génétique, ce qui alimente le débat sur les conséquences associées à l'introduction de nouveaux traits microbiens dans l'environnement (Perrineau et al. 2014).

La sélection de ces microorganismes à introduire devrait passer par un criblage basé sur leur génome pour identifier des traits liés à des fonctions bénéfiques pour les plantes, améliorant ainsi la stabilité des communautés synthétiques (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020). Dans ce même contexte, la colonisation des SynComs doit être soutenue par des techniques de séquençage appliquées afin de valider leur stabilité, leur robustesse et leur efficacité à petite échelle (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020).

Bien que les études et les connaissances se soient accumulées de manière exponentielle ces dernières années, peu de nouvelles méthodes concernant l'utilisation d'inoculum agricole ont été publiées. Il reste encore des défis à relever dans la conception et l'utilisation des SynComs. En revanche, la sélection des souches microbiennes appropriées et leur interaction au sein de la communauté sont des aspects complexes qui nécessitent davantage de recherches. De plus, l'efficacité des SynComs peut varier en fonction des conditions environnementales spécifiques, des types de cultures et des pratiques agricoles utilisées. Ainsi, l'utilisation des SynComs pour augmenter la productivité et la résilience des plantes rencontre une limitation supplémentaire liée aux méthodes de mesure et d'évaluation des performances des plantes sur terrain (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020).

1.6.2 Les différentes approches de la conception des SynComs

Les communautés microbiennes synthétiques sont conçues pour améliorer des fonctions existantes ou bien pour élargir la gamme d'applications des communautés microbiennes naturellement existantes (Eng and Borenstein 2019). Par ailleurs, ces communautés peuvent être évaluées par différentes approches, soit en se basant sur l'écologie du système en étudiant ainsi les changements dans leur abondance, ou bien en se basant sur l'étude de leur physiologie en se basant sur leur taux de consommation ou production de métabolites secondaires, taux de croissance ou leurs propriétés moléculaires telles que les gènes fonctionnels (Perez-Garcia, Lear, and Singhal 2016).

Ainsi, pour répondre aux besoins actuels dans le contexte environnemental et industriel, plusieurs approches de conception de SynComs ont été étudiées pour améliorer leur efficacité. Les plus connues sont basées sur l'enrichissement de la communauté microbienne par stimulation de la croissance des microorganismes d'intérêt, la réduction de la communauté microbienne par élimination des microorganismes indésirables ou inutiles pour une fonction spécifique, l'évaluation combinatoire de différentes combinaisons microbiennes potentiellement prédéterminées ou bien la conception artificielle des différentes SynComs à travers une modélisation *in silico* (Eng and Borenstein 2019). La figure 1.5 résume les principales approches de conception des communautés microbiennes synthétiques.

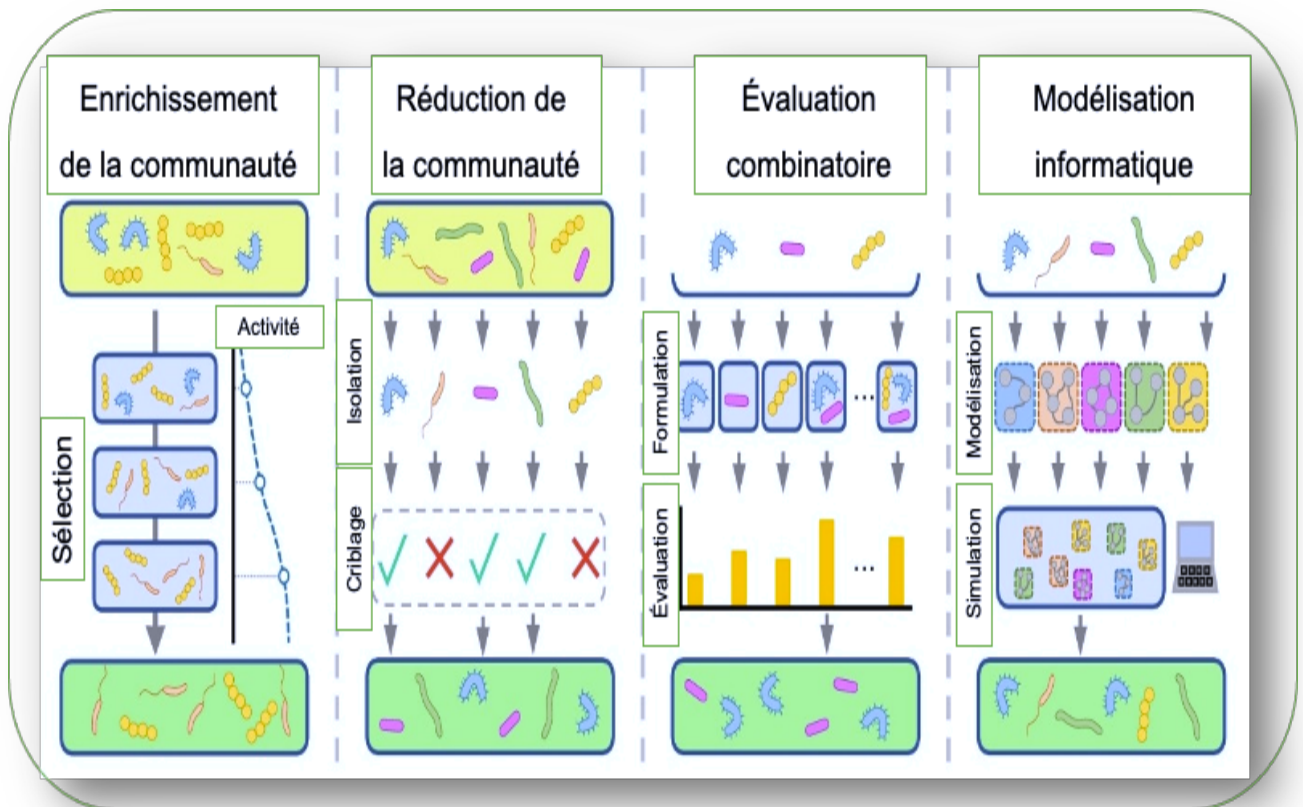


Figure 1-3 Les différentes approches de la conception des SynComs, daptée de (Eng and Borenstein 2019), reproduit avec permission de ELSEVIER

1.6.2.1 Conception des SynComs par enrichissement de la communauté microbienne

L'approche d'enrichissement des communautés consiste à stimuler la croissance ou l'abondance des microorganismes qui jouent un rôle crucial dans une fonction spécifique. L'application d'un stress sur une communauté microbienne peut entraîner une sélection naturelle, favorisant ainsi les microorganismes capables de résister à ce stress. En conséquence, il y aura un enrichissement naturel des communautés grâce à une augmentation de l'abondance des microorganismes d'intérêt (Eng and Borenstein 2016). Par ailleurs, la plupart des études menées jusqu'à présent ont suivi une procédure similaire de sélection *in vitro* de microorganismes répondant à leurs besoins. Toutefois, dans le contexte de la bio-rémediation des produits pétroliers, Bell *et al.* (2016) ont montré que l'inoculation du sol avec l'ensemble de son propre microbiome a un effet plus important sur la dégradation de ce produit par rapport à l'inoculation avec une communauté synthétique présélectionnée *in vitro*. Cela peut être justifié par le fait que les différentes espèces composant une communauté microbienne donnée ne fonctionnent pas de manière indépendante, et chaque communauté

impacte son environnement à travers l'activité orchestrée de ses membres (Eng and Borenstein 2016).

1.6.2.2 Conception des SynComs par réduction microbienne

La sélection des microorganismes d'intérêt se fait généralement en se basant sur des tests préliminaires au laboratoire dans le but de répondre aux besoins spécifiques pour lesquels l'ensemencement sera effectué. Ainsi, un ensemble de souches hautement adaptées à répondre à des besoins bien déterminés pourrait effectuer une fonction particulière dans l'ensemble de la voie métabolique conçue pour résoudre une tâche biotechnologique définie (García-Jiménez, García, and Nogales 2018). Cela implique moins de transformation génétique par souche, en réduisant ainsi la complexité technique et augmentant les chances de succès. De plus, en utilisant des souches spécialisées pour des tâches spécifiques, on évite l'accumulation de métabolites intermédiaires indésirables (García-Jiménez, García, and Nogales 2018). Enfin, l'utilisation de différentes souches sélectionnées pour leurs capacités spécifiques, permettra la réalisation de diverses fonctions, comme la dégradation de produits ou la production de différents composés.

D'autres contraintes doivent être prises en compte lors de la conception des SynComs par criblage au laboratoire, telles que l'utilisation d'un nombre minimal de microorganismes pour réduire les coûts et simplifier les procédures. Cela peut être fait en adaptant des SynComs avec des isolats qui ont des effets synergiques et cumulatifs (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020) et en déterminant les conditions de co-culture et de compatibilité de croissance entre différentes souches (García-Jiménez, García, and Nogales 2018). Un cadre de conception bien réussi doit donc tenir compte de la plupart de ces interactions et de leur impact sur la communauté dans son ensemble.

Chaque espèce peut également inclure un ensemble de réactions de transport qui convertissent les métabolites environnementaux en métabolites spécifiques à l'espèce (l'absorption), ou des métabolites spécifiques à l'espèce aux métabolites environnementaux (la sécrétion). Cependant, le fait que ces espèces possèdent l'ensemble des réactions menant des substrats aux produits n'implique pas nécessairement que la communauté accomplirait activement et efficacement la fonction métabolique souhaitée (Eng and Borenstein 2016).

1.6.2.3 Conception des SynComs par évaluation combinatoire

Dans ce contexte, les souches préalablement isolées au laboratoire, peuvent faire l'objet de différents tests de criblage en co-culture mixte afin d'évaluer leur pouvoir en présence de d'autres microorganismes. Cela pourrait aider à évaluer l'effet symbiotiques des souches avant de les incorporer dans l'environnement. Paredes et al. (2018) ont réalisé une évaluation systématique de la performance d'une large collection d'isolats bactériens de racines d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant des tests *in vitro* et des tests binaires d'association bactérie-plante comme prédicateurs de l'effet des consortium bactériens dérivés sur les phénotypes végétaux en réponse à la déprivation de phosphate. L'objectif était de concevoir des communautés synthétiques qui modifient l'accumulation de phosphate dans les pousses de la plante. Les résultats ont montré que les tests bactériologiques *in vitro* n'ont aucune corrélation avec les effets bactériens sur les phénotypes des plantes. Cependant, les tests d'association binaire plante-bactérie ont été utiles pour la conception de petites communautés synthétiques. De manière surprenante, les effets des consortium bactériens sur la physiologie de l'hôte étaient principalement additifs et indépendants des abondances bactériennes, ce qui suggère que l'assemblage fonctionnel au sein d'un consortium microbien peut déterminer son effet sur la réponse phénotypique de l'hôte.

1.6.2.4 Conception des SynComs par modélisation *in silico*

L'utilisation de modèles informatiques est devenue plus prévalent dans notre époque, et a également été exploitée dans le cadre de la conception des SynComs en se basant sur les prédictions des rôles de différentes souches microbiennes qui peuvent répondre à un besoin spécifique. Par ailleurs, les modèles *in silico* peuvent être basés sur l'étude des réseaux, les interactions hôte-microbes, les contraintes entre les espèces ou bien les interactions métaboliques au niveau communautaire (Greenblum et al. 2013). Ainsi, l'analyse de ces interactions *in silico* peut permettre l'optimisation de l'utilisation d'une ou plusieurs souches dans différents contextes biotechnologiques, et peut faciliter la compréhension des échanges de substrat et/ou la compétition des échanges entre les espèces d'une même communauté (Perez-Garcia, Lear, and Singhal 2016). Cela permettra également d'accroître notre compréhension de ces réseaux complexes (Kumar et al., 2016).

Les reconstructions métaboliques à l'échelle du génome d'une seule espèce sont des bases de connaissances spécifiques à cet organisme, qui sont développées systématiquement en utilisant les connaissances biologiques disponibles pour l'espèce cible, l'annotation du génome et les données omiques (García-Jiménez, García, and Nogales 2018). Ainsi, l'optimisation des allocations des ressources intracellulaires par individu bactérien peut aider à comprendre

l'émergence des dynamiques et des interactions entre les espèces d'une communauté microbienne (Harcombe et al. 2014). Un autre exemple de modélisation *in silico* est le modèle FLYCOP (FLexible sYnthetic Consortium OPTimization), qui permet d'explorer de multiples configurations de consortiums de manière automatique et bien guidée pour intégrer, analyser et optimiser différents modèles métaboliques spécifiques à l'échelle du génome. Ce modèle permet d'optimiser la conception d'un consortium personnalisé en décrivant les partenaires de la communauté (García-Jiménez, García, and Nogales 2018).

De toute évidence, le développement d'un cadre de conception complète et à usage général peut encore être hors de notre portée pour les années à venir (Eng and Borenstein 2016). Un modèle réussi prend plusieurs configurations de consortium en entrée et ne renvoie qu'une seule configuration en sortie qui correspond à la meilleure trouvée (García-Jiménez, García, and Nogales 2018). Cependant, des données omiques manquent encore pour intégrer différentes dimensions et faciliter la conception rationnelle des SynComs et optimiser l'agriculture durable (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020).

Enfin, concevoir et tester ces consortiums *in vitro* sur des espèces végétales en se basant sur l'évaluation phénotypique ou bien faire un suivi de la réponse transcriptionnelle chez la plante reste de meilleures méthodes pour valider ou sélectionner les meilleures combinaisons plante-SynCom parmi un vaste choix de SynCom construit *in silico*.

1.6.3 Les différentes méthodes de traitements des plantes par des microorganismes bénéfiques

Les méthodes les plus couramment développées et explorées comprennent le traitement des semences par des microorganismes bénéfiques, l'amendement du sol et l'immersion des racines dans les suspensions bactériennes avant la transplantation (O'Callaghan 2016). Ces microorganismes doivent être produits en grande quantité sous forme liquide ou sous forme d'une formulation solide afin de faciliter leur application au champ (O'Callaghan 2016). Leur efficacité dans le sol dépend des conditions après leur libération et nécessite des conditions optimales pour que l'inoculum survive mieux (Mahmood et al. 2016). Cependant, leur robustesse en termes de colonisation et leur prévalence tout au long du développement des plantes sont aussi des facteurs majeurs à considérer (de Souza, Armanhi, and Arruda 2020).

Les études préalablement publiées ont décrit différentes méthodes pour la préparation et l'application d'un nombre très intéressant de microorganismes sur différentes semences à des fins de recherche ou commerciales (tableau 1-3). La plupart de ces approches déjà démontrées en laboratoire demeurent difficilement applicables au champ en raison de leur dépendance d'une forte production de masse microbienne (O'Callaghan 2016). Pour cette raison, le traitement des semences est la méthode la plus réalisable, car elle nécessite

généralement moins de biomasse microbienne par rapport aux autres méthodes, et elle est facilement acceptable par les industries et les agriculteurs. De plus, l'ensemencement des graines permet de réduire le temps de latence nécessaire pour répondre au stress et assure la réponse immédiate des microorganismes inoculés dès que les conditions de stress s'appliquent. Cependant, l'exposition de la graine inoculée au soleil provoque la mort des cellules bactériennes, et son exposition à l'environnement peut entraîner une contamination (Mahmood et al. 2016).

Tableau 1-3 Tableau récapitulatif des différentes méthodes de traitements des plantes par des communautés microbiennes synthétiques (adapté de (Mahmood et al. 2016; O'Callaghan 2016)

	Méthodes	Avantages	Inconvénients
Bioprimered	Tremper les graines dans une suspension saline	Les microorganismes peuvent vivre assez longtemps	Usage commercial limité
Recouvrement ou enrobage (Seeds coating)	Inoculant disperser sur la surface de la graine, puis sécher	Très utile pour prétraiter les graines par les pesticides	Durée de vie très courte/utile au laboratoire.
Granulation (Pelleting)	Inoculant appliquer à la graine avec des additifs de semences conventionnels	Usage commercial typique	Difficulté de survie des microorganismes saufs les sporulants.
Application foliaire	Application directe sur les plantes	Utile pour la lutte biologique	Demande un grand volume d'inoculum
Amendement	Application directe sur le sol	Facile pour les grands champs agricoles	Demande un grand volume/masse d'inoculum
Traitement des racines	Immersion dans les suspensions bactériennes.	Utile dans le cas des transplantations faisables	Utilisation pour la recherche seulement.

Les microorganismes bénéfiques ont démontré certaines capacités de repousser les agents pathogènes, réduire les niveaux de stress environnementaux, améliorer la nutrition et stimuler la croissance des plantes dans le contexte de l'amélioration des cultures. Cependant, les communautés microbiennes associées aux plantes peuvent ne pas répondre de manière optimale aux besoins agricoles. Face à ce défi, se pose la question de savoir comment nous pouvons manipuler délibérément les communautés microbiennes associées aux cultures?

Une approche intéressante pour aborder cette question repose sur la théorie des communautés écologiques, qui met en lumière quatre processus par lesquels les communautés peuvent se développer. En acquérant une compréhension approfondie de ces mécanismes, nous pourrions alors les utiliser de manière stratégique pour moduler délibérément le microbiote des cultures. Le chapitre suivant se consacre à l'exploration détaillée de ces quatre processus qui sous-tendent l'évolution des communautés microbiennes associées aux plantes.

2 ENGINEERING THE PLANT MICROBIOTA IN THE CONTEXT OF THE THEORY OF ECOLOGICAL COMMUNITIES

Auteurs : Asmaâ Agoussar and Etienne Yergeau*

*Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie,
531 boul. des Prairies, Laval (Québec), H7V 1B7, Canada

*Corresponding author: ; +1 450 687-5010, ext. 8881

Titre de la revue ou de l'ouvrage : Current Opinion in Biotechnology, volume 70, pages 220–
225

Publié en ligne le 20 Aout 2021

PMID : 34217124 DOI: 10.1016/j.copbio.2021.06.009

2.1 Abstract

Crop-associated microorganisms are known to have a determining influence on crop growth and resistance to stresses. Indeed, microorganisms can deter pathogens, reduce stress levels, improve nutrition, and stimulate growth. However, the microbial communities associated with a plant are rarely optimal for agricultural needs. But how can we engineer crop-associated microbial communities? An interesting framework to address this question is the theory of ecological communities that stipulates four processes by which communities can change: 1) selection, 2) dispersal, 3) speciation and 4) ecological drift (Figure 2.1). Of these, speciation and dispersal can result in the addition of new species to the plant microbiota, whereas selection and drift can lead to the loss of species. We believe that if these mechanisms are sufficiently understood, they could be harnessed to purposefully engineer the crop microbiota. Here, we will discuss the recent efforts to modify the phenotype of plants that are aligned with these ecological processes.

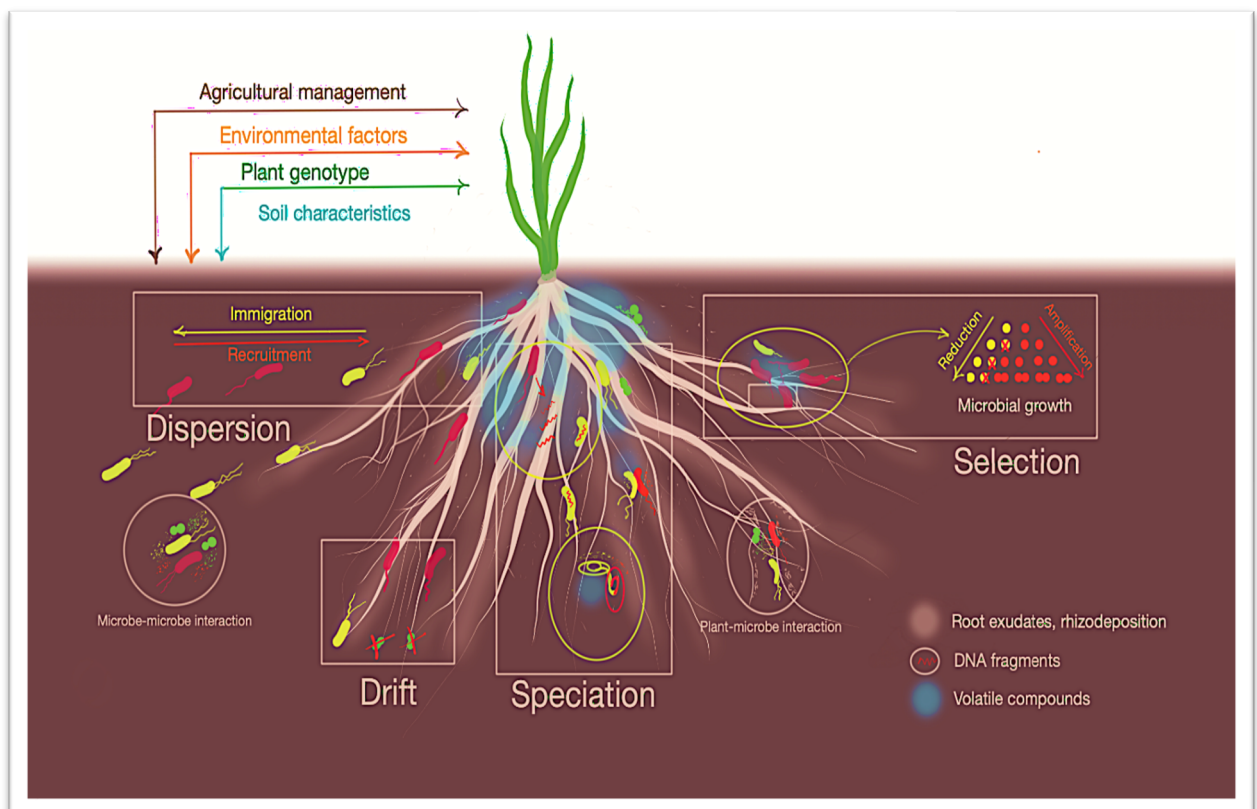


Figure 2-1 Illustration of principal processes by which communities can change in the theory of ecological communities

2.2 Introduction

Due to global changes, biotic and abiotic pressure on agriculture will only increase in the future, resulting in lower yields and lower quality products while the global population climbs toward the 9 billion marks. The unprecedented rate of these changes calls for novel, rapid approaches to improve the resistance and resilience of crops to stresses. One such approach is to engineer the crop-associated microbial communities, as microorganisms are known to provide vital services to plants such as increasing nutrition, deterring pathogens, protecting from stresses, and stimulating growth, amongst others. However, because of various co-evolutionary mechanisms, microbial communities interacting stably with the plant host are not necessarily providing the optimal services to the plant and might even be deleterious. The question then becomes: How can we revert this stable equilibrium and engineer the plant microbial communities for optimal services to the crops? An interesting theoretical framework to start addressing this question is the theory of ecological communities (Vellend 2016) that stipulates that there are four high-level processes by which ecological communities can be modified (Figure 2.1): 1) selection, by reduction or amplification of community members already present within the host, 2) dispersal, by recruitment or immigration of new community members from the environment (soil, water or air), 3) speciation, by gradual mutation or, perhaps more importantly for bacteria, horizontal gene transfer (HGT) and 4) ecological drift. We believe that, if correctly understood in their proper theoretical framework, some of these ecological processes could be harnessed to purposefully modify the microbial communities of crops. Here, we will review plant microbiota engineering efforts made in the last few years through the lens of the theory of ecological communities. Since ecological drift is the random component of community dynamics, by definition it cannot be harnessed in the context of microbiota engineering, so it will not be included in our discussion.

2.3 Engineering the plant microbiota

2.3.1 Selection

When facing stress or under varying environmental conditions, plant microbial communities undergo several modifications in terms of their composition, diversity, and the relative and absolute abundances of their various members (Azarbad et al. 2018; Azarbad et al. 2020). This, in turn, results in shifts at the functional level (Azarbad et al. 2018), which can be either beneficial or deleterious for plant fitness and resilience to the changing conditions. In view of the remarkably high diversity of microorganisms

present in the plant environment and the dynamic nature of microbial communities, there must be ways to orient these shifts toward increased beneficial services.

Microorganisms associated to crops could be selected directly, by acting on environmental variables, such as nutrient and water availability, soil pH, soil oxygen levels, crop identity, or other biotic or abiotic factors. Arguably, this type of selection has been carried out empirically by farmers around the world since the dawn of agriculture. However, with a more microbially- and ecologically-informed framework, selection-driven approaches using simple and already known interventions have a huge potential. For example, as even closely related plant genotypes were shown to harbor different microbial community compositions (Bell et al. 2014; Azarbad et al. 2020; Yergeau, Quiza, and Tremblay 2020) and functions (Azarbad et al. 2018), a microbially-informed crop variety selection could increase resilience to stress likely to occur during the growing season. Interestingly, some engineering attempts using inoculation (covered in the next section about dispersal) failed to introduce the desired microorganisms, but resulted in clear shifts in the plant and soil microbial community composition (Mallon et al. 2018). It was also shown that roots of common beans growing in a soil inoculated with the fungi *Metarhizium* harbored several bacterial taxa that were not found in the roots of the plants growing in the uninoculated soils, even though no differences were observed in the abundance of the inoculated *Metarhizium* (Barelli et al. 2020).

Alternatively, microorganisms could be selected indirectly, by acting on the plant selection mechanisms (Vives-Peris et al. 2020). This would be most interesting and practical in the plant rhizosphere, where crops typically channel 3 to 5% of their net photosynthates (Pausch and Kuzyakov 2018), creating a strongly selective environment for microorganisms. Some studies have reported mechanisms by which plant exudation can be modified (Vries et al. 2019; Cox et al. 2019; Marastoni et al. 2020), which would provide an indirect method to alter the root-associated microbial communities. For example, Arabidopsis plants that were genetically modified to exude octopine had a rhizosphere that was significantly enriched in octopine degraders (Mondy et al. 2014), providing a proof of concept that plants exudation patterns could be genetically engineered to steer “selection” processes in the rhizosphere. Another interesting study conditioned soils by seeding Arabidopsis for five generation in the same soil and exposing them to an aboveground pathogen (Yuan et al. 2018). When plants were grown in this conditioned soil, they exhibited altered root exudation patterns and rhizosphere microbiota and an improved disease resistance, suggesting that following exposure to an aboveground pathogen, plants associate with beneficial

rhizosphere microorganisms through a shift in their root exudation patterns and that this can benefit the following generation of plants (Yuan et al. 2018). This also highlights that foliar application of certain microorganisms could be used to steer “selection” in the rhizosphere microbial communities, toward more beneficial services to the plant.

In addition to rhizodeposits, other factors are emerging as having a defining factor on the plant microbial communities. For instance, many gaseous compounds such as volatile organic compounds (VOCs) (Schmidt and Saha 2021) or hydrogen (Wang et al. 2020) were shown to have a determining influence on plant- and soil-associated microorganisms, which led to the suggestion that the plant rhizosphere does in fact extend much farther than the millimetric zone of soil surrounding the roots (De La Porte et al. 2020). However, it is still unclear how microorganisms within this extended rhizosphere would affect plant phenotype, and if they could be manipulated. In one study, hydrogen was infused in soil which led to a modification of the bacterial community (Wang et al. 2020) but it was not shown if this would have subsequently impacted crops. Some studies also reported that bacteria-emitted VOCs can inhibit the growth of fungal pathogens (Tsolakidou et al. 2019), and, conversely, fungal pathogens VOCs were shown to affect bacterial metabolism (Schmidt et al. 2017).

Another novel approach would be to use plant small RNAs to modify the activities of the plant-associated microbial communities. Indeed, small RNAs, and most particularly microRNAs (miRNAs), were shown to be involved in cross-kingdom communication (C.-Y. Huang et al. 2019; Weiberg and Jin 2015), and their presence in the plant environment was suggested to have a key influence on the rhizosphere microbial communities (Middleton et al. 2021). The expression of plant miRNAs was shown to be regulated by micro-peptides (miPEPs) (Lauressergues et al. 2015), which could be used as a tool to increase the transcription of specific miRNAs (Couzigou et al. 2015; 2016), suggesting an interesting avenue for modulating the gene expression and community composition of the plant microbiota.

Since the selection of microbes in the plant rhizosphere is thought to be based more on functions than taxonomy (Lopes, Pereira e Silva, and Andreote 2016; David et al. 2020) we could extend our reflection on selection processes to gene expression. In that case, the shifts in the transcriptome and proteome of existing communities would be transient selection events, which would similarly lead to a differently functioning microbial community. In fact, shifts in microbial gene expression are not necessarily linked to shifts in microbial community composition, and can lead to different functioning within an otherwise identical microbial community (Yergeau et al. 2018).

However, without an explicit theoretical framework, it is difficult to interpret the results observed. For instance, there are three different forms of selection (constant, negative frequency-dependent and positive frequency-dependent) and the outcome in term of the abundance of the target microorganisms will depend on the form of selection that is at play.

2.3.2 Dispersal

The dispersal approach is the most frequently used in plant microbiota engineering efforts, mostly through the inoculation of single or multiple beneficial microorganisms, with the expectation that the inoculated organisms would establish themselves among the plant microbial communities and provide beneficial services to the plant. Many ecological mechanisms are counteracting this directed dispersal approach, such as priority effects, where microorganisms already occupying a niche are likely to have the upper hand on newcomers (Vannette and Fukami 2014). Other mechanisms, such as the one described in the “Kill the Winner” hypothesis (Winter et al. 2010), could also reduce the efficiency of microorganisms with rapid growth rates that are typically used in the inoculant industry, through preferred predation by soil animals or preferred lysis by phages. Additionally, diversity is known since a long time to be a buffer to invasion by plants and animals (Elton 1958), and in the case of soil microbial communities, to determine the invasion by bacterial plant pathogens (van Elsas et al., 2012).

Recent work has pointed out that the seed microbiome was the preferred source of microorganisms during soybean development, preventing colonization from environmental (e.g., soil) microorganisms (Moroenyane, Tremblay, and Yergeau 2021). This could complicate any inoculation efforts that are not aiming specifically at the seed microbiome. Inoculating seeds during flower development was successful for introducing beneficial bacteria that could modulate the plant phenotype (Mitter et al. 2017), which led to the patenting of the approach (Mitter, Sessitsch, and Naveed 2015). Similarly, the plant compartment origin of the inoculated isolates was shown to have a crucial effect on the growth and nutrient assimilation of the inoculated crops (Gu et al. 2020), which is further compounded by the variability of isolates coming from the same compartment (Tsolakidou et al. 2019).

Multi-isolates inoculants were often shown to outperform single isolates (Tsolakidou et al. 2019; Moroenyane, Tremblay, and Yergeau 2021; Schütz et al. 2018; Hu et al. 2016; Magallon-Servin et al. 2020; Emami et al. 2020), potentially related to an enhanced robustness and adaptability conferred by the functional redundancy within the multi-isolate consortium. It was suggested that the creation of complex synthetic

communities (SynComs) (Eng and Borenstein 2019) could provide better inoculants, but it is still debatable if these would be able to outcompete the communities already interacting with the plant. Multiple inoculations of leaves and soil resulted in a shift in the resident microbial communities, which was not necessarily conducive to a better colonization in subsequent inoculations (Copeland and Schulze-Lefert 2020; Mallon et al. 2018). Finally, because of conflicting microbial traits requirements during the typical process of creating an inoculum, current approaches were suggested to be inadequate to generate ideal soil microbial inoculants (Kaminsky et al. 2019).

An approach at the intersection of dispersal and speciation is the inoculation of genetically engineered strains in the plant environment. For instance, cloned strains capable of fixing nitrogen and of excreting large amounts of this fixed nitrogen in their environment were shown to colonize the root environment under different field conditions and could still be re-isolated from roots after 12 weeks (Bloch et al. 2020). Similarly, bacterial isolates engineered for phytate solubilization improved the growth of *Arabidopsis* plants supplemented with 0.8 mM sodium phytate (Shulze et al. 2019), whereas endophytic isolates modified to express the ACC deaminase gene increased the resistance of banana to *Fusarium* wilt and promoted plant growth (Liu et al. 2019). Similarly at the intersection of dispersal and speciation, it has been shown that in the longer-term (5 to 15 years), inoculated N-fixing strains evolved, resulting in an altered N-fixing efficiency, among other traits (Perrineau et al. 2014). These results along with concerns related to non-target effects of the inoculants on soil microbial communities in the longer term (Mawarda et al. 2020), indicates that more research should be carried out to ascertain the innocuity of dispersal-based approaches on ecosystem functions.

Here again, without putting these results in the appropriate theoretical framework, it is difficult to explain why some “dispersal” efforts are successful and other are not. Recent work in that field showed that soybean-associated microbial communities were mostly assembled through niche-based processes (Moroenyane et al. 2021), making it more difficult for exogenous microorganisms to invade these plant environments. However, neutral assembly processes also appeared to play a role in some plant compartments or at some plant growth stages, suggesting that these might be more amenable to microbial inoculations (Moroenyane et al. 2021). Modelling of the plant microbial communities based on the theory of ecological communities could also help predict the conditions necessary for successful inoculations without the need for large scale experimentations on many isolated microbial strains. In one such example, after categorizing a library of bacterial isolates for their effect on *Arabidopsis* phosphate

content and testing the effect of a few consortia constructed from these strains, it was possible using neural network to accurately model and predict the effect of untested communities on Arabidopsis phosphate content (Paredes et al. 2018). More such predictive modelling efforts will be necessary to fully harness the potential of the “dispersal” approach.

2.3.3 Speciation

Since the definition of bacterial species is difficult and controversial, we will restrict our discussion on the apparition of new traits in a population already present in the plant environment. Within the framework of plant microbiota engineering, horizontal gene transfer mechanisms are particularly interesting, as it very rapidly changes the metabolic capacity of the plant microbiome (Maheshwari et al. 2017), especially when compared to speciation through the accumulation of mutations. There are three main mechanisms of horizontal gene transfer, which could occur in the plant environment: 1) natural transformation, where bacteria pick up DNA fragments from the environment, 2) transduction, where bacteria are transformed by the action of phages, and 3) conjugation, where bacteria exchange a plasmid or a transposon. Interestingly, the rhizosphere is a known hotspot for HGT (Maheshwari et al. 2017).

A classic example of conjugation in the plant environment is the study of Taghavi and coauthors (Taghavi et al. 2005), where poplars were inoculated with an endophytic *Burkholderia* strain harboring a plasmid expressing constitutively the toluene degradation gene. Poplar inoculated with the strain grew better in the presence of toluene, and toluene was more effectively removed from the soil. However, the inoculated strain could not be found in the plants, but the plasmid was readily detected, suggesting it had been transferred to resident microorganisms. This was shown to occur both in the presence and absence of toluene, highlighting that a selective pressure is not necessary to initiate HGT events. Two other HGT approaches based on conjugation were shown to be efficient to purposefully modify in place the gut (Ronda et al. 2019) and the soil (Brophy et al. 2018) microbial communities. For instance, Brophy et al. (2018) used inducible integrative and conjugative elements (ICE) to transfer DNA to either a single strain or a simple bacterial community directly in a soil. They reported that approximately 1 in 800 of the recipient strains were transformed, and that the ICE was detected in 4 out of the 6 members of the community (Brophy et al. 2018). The strength of this approach is that virtually any gene could be integrated in the ICE and transferred to, for instance, rhizosphere microbial communities.

Although these approaches are clearly extremely powerful, very few studies have attempted to harness HGT mechanisms for plant microbiome engineering. In the context of community ecology, speciation-based mechanisms need to work together with positive selection processes for the approach to be successful. A bacterium acquiring a new trait will not be able to establish and thrive in the plant microbial community without being positively selected. Nevertheless, these approaches, like the inoculation of genetically engineered microbial isolates, would have to be accepted by the public and the regulators before being used at a larger scale, and more studies would be needed to be able to control the persistence and host range of the inoculated DNA.

2.4 Conclusion

The plant microbiota engineering efforts discussed above were mostly conducted empirically without necessarily putting the approach in its theoretical context. We believe that by putting these efforts in the context of the theory of ecological communities, it will be possible to better choose and tailor an engineering approach, and to select which processes to combine. In addition, this theoretical framework allows for prediction and modelling, which will be invaluable tools to refine our plant microbiota engineering efforts without the necessity for substantial trial-and-error experimentation. With this framework in place, we can already predict that methods that aim at modifying microbial communities that are already in place (speciation and selection) are more promising and ecologically sounder than methods that aim at adding new microorganisms or replacing already established microbial communities (dispersal). In line with this, when inoculating wheat rhizosphere with a highly complex soil extract inoculum, it was calculated that, in the best case, 7% of the microbial communities of wheat plants under water stress was recruited from the inoculum, and that the vast majority of the changes observed were due to the selection of microorganisms already present in the plant environment (Giard-Laliberté et al. 2019). Putting our plant microbiota engineering efforts back in the theory of ecological communities offer an exciting window toward increasing beneficial services to the plant.

2.5 Acknowledgements

This work was supported by a Natural Science and Engineering Research Council Discovery Grant (RGPIN-2020-05723).

2.6 References

All references for this chapter are listed at the end of this document in the reference list.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

2.7 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ma thèse consiste à créer et évaluer une communauté microbienne synthétique qui peut aider à renforcer la capacité du blé à résister aux conditions de stress hydrique. De plus, il vise à mieux comprendre les impacts directs liés aux facteurs génomiques, et indirects liés aux modifications de la communauté microbienne, induits par l'ensemencement de cette SynCom. Plus spécifiquement, les objectifs spécifiques sont les suivants:

- 1) Étudier la réaction du microbiote du blé au stress hydrique sur le terrain et comparer la résistance des microorganismes isolés à partir d'échantillons de la plante et de la rhizosphère du blé provenant du même champ, en évaluant leur capacité à se développer sous une faible activité de l'eau. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans *FEMS Microbiology Ecology* et sont présentés dans le chapitre suivant (3).
- 2) Déterminer la méthode la plus efficace pour développer une SynCom en comparant différentes approches, et tester l'effet de l'ensemencement par ces SynComs sur la croissance du blé, qu'il soit exposé ou non à la sécheresse. Ainsi, examiner l'impact de l'ensemencement par la SynCom la plus performante sur la communauté bactérienne et fongique du blé et de la rhizosphère exposée ou non au stress hydrique.
- 3) Déterminer les facteurs génomiques microbiens impliqués dans l'amélioration de la croissance du blé inoculé dans des conditions de stress hydrique.

Les deux objectifs finaux (2) et (3) ont été combinés et présentés sous forme d'un article scientifique, qui est inclus en tant que chapitre (4) dans cette thèse et qui est prêt à être soumis pour publication.

2.8 Hypothèses de recherche

Les microorganismes colonisant la rhizosphère et la plante du blé sont capables d'améliorer la résistance et la croissance du blé dans des conditions de déficit hydrique. Ces microorganismes expriment des gènes codant des enzymes/fonctions responsables de l'amélioration de la résistance de la plante face au stress appliqué. Les hypothèses spécifiques sont les suivantes :

- 1) La diminution des précipitations au champ expérimental aura un effet sur les communautés microbiennes de la rhizosphère et de la plante du blé, et les échantillons exposés à la sécheresse hébergeront plus fréquemment des isolats osmotolérants.
- 2) L'ensemencement des graines de blé par une SynCom qui ont un pouvoir PGPB contenant des microorganismes osmotolérants isolés de la rhizosphère et de la plante du blé, aura un effet positif sur la croissance de la plante comparée à d'autres SynComs conçues aléatoirement ou par d'autres approches de conception de SynComs.
- 3) L'ensemencement du blé par la SynCom la plus efficace stimulera la croissance des microorganismes bénéfiques pour le blé. Ainsi, les microorganismes inoculés qui seront capables de persister dans la rhizosphère et la plante du blé auront des particularités génomiques clés codant des fonctions liées à l'amélioration de la croissance et de la résistance du blé au stress hydrique.

3 THE RESISTANCE OF THE WHEAT MICROBIAL COMMUNITY TO WATER STRESS IS MORE INFLUENCED BY PLANT COMPARTMENT THAN REDUCED WATER AVAILABILITY

Auteurs : Asmaâ Agoussar¹, Hamed Azarbad², Julien Tremblay³, Étienne Yergeau^{1*}

¹ Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada.

² Department of Biology, Philipps-University Marburg, Karl-von-Frisch-Str. 8, 35032 Marburg, Germany.

³Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, 6100 avenue Royalmount, Montreal, QC, H4P 2R2, Canada.

*Correspondance to : Etienne Yergeau, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada. Tel. : +1 450-687-5010 ext. 8881, etienne.yergeau@inrs.ca

Titre de la revue ou de l'ouvrage : *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 97, Issue 12, December 2021

Publié en ligne le 13 November 2021

PMID : 34217124 DOI: 10.1093/femsec/fiab149

3.1 Abstract

Drought is a serious menace to agriculture across the world. However, it is still not clear how this will affect crop-associated microbial communities. Here, we experimentally manipulated precipitation in the field for two years and compared the bacterial communities associated with leaves, roots, and rhizosphere soils of two different wheat genotypes. The bacterial 16S rRNA gene was amplified and sequenced, while 542 microorganisms were isolated and screened for their tolerance to osmotic stress. The bacterial community was not significantly affected by the precipitation manipulation treatments but differed drastically from one plant compartment to the other. Forty-four isolates, mostly bacteria, showed high levels of resistance to osmotic stress by growing in liquid medium supplemented with 30% polyethylene glycol. The Actinobacteria were overrepresented among these isolates, and in contrast to our expectation, precipitation treatments did not influence the odds of isolating osmotic stress-resistant bacteria. However, the odds were significantly higher in the leaves as compared to the roots, the rhizosphere, or the seeds. Our results suggest that isolation efforts for wheat-compatible water stress resistant bacteria should be targeted at the leaf endosphere and that short-term experimental manipulation of precipitation does not result in a more resistant community.

Keywords: Drought stress; wheat; amplicon sequencing; microbial isolates.

3.2 Introduction

Global changes will result in altered precipitation patterns, which will lead to more frequent and longer drought periods in some regions of the world, including Canada (Stocker *et al.* 2013; Canada 2018). Drought is a factor that limits the growth of plants and can lead to losses of up to 50% in global agricultural productions, including wheat (Sangiorgio *et al.* 2020; Duggan, Domitruk and Fowler 2000; Bagci *et al.* 2007). In view of the rising world population and the scale and speed of global changes, we need innovative solutions to help crops withstand higher levels of water stress. One approach would be to manipulate or engineer the plant microbiota (Quiza, St-Arnaud and Yergeau 2015; Agoussar and Yergeau 2021) toward a community that would provide more beneficial services to the plant under drought. The first step down that road is to better understand how plant-associated microbial communities respond to water stress. Microorganisms can adapt to water stress through different mechanisms such as solutes accumulation, exopolysaccharides production, ribosome storage or sporulation (Ngumbi and Kloepper 2016). At the community level, wheat-associated microbial communities were shown to react strongly to changes in soil water availability (Azarbad 2018, 2020, 2021, Giard-Laliberté *et al.* 2019). Most of these changes were shown to be due to shifts in the relative abundance of microorganisms already present in the plant environment, with very little recruitment from outside sources (Giard-Laliberté *et al.* 2019), suggesting that plant-associated microbial communities have members that are already resistant to water stress. However, because it is a multigenic phenomenon, the resistance to water stress of bacteria is almost impossible to clearly predict from amplicon sequencing or metagenomic datasets. Most studies assume that the statistical association of OTUs with water-depleted treatments is indicative of a better resistance to water stress. For instance, the phylum *Actinobacteria* often becomes relatively more abundant when water availability decreases, but it is not shown if individual microorganisms from this phylum are resistant to stress or simply less rapidly affected than other microbial groups. Combining microbial isolation with amplicon sequencing could help bridge this gap.

Not only does the tolerance to water stress vary among microorganisms (Evans and Wallenstein 2014), but they can also influence the plant resistance to such stress. Indeed, many specific bacteria of the phyla *Actinobacteria* and *Proteobacteria* were shown to improve plant tolerance to drought- or salinity-related stresses (Mayak, Tirosh and Glick 2004a, 2004b; Cheng, Park and Glick 2007; Saravanakumar and Samiyappan 2007). Fungal endophytes were also shown to improve plant performance under abiotic stress (Redman *et al.* 2011; Singh, Gill and Tuteja 2011;

Hubbard 2012). Mycorrhizal fungi can improve water use efficiency and reduce drought stress in wheat (Al-Karaki, McMichael and Zak 2004), oat (Khan, Ahmad and Ayub 2003), and corn (Subramanian et al. 1995). Many mechanisms were shown to be involved in the enhancement of plant drought tolerance by microbes, such as modulation of plant drought stress genes (Timmusk and Wagner 1999), reduction of the stress hormone ethylene levels through degradation of its precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by the bacterial enzyme ACC deaminase (Mayak 2004a, b), increase in the production of phytohormones, proline and pigments induced by bacterial volatile organic compounds (Yasmin et al. 2021), stimulation of the expression of plant genes related to osmolytes (Barnawal, Singh and Singh 2019) or modulation of the plant epigenetics response to drought (Hubbard, Germida and Vujanovic 2014).

To help crops sustain increasing water stress levels, it could be useful to isolate microorganisms that are resistant to drought, but at the same time are compatible with crops and provide beneficial services under stressful conditions. Endophytic and rhizospheric microorganisms isolated from environments prone to drought tend to confer plants with better resistance to drought (Redman et al. 2011; Timmusk et al. 2011). At the same time, compatibility with the host plant is highly important. For instance, *Arabidopsis* plants growing in their soil were more resistant to moderate drought than *Arabidopsis* plants growing in corn or pine soil (Zolla et al. 2013). This led to a significant reduction of the expression of drought stress-related genes in the plant, and it was suggested that the presence of specific soil bacteria could dampen the drought stress response of the plant. Recent work from our groups showed that the soil water stress history influences the soil microbial community composition, diversity and functions and plant root biomass when faced with a water stress event (Azarbad et al. 2018; 2020; 2021). Taken together, these results suggest that selecting an appropriate environment/sample type would be paramount to isolate microorganisms with the right properties to help crops resist to water stress.

Here, we hypothesize that experimentally decreasing precipitations would result in a microbial community that contains a higher frequency of osmotolerant isolates. To test this hypothesis, we designed and carried out a field experimental manipulation of the precipitation for two years and sampled leaves, roots, rhizosphere soils, and seeds of two wheat genotypes. On top of comparing bacterial communities using 16S rRNA gene sequencing, we went one step further and isolated 542 bacteria and fungi, screened them for osmotic stress resistance, and linked them back to the amplicon dataset.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Experimental design

The experiment was conducted at the Institut national de la recherche scientifique experimental field (Laval, Qc, Canada) in 2016 and 2017. The field was divided into 6 blocks separated by 2 m, each containing eight 4 m² plots separated by 1 m. Each plot was subjected to one of the following four rainfall manipulation treatments from May to October each year: 100% precipitation, 75% precipitation, 50% precipitation, or 25% precipitation by covering the plots with wooden shelters supporting various amounts of UV-transparent plastic sheets (Figure 3.1). The excess rainfall was collected in a gutter and directed into a bucket, which was manually emptied after significant rainfall events. Two wheat genotypes were used in this study: *Triticum aestivum* cv AC Nass (spring wheat) which was developed for the province of Quebec climate and known as a water stress-sensitive genotype, and *Triticum turgidum* subsp. *durum* cv. Strongfield (durum wheat) which was developed for the Canadian Prairies climate and is known as a water stress tolerant genotype. The first year, the seeds were obtained from Agriculture and Agri-Food Canada, and for the second year, the seeds harvested at the end of the first year were used. In May, each plot was seeded with approximately 2,000 seeds distributed in ten rows, for a density of 500 seeds/m². The experiment contained 6 fully randomized blocks, for a total of 48 plots (2 genotypes x 4 rainfall manipulation x 6 blocks). For the need of the current study, we sampled, in July 2017, roots, leaves and rhizosphere soil from the 25% and 100% precipitation treatments, resulting in 72 samples: 3 compartments x 2 rainfall manipulation treatments x 2 genotypes x 6 blocks). The soil water content (SWC) at the moment of sampling was on average 19.08% ± 2.48 and 14.45% ± 3.14 for the 100% and 25% precipitation treatments, respectively. Seeds were collected for isolation work at the end of the growing season, in August 2017. Samples were stored at -20 °C before DNA extraction and microbial isolation.

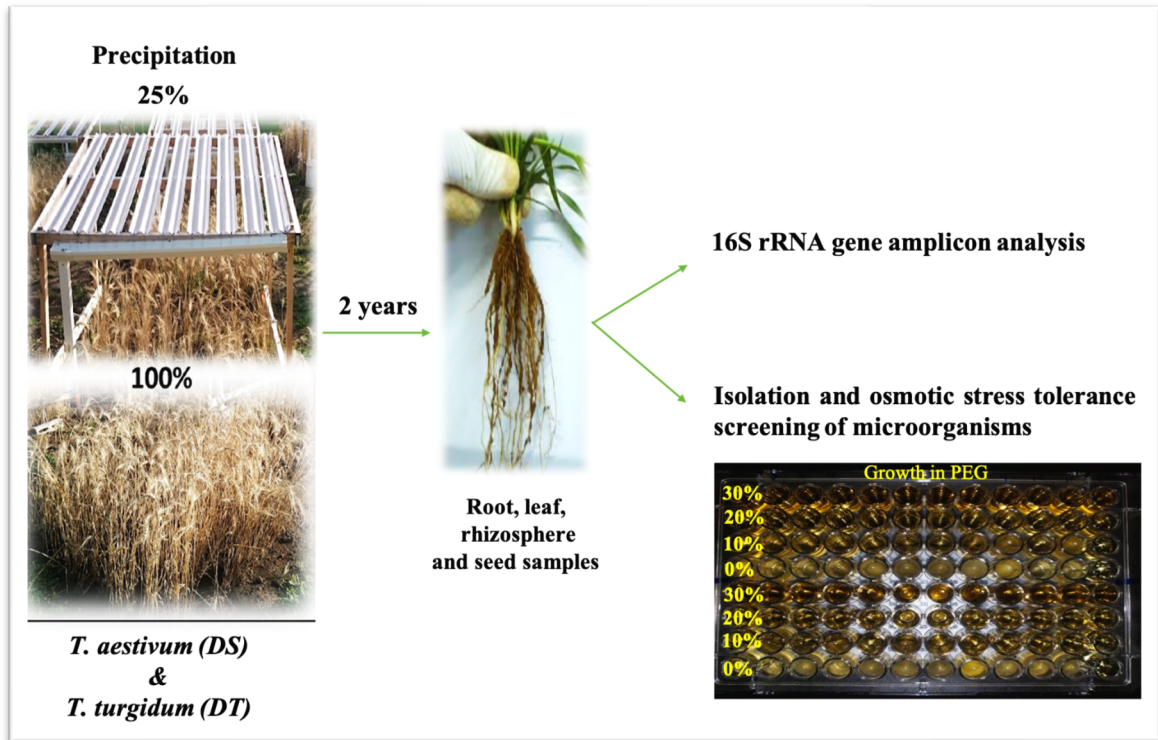


Figure 3-1 Illustration of the methodology used to subject wheat plant to drought in the field and the test of microbial growth in osmotic stress in laboratory

3.3.2 Isolation media

We used eight different solid culture mediums (tap-water yeast extract (TWYE), tryptic-soy agar (TSA), Reasoner's 2A agar (R2A), potato dextrose agar (PDA), Czapek-Dox agar, soil extract, plant extract and artificial root exudates (solution 2) (Baudoin, Benizri and Guckert 2003)) to maximize the diversity of isolates. For the soil and the plant extract media, 10 seeds of the two wheat genotypes were seeded separately in 500 g of commercial organic soil, maintaining the SWC at 50% of soil holding capacity for 20 days in triplicates pots. The plants were then harvested, and 50 g of plant leaves and root-adherent soil were crushed separately in 100 ml of autoclaved water then ground with an electric mixer. The extracted mixture was then filtered at 0.22 μm and the flow-through was mixed with the same volume of autoclaved 3% agar maintained at 45 $^{\circ}\text{C}$. The two media were then poured into sterile petri dishes.

3.3.3 Surface sterilization and microbial isolation

Bacteria and fungi were isolated from the rhizosphere, and surface-sterilized roots, seeds and leaves of the two wheat genotypes from the 25% and 100% treatments of blocks 1 and 2 of the precipitation manipulation field experiment. The surface

sterilization of 0.1g of harvested plant material was done according to Tardif *et al.* (2016) with some modifications. Thoroughly rinsed samples were immersed for 5 min in 95% ethanol, for 10 min in 2.5% NaOCl with gentle shaking every minute, for 5 min in 95% ethanol, and rinsed 3 times in autoclaved distilled water. The final water wash was plated on three TSA plates (100 μ l per petri) and incubated at 30 °C for 24h to check the success of surface sterilization. Rhizosphere soils and surface sterile plant material (0.1g) were crushed with a sterile pestle and mortar in 1 ml of autoclaved saline water (0.9% NaCl). A hundred microliters of this crushed plant and soil material were mixed with 0.9 ml of sterile saline water and then serially diluted in (10^{-1} to 10^{-6}) in sterile saline water. A hundred microliters of the four last dilutions were plated on the 8 different media and incubated at 28 °C for 24h for the 10^{-3} and 10^{-4} dilutions on TWYE, TSA, R2A, for 48h for the 10^{-5} and 10^{-6} dilutions on TWYE, TSA, R2A, or for 5 to 7 days for all dilutions plated on the plant, soil and artificial root exudates media. The PDA and Czpaek-Dox agar plates were incubated at 25 °C for 48h for the 10^{-3} and 10^{-4} dilutions and for 5 days for the 10^{-5} and 10^{-6} dilutions. The streaking method was used to isolate all colonies separately on TSA (bacteria) or PDA (fungi) plates. Each isolated bacterial colony was grown in TSB supplemented with 15% glycerol and then frozen at -20 °C. For fungi, an agar plug with abundant mycelia was immersed in 70% glycerol before freezing at -20 °C.

3.3.4 Screening of the isolates for growth in polyethylene-glycol

The isolated microorganisms were screened for their capacity to grow in liquid culture under reduced water availability in 96-well plates. Each isolate was inoculated in TSB (bacteria) or yeast-extract peptone dextrose broth (YPD; fungi) and incubated for 24h at 28 °C with shaking at 240 rpm. A volume of 350 μ l of each liquid culture was then inoculated in 0.2 ml of TSB (bacteria) or YPD (fungi) containing various concentrations of PEG-600. 0%, 10%, 20%, 30% of PEG (v/v) (Figure 3.1) were used to simulate water stress (Marulanda, Barea and Azcón 2009) by generating hyperosmotic conditions (Michel and Kaufmann 1973). The plates were incubated for 24h at 28 °C under aerobic conditions with shaking at 140 rpm. Growth was deemed positive when the opacity of the well changed.

3.3.5 DNA extraction

For bacterial isolates, DNA was extracted by phosphate-buffered saline (PBS) lysis using the thermal shock method. For that, 20 μ l of the glycerol-preserved bacteria was diluted in 2 ml of TSB and incubated at 28 °C for 24 h with shaking at 240 rpm. A

volume of 1.5 ml of each culture was centrifuged at 1,400 rpm for 10 min. The pellet was washed in 500 µl of autoclaved PBS and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. Cell lysis was achieved by resuspending the pellet in 100 µl of PBS. Tubes were incubated at 100 °C for 10 min followed by 10 min on ice. The supernatant containing the DNA was recovered in sterile Eppendorf tubes after 10 min of centrifugation at 14,000 rpm. For fungal isolates, glycerol-preserved fungal agar plugs were deposited on PDA and incubated at 25 °C for 48h. A small quantity of mycelia was transferred to 100 µl of sterile water in a microcentrifuge tube and vortexed thoroughly and centrifuged at 10,000 g for 2 min. The pellet was then resuspended in 100 µl of lysis solution (50 mmol/l sodium phosphate at pH 7.4, 1 mmol/l EDTA and 5% glycerol) and DNA was extracted as previously described (Zhang *et al.* 2010). For DNA extraction from plant tissue, leaves and roots were grounded in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Five hundred milligram of rhizosphere soil or ground plant tissues (pooled from 5–6 individual plants) was then used for DNA extraction using a phenol-chloroform extraction method (Dellaporta, Wood and Hicks 1983) as modified by Azarbad *et al.* (2018).

3.3.6 PCR amplification and library preparation

To identify isolates, the bacterial 16S rRNA gene was amplified by PCR using the universal primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Suzuki and Giovannoni 1996) and the fungal ITS1 region was amplified using ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). PCR products were purified and sent for forward and reverse Sanger sequencing at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (CESGQ) (Montréal, Canada). For Illumina 16S rRNA gene amplicon sequencing, the amplicon library construction was done as described previously in Yergeau *et al.* (2015) based on a dual-indexing strategy that followed the "16S Metagenomic Sequencing Library preparation" Illumina guide (Part #15 044 223 Rev. B). The V4 hypervariable region was amplified using the universal primers 520F (5'—AGCAGCCGCGGTAAT—3') and 799R2 (5'—CAGGGTATC TAATCCTGTT—3') (J. E. Edwards *et al.* 2007), that exclude plant plastids 16S rRNA genes. PCR products were purified, pooled and submitted for 2 × 250 bp Illumina MiSeq sequencing at the CESGQ.

3.3.7 Bioinformatic analyses

16S rRNA gene amplicon sequencing data was analyzed using AmpliconTagger (Tremblay and Yergeau 2019). Raw reads were controlled for quality. Remaining high quality reads and free of sequencing adapters artefacts were dereplicated at 100% identity and clustered/denoised at 99% (DINAclust v3). Clusters of less than three reads were discarded and remaining clusters were scanned for chimeras using UCHIME, first in de novo mode then in reference mode (Edgar et al. 2011). Remaining clusters were clustered at 97% identity (DINAclust v3) to produce OTUs. OTUs were assigned a taxonomic lineage with the RDP classifier (Wang et al. 2007) using the Silva release 128 database (Quast et al. 2013) supplemented with eukaryotic sequences from the Silva database and a customized set of mitochondria, plasmid and bacterial 16S sequences (see the AmpliconTagger databases DOI:10.5281/zenodo.3560150). The RDP classifier gave a score (0 to 1) to each taxonomic depth of each OTU. For each OTU, the taxonomic lineage was reconstructed by keeping only the taxa that had a score ≥ 0.5 . To normalize the OTU table, thousand-reads rarefactions were then performed 500 times and the average number of reads of each OTU of each sample was then computed to obtain a consensus normalized OTU table.

For Sanger sequencing and the identification of isolates, sequence data were treated using the Genious software (Genious Prime 2021.0.3, Biomatters, *Inc.*, San Diego, USA). We first proceeded by inspecting the electropherogram and replacing unresolved sequencing peaks by Ns for both reverse and forward sequence reads. The two sequences were then merged by the *de novo* assembly method and the merged sequences were identified through Blast searches in the NCBI database, keeping only hits with more than 97% similarity. The bacterial isolates that were highly resistant to osmotic stress (i.e. that grew in PEG 30%) were matched to their representative OTUs (from the normalized OTU table) by locally Blasting the 16S rRNA gene sequences of the isolates against the sequence representative of each OTU and keeping only hits that had >97% identity over at least 200 bp. We thereby created a truncated normalized OTU table that matched the osmotic stress resistant isolates.

3.3.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R (version 4.0.3, The R Foundation for Statistical Computing). Shapiro-Wilks and Levene tests revealed that, even after log or square root transformation, the alpha diversity and relative abundance data did not meet the assumptions for parametric ANOVA. Therefore, four independent one-way Kruskal-Wallis tests by rank were performed for the effects of Precipitation,

Compartment, Genotype and Block. In the case of compartments, when the Kruskal-Wallis tests were significant, we performed pairwise Mann-Whitney U-tests to determine which compartment significantly differed from the others. The effect of Precipitation, Compartment and Genotype on the bacterial community structure was visualized using principal coordinate analyses (PCoA) and tested using Permanova with 1,000 permutations (including Blocks as a controlling factor), both based on Bray-Curtis dissimilarity calculated from the normalized OTU table. For significant Permanova results, we further tested if this effect was due to differences in the dispersion of the samples within each group (beta-dispersion). Indicator species analysis was performed on the OTU table to single out OTUs that were strongly linked to either the 25% or 100% precipitation treatments. Chi-square test for contingency tables was used to test, for the different treatments (compartment, wheat genotypes and precipitation treatments), if the observed frequency of isolates that could grow in PEG 30% differed significantly from expected values under the null hypothesis.

3.3.9 Data availability

The raw amplicon datasets and associated metadata are available through NCBI BioProject accession PRJNA767855.

3.4 Results

3.4.1 Bacterial community structure, composition and diversity

The principal coordinate analyses (PCoA) showed that the plant compartment (leaf, root, rhizosphere) was the main factor influencing the bacterial community structure, with a visible effect of wheat genotype and precipitation levels for some compartments (Figure 3.2). Accordingly, in Permanova tests, plant compartment and genotype were the factors having the strongest influence followed by precipitation (Table 3.1). In the case of compartment, there was also significantly different ($P < 0.001$) dispersion among groups in beta-dispersion analyses. Compartment and genotype also significantly interacted to shape the microbial community structure. This can be visualized by the separation of the DS genotype from the DT genotype for the leaf samples, a pattern that was not clear for the other compartments (Figure 3.2). Beta-dispersion analysis was also significant for the Compartment: Cultivar interaction ($P=0.033$). In Permanova, the effect of the precipitation treatments had a marginally significant main effect ($P=0.072$) and a similarly marginally significant interactive effect with compartment ($P=0.070$, Table 3.1). In the PCoA, the precipitation treatments are well separated for the root samples, but not for the other compartments (Figure 3.2). The interactive effects were confirmed by running Permanova for each compartment separately (Table 3.2). We found a significant genotype effect only in the leaf samples, and a significant effect of the precipitation manipulations only in the root samples (Table 3.2).

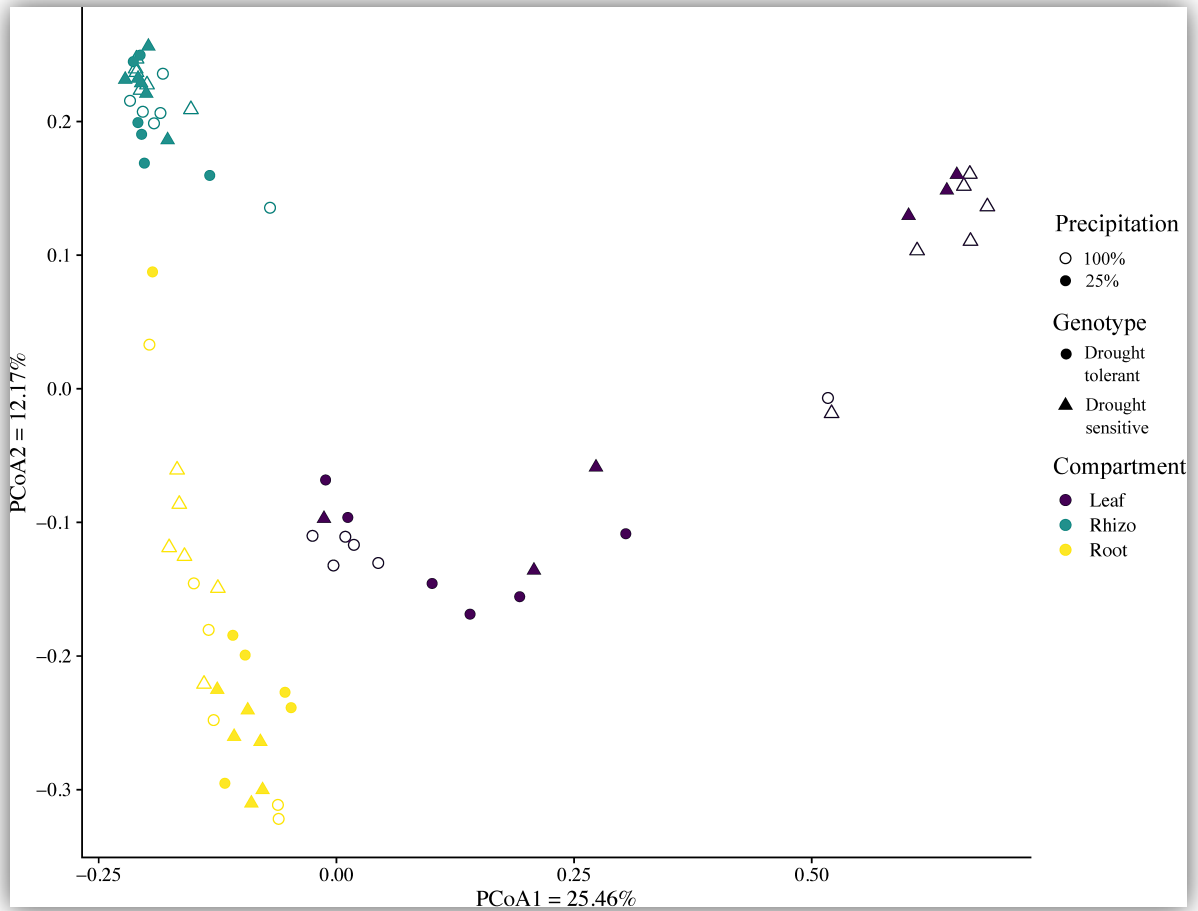


Figure 3-2 Principal coordinates analysis of Bray–Curtis dissimilarities calculated from the bacterial 16S rRNA gene OTUs relative abundance for leaf, root and rhizosphere samples from two wheat cultivars (drought-tolerant and drought-sensitive) growing in the field under two precipitation levels (25% and 100%).

Tableau 3-1 Permanova tests for the effects of precipitation manipulation, genotype, compartments and their interactions on the bacterial community structure based on Bray-Curtis dissimilarities.

<i>Factor</i>	<i>Df</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Compartment (C)</i>	2	0.439	39.02	0.001 ***
<i>Genotype (G)</i>	1	0.047	8.389	0.001 ***
<i>Precipitation (P)</i>	1	0.012	2.193	0.072 .
<i>Block</i>	5	0.047	1.681	0.029 *
<i>C: G</i>	2	0.094	8.426	0.001 ***
<i>C: P</i>	2	0.021	1.792	0.070 .
<i>G: P</i>	1	0.010	1.832	0.131
<i>C:G:P</i>	2	0.018	1.630	0.101
<i>Residual</i>	55	0.309		
<i>Total</i>	71	1.000		

***: P <0.001, **: 0.001 <P <0.01, *0.01 <P <0.05, .: 0.05 <P <0.10

Tableau 3-2 Permanova tests for the effects of precipitation and genotype on rhizosphere, root and leaf-associated bacterial community structure based on Bray-Curtis dissimilarities.

	Rhizosphere				Leaf				Root			
	Df	F	R ²	P	Df	F	R ²	P	Df	F	R ²	P
<i>Genotype</i>	1	1.21	0.05	0.21	1	12.02	0.35	0.001***	1	1.20	0.05	0.24
<i>Precipitation</i>	1	0.71	0.31	0.86	1	1.17	0.05	0.259	1	2.27	0.09	0.01**

***: P <0.001, **: 0.001 <P <0.01, *0.01 <P <0.05, .: 0.05 <P <0.10

Bacterial alpha diversity (Shannon index) had a mean of 4.45 and did not vary significantly across the treatments ($P > 0.05$ in Kruskal-Wallis tests). In contrast, the community composition was significantly affected by the compartments, with compartment having a highly significant effect on all dominant phyla/classes (Table 3.3). Post-hoc pairwise tests showed that for Actinobacteria, Betaproteobacteria, and Gammaproteobacteria, the three compartments were significantly different from each other, with Gammaproteobacteria being more abundant in the leaves, Actinobacteria in the rhizosphere and Betaproteobacteria in the roots (Figure 3.3, Table 3.3). Bacteroidetes were significantly more abundant in the roots, as compared to the two other compartments, whereas Gemmatimonadetes and Deltaproteobacteria were significantly more abundant in the rhizosphere as compared to the leaves and roots (Figure 3.3, Table 3.3). The Alphaproteobacteria were significantly less abundant in the leaves as compared to the two other compartments (Figure 3.3, Table 3.3). Finally, the Firmicutes were significantly less abundant in the roots as compared to the rhizosphere, but their relative abundance in these two compartments did not differ significantly from their relative abundance in the leaves (Figure 3.3, Table 3.3). The Firmicutes were significantly more abundant on the DT cultivar as compared to the DS cultivar (Figure 4.3, Table 3.3). Indicator species analyses highlighted 63 OTUs that were indicators of the 25% precipitation treatment and 26 that were indicators of the 100% precipitation treatment (Annexe 1: Table 7.1). Among the 25% treatment indicators, 26 belonged to the Proteobacteria, 17 to the Bacteroidetes, 9 to the Actinobacteria and 3 to the Firmicutes (Annexe 1: Table 7.1). Among the 100% treatment indicators, 14 belonged to the Proteobacteria, 2 to the Bacteroidetes, 2 to the Actinobacteria and 2 to the Firmicutes (Annexe 1: Table 7.1).

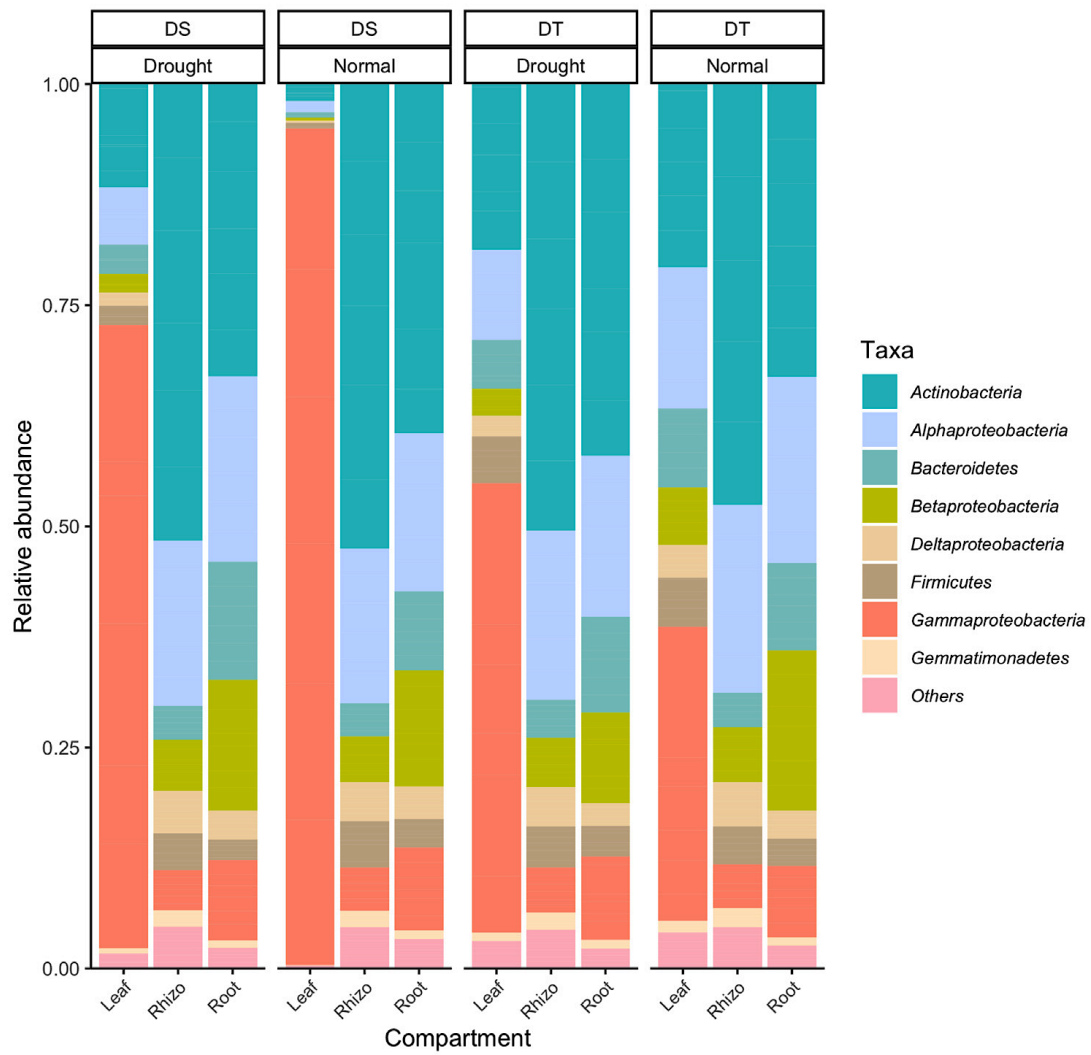


Figure 3-3 Relative abundance of the phyla/classes that accounted for, on average, more than 1% of the bacterial 16S rRNA gene reads retrieved from leaf, root and rhizosphere samples from two wheat cultivars (drought-tolerant and drought-sensitive) growing in the field under two precipitation levels (25% and 100%).

Tableau 3-3 Kruskal-Wallis and post-hoc Mann-Whitney U tests for the effects of precipitation, genotype, and compartments on the relative abundance of the bacterial phyla/classes that represented, on average, over 1% of the reads in the 16S rRNA gene amplicon dataset.

FACTOR		ACTINO.	BACTEROI	FIRMICUT	GEMMA.	ALPHA.	BETA.	DELTA.	GAMMA
COMP ARTM ENT	Df	2	2	2	2	2	2	2	2
	X ²	55.58	34.85	9.76	37.99	31.54	45.21	31.93	58.76
	P	8.5 x 10⁻¹³	2.7 x 10⁻⁸	0.007	5.6 x 10⁻⁹	1.4 x 10⁻⁷	1.5 x 10⁻¹⁰	1.2 x 10⁻⁷	1.7 x 10⁻¹³
	Post- hoc	L Rh R a b c	L Rh R a a b	L Rh R ab b a	L Rh R a b a	L Rh R a b b	L Rh R a b c	L Rh R a b a	L Rh R a b c
GENO TYPE	Df	1	1	1	1	1	1	1	1
	X ²	0.07	3.67	8.73	3.60	1.97	1.63	1.16	0.51
	P	0.79	0.05	0.003	0.057	0.16	0.20	0.28	0.47
PRECI PITATI ON	Df	1	1	1	1	1	1	1	1
	X ²	0.49	0.68	0.00	0.02	0.02	0.86	0.54	0.22
	P	0.48	0.41	0.99	0.87	0.87	0.35	0.46	0.74
BLOC K	Df	5	5	5	5	5	5	5	5
	X ²	0.81	2.23	2.56	1.01	4.61	1.68	1.71	1.23
	P	0.97	0.82	0.77	0.96	0.46	0.89	0.88	0.94

Values in boldtype face are significant at P <0.05.

3.4.2 Microbial isolation and screening

We isolated 542 microorganisms from the different wheat compartments (147 (27.1%) from roots, 152 (28.0%) from leaves, 204 (37.6%) from rhizosphere soil and 39 (7.2%) from seeds) of the two genotypes (304 (56.1%) for DT and 238 (43.9%) for DS) growing under different precipitation treatments (297 (54.8%) for 100% precipitation and 245 (45.2%) for 25% precipitation). Among these, 223 isolates (41.1% of all isolates) could grow in liquid media supplemented with 20% PEG. In liquid media supplemented with 30% PEG, only 44 isolates (8.1% of all isolates) were able to grow, comprising 32 bacteria, 9 fungi and 3 unidentified isolates (Table 3.4). Among the 32 bacterial isolates that grew in PEG 30%, 52% belonged to the Firmicutes, 39% to the Actinobacteria and 9.7% to the Proteobacteria (Table 3.4), as compared to relative frequencies of 67.6% for Firmicutes, 26.6% for Actinobacteria and 5.8% for Proteobacteria for all bacterial isolates that could be identified by Sanger sequencing. Eight of the nine fungal isolates growing in liquid media supplemented with PEG 30% were *Penicillium* spp. and the other was *Cladosporium* sp. (Table 3.4). Isolates from leaves were more often able to grow in liquid media supplemented with 30% PEG (15/152, 9.9% of leaf isolates) than isolates from other compartments (3/39, 7.7% for seeds, 16/204, 7.8% for rhizosphere and 10/147, 6.8% for roots) (Figure 3.4). To test if the frequency of isolates being able to grow in liquid media supplemented with 30% PEG significantly differed from expected values if the treatments had no effect, we performed a chi-square test for each of the experimental factors. Precipitation and genotype did not significantly change the frequency of isolates that could grow in PEG 30% ($\chi^2 = 0.00$, $df=1$, $P=1$ and $\chi^2 = 0.09$, $df=1$, $P=0.763$, respectively). However, there was a significant effect of the compartment on the frequency of isolates that could grow in PEG 30% ($\chi^2 = 9.64$, $df=3$, $P=0.0219$).

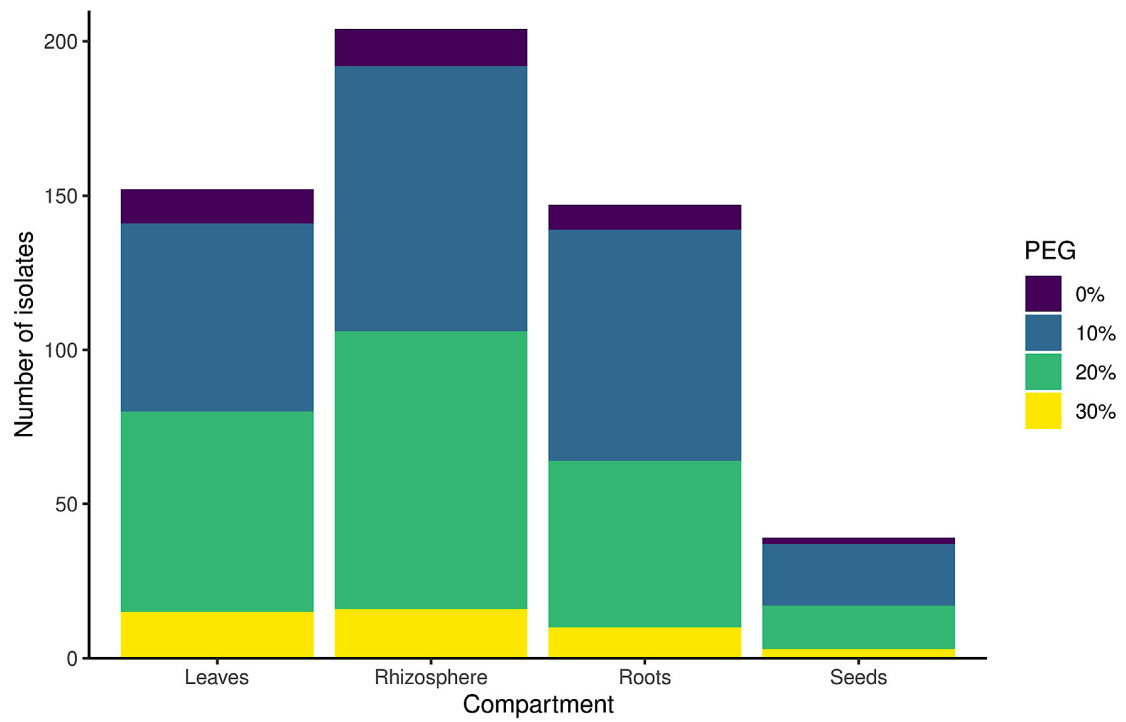


Figure 3-4 Number of microbial isolates from leaves, rhizosphere, roots and seeds that could grow in liquid media supplemented with 0%, 10%, 20% or 30% of polyethylene glycol (PEG-600).

Tableau 3-4 Taxonomical assignment and source of isolation of bacterial and fungal isolates that grew in media supplemented with 30% PEG based on Blast searched in NCBI.

GENOTYP	COMPARTM	PRECIPITAT	IDENTITY (%)	ASSIGNMENT
BACTERIA				
DT	Leaves	25%	99.5	<i>Bacillus sp.</i>
DS	Leaves	25%	99.5	<i>Bacillus pumillus</i>
DS	Leaves	25%	97.3	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
DT	Leaves	100%	99.9	<i>Bacillus sp.</i>
DT	Leaves	100%	100	<i>Psychrobacillus sp.</i>
DS	Leaves	25%	100	<i>Bacillus pumilus</i>
DT	Leaves	25%	99.1	<i>Micrococcus sp.</i>
DS	Rhizosphere	100%	99.6	<i>Streptomyces sp.</i>
DS	Rhizosphere	100%	99.4	<i>Rhodococcus fascians</i>
DT	Rhizosphere	100%	100	<i>Microbacterium maritypicum</i>
DT	Rhizosphere	100%	100	<i>Microbacterium oxydans</i>
DT	Rhizosphere	100%	97.6	<i>Microbacterium arborescens</i>
DT	Rhizosphere	100%	99.9	<i>Sporosarcina ureae</i>
DT	Rhizosphere	25%	99.9	<i>Pseudomonas sp.</i>
DT	Rhizosphere	25%	99.9	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
DT	Rhizosphere	25%	100	<i>Microbacterium oleivorans</i>
DS	Rhizosphere	25%	100	<i>Microbacterium sp.</i>
DS	Rhizosphere	25%	99.9	<i>Alcaligenes sp.</i>
DS	Rhizosphere	25%	99.9	<i>Alcaligenes sp.</i>
DS	Rhizosphere	100%	99.7	<i>Bacillus aryabhatai</i>
DS	Rhizosphere	100%	98.8	<i>Pseudarthrobacter sp.</i>
DT	Roots	25%	97.7	<i>Sphingobacterium sp.</i>

DT	Roots	25%	99.9	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
DT	Roots	100%	98.1	<i>Bacillus sp.</i>
DT	Roots	100%	99.8	<i>Solibacillus silvestris</i>
DT	Roots	25%	97.0	<i>Bacillus megaterium</i>
DS	Roots	25%	99.6	<i>Bacillus megaterium</i>
DS	Roots	100%	100	<i>Bacillus aryabhatai</i>
DS	Roots	100%	99.9	<i>Arthrobacter sp.</i>
DS	Roots	100%	98.7	<i>Bacillus aryabhatai</i>
DS	Seeds	100%	99.5	<i>Bacillus pumilus</i>
DS	Seeds	100%	99.7	<i>Bacillus aerius</i>
FUNGI				
DT	Seeds	25%	97.5	<i>Penicillium sp.</i>
DT	Rhizosphere	100%	98.8	<i>Penicillium sp.</i>
DS	Rhizosphere	25%	99.2	<i>Cladosporium sp.</i>
DT	Shoot	25%	100	<i>Penicillium sp.</i>
DT	Shoot	25%	98.9	<i>Penicillium sp.</i>
DT	Shoot	25%	99.1	<i>Penicillium sp.</i>
DS	Root	25%	98.9	<i>Penicillium sp.</i>
DS	Shoot	100%	99.3	<i>Penicillium sp.</i>
DS	Shoot	100%	99.2	<i>Penicillium sp.</i>

DS: Drought sensitive.

DT: Drought tolerant.

3.4.3 OTUs corresponding to the PEG 30% isolates

We Blasted the 16S rRNA gene sequences from the 32 bacterial isolates that grew in liquid media supplemented with 30% PEG against the consensus sequences of the OTUs derived from the amplicon sequencing dataset, to identify which OTUs corresponded to our isolates. These OTUs represented 0.51% of all OTUs (24 OTUs out of 4,672 OTUs) and 3.2% of all reads (37,348 reads out of 1,173,132 reads). We performed statistical analyses on this subset of OTUs, to determine if they responded to the treatments as the general community. Compartment, Genotype, Precipitation, and the Cultivar: Genotype and the three-way interactions were all significant (Table 3.5). Three OTUs that matched our PEG 30% bacterial isolates were also found as indicators for the 25% precipitation treatment and were identified as *Rhodococcus* (Actinobacteria), *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) and *Microbacterium* (Actinobacteria) (Annexe 1 : Table 7.1).

Tableau 3-5 Permanova test for the effects of precipitation manipulation, genotype, compartments, and their interactions on the community structure of the OTUs that matched the 16S rRNA gene of the bacterial isolates growing in TSB supplemented with 30% PEG.

<i>Factor</i>	<i>Df</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Compartment (C)</i>	2	0.26	15.52	0.001 ***
<i>Genotype (G)</i>	1	0.033	3.881	0.006 **
<i>Precipitation (P)</i>	1	0.216	2.529	0.032 *
<i>Block</i>	5	0.073	1.724	0.024 *
<i>C: G</i>	2	0.063	3.699	0.001 ***
<i>C: P</i>	2	0.027	1.618	0.098 .
<i>G: P</i>	1	0.013	1.551	0.165
<i>C:G:P</i>	2	0.035	2.031	0.035 *

***: $P < 0.001$, **: $0.001 < P < 0.01$, *: $0.01 < P < 0.05$, .: $0.05 < P < 0.10$

3.5 Discussion

Here, we experimentally manipulated precipitation levels in the field and assessed its effect on the microbial community, not only through an amplicon sequencing approach but also by retrieving microbial isolates and testing their resistance to osmotic stress in link with the experimental treatments. In contrast to our hypothesis, the precipitation reduction only modified the community structure in the roots and, consequently, did not increase the frequency of water stress-resistant microorganisms in the wheat environment. Osmotic stress-resistant microorganisms were more frequently isolated from the leaf endosphere, and the bacterial OTU community matching these isolates was significantly influenced by the plant compartment. This suggests that the frequency of water-stress resistance naturally varies across plant-associated habitats. Even though they were relatively depleted in Actinobacteria (the phylum to which belonged most of our resistant isolates), the leaf endosphere yielded more frequently isolates that could grow at high osmotic pressure (PEG 30%). The assembly of the leaf endophytic bacteria results either from the colonization of the rhizosphere followed by migration or through colonization from the leaf surface community (Compant, Clément and Sessitsch 2010). The model put forward by Xiong et al. (2021) suggests that plant-associated bacterial communities are gradually filtered from the bulk soil to the different plant compartments. This would result in leaf microbiomes with lower diversity, less complex networks (Xiong et al. 2021) and lower biomass (Azarbad et al. 2018). This also suggests that leaf endophytic bacteria must possess several very specific physiological adaptations to migrate through the xylem or nutrient-rich intracellular spaces and finally colonize the leaf endosphere (Compant, Clément and Sessitsch 2010). One of these adaptations could be growing at high osmotic pressure. Alternatively, leaf surfaces are believed to be one of the harshest microbial plant environments, with very little nutrient and water available and high solar irradiation (Kowalchuk et al. 2010; Bulgarelli et al. 2013). It would therefore not be surprising if microbes that migrated from this environment into the leaf endosphere would be more frequently able to grow under high osmotic pressure. However, the frequency of resistant microorganisms did not exceed 10% of the leaf isolates retrieved, which suggests that the ability to grow at high osmotic pressure is not a major trait needed for adaptation to the leaf endosphere environment. Because microorganisms that were not isolated here (either because they are not culturable or because our isolation effort was not enough) could grow at high osmotic pressure, it is difficult to conclude if this trait is important for life in the leaf endosphere. Other mechanisms of adaptation to low

water availability, such as dormancy, could also be more prevalent among the leaf endospheric community.

Even though the bacterial communities were generally not affected by the precipitation manipulations, some results suggested an effect on the osmotic stress resistant microorganisms. Many bacterial OTUs were indicators for the 25% precipitation treatment, including three that matched with the PEG 30% bacterial isolates. Precipitation treatment was also significant when focusing the analyses on the OTUs that matched the PEG 30% bacterial isolates. This suggests that experimentally reducing precipitations favored bacteria with a high resistance to osmotic stress, even though this reduction in precipitation had minor effects on soil water content (reduction of soil water content by 23%, from 19% to 14.5%) and did not visibly stress the plants. Since these osmotic-stress resistant bacteria were a relatively minor part of the community (the OTUs matching PEG 30% isolates accounted for 3.2% of the total reads), the effects of the precipitation treatments were not clearly visible in global tests and on the isolation frequency. Rare microorganisms are thought to play central roles under changing environmental conditions, and the relatively infrequent osmotic stress resistant bacteria detected here could play a key role under more severe water stress.

As compared to leaf isolates, root and rhizosphere isolates were less frequently able to grow at high osmotic pressures, and when taken separately, the root bacterial community was significantly affected by the precipitation treatments. This heightened sensitivity of the root microbial communities to changes in water availability was previously shown for field-grown sorghum, where root microbial community composition was more sensitive to drought which also resulted in a decreased total bacterial abundance (Xu et al. 2018). In addition, drought stress can reduce root biomass and development (Azarbad et al. 2018; Xu et al. 2018), induce changes in exudates (Rizaludin et al. 2021) and have a significant effect on root transcriptional (Xu et al. 2018) and metabolomics activity (Liu et al. 2020), suggesting an indirect plant-mediated route by which root-associated microbes can be affected by changing water availability. This might explain why, the later the drought event occurs in the development of the plant, the lower the impact on the composition of the root microbial community (Xu et al. 2018). Taken together, this implies that a lower frequency of osmotic stress resistant microorganisms and the potential for indirect plant-mediated effects make the root microbial communities particularly sensitive to change in soil water availability.

Significant differences between the two wheat genotypes were also observed. Differences between the microbial communities of different plant genotypes were often

reported (Berg *et al.* 2006; Garbeva, van Elsas and van Veen 2008; Azarbad *et al.* 2020 ; Wagner, Busby and Balint-Kurti 2020) and linked to differences in protein-level responses to drought for different genotypes (Budak *et al.* 2013), or specific root exudation patterns across genotypes (Garbeva, van Elsas and van Veen 2008; Sasse, Martinoia and Northen 2018). However, recent reports showed that the strength of the wheat genotype effect on microbial communities is often subtle and can be dwarfed by other factors (such as plant compartments in the present study), and can even sometimes completely disappear (Yergeau, Quiza and Tremblay 2020). We also isolated osmotic stress resistant bacteria from the two cultivars at the same frequency, suggesting that the differences between the plant genotype in their resistance to water stress are not necessarily mirrored in their associated microbial communities.

Our result showed that the Actinobacteria were overrepresented among the isolates having a high resistance to osmotic stress, being represented by five genera (*Streptomyces*, *Micrococcus*, *Artrobacter*, *Microbacterium* and *Rhodococcus*). Together with the Firmicutes, they represented over 90% of the osmotic stress resistant isolates, which is consistent with recent research that demonstrated that Actinobacteria and Firmicutes are more resistant to drought conditions as compared to the Proteobacteria (Xu *et al.* 2018). In amplicon sequencing studies, the Actinobacteria generally increase their abundance under drier conditions (Barnard, Osborne and Firestone 2013; Xu *et al.* 2018; Azarbad *et al.* 2020, 2021 ; Simmons *et al.* 2020 ; Wipf, Bui and Coleman-Derr 2020), which can be modulated by the duration of the dry period (Xu *et al.* 2018) and the plant development stage (Xu *et al.* 2018; Simmons *et al.* 2020). In contrast to other phyla containing water stress-resistant bacteria, such as the Proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes and Planctomycetes, the Actinobacteria seem to be particularly adapted to life in dry environments as they synthesize and accumulate ribosomes throughout dry periods, which makes them able to get a head start as soon as conditions become more favorable for nutrient acquisition (Barnard, Osborne and Firestone 2013). Our culture-based approach allows us to indicate that this pattern of increased abundance could also be due to a better ability of the Actinobacteria to grow under high osmotic stress. In contrast, although the relative abundance of the Firmicutes is known to increase under dry conditions (Azarbad *et al.* 2021; Xu *et al.* 2018), they were underrepresented among the isolates that were able to grow in liquid media supplemented with 30% PEG, suggesting that they might use different mechanisms to survive drier conditions, such as spore formation.

In conclusion, our study shows the value of combining culture-based approaches to more commonly used amplicon sequencing approaches. Indeed, using this combined methodology we were able to confirm the osmotic stress resistance of the bacterial communities associated with wheat plants subjected to reduced precipitation. Although the reduction in precipitation did not increase the frequency of isolation of osmotic stress resistant microorganisms, we were able to show that wheat leaves are a potential source of such isolates and that reduction in precipitations does affect the osmotic stress resistant bacterial community. With these isolates in hand, the next steps would be to test for their capacity to improve wheat resistance to drought, toward the development of microbe-based solutions to mitigate the impact of global changes on crops.

3.6 Acknowledgments

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Strategic grant for projects STPGP 494702 to EY). This research was enabled in part by support provided by Calcul Québec (www.calculquebec.ca) and Compute Canada on the Graham compute cluster (University of Waterloo) (www.computecanada.ca).

3.7 Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.8 References

All references for this chapter are listed at the end of this document in the reference list.

4 DECIPHERING THE GENOMIC FACTORS GOVERNING WHEAT HOLOBIONT'S RESISTANCE TO WATER STRESS USING A SYNTHETIC MICROBIAL COMMUNITY DESIGN

Authors: Asmaâ Agoussar¹, Julien Tremblay², Étienne Yergeau¹

¹ Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada.

² Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, 6100 avenue Royalmount, Montreal, QC, H4P 2R2, Canada.

*Correspondance to : Etienne Yergeau, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada. Tel. : +1 450-687-5010 ext. 8881, etienne.yergeau@inrs.ca

4.1 Abstract

Manipulating microbial communities is seen as one way to increase crop resistance to environmental stressors. It is, however, not clear what is the best method to manipulate microbial communities. Here, we compared a commercial inoculum to four inoculum development methods in term of their effect on wheat growth under water stress. The four methods were: 1) random selection from an isolate bank, 2) directed selection from an isolate bank, 3) cell extraction from dry soil, 4) cell extraction from a well-watered soil. The largest changes in wheat biomass were observed for the directed-selected inoculum. We then looked at two potential mechanisms of action: 1) direct action, by sequencing and screening the genomes of the inoculated bacteria, 2) indirect action, by sequencing the 16S rRNA gene and ITS region of rhizosphere, root and leaves microbial communities. The microbes in the inoculum harbored many traits related to plant growth promoting, competition and water stress resistance. The inoculation also resulted in significant shifts in the microbial communities associated with wheat. We conclude that the inoculum developed in this study increased wheat growth because it potentially acted on two fronts: directly, through the traits it was selected for, and indirectly, through shifts in the resident plant microbial communities. This double effect of multispecies inoculum could enhance efforts to manipulate crop microbial communities.

4.2 Introduction

Manipulating or engineering the microbiota could be one possible avenue to help crops better resist to drought (Farrar, Bryant, and Cope-Selby 2014; Quiza, St-Arnaud, and Yergeau 2015; Agoussar and Yergeau 2021). Some microorganisms have previously shown a positive effect on plant growth and have increased the resistance of wheat to environmental stress (Emami et al. 2020; Giri, Shitut, and Kost 2020; Hone et al. 2021). In parallel, water stress may also directly and indirectly affect microbial communities. Changes in soil water availability was shown to affect the microbial communities associated with wheat (Azarbad et al. 2018; 2020; Giard-Laliberté et al. 2019; Agoussar et al. 2021). More generally, the plant microbiome can change by selection (reduce or amplify already present members), speciation (gradual mutation or, horizontal gene transfer, HGT), dispersal (recruitment or migration) or drift (random life and death events) (Agoussar and Yergeau 2021). In one of our studies, we observed that most changes in the wheat microbiota under water stress resulted from alterations in the relative abundance of present microbes, with little recruitment from an inoculum or from the bulk soil (Giard-Laliberté et al. 2019). It might therefore be that engineering methods based on more than one mechanism, like dispersal and selection, could be more successful. Microbial consortia selected for multiple complementary traits could fill this role.

The inoculation of mixed microbial isolates, known as SynCom or consortium, has been used to enhance crop growth in stressful conditions (Figueiredo et al. 2008; Riaz et al. 2021; Yadav, Bhagat, and Sharma 2022). Isolates from drought-prone plants and their rhizospheres can provide better drought resistance to plants (Redman et al. 2011; Timmusk et al. 2011), through manipulations of plant hormones (Glick 2014; Defez et al. 2017), provision of osmolytes ((Madkour, Smith, and Smith 1990; Gagné-Bourque et al. 2016; Vilchez et al. 2018; N. Khan et al. 2019; Paul and Nair 2008) or modification of the plant epigenetics (Hubbard 2012; Hubbard, Germida, and Vujanovic 2014). To enhance growth under water stress, the inoculated microbes should not only be able to resist to water stress but also to promote plant growth (e.g. PGPB), through provision of nutrients, manipulation of plant hormones, among others (Babalola 2010; Camaille et al. 2021; Sandhya et al. 2009). Additionally, a pivotal factor influencing plant-microbe interactions and their stress tolerance is the production of some bioactive compounds as the secondary metabolites. Those compounds can be the key factors to promote water stress resilience by acting as antioxidants to mitigate oxidative stress, enhance nutrient uptake or facilitate osmotic adjustment in plant. Another factor to consider is the compatibility of those microorganisms with the host – this will define

their capacity to colonize and establish themselves in the plant environment. For instance, *Arabidopsis* plants grown in their native soil exhibited greater resistance to moderate drought than those grown in soil where corn or pine was grown (Zolla et al. 2013). Microbial communities also vary from one plant compartment to another (Azarbad et al. 2020; Agoussar et al. 2021), resulting in different capacities to grow at low water availabilities (Agoussar et al. 2021). Finally, another trait often less considered is the capacity of the inoculated strains to modify the resident microbial communities, either by changing the community structure (Mallon et al. 2018; Mawarda et al. 2020) or its functional potential by horizontal gene transfer (Taghavi et al. 2005; Barcellos et al. 2007; Ling et al. 2016). This could indirectly impact plant growth and resistance to water stress. A better understanding of these mechanisms is crucial for the rational design of multi-species consortia.

Developing microbial consortia can be approached in various ways (Eng and Borenstein 2019). The community enrichment approach consists in subjecting a whole community to a selection pressure - water stress, contaminant, etc. - and using these selected communities as inoculant. The “reduction approach” is one of the most used and consist of the traditional isolation-screening approach. It can be effective to select the most suitable strains for particular traits. Although some studies have demonstrated the efficiency of selected beneficial microorganisms for inoculum creation (I. A. Khan, Ahmad, and Ayub 2003; Figueiredo et al. 2008; Maymon et al. 2015; 2015), comparison of methods and in-depth characterization beyond the plant responses are seldom performed.

Here, we hypothesize that a microbial selection approach based on laboratory screening tests will be superior for preparing a multi-species inoculum to improve wheat growth. To test this hypothesis, we prepared four different multi-species consortia from 1) random selection of isolated strains, 2) screening-based selection of isolated strains, 3) bacterial cell extraction from a dry soil, 4) bacterial cell extraction from a well-watered soil, and compared their effect on wheat growth under normal and water stress conditions. Furthermore, we sequenced the genomes of the isolates used in developing the most effective inoculant. We examined the impact of the inoculant on wheat-associated microbial communities, focusing on key genes and secondary metabolites responsible for bacterial resistance to water stress. This analysis provides insights into the mechanisms underlying the observed effects on wheat growth and its adaptive response to varying water availability.

4.3 Material and methods

4.3.1 SynComs preparation

4.3.1.1 Enrichment SynCom preparation

Two SynComs were prepared based on the community enrichment approach (Eng and Borenstein 2019). First, the soil was incubated in drought conditions at 30°C for two months, in an aluminum plate without cover, using an oven for the Enrichment-Dry-SynCom (Enrich-Dry), or in moisture conditions using a plastic box with a cover in an incubator. The soil was soaked with sterile water each week for the Enrichment-Moisture-SynCom (Enrich-Mois). The extraction of soil microbes for the two SynComs was done following the protocol described by Riis, Lorbeer, and Babel (1998).

4.3.1.2 Isolates-based SynCom preparation

Two SynComs were prepared with a mixture of 25 isolates each. The isolation and identification of microbial isolates were done based on the protocol described by Agoussar et al. (2021). First, the isolates were tested for their capability of growth under low water availability in liquid media supplemented by different concentrations of PEG as described in Agoussar et al. (2021). Subsequently, the isolates were individually evaluated for their potential to promote the germination and plant growth by inoculating five surface-sterilized wheat seeds with 1 ml of each isolate culture, or with sterile liquid media for the control. The germination test was performed in a small sterile petri dish covered with soaked sterile paper, and incubated at room temperature for three days. The surface sterilization of the seed was performed in 70% Ethanol for 2min followed by 0,5% NaOCl for 2min then five times wash in sterile water. Finally, the plant growth promoting capacity test was performed in sterile plastic Magenta boxes, and surface sterilized seeds were grown in autoclaved soil at room temperature watered daily with sterile water for one week. The results of both tests were categorized as positive, neutral or negative, based on their performance compared to the control group. A total of 25 isolates that exhibited positive results in all three tests were selected to form the Screening-SynCom. On the other hand, the Random-SynCom was composed of 25 wheat isolates randomly chosen from the larger pool of 542 isolates.

Both SynComs were prepared by mixing 1 ml (10^4 UFC/ml) of each isolate growing in a liquid media (TSB for bacteria and YPD for fungal). A volume of 25 ml as a total mixture was then used to prepare each SynCom using the same buffer as the

Enrichment one (Riis, Lorbeer, and Babel 1998). The microbes were resuspended in sterile potassium phosphate buffer after centrifugation and then maintained at 25% of glycerol at 4°C.

4.3.1.3 Control SynComs

A commercial biofertilizer containing a mixture of *Mycorrhiza spp.*, *Trichoderma spp.* and *Bacillus spp.* chosen to improve wheat growth in drought conditions, was used as a positive control. As per the provided instructions, a volume of 40 μ l/10g of wheat seeds was centrifuged. And following the same protocol as the one used for the previous SynComs, a pellet was supplemented with 160 μ l of sterile potassium phosphate buffer and maintained in 25% of glycerol at 4°C, while the negative control contained only a sterile potassium phosphate buffer and glycerol at 25%.

All six SynComs were maintained at a final concentration of 25% of glycerol and stored at 4°C until use.

4.3.2 Plant growth experiment

The soil used in this experiment was collected from the INRS experimental field, mixed with 1/3 of sand, sieved in 2mm and autoclaved each 24h for three successive days using autoclave bags. First, wheat seeds (*Triticum aestivum*) were surface sterilized as described by Tardif et al. (2016) and soaked in different SynComs for one to two hours until being seeded in autoclaved soil.

The plant growth was performed in controlled conditions at 70% of humidity for a cycle of 6h of darkness at 21°C, 1h of transition in intermediate level of luminosity at 21°C, 16h of high luminosity at 25°C, and then 1h of transition in intermediate level of luminosity at 21°C, for four weeks. The experiment was performed in four different growth chambers as four different blocks at the same time with twelve pots per growth chamber placed randomly. All pots were maintained in irrigated conditions for the first two weeks. For the next two weeks, six pots inoculated with different SynComs were maintained in normal conditions with 50% of soil water holding capacity (SWHC) and six other pots were used to test the same SynComs in drought conditions with only 15% SWHC. A Hoagland's nutrient solution was prepared as described by Maynard and Hochmuth (2007) and each plant was inoculated with 1 ml per week to maintain their growth in good conditions.

To select the most performant SynCom under water stress or normal conditions, a germination test was conducted using five seeds per pots. After three days, only three

plants per pot were retained for the subsequent experiment. The number of leaves was recorded weekly. At the end of the four-week growth period, samples of roots, leaves, and rhizosphere were collected from plants inoculated with different SynComs under water stress and normal conditions.

For each sample, the length and weight of roots and leaves were measured, and the total fresh and dry weight of the plants was determined. The foliar water mass was calculated using the formula $((\text{leaves fresh weight} - \text{leaves dry weight}) / \text{leaves dry weight} * 100)$. The fresh weight was measured immediately, and the dry weight was obtained after incubating leaf samples in a drying oven set at 65°C for 72 hours.

Based on the results obtained after four weeks of growth, samples from the high-performing SynComs (Screening) and the control group were used for DNA extraction and subsequent data analysis.

4.3.3 DNA extraction and sequencing

Total DNA extraction was performed on 0.5g of the wheat rhizosphere, roots and leaves samples, inoculated or not with the screening-SynCom in irrigated and non-irrigated conditions, using the Qiagen kit (DNeasy PowerLyzer PowerSoil). The library preparation for 16S and ITS amplicon sequencing was done at genome QC, and samples were sequenced by Illumina MiSeq sequencing at the Centre d'expertise et de service Génome Québec (CESGQ – Montréal, Canada), using the primers (520F-799R) for 16S and (ITS1F-58A2R) for ITS.

The genomic DNA extraction for each isolate used to prepare the Screening-SynCom was done using different kits for DNA extraction recommended for PacBio sequencing technology, the DNA from isolates number 123, 137, 141, 168, 172, 190, 253, 331, 372, 376, 389, 417, 427 and 483 was extracted using the Qiagen kit (MagAttract HMW Mini kit), and for the isolates number 128, 153, 276, 300, 351, 377, 382, 398, 411, 507, 547 using the Qiagen kit (DNeasy Blood & Tissue kit). The whole genome of the isolate 300 and 153 was sequenced by Genome Quebec, using Illumina (WGS-Miseq) and for 21 other bacterial isolates, the Pacific Biosciences SMRTcell for the shared large inserts was instead used.

4.3.4 Bioinformatic analyses

Data from the amplicon sequencing for the 16S and ITS rRNA gene were analyzed using AmpliconTagger (Tremblay and Yergeau 2019). Remaining high-quality reads and free of sequencing adapters artifacts were dereplicated at 100% identity and

clustered/denoised at 99% (DNaClust v3). Clusters of less than three reads were discarded and the remaining clusters were scanned for chimeras using UCHIME, first in de novo mode and then in reference mode (Edgar et al. 2011). The remaining clusters were clustered at 100% identity (DNaClust v3) to produce ASVs. OTUs were assigned a taxonomic lineage with the RDP classifier (Wang et al. 2007) using the Silva release 128 databases (Quast et al. 2013) supplemented with eukaryotic sequences from the Silva database and a customized set of mitochondria, plasmid and bacterial 16S sequences (see the Amplicon Tagger databases DOI:10.5281/zenodo.3560150). The RDP classifier gave a score (0 to 1) to each taxonomic depth of each OTU. For each OTU, the taxonomic lineage was reconstructed by keeping only the taxa that had a score ≥ 0.5 . To normalize the ASV table, thousand-read rarefactions were then performed 500 times and the average number of reads of each ASV of each sample was then computed to obtain a consensus-normalized ASV table.

The genomic assembly for the 21 bacterial genomes sequenced by the Pacific Biosciences technology was performed at the CESGQ, while the genomic assembly for the two isolates sequenced by Illumina (WGS-Miseq) was performed by SPAdes. The annotation of the bacterial genome was performed based on 'Prokka' Prokaryotic genome annotation on Galaxy (Version 1.14.6+galaxy1) (<http://bitly.ws/DuAz>). Comparative genomic analysis of bacterial genomes was conducted using the OrthoFinder tool on Galaxy (Version 2.5.4+galaxy1) to identify orthogroups within a collection of proteomes and to uncover conserved gene families across the 23 bacterial species. The Diamond research program was employed, and the gene tree inference method was used based on multiple sequence alignment (MSA) using the Muscle program, with a FastTree as a tree inference method. The analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in different bacterial isolates was performed using the antiSMASH platform (<http://bitly.ws/DuHF>).

4.3.5 Statistical analysis and data visualization

Statistical analyses for plant growth parameters, alpha diversity and relative abundance data were performed in R (version 4.0.3, The R Foundation for Statistical Computing). The results from plant samples were calculated as the average of three plants per pot with a total of twelve pots in four growth chambers, each considered as a separate block. Within these growth chambers, six different treatments (SynComs) were applied, and the plants were subjected to two different watering regimes (15% and 50% SWHC). If the Shapiro-Wilks and Levene tests revealed that, even after log

or square root transformation, the alpha diversity and relative abundance data did not meet the assumptions for parametric ANOVA, then independent one-way Kruskal-Wallis tests by rank were performed for the effects of Irrigation, Compartment, Treatment and Block. The effect of Treatment with Screening-SynCom, Compartment and Irrigation on the bacterial and fungal community structure was visualized using principal coordinate analyses (PCoA) and tested using Permanova with 1,000 permutations (including Blocks as a controlling factor), both based on Bray-Curtis dissimilarity calculated from the normalized ASV tables. For significant Permanova results, we further tested if this effect was due to differences in the dispersion of the samples within each group (beta-dispersion). In the case of plant parameters, the average of three plants per pot was used to evaluate the length and weight of roots and leaves after sampling, and the statistics were made on four blocks. When the difference is significant within the irrigation, the analysis was then performed in Compartment, Treatment and Block in two different irrigation regimes separately. The Dunn test was used to compare the effect of the inoculation on germination within the treatments.

4.4 Results

4.4.1 Plant leaves biomass

Under water stress conditions, the treatments significantly increased leaves fresh weight (ANOVA, $P=0.0261$) The screening inoculum was the most efficient when compared to the enrichment-moist (Tukey-HSD: $P=0.045$), followed by the commercial biofertilizer (Tukey-HSD: $P=0.001$) and the control treatment (Tukey-HSD: $P=0.08$) (Fig. 4-1). Although similar trends were observed for leaves fresh weight in the irrigated pots and in the irrigated and non-irrigated pots for leaves dry weight (Fig. 4-1), these were not statistically significant. This indicates that the Screening inoculum was the best candidate to improve wheat growth under dry and normal conditions. This inoculum was therefore selected for further analyses.

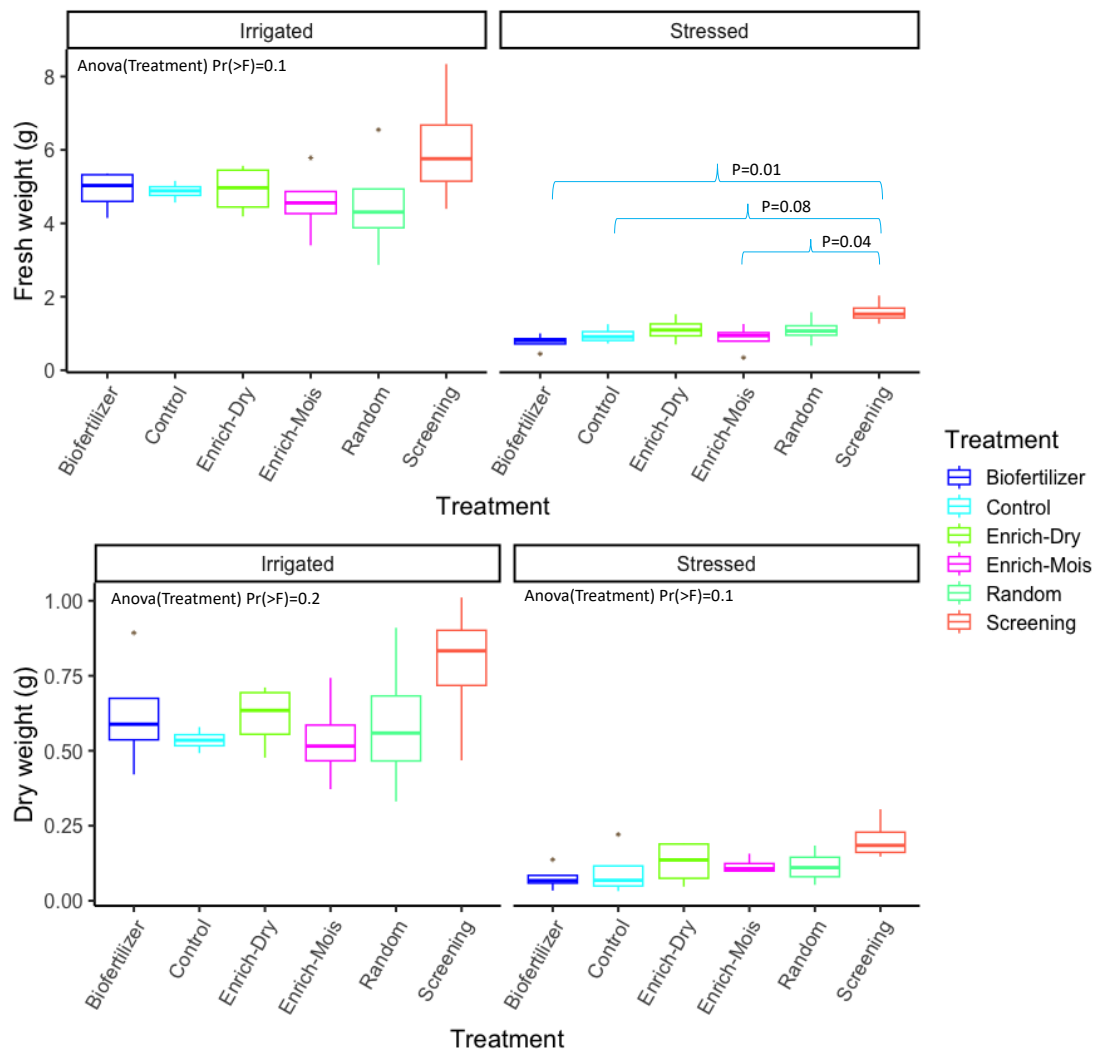


Figure 4-1 Boxplots for wheat leaves weight following SynCom inoculation after two weeks of growth under normal irrigation or drought.

4.4.2 Microbial community structure, composition and diversity following inoculation

We first looked at the microbial communities associated with the wheat plant leaves, the roots and the rhizosphere following inoculation to uncover any indirect – through modifying the microbial community - effects on inoculation-induced plant growth. The principal coordinate analyses (PCoA) showed that the plant compartment (leaf, root, rhizosphere) was the main factor influencing the bacterial community structure, while the inoculation was the main factor influencing the fungal community structure (Fig. 4.2).

Accordingly, in the Permanova, the compartment and the irrigation were the main factors influencing the bacterial community followed by the inoculation (Table 4-1), whereas the fungal community was influenced by the compartment and the inoculation but not by irrigation (Table 4-1). The interaction term inoculation:irrigation didn't affect the bacterial community, contrary to fungal community ($P=0.03$), suggesting that the inoculum did not affect the fungal community equally depending on irrigation. The fact that there were no substantial differences in beta-dispersion among the groups for either bacterial ($p=0.06$) or fungal ($p=0.7$) communities supports the validity of the Permanova. Pairwise-Permanova showed a significant difference in the bacterial ($P=0.026$) but not the fungal communities ($P=0.3$) between the normally irrigated and the dry pots. For the difference between the inoculated and uninoculated pots, there was a marginal difference for the bacterial communities ($P=0.09$) and a significant difference for the fungal communities ($P=0.009$). For the compartments, there was a significant difference between all compartments ($P=0.003$) for bacterial community while, for fungal community, the difference was significant ($P=0.003$) between the shoot and the underground compartments (root and rhizosphere) but there was no significance between the root and rhizosphere ($P=0.24$).

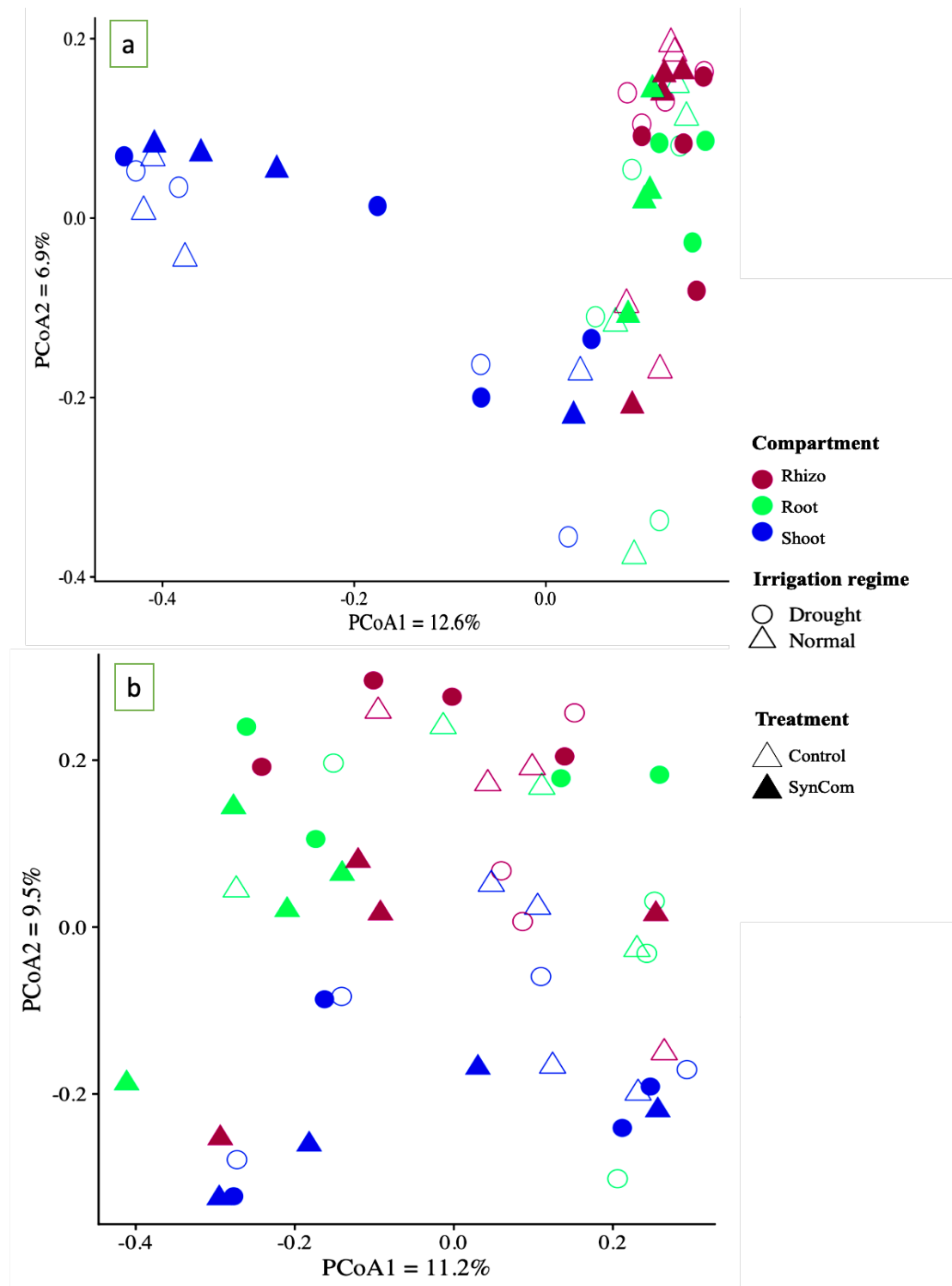


Figure 4-2 : Principal coordinates analysis of Bray–Curtis dissimilarities, calculated from the bacterial 16S rRNA (a) and the fungal ITS rRNA (b) genes ASVs relative abundance, for shoot root and rhizosphere samples from wheat inoculated or not with the screening SynCom and growing in the growth chambers in controlled conditions under two different irrigation regimes (15% and 50% SWHC).

Tableau 4-1 : Permanova tests for the effects of inoculations, plant compartment, irrigation and their interactions on the bacterial and fungal community structure based on Bray-Curtis dissimilarities.

	Bacteria			Fungi		
	F	P	R2	F	P	R2
Compartment (C)	6.5949	0.001 ***	0.208	3.2493	0.001 ***	0.123
inoculation (I)	2.0625	0.015 *	0.032	2.5568	0.007 **	0.048
irrigation (IR)	2.4604	0.002 **	0.038	1.3516	0.141	0.025
block	2.4732	0.001 ***	0.117	1.3912	0.054 .	0.079
C:I	0.9858	0.486	0.031	0.9189	0.573	0.034
C:IR	0.8477	0.724	0.026	0.8529	0.683	0.032
I:IR	1.3758	0.125	0.021	1.5129	0.084 .	0.028
C:I:IR	0.5440	0.996	0.017	0.5294	0.987	0.020

***: $P < 0.001$, **: $0.001 < P < 0.01$, *: $0.01 < P < 0.05$, .: $0.05 < P < 0.10$

Bacterial Shannon diversity was influenced by plant compartment ($P < 2 \times 10^{-16}$) and inoculation ($P = 0.02$). For compartments, the difference was between the roots and rhizosphere vs. the shoots. The fungal Shannon diversity did not vary across plant compartments, inoculation or irrigation treatments.

We also tested the effects of irrigation, plant compartment and inoculation on the dominant genera found in the amplicon sequencing datasets (Table 4-2). We only report here the genera for which the inoculation or its interaction with another factor was significant. The *Flavobacterium* genus was affected by the interactive effect of inoculation with irrigation ($P = 0.008$), with relatively more *Flavobacterium* in the inoculated leaves under non-irrigated conditions, and less *Flavobacterium* in inoculated roots (Fig. 3).

The *Klebsiella* was relatively more abundant in the inoculated samples ($P = 0.0003$), but this interacted with irrigation ($P = 0.004$) – for instance *Klebsiella* was relatively more abundant in the inoculated leaves under water stress but not so much in the inoculated leaves of well-watered plants (Fig. 4-3). An interaction between plant compartment and inoculation was found for *Paenibacillus* ($p = 0.0002$). This genus was relatively less abundant in the inoculated samples under drought conditions, but not under normal watering conditions (Fig. 4-3).

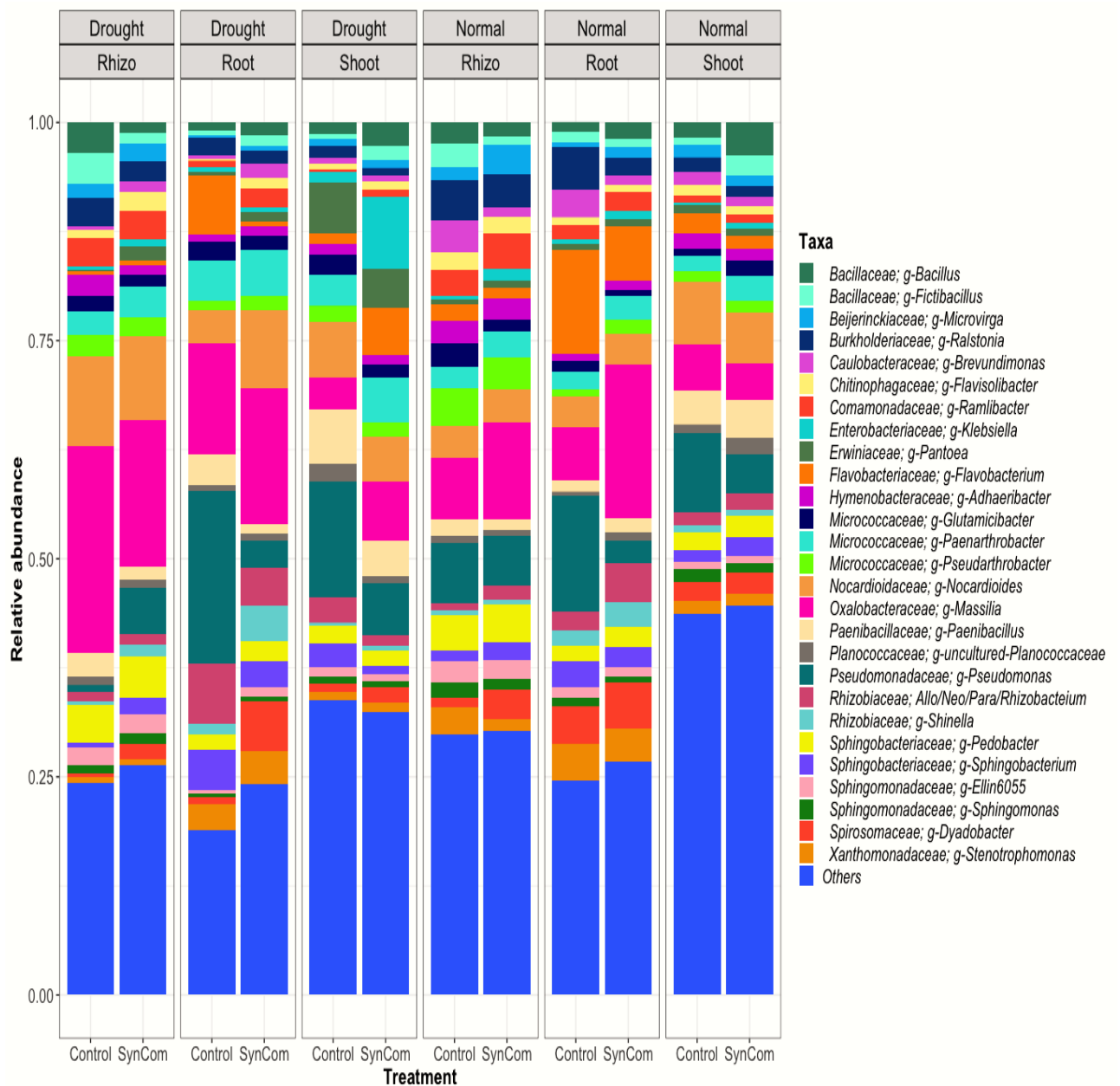


Figure 4-3 : Relative abundance of the dominant genera (on average, more than 1% of the bacterial 16S rRNA gene reads) retrieved from shoot, root and rhizosphere samples from wheat inoculated or not with the screening-SynCom and growing in the growth chambers in controlled conditions under two different irrigation regimes (15% and 50% SWHC).

Tableau 4-2 : The effects of irrigation, plant compartment and inoculation on the dominant genera found in the amplicon sequencing datasets based on Kruskal-Wallis test with Benjamini-Hochberg Adjusted p-values

	Compartment (C)	inoculation (I)	irrigation (IR)	block
<u>Bacteria</u>				
<i>Flavobacterium</i>	P=0.008** P(adj)=0.028*	P=0.749 P(adj)=0.873	P=0.001** P(adj)=0.007**	P=0.070. P(adj)=0.148
<i>Klebsiella</i>	P=0.849 P(adj)=0.849	P=0.0003*** P(adj)=0.002**	P=0.966 P(adj)=1	P=0.667 P(adj)=0.667
<i>Pseudomonas</i>	P=0.078. P(adj)=0.091.	P=0.277 P(adj)=0.646	P=0.983 P(adj)=1	P=0.099. P(adj)=0.138
<i>Bacillus</i>	P=0.063. P(adj)=0.091.	P=0.456 P(adj)=0.798	P=0.394 P(adj)=1	P=0.076. P(adj)=0.138
<i>Paenibacillus</i>	P =0.0002*** P(adj)=0.001*	P= 0.209 P(adj)=0.646	P=0.609 P(adj)=1	P=0.537 P(adj)=0.626
<i>Stenotrophomonas</i>	P=0.068. P(adj)=0.091.	P= 1 P(adj)=1	P =0.670 P(adj)=1	P=0.084. P(adj)=0.138
<i>Sphingobacterium</i>	P =0.039* P(adj)=0.091.	P=0.686 P(adj)=0.873	P =1 P(adj)=1	P=0.009** P(adj)=0.063.
<u>Fungi</u>				
<i>Zopfiella</i>	P=0.570 P(adj)=0.57	P=0.004** P(adj)=0.036*	P=0.147 P(adj)=0.436	P=0.070 P(adj)=0.171
<i>Epicoccum</i>	P=0.003** P(adj)=0.009**	P=0.798 P(adj)=0.897	P=0.848 P(adj)=0.983	P=0.45 P(adj)=0.578

<i>Alternaria</i>	P=0.235 P(adj)=0.302	P=0.654 P(adj)=0.897	P=0.932 P(adj)=0.983	P=0.536 P(adj)=0.603
<i>Aspergillus</i>	P=0.318 P(adj)=0.357	P=0.317 P(adj)= 0.709	P=0.028* P(adj)=0.252	P=0.076. P(adj)=0.171
<i>Penicillium</i>	P=0.0002*** P(adj)=0.001**	P=0.317 P(adj)= 0.709	P=0.983 P(adj)=0.983	P=0.097. P(adj)=0.174
<i>Humicola</i>	P=0.0003*** P(adj)=0.001**	P=0.966 P(adj)= 0.966	P=0.443 P(adj)=0.797	P=0.066. P(adj)=0.171
<i>Papulaspora</i>	P=0.172 P(adj)=0.258	P=0.041* P(adj)= 0.184	P=0.551 P(adj)=0.826	P=0.707 P(adj)=0.707
<i>Acremonium</i>	P=0.013* P(adj)=0.029*	P=0.782 P(adj)=0.897	P=0.194 P(adj)=0.436	P=0.066. P(adj)=0.171
<i>Bipolarise</i>	P=0.1091 P(adj)=0.196	P=0.394 P(adj)=0.709	P=0.070. P(adj)=0.315	P=0.332 P(adj)=0.498

***: $P < 0.001$, **: $0.001 < P < 0.01$, *: $0.01 < P < 0.05$, .: $0.05 < P < 0.10$

For fungal genera, *Zopfiella* was affected by inoculation ($P_{adj}=0.036$), but in interaction with irrigation ($P = 0.01$). It was relatively more abundant in the irrigated plants and disappeared in non-irrigated plants. Additionally, for the irrigated conditions, this genus was more abundant in non-inoculated plant compared to the SynCom-inoculated plant (Fig. 4-4). The *Acremonium* genus was affected by the interaction between compartments and inoculation ($P = 0.01$). The *Penicillium* genus was affected by the compartment ($P_{adj}=0.001$), with a higher relative abundance in inoculated roots, especially under normal watering conditions (Fig. 4-4). Under dry conditions, the roots of inoculated plants hosted more *Humicola* (Fig. 4-4) with an interactive effect of inoculation and compartment ($P = 0.0003$) (Fig. 4-4). Similarly, the *Epicoccum* genus, was relatively more abundant in the inoculated rhizospheres under non-irrigated conditions compared to irrigated conditions (Fig. 4-4) indicating an interactive effect between inoculation and plant compartments ($P = 0.003$).

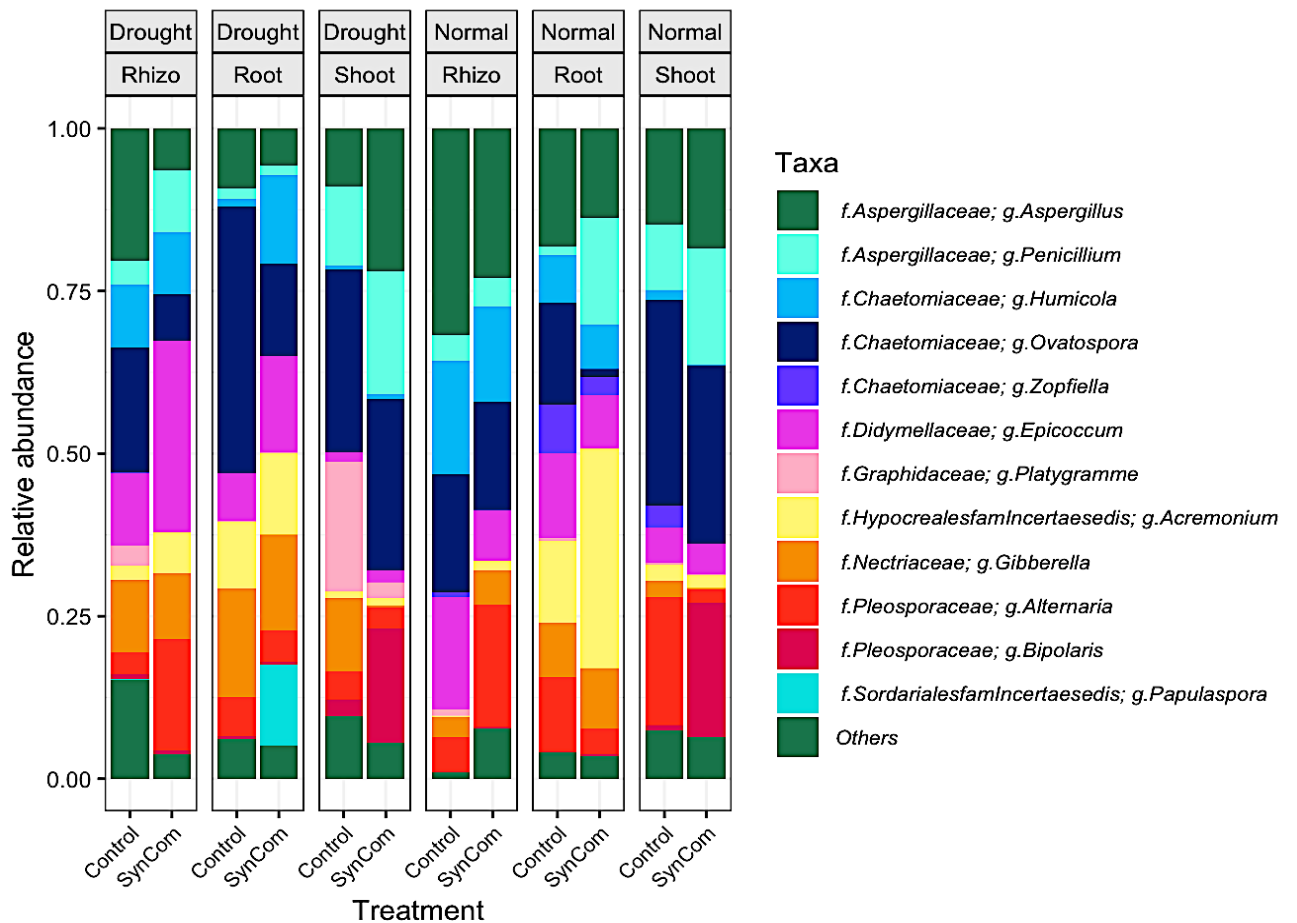


Figure 4-4 : Relative abundance of the family/genus that accounted for, on average, more than 1% of the fungal ITS region reads retrieved from shoot, root and rhizosphere samples from wheat inoculated or not (with the screening-SynCom) and growing in the growth chambers in controlled conditions under two different irrigation regimes (15% and 100%).

4.4.3 Genomic analysis of the inoculated microbes

We sequenced the genomes of the inoculated microorganisms. The microorganisms were identified using the average nucleotide identity (ANI) against sequenced isolates available in GenBank (Table 4-3). We also looked in the whole genomes for their 16S rRNA genes or ITS region and compared them to the amplicon dataset to match each inoculated microorganism to an ASV. Among the 25 inoculated strains, 8 had no match to ASVs, whereas 17 had a 100% similarity with a unique ASV (Table 4-3). Thereby, we could determine which ASV from the inoculum potentially persisted in the plant environment and which were not detectable anymore at the time of sampling. Some of the inoculated microorganisms matched the same ASV they were very closely related and had highly similar 16S rRNA genes. They also matched the same published genome based on the ANI analysis, potentially indicating different strains from the same species (Table 4-3).

Tableau 4-3 : Identification of the isolates used to prepare to Screening-SynCom based on their average nucleotide identity (ANI) compared to Genbank genomes and their isolation origin (Agoussar et al. 2021)

Isolate	Identification	Origin
<u>Isolates that did found to match an ASV based on the amplicon sequencing</u>		
137	<i>Paenibacillus graminis</i>	DT-100%-Rhizosphere
141	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DT-100%-Shoot
331	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DS-25%-Root
253	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DT-100%-Shoot
168	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DT-100%-Rhizosphere
190	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DS-25%-Rhizosphere
300	<i>Bacillus pumilus</i>	DT-25%-Rhizosphere
351	<i>Paenibacillus graminis</i>	DT-100%-Root
372	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DT-100%-Shoot
389	<i>Arthrobacter sp. Rue61a</i>	DS-100%-Shoot

376	<i>Arthrobacter sp. Rue61a</i>	DS-100%-Rhizosphere
417	<i>Arthrobacter sp. Rue61a</i>	DT-100%-Rhizosphere
377	<i>Sphingobacterium sp. ML3W</i>	DT-100%-Root
382	<i>Sphingobacterium sp. ML3W</i>	DT-25%-Root
398	<i>Sphingobacterium sp. ML3W</i>	DS-100%-Shoot
172	<i>Sphingobacterium sp. ML3W</i>	DT-100%-Rhizosphere
483	<i>Bacillus velezensis</i>	DT-100%-Seed

Isolates that did not match any ASV based on the amplicon sequencing

123	<i>Bacillus sp.</i>	DS-100%-Shoot
128	<i>Microbacterium sp.</i>	DT-25%-Shoot
427	<i>Paenibacillus sp.</i>	DS-25%-Shoot
411	<i>Bacillus sp.</i>	DT-25%- Rhizosphere
153	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	DS-100%- Rhizosphere
276	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	DT-100%- Rhizosphere
507	<i>Penicillium sp. (Sanger)</i>	DS-100%-Shoot
547	<i>Penicillium commune (Sanger)</i>	DT-100%-Shoot

DT: Drought tolerant (*Triticum turgidum* subsp. *durum* cv. Strongfield (durum wheat))

DS: Drought sensitive (*Triticum aestivum* cv AC Nass (spring wheat))

25% : Drought conditions based on the precipitation regime

100% : Normal conditions based on the precipitation regime

4.4.4 Genomic analysis of the inoculated microorganisms

The isolates used to prepare the Screening SynCom were separated in two groups. The first group consisted in microbes that had no match with the ASV retrieved from the amplicon sequencing and the second group consisted in microbes that had a match with an ASV at 100%. The microbes from the first group probably didn't colonize the wheat environment, whereas the microbes in the second group potentially persisted in the wheat environment to sufficiently high levels. This comes with the caveat that the non-persisters might have been below the detection limit of the method, whereas the persisters might match the 16S rRNA gene of a closely related ASV from the environment. Still, we compared the genomes of the two groups to identify potential key genomic factors implicated in persistence, growth promotion, and water stress resistance, particularly for genes encoding osmolytes. This distinction allowed us to delve into the underlying factors contributing to strain persistence or absence within the complex plant-associated microbial network.

The genes encoding osmoprotectant-binding protein (*osmX*), proline dehydrogenase (*proB*), proline/betaine transporter (*proP*), and inositol-dehydrogenase (*iolG*) were shared among most strains of the persisters group. The annotation of the 23 bacterial genomes resulted in 270,746 predicted genes, with 926 shared genes between the two groups and 30 genes shared across all bacteria isolates. The phylogenomic tree was constructed to highlight the evolutionary connections within 23 bacterial isolates using amino acid annotations for the bacterial genomes (Fig. 4-5). The analysis of the isolates showed that the non-persisters mostly clustered in two groups (Fig. 4-5). Gene content comparison of the two groups revealed that some genes present in at least 50% of the persistent bacterial group were totally absent in the other group (Fig. 4-6). One bacterium from the persister group (*Paenibacillus graminus* 137) harbored none of the genes singled out in Figure 4-6.

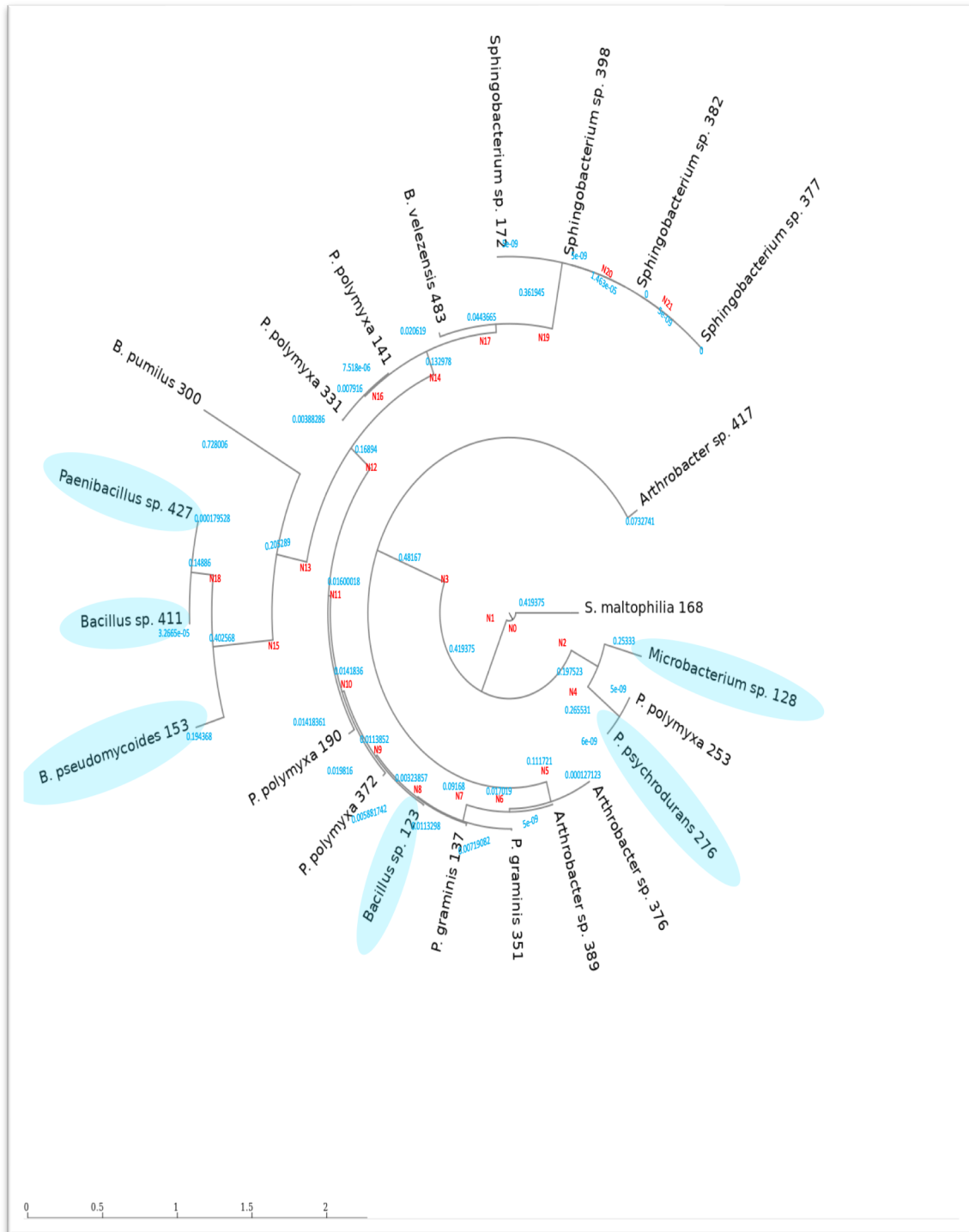
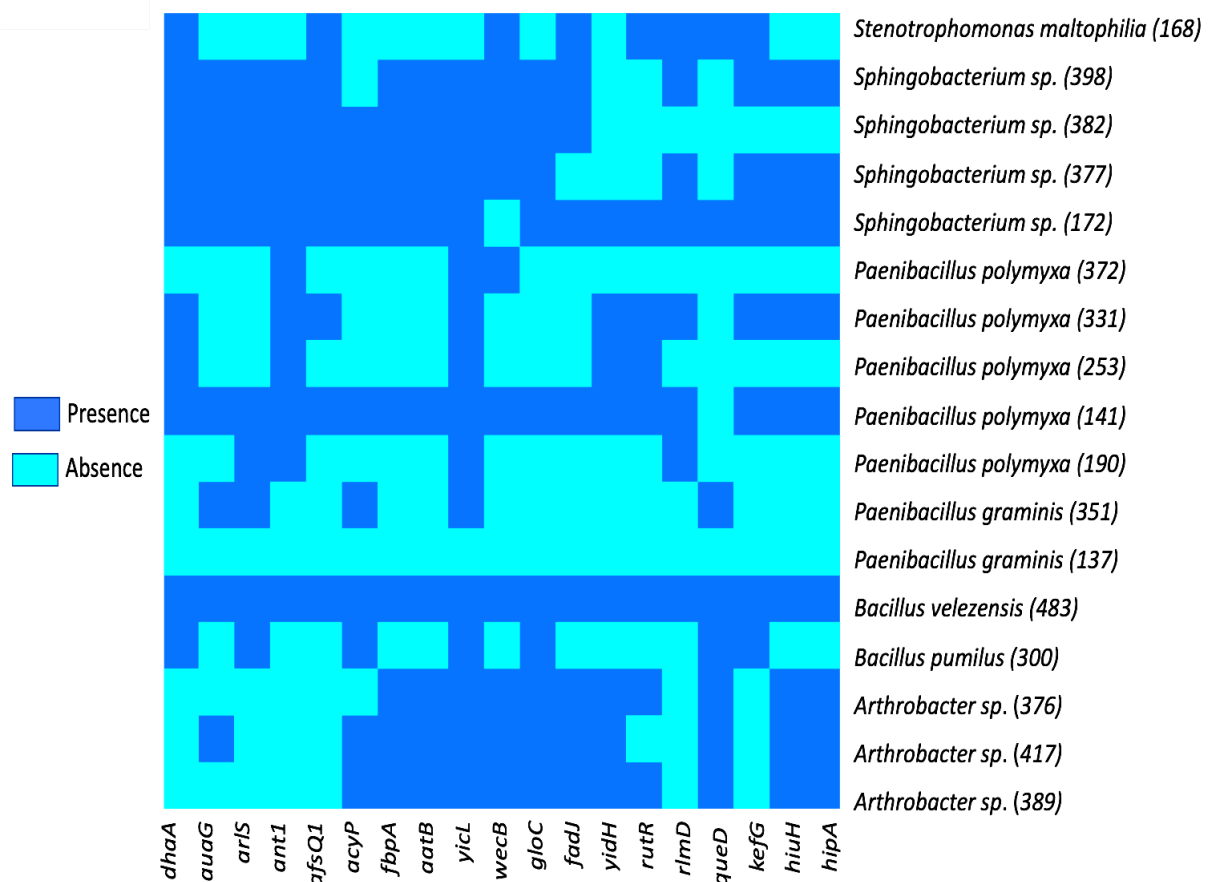


Figure 4-5 : Phylogenomic tree illustrating genetic relationships among the 23 bacterial isolates. The tree graph is visualized using Newick Display, utilizing amino acid annotations for the 23 bacterial genomes. The tree is rooted with a distant outgroup, while the branch lengths signify the genetic distances between the isolates. Bootstrap values are represented as N numbers as a level of support for branches. Bacterial isolates highlighted in blue signify non-persisters.



The *dhaA* gene code for an haloalkane dehalogenase, *auaG* gene code for aurachin C monooxygenase/isomerase, *arlS* gene code for signal transduction histidine-protein kinase, *ant1* gene code for spectinomycin 9-adenylyltransferase, *afsQ1* gene code for Transcriptional regulatory protein AfsQ1, involved in secondary metabolism, *acyP* gene code for acylphosphatase, *fbpA* gene code for iron-utilization periplasmic protein, *aatB* gene code for aspartate aminotransferase, *yicL* gene code for uncharacterized inner membrane transporter, *wecB* gene code for UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase, *gloC* gene code for hydroxyacylglutathione hydrolase, *fadJ* gene code for fatty acid oxidation complex subunit alpha, *yidH* gene code for inner membrane protein YidH, *rutR* gene code for HTH-type transcriptional regulator RutR, *rlmD* gene code for 23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD, *queD* gene code for 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin, *kefG* gene code for glutathione-regulated potassium-efflux system ancillary protein KefG, *hiuH* gene 5-hydroxyisourate hydrolase, *hipA* gene code for Serine/threonine-protein kinase toxin.

Figure 4-6 : Heatmap visualization of key genes shared among at least 50% of within the persistent bacterial group that were completely absent in the disappeared bacteria.

We also looked more specifically for secondary metabolites biosynthetic gene clusters using the antiSMASH tool. This exploration unveiled a landscape characterized by remarkable diversity, with a significant variance in the number of predicted genes among the 23 bacterial isolates in the number of predicted genes for the 23 bacterial isolates (Figure 4-7), from >230 genes predicted for the isolate *Bacillus velezensis* (483), to around 75 predicted genes for four isolates (141, 153, 190 and 389), as well as more than 50 predicted genes for three isolates (123, 300 and 331) and less than 50 predicted genes for the remaining 16 bacterial isolates.

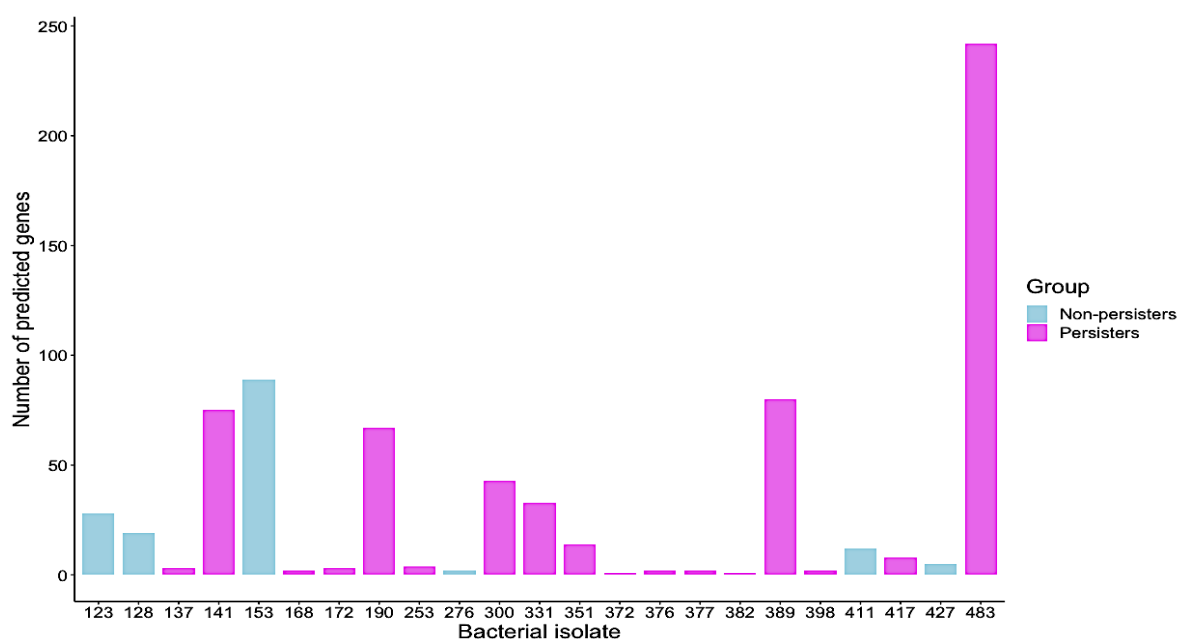


Figure 4-7 : Number of biosynthetic gene clusters of specialized metabolites that have been predicted using *antiSMASH* for the 23 bacterial isolates of the “Screening” inoculum.

The secondary metabolites can assume multifaceted roles, including enhancing plant resilience under stress conditions. They can undertake pivotal roles, as antioxidants, osmolytes, and modulators of plant hormones, collectively bolstering the plant's adaptive capacity in water-limited scenarios. The dissection of secondary metabolite profiles thus offers an illuminating insight into the mechanisms that underpin drought resilience. For this ultimate reason, we also wanted to determine if the persister bacterial group shared secondary metabolite biosynthetic gene clusters that were absent in the non-persisters. We found out that some secondary metabolites gene cluster predicted for the persistent bacterial group with similarity scores above 80%, were absent among the non-persisters (Figure 4-8).

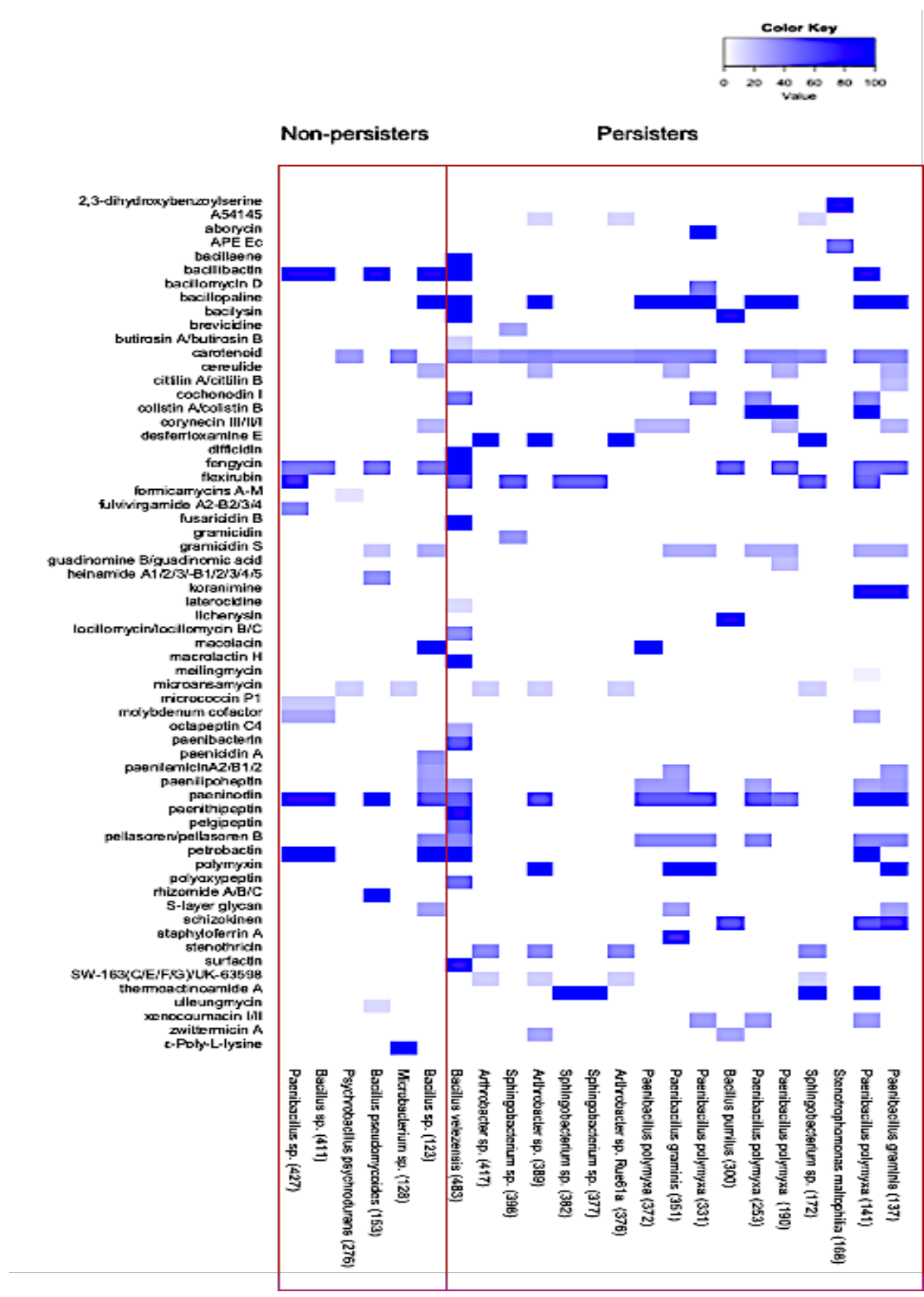


Figure 4-8 : Heatmap visualization of specialized secondary metabolite gene clusters in the genomes of persister and non-persister bacterial groups. Analysis was performed using the antiSMASH platform and only metabolites that exhibited more than 80% similarity to known metabolites were selected for this analysis.

Among the persistent group, strains 372 and 398 lacked secondary metabolite gene clusters that showed a similarity of over 80% that were absent in the non-persisters. The remaining isolates harbored at least one gene coding for secondary metabolites, whereas strain 483 had the genetic potential to produce six secondary metabolites. Many of the persisted strains had the genetic potential to produce secondary metabolites such as antibiotics (aborycin, bacillaene, colistin A/colistin B, fusaricidin B, koranimine, lichenysin, macrolactin H, paenithipeptin, and thermoactinoamide A), or other secondary metabolites, such as siderophores.

4.5 Discussion

Plant and soil associated microbes have a key role in helping crops adapt to abiotic stresses, such as drought (David et al. 2020). One way to maximize yields under the current climatic emergency would be to manipulate the plant microbiome. Although the field is still in its infancy, a general ecological framework was suggested (Agoussar and Yergeau 2021), which included inoculation of new microbes and selection among already present microbes. Many different methods are available to create inoculants (Eng and Borenstein 2019), but they are rarely tested side-by-side. In a previous study, we compared inoculated microbes extracted from a soil with a water stress history or not, to wheat plant under water stress (Giard-Laliberté et al. 2019). This resulted in no improvement in plant growth or water content and only modestly shifted the fungal communities in the rhizosphere (Giard-Laliberté et al. 2019). We also applied this approach in the context of bio/phytoremediation of hydrocarbon petroleum, with similar lack of improvement in plant growth and hydrocarbon degradation rates using an “evolved” inoculum (Bell et al. 2016; Yergeau et al. 2015). In fact, for both studies, the control inoculum that wasn’t “evolved” was more efficient to promote plant growth or degrade hydrocarbons (Bell et al. 2016; Yergeau et al. 2015). We suggested that a highly diversified, unselected inoculum was more prone to contain the optimal microbes for the process of interest (Bell et al. 2016; Yergeau et al. 2015). Mismatches between the successional stages of the selected communities and of the inoculated ecosystem were also suspected to create problems. We also found that the inoculum created by “evolving” soil under dry or wet conditions had little effect on wheat growth under water stress.

In contrast, the inoculum developed from isolates that grew under high osmotic pressure were able to promote plant growth (the “Screening” inoculum), by increasing wheat aboveground fresh biomass under water stress, but not the dry biomass nor the root biomass. This indicates that the “Screening” inoculum probably helped wheat to retain water in its leaves. This was also evident when looking at the plant morphology, with the inoculated plants showing an improved turgor under water stress. This could be explained by an effect of the inoculum on stomatal closure or on accumulation of osmolytes, two mechanisms by which microbes were previously shown to improve plant growth under water stress (Ravel et al. 1997; Kavroulakis et al. 2018). This is interesting because simply promoting plant growth isn’t an ideal mechanism to help plants survive drought, because plant communities with more biomass are more susceptible to drought (Wang, Yu, and Wang 2007). Our screening method, using high osmolarity growth media, probably selected for microbes that were highly efficient in producing osmolytes. Microbial endophytes and rhizobacteria can increase plant osmolyte concentration (Gagné-Bourque et al. 2016; Vílchez et al. 2018; N. Khan et al. 2019), and can also exude

osmolytes in the plant environment (Madkour, Smith, and Smith 1990; Paul and Nair 2008). We also recently showed that microbial osmolytes-related transcripts were more abundant in the wheat rhizosphere when soil water content decreased (Pande et al. 2023). Many osmolytes are derived from the metabolism of amino acids or carbohydrates that were encoded in most of the microbial genomes of our inoculum. Taken together, our comparison of inoculation development approaches suggests that there are probably no shortcuts to the painstaking process of isolating and screening hundreds of microorganisms. This targeted approach allows for a more efficient and effective selection of microorganisms and was the only one that led to improved wheat biomass under water stress.

The inoculated microorganisms could have directly affected wheat resistance to water stress. Among the bacterial strains inoculated that were represented among the ASVs (the “persisters”), twelve out of seventeen were Gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria produce osmolytes constitutively whereas Gram-negative bacteria produce them as a drought-induced response (Schimel, Balsler, and Wallenstein 2007). This constitutive production of osmolyte together with a thick peptidoglycan cell wall in Gram-positive bacteria allows them to remain active under low water availability, in contrast to bacteria that avoid drought by dormancy or sporulation (Vries et al. 2020). Only living bacteria are able to protect the plant from water stresses, suggesting that bacteria that have a drought resistance rather than a drought avoidance strategy would be better inoculants. More specifically, among the inoculated strains, *Stenotrophomonas maltophilia* increased wheat abiotic resistance (Singh and Jha 2017; Kasim et al. 2021), and *Bacillus pumilus* improved the accumulation of metabolites and drought resistance in Chinese liquorice (Xie et al. 2018; Xinhui Zhang et al. 2021), *Paenibacillus polymyxa* increased drought stress resistance, nitrogen content and nodulation in common beans when co-inoculated with *Rhizobium tropici* (Figueiredo et al. 2008). In contrast, *Arthrobacter* sp. was shown to reduce tomato leaves water content under drought (Qi et al. 2021). However, co-inoculation with *Variovorax* sp counteracted this reduction (Qi et al. 2021). This illustrates that, although they might be more resistant to environmental disturbances and offer several advantages for industrial applications (Giri, Shitut, and Kost 2020), multispecies inoculants are complex and might not behave as expected from the sum of its parts.

Some of the strains inoculated could not be detected among the microbial communities, suggesting that the non-persisters may have been below the detection limit of the method, or may be due to their adaptation capabilities within the plant environment under drought stress conditions. To understand why they didn't persist, we compared the genomes of these strains to the ones of the strains that had a match in the ASV tables. The genomic analysis showed that the genomes of the non-persisters clustered together, and further analyses showed that

they were missing several of the genes that were widely shared among the persisters. Some of these genes were related to nutrient cycling, such *aatB* (aspartate aminotransferase) involved in amino acid metabolism, *gidH* (inner membrane protein YidH) involved in selenate and tellurate reduction (Fujita et al. 2021), and *fbpA* (iron-utilization periplasmic protein) involved in iron transport. Some other shared genes were linked to resistance to toxic compounds (*dhaA*, haloalkane dehalogenase) (Poelarends et al. 1998) or virulence (*wecB*, *hipA*, and *arlS*) (Côté et al. 2016; Korch and Hill 2006; Fournier, Klier, and Rapoport 2001). The presence of these genes in the genome of the persisters is well aligned with the traits that are required to colonize the plant environment. For instance, the capacity of *Paenibacillus polymyxa* to promote the growth of plants was partly linked to its capability to produce polymyxin (J. F. Kim et al. 2010). It is therefore not surprising that the potentially persistent strains shared widely these traits in their genomes.

On top of their direct effects on plants, inoculants can modify the resident soil and plant microbial communities (Mallon et al. 2018; Mawarda et al. 2020). In our study, this could explain indirectly the effect of our “Screening” inoculum, as inoculation affected the bacterial and fungal communities. For example, the genus *Klebsiella*, for which some strains can accumulate osmolytes such as glycine betaine, trehalose and proline in response to drought stress (Madkour, Smith, and Smith 1990), was more abundant in the leaves following inoculation. The genus *Flavobacterium* was also more abundant in the leaves following inoculation and some strains of this genus induced the up-regulation of drought-inducible genes and stomatal closure in *Arabidopsis* (J. Kim et al. 2020). These traits align well with the enhanced fresh biomass of our wheat plants. These two genera were not part of our inoculum and were therefore amplified from environmental strains following inoculation. In contrast, *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Stenotrophomonas* were well represented in our inoculum and are known to enhance drought stress resistance in plants (J. F. Kim et al. 2010; Saxena et al. 2020; Rashid et al. 2022; Xue et al. 2023; Singh and Jha 2017; Kasim et al. 2021) but ended up being less abundant in the inoculated rhizospheres. The *Bacillus* genus can shape the microbial community in the rhizosphere (Mahapatra, Yadav, and Ramakrishna 2022), and it might have played a role in the community shifts observed. *Paenibacillus polymyxa* produces antibiotics (Jeong et al. 2019), which could also modulate the microbial community. In addition, many of the strains had the genetic potential to produce antibiotics, such as aborycin, bacillaene, colistin A/colistin B, fusaricidin B, koranimine, lichenysin, macrolactin H, paenithipeptin, and thermoactinoamide A, or other secondary metabolites, such as siderophores. In contrast to the bacterial community, the inoculation was the primary factor influencing the fungal community. A previous study showed that fungi are more affected by inoculation than bacteria (Giard-Laliberté et al. 2019) but at the same time they are less

sensitive to water stress (Azarbad et al. 2018). Many fungal genera were affected by the inoculation – *Epicoccum*, *Humicola*, *Papulospora*, *Zopfiella*, and *Penicillium*. Only *Penicillium* was part of the inoculum, but the two strains inoculated did not match any ASV from the ITS amplicon dataset. Some strains in these genera like *Zopfiella* and *Penicillium*, were reported to accumulate osmolytes such as proline in plant under drought conditions (Kour, Rana, Yadav, et al. 2020; Miranda et al. 2023; Kour, Rana, Kaur, et al. 2020). Some *Humicola sp.* were reported to attenuate oxidative stress by enhancing the superoxyde dismutase activity (Radhakrishnan et al. 2015). Many of the inoculated bacteria had the genetic potential to produce secondary metabolites that could affect fungi. For instance, *Paenibacillus polymyxa* can protect cereals against *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* (Abd El Daim et al. 2015). These results indicate that the inoculation can also affect the resident soil and plant fungal and bacterial communities, with a potential for indirect effects on plant response to water stress. It is, however, not possible using our experimental design to disentangle the direct from the indirect effects of the inoculation.

4.6 Conclusion

We found that, among the four approaches tested, only the inoculum made of a mixture isolates able to grow at high osmolarity and promote plant growth successfully enhanced wheat aboveground fresh weight. Not all strains of the inoculum potentially persisted in the plant environment, and this persistence could be linked to genomic features. The question remains as to if the inoculated strains acted directly on the plant, or indirectly through shifts in the microbial communities. Our data supports both routes, and probably the effect on plant fresh biomass was a result of a combination of the two mechanisms. Microbiome engineering approaches that combine more than one mechanism of action are more likely to be successful (Quiza, St-Arnaud, and Yergeau 2015; Agoussar and Yergeau 2021), which could provide direly needed tools to adapt crops to the ongoing climatic emergency.

4.7 References

All references for this chapter are listed at the end of this document in the reference list.

5 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

5.1 Discussion

"Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot".

Cette citation de 'Louis Pasteur' mis en évidence l'importance et la dominance des microorganismes dans la nature. Aux yeux du monde, les microorganismes sont des agents pathogènes causants des maladies et des pandémies dévastatrices. Mais, à nos yeux, ces derniers sont la clé pour résoudre des problèmes majeurs de notre époque, liés à la santé humaine et environnementale. Mon projet de thèse s'intéresse à la deuxième catégorie des microorganismes, plus spécifiquement, les microorganismes favorisant la tolérance du blé à la sécheresse.

Les microorganismes des plantes ont toujours suscité l'intérêt des chercheurs pour leur capacité à promouvoir la croissance des cultures et leur résistance aux stress environnementaux. Ils peuvent aussi aider les cultures à s'adapter aux stress abiotiques, tels que la sécheresse (David et al. 2020). Mon projet de thèse, s'intéresse ainsi à valoriser leur utilisation et d'étudier les caractéristiques génomiques derrière leur pouvoir.

Mon premier chapitre de thèse consiste en une revue de la littérature afin de comprendre tous les aspects liés à la plante et sa relation avec son microbiote, ainsi que les différentes approches de conception et d'utilisation des communautés microbiennes en s'inspirant de la théorie des communautés écologiques. Cette théorie stipule qu'il existe quatre processus de changement des communautés microbiennes. La spéciation et de la dispersion : deux processus qui peuvent entraîner l'ajout de nouvelles espèces au microbiote végétal. Aussi, la sélection des microorganismes ou la dérive, sont des processus qui peuvent entraîner la perte de certaines espèces microbiennes. Dans ce contexte, on commence à se questionner plus spécifiquement, sur la réponse des microorganismes du blé face à la sécheresse. Et, comment cette théorie de communautés écologiques pourrait être exploitée pour manipuler et modifier le microbiote du blé pour faire face à la sécheresse?

Pour répondre à ces questions, j'ai étudié et comparé la réponse des communautés microbiennes au stress hydrique dans le champ, par séquençage d'amplicons, et au laboratoire en les cultivant dans des conditions de déficit hydrique. Les résultats ont montré que les communautés bactériennes n'étaient pas affectées par les manipulations de précipitations, malgré une abondance accrue des bactéries appartenant à la famille des Actinobactéries dans des conditions de stress hydrique sur le terrain. Cette abondance pourrait être lié à leur capacité de se développer dans des conditions de stress osmotique élevé, contrairement aux bactéries appartenant à la famille des Firmicutes. Bien que ces

dernières peuvent aussi augmenter dans des conditions sèches (Hamed Azarbad et al. 2021; Xu et al. 2018), elles étaient sous-représentées parmi les isolats capables de se développer dans un milieu liquide complété par 30% de PEG au laboratoire. Par ailleurs, l'effet des différents traitements de précipitation n'étaient pas clairement visibles sur la fréquence d'isolement, comme les bactéries résistantes au stress osmotique constituaient une partie relativement mineure de la communauté totale. Néanmoins, le traitement par précipitation était significatif lorsqu'on se concentrait seulement sur les OTU correspondant aux isolats bactériens du PEG 30%. Cela suggère que la réduction expérimentale des précipitations a favorisé les bactéries présentant une résistance élevée au stress osmotique, même si cette réduction des précipitations a eu des effets mineurs sur la teneur en eau du sol et n'a pas visiblement stressé les plantes. Ainsi, nous avons pu montrer que l'endosphère des feuilles de blé est une source potentielle pour isoler des microorganismes osmotolérants. Ces bactéries relativement peu fréquentes pourraient jouer un rôle clé en cas de stress hydrique plus sévère. On peut commencer à se demander si ces microorganismes, qui ont démontré cette capacité de résistance au stress osmotique, pourront servir comme inoculum pour aider les plantes à s'adapter à ce même stress?

De nombreuses méthodes différentes sont disponibles pour créer des inoculas (Eng and Borenstein 2019), mais elles sont rarement testées ou comparées les unes aux autres dans un même contexte. Pour ma thèse, j'ai décidé de tester différentes SynComs conçues par différentes approches, pour leur effet sur la croissance du blé sous stress hydrique. Pour notre première SynCom, nos isolats ont été testés individuellement pour leur pouvoir à promouvoir la germination des graines de blé, et la croissance des feuilles et des racines du blé inoculées au laboratoire. Dans l'ensemble, 25 souches ont été choisies à la base de ces tests combinés au test de PEG pour préparer la 'Screening-SynCom'. La deuxième SynCom a été préparée de la même façon en choisissant aléatoirement 25 isolats de notre banque de 542 souches 'Random-SynCom'. Ainsi, en tenant compte des microorganismes qui ne sont pas cultivables, il était primordial de concevoir une SynCom en se basant sur une approche différente qui nous permettra de récupérer ces microorganismes. Pour cet effet, nous avons testé une 'SynCom-Enrich-Dry' résultante de l'extraction des microorganismes du sol séché au four sans arrosage pendant deux mois, et une 'SynCom-Mois-Dry' résultante de l'extraction des microorganismes du sol incubé pendant deux mois à l'incubateur avec un arrosage période d'une fois par semaine. L'utilisation de différentes approches nous a entraîné des différences dans la densité microbienne entre les différentes SynComs issues de différentes approches. Les deux SynComs préparées à partir des isolats microbiens ont été ajustées à une concentration de (104 CFU/ml/ souche), tandis que les deux SynComs issues de l'enrichissement des communautés provenaient de l'extraction de microorganismes totaux du sol exposé à la

sécheresse et n'ont pas été ajustées en fonction de leur abondance. Par contre, cela répond bien à notre objectif principal qui est de comparer ces différentes approches de préparation de SynCom.

Les résultats montrent que l'ensemencement des graines du blé par les différentes SynCom n'a pas affecté le nombre de feuilles ou le poids sec total par plante après un mois de croissance du blé au laboratoire. Ainsi, en réponse au stress hydrique, les plantes peuvent ralentir leur croissance en réduisant le nombre de feuilles pour diminuer la surface de contact (Rassaa, Ben Haj Salah, and Latiri 2008), ce qui n'était pas significativement le cas de nos plantes, et cela pourrait être dû à la durée d'exposition à la sécheresse. En raison de la sévérité du stress hydrique appliqué (seulement 15% de la capacité de rétention d'eau du sol), nous avons échantillonné nos plantes après deux semaines de leur exposition au stress hydrique pour une durée finale de quatre semaines de croissance. Les résultats ont également montré une tendance similaire pour la longueur et le poids des racines. Par ailleurs, il est important de noter que l'ensemencement par certaines PGPB peut moduler les voies de signalisation hormonale pour favoriser l'élongation racinaire (Emami et al. 2020) et réduire la sévérité des stress hydrique ou salin (Rawat et al. 2011; Shukla N. et al. 2014). Le développement d'un système racinaire plus robuste permettra à la plante d'explorer des réserves d'eau plus profondes et de survivre pendant les périodes de sécheresse. Cependant, dans notre cas, aucune différence significative n'a été observée dans la longueur ni le poids des racines, et cela peut être attribuer au fait que nos plantes étaient cultivées dans des pots qui limitaient le développement et l'échantillonnage de la longueur totale des racines.

La différence était plus évidente au niveau du poids frais des plantes inoculées par nos 25 souches présélectionnées au laboratoire 'Screening-SynCom' dans des conditions de sécheresse. Cela indique que les plantes inoculées ont pu réduire leur perte d'eau par transpiration en fermant partiellement leurs stomates, afin de limiter la perte d'eau tout en permettant à la plante de maintenir une certaine activité photosynthétique. Peut-être que les plantes à l'étude ont pu accumuler des solutés osmotiques en permettant de maintenir un potentiel hydrique plus élevé dans leurs cellules. Ces stratégies adaptatives sont connues pour réduire la perte d'eau dans les tissus végétaux par transpiration (Camaille et al. 2021; Osakabe et al. 2014; Ravel et al. 1997; Kavroulakis et al. 2018) par le biais de certaines bactéries endophytes ou des rhizobactéries (Gagné-Bourque et al. 2016; Vilchez et al. 2018; N. Khan et al. 2019), qui peuvent également exsuder des osmolytes dans l'environnement des plantes (Madkour, Smith, and Smith 1990; Paul and Nair 2008). Ainsi, une étude préalablement publiée de notre groupe a révélé une plus grande abondance de transcrits liés aux osmolytes microbiens dans la rhizosphère du blé soumis à un stress hydrique (Pande et al. 2022). Ces osmolytes peuvent provenir du métabolisme des acides aminés ou des

hydrates de carbone, dont les gènes responsables étaient détectés dans la plupart des génomes microbiens de notre inoculum.

Bien que les 25 souches utilisées pour concevoir notre Screening-SynCom proviennent de la plante de blé et de la rhizosphère dans le champ d'expérimentation de l'INRS, seulement 17 bactéries ont eu une similarité à 100% à un ASV dans les échantillons de la plante inoculée après quatre semaines. Par ailleurs, douze souches de ces bactéries ont été identifiées comme Gram-positives et cinq souches de Gram-négatives. Les bactéries Gram-positifs sont connues pour produire des osmolytes de manière constitutive, tandis que les bactéries Gram-négatives ne le font qu'en réponse à la sécheresse (Schimel, Balsler, and Wallenstein 2007), ce qui pourrait probablement expliquer leur capacité à promouvoir la croissance des plantes du blé dans des conditions irriguées ou non irriguées. D'autre part, la production d'osmolytes et la paroi cellulaire épaisse en peptidoglycane peuvent aider les bactéries Gram-positives à conserver leur activité de protecteurs des plantes tant qu'elles sont capables de survivre (Vries et al. 2020). Ce qui suggère que ce n'est que si les bactéries restent actives qu'elles pourront protéger la plante contre le stress hydrique, suggérant ainsi que les bactéries qui ont une stratégie de résistance à la sécheresse plutôt que d'évitement de la sécheresse seraient de meilleurs inoculas. Enfin, l'effet osmotique des souches inoculées s'est manifesté de manière plus prononcée après seulement deux semaines d'exposition des plantes à la sécheresse contrairement à l'élongation racinaire ou la différence dans le nombre de feuilles. Cette observation peut être attribuée au fait que nous avons sélectionné nos souches en fonction de leur capacité à survivre dans un environnement à faible activité osmotique (30% PEG), ce qui est directement lié à leur capacité à produire des osmolytes non seulement dans des conditions de stress hydrique, mais aussi dans des conditions normales d'arrosage.

En plus, notre inoculum "Screening" a eu un effet sur les communautés bactériennes et fongiques. On note, l'apparition du genre bactérien *Klebsiella* avec une abondance élevée dans les feuilles des plantes inoculées. Certaines souches de ce genre peuvent aussi accumuler des osmolytes en réponse à un stress de sécheresse tels que la glycine-bétaïne, le tréhalose et la proline (Madkour, Smith, and Smith 1990). La même observation peut être appliquée au genre *Flavobacterium*. Les bactéries appartenant à ce genre ont également montré la capacité d'induire la régulation à la hausse de gènes inductibles à la sécheresse et la fermeture des stomates chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (J. Kim et al. 2020). Ces caractéristiques cohérent bien avec l'augmentation de la biomasse fraîche de nos plants de blé sous stress hydrique. Cependant, ces deux genres ne faisaient pas partie de notre inoculum et ont donc été amplifiés à partir de souches environnementales après l'ensemencement. Ceci est contraire, aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Stenotrophomonas* qui étaient bien représentés dans notre inoculum mais ont fini par être

moins abondants dans les rhizosphères inoculées, malgré qu'ils sont connus pour renforcer la résistance des plantes à la sécheresse (J. F. Kim et al. 2010; Saxena et al. 2020; Rashid et al. 2022; Xue et al. 2023; Singh and Jha 2017; Kasim et al. 2021). En fin de compte, ces bactéries sont potentiellement présentes, et la diminution de leur abondance ne signifie pas nécessairement qu'elles sont moins actives ou moins utiles, ni qu'elles n'ont pas exercé leur rôle dans la protection des plantes. Ainsi, parmi les souches inoculées, la souche *Stenotrophomonas maltophilia* connue pour augmenter la résistance du blé au stress abiotique (Singh and Jha 2017; Kasim et al. 2021), *Bacillus pumilus* connue pour améliorer l'accumulation de métabolites et la résistance à la sécheresse dans la réglisse chinoise (Xie et al. 2018; Xuechen Zhang et al. 2021), et *Paenibacillus polymyxa* a augmenté la résistance au stress osmotique, la teneur en azote et la nodulation dans les haricots communs en co-inoculation avec *Rhizobium tropici* (Figueiredo et al. 2008). Il convient de noter qu'il n'était pas possible de suivre chaque souche individuellement en utilisant les séquences d'ASV. Cette limitation de notre étude nous a empêché de déterminer l'amplification spécifique ou la diminution de croissance de chaque souche car elles partageaient toutes la même séquence d'ASV. Pour faire un suivi plus précis de l'amplification ou la disparition des souches inoculées, il serait plus utile d'utiliser des techniques moléculaires telles que la PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque souche introduite.

La combinaison de ces espèces ensemble peut améliorer leur efficacité, étant donné que les inoculas multi-espèces sont plus résistants aux perturbations environnementales, offrant ainsi de nombreux avantages pour les applications industrielles (Giri, Shitut, and Kost 2020). Par exemple, la souche *Arthrobacter sp.* a réduit la teneur en eau des feuilles de tomate en cas de sécheresse si inoculé seule, mais en co-inoculation avec *Variovorax sp.* cette même souche a contrecarré cette réduction (Qi et al. 2021). Enfin, des approches expérimentales complémentaires pourraient être envisagées pour améliorer notre inoculum. Par exemple, des expériences de co-culture en laboratoire pourraient être réalisées pour examiner les interactions directes entre les différentes souches bactériennes et les plantes sous différents niveaux de stress hydrique.

L'influence des microorganismes que nous avons introduits s'étend bien au-delà de leur simple présence. Le genre *Bacillus* peut façonner la communauté microbienne dans la rhizosphère (Mahapatra, Yadav, and Ramakrishna 2022), et il pourrait aussi avoir joué un rôle dans les changements de communauté observés. Ainsi, *Paenibacillus polymyxa* pourraient également moduler la communauté microbienne par la production des antibiotiques (Jeong et al. 2019). Et dans ce même contexte, de nombreuses souches de notre inoculum avaient le potentiel génétique de produire des antibiotiques, tels que l'aborycine, le bacillaène, la colistine A/colistine B, la fusaricidine B, la koranimine, la lichenysine, la macrolactine H, la

paenithipeptine et la thermoactinoamide A, ou d'autres métabolites secondaires, tels que les sidérophores. Ces capacités métaboliques pourraient avoir contribué aux effets observés sur la composition microbienne et pourrait influencer la compétition entre les différentes espèces présentes dans l'environnement de la plante.

De nombreux genres fongiques ont été également affectés par l'ensemencement, tels que *Epicoccum*, *Humicola*, *Papulospora*, *Zopfiella* et *Penicillium*. Seul le genre *Penicillium* faisait partie de l'inoculum, mais les deux souches inoculées ne correspondaient pas à aucune ASV de l'ensemble de données de l'amplicon ITS. Par contre, Certaines souches de ces genres, comme *Zopfiella* et *Penicillium*, ont été signalées pour leur pouvoir accumulant de certains osmolytes comme la proline dans les plantes associées sous stress hydrique (Kour, Rana, Yadav, et al. 2020; Miranda et al. 2023). Ainsi, certaines *Humicola sp.* peuvent aider à atténuer le stress oxydatif en augmentant l'activité de la superoxyde dismutase (Radhakrishnan et al. 2015). Par ailleurs, il est à noter que de nombreuses bactéries inoculées avaient le potentiel génétique de produire des métabolites secondaires susceptibles d'affecter les communautés fongiques. Par exemple, *Paenibacillus polymyxa* peut protéger les céréales contre la Fusariose de l'épi causée par *Fusarium culmorum* (Abd El Daim et al. 2015), ce qui signifie que l'ensemencement par ces bactéries peut également affecter les communautés fongiques et bactériennes résidentes du sol et des plantes. La compréhension des interactions et des évolutions au sein de ces communautés microbiennes reste une tâche complexe et exigeante. Les mécanismes sous-jacents impliquant une multitude d'espèces microbiennes, de facteurs environnementaux et de processus biologiques interdépendants. Notre expérience peut difficilement capturer la variété complète des interactions qui se déroulent dans cet écosystème complexe.

En parallèle, nous avons comparé les génomes des souches inoculées qui ont pu persister dans l'environnement des plantes après quatre semaines, et les résultats ont montré que leurs génomes codent pour plusieurs gènes liés au cycle des nutriments, comme *aatB* impliqué dans le métabolisme des acides aminés, *yidH* impliqué dans la réduction du sélénate et du tellurate (Fujita et al. 2021), et *fbpA* impliqué dans le transport du fer. D'autres gènes ont été associés à la résistance aux composés toxiques tel que le gène *dhaA* (Poelarends et al. 1998) ou à la virulence des bactéries tels que les gènes *wecB*, *hipA*, et *arlS* (Côté et al. 2016; Korch and Hill 2006; Fournier, Klier, and Rapoport 2001). La présence de ces gènes dans le génome des bactéries persistantes pourrait être aussi alignée avec les traits requis pour coloniser l'environnement végétal. Par ailleurs, des études antérieures ont déjà démontré que le pouvoir PGPB de *Paenibacillus polymyxa* est en partie attribuée à sa capacité à produire de la polymyxine (J. F. Kim et al. 2010). Il est donc plus cohérent de constater que ces souches peuvent potentiellement persister dans l'environnement des plantes après quatre semaines

de leur introduction et peuvent ainsi doter d'un pouvoir PGPB. Ces résultats mettent en évidence le potentiel multifonctionnel des souches bactériennes persistantes et leur capacité à contribuer à la santé et à la résilience des plantes dans des conditions stressantes. Cependant, pour une compréhension plus approfondie et une utilisation efficace de ces souches en tant qu'inoculant, il serait nécessaire de poursuivre les investigations pour élucider les mécanismes moléculaires liés à ces fonctions spécifiques et explorer comment ces souches interagissent avec la plante et ses microorganismes.

Dans l'ensemble, l'ensemencement des graines du blé par les différentes SynComs indique que l'approche gagnante était l'isolement et la sélection des microorganismes capables de se développer dans des conditions de faible disponibilité en eau et de favoriser la germination et la croissance du blé au laboratoire au même temps. Bien que les plantes étaient normalement arrosées les deux premières semaines, l'ensemencement a eu un effet significatif sur le poids frais des plantes après seulement deux semaines d'exposition à la sécheresse. Ainsi avec la disparition de six souches bactériennes et deux souches fongiques, il sera utile de réétudier l'effet de l'inoculation des plantes du blé par un mélange de seulement 17 souches persistantes, sous un stress hydrique modéré (25 à 30% de la teneur en eau du sol), ce qui pourrait prolonger la durée de croissance de nos plantes. L'application d'un stress hydrique moins sévère pourrait permettre d'observer d'autres réponses adaptatives des plantes au stress sur une période de croissance prolongée. Parmi ces réponses pourraient figurer la chute des feuilles, une croissance ralentie et le développement d'un système racinaire plus profonde, autant de mécanismes par lesquels les plantes peuvent moduler leur physiologie pour faire face à des conditions de sécheresse.

Additionnement, on pourrait envisager plusieurs blocks d'échantillonnage selon différents stades de croissance de la plante, cela pourrait aider à tracer le stade de disparition des bactéries. Cette approche pourrait fournir plus d'informations détaillées sur la dynamique des populations bactériennes et pourrait aider à clarifier comment et quand leur ensemencement influence sur la réponse des plantes au stress hydrique. Ainsi, des expériences sur le terrain, peuvent refléter plus fidèlement les conditions naturelles, en offrant une meilleure perspective sur la persistance à long terme de ces souches ensemencées et leur capacité à améliorer la résistance des plantes à la sécheresse dans des conditions réelles de croissance.

Finalement, depuis le 19^{ème} siècle, Louis Pasteur avait jugé que les microorganismes auront le dernier mot, et en 2023 je souligne que ces microorganismes peuvent changer le monde. Les communautés microbiennes du sol et de la plante peuvent jouer un rôle crucial dans la protection de l'environnement, l'amélioration de la résistance des plantes aux stress environnementaux et le plus important c'est l'arrêt de l'utilisation des produits chimiques qui détruisent l'équilibre, la santé du sol et la biodiversité.

5.2 Conclusion

Les résultats de ce projet de thèse ont mis en évidence l'effet de la sécheresse sur l'holobionte du blé sur le terrain et au laboratoire, ainsi que les caractéristiques clés des communautés microbiennes impliquées dans l'amélioration de la tolérance du blé au stress hydrique. La méthodologie utilisée a permis également d'évaluer différentes approches de conception de SynCom et d'évaluer le potentiel d'utiliser des SynComs comme biostimulant pour créer rapidement des plantes de blé résistantes aux stress environnementaux, atténuant ainsi les pertes de rendement prévues suite aux changements climatiques.

Nous avons constaté que, parmi les différentes approches testées, l'approche gagnante se base sur des isolaments et des tests préalables au laboratoire. Ainsi, cet inoculum composé d'un mélange d'isolats soigneusement choisi au laboratoire pour leur capacité à se développer dans une osmolarité élevée et de favoriser la croissance de la plante, en augmentant le poids frais des feuilles du blé dans des conditions de sécheresse. Cet effet sur la biomasse fraîche de la plante est probablement le résultat d'une combinaison de plusieurs mécanismes, notamment, la fermeture des stomates, la production des osmolytes, et la capacité de l'inoculum à façonner les communautés microbiennes existantes pour répondre à nos besoins. D'ailleurs, dans ce même contexte, certaines bactéries non-inoculées ont subi une amplification (recrutement de l'environnement), d'autres espèces inoculés ont eu une abondance significativement faible sous l'effet de la sélection, et certaines espèces ont totalement disparus avec l'effet de la dérive microbienne, cela étant cohérent avec les principes fondamentaux de l'écologie des communautés (Agoussar and Yergeau 2021). Offrant plus de clarté sur l'importance de l'adaptation et des interactions complexes au sein des communautés microbiennes dans des environnements en constante évolution.

Bien que nous ayons fait de notre mieux pour examiner les interactions microbiennes en nous basant sur les séquences d'ASV, il est évident que cette approche présente des limitations en termes de résolution au niveau de la souche. Pour relever ce défi, des méthodes plus avancées telles que la métagénomique à haut débit pourraient être envisagées. Cette approche permettrait de séquencer l'ensemble du génome des microorganismes présents dans l'échantillon, permettant ainsi une caractérisation plus précise des souches individuelles et de leurs fonctions spécifiques.

L'étude génomique des microorganismes persistantes a révélé que pour qu'une souche soit capable d'améliorer la résistance de la plante au stress environnementaux, elle devrait tout d'abord être capable de persister dans l'environnement. Cette persistance pourrait être liée à des caractéristiques génomiques, telles que la virulence de la souche, sa capacité à produire des antibiotiques, ainsi que sa capacité à dégrader certains composés complexes ou

toxiques et les utiliser comme sources de nutriments. Après leur colonisation de la plante, ces souches peuvent jouer un rôle direct sur la résistance de la plante au stress hydrique en aidant ainsi à améliorer l'adaptation de la plante hôte au stress hydrique, soit par la fermeture de ces stomates ou la production des osmolytes, et peuvent aussi avoir un rôle indirect qui se traduit par les changements observés dans les communautés bactériennes et fongiques.

En fin de compte, notre étude offre un potentiel considérable pour l'amélioration de la résistance du blé face à la sécheresse, tout en soulignant l'importance de poursuivre les recherches pour une compréhension approfondie des mécanismes sous-jacents impliqués dans l'amélioration de cette résistance. En outre, il pourrait être bénéfique d'explorer davantage les facteurs environnementaux qui pourraient influencer les interactions au sein de l'holobionte du blé. Ainsi, des études ciblées sur les caractéristiques du sol, la composition chimique de la rhizosphère et d'autres variables environnementales pourraient aider à élucider les mécanismes de sélection des microorganismes et à mieux comprendre leur rôle dans la réponse des plantes au stress environnementaux. En intégrant nos résultats dans le contexte plus large de la littérature, nous avons l'occasion de guider de manière plus précise le développement de stratégies d'inoculation ciblées pour une agriculture durable et résiliente.

Pour finir, je tiens à souligner que « c'est les microbes qui auront le dernier mot : *Louis Pasteur* ».

6 BIBLIOGRAPHIE

- Abd El Daim, Islam A., Per Häggblom, Magnus Karlsson, Elna Stenström, and Salmé Timmusk. 2015. "Paenibacillus Polymyxa A26 Sfp-Type PPTase Inactivation Limits Bacterial Antagonism against Fusarium Graminearum but Not of F. Culmorum in Kernel Assay." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00368>.
- Abee, Tjakko, and Jeroen A. Wouters. 1999. "Microbial Stress Response in Minimal Processing." *International Journal of Food Microbiology* 50 (1): 65–91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00078-1).
- Adhikari, Kabindra, and Alfred E. Hartemink. 2016. "Linking Soils to Ecosystem Services — A Global Review." *Geoderma* 262 (January): 101–11. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.08.009>.
- Agoussar, Asmaâ, Hamed Azarbad, Julien Tremblay, and Étienne Yergeau. 2021. "The Resistance of the Wheat Microbial Community to Water Stress Is More Influenced by Plant Compartment than Reduced Water Availability." *FEMS Microbiology Ecology* 97 (12): fiab149. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab149>.
- Agoussar, Asmaâ, and Etienne Yergeau. 2021. "Engineering the Plant Microbiota in the Context of the Theory of Ecological Communities." *Current Opinion in Biotechnology* 70 (August): 220–25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.009>.
- Al-Karaki, Ghazi, B. McMichael, and John Zak. 2004. "Field Response of Wheat to Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Drought Stress." *Mycorrhiza* 14 (4): 263–69. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0265-2>.
- Amellal, N., G. Burtin, F. Bartoli, and T. Heulin. 1998. "Colonization of Wheat Roots by an Exopolysaccharide-Producing Pantoea Agglomerans Strain and Its Effect on Rhizosphere Soil Aggregation." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 3740–47.
- Anderberg, R J, and M K Walker-Simmons. 1992. "Isolation of a Wheat cDNA Clone for an Abscisic Acid-Inducible Transcript with Homology to Protein Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10183–87.
- Asseng, S, P. D Jamieson, B Kimball, P Pinter, K Sayre, J. W Bowden, and S. M Howden. 2004. "Simulated Wheat Growth Affected by Rising Temperature, Increased Water Deficit and Elevated Atmospheric CO₂." *Field Crops Research* 85 (2): 85–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00154-0).
- Azarbad, H., P. Constant, C. Giard-Laliberté, L. D. Bainard, and E. Yergeau. 2018. "Water Stress History and Wheat Genotype Modulate Rhizosphere Microbial Response to Drought." *Soil Biology & Biochemistry* 126: 228–36.
- Azarbad, Hamed, Luke D. Bainard, Asmaâ Agoussar, Julien Tremblay, and Etienne Yergeau. 2022. "The Response of Wheat and Its Microbiome to Contemporary and Historical Water Stress in a Field Experiment." *ISME Communications* 2 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00151-2>.
- Azarbad, Hamed, Philippe Constant, Charlotte Giard-Laliberté, Luke D. Bainard, and Etienne Yergeau. 2018. "Water Stress History and Wheat Genotype Modulate Rhizosphere Microbial Response to Drought." *Soil Biology and Biochemistry* 126 (November): 228–36. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.017>.
- Azarbad, Hamed, Julien Tremblay, Luke D. Bainard, and Etienne Yergeau. 2021. "Relative and Quantitative Rhizosphere Microbiome Profiling Result in Distinct Abundance

- Azarbad, Hamed, Julien Tremblay, Charlotte Giard-Laliberté, Luke D Bainard, and Etienne Yergeau. 2020a. "Four Decades of Soil Water Stress History Together with Host Genotype Constrain the Response of the Wheat Microbiome to Soil Moisture." *FEMS Microbiology Ecology* 96 (fiaa098). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa098>.
- Babalola, Olubukola Oluranti. 2010. "Beneficial Bacteria of Agricultural Importance." *Biotechnology Letters* 32 (11): 1559–70. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>.
- Badri, Dayakar V., Jacqueline M. Chaparro, Ruifu Zhang, Qirong Shen, and Jorge M. Vivanco. 2013. "Application of Natural Blends of Phytochemicals Derived from the Root Exudates of Arabidopsis to the Soil Reveal That Phenolic-Related Compounds Predominantly Modulate the Soil Microbiome." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4502–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433300>.
- Bagci, S. A., H. Ekiz, A. Yilmaz, and I. Cakmak. 2007. "Effects of Zinc Deficiency and Drought on Grain Yield of Field-Grown Wheat Cultivars in Central Anatolia." *Journal of Agronomy and Crop Science* 193 (3): 198–206. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00256.x>.
- Bai, Yang, Daniel B. Müller, Girish Srinivas, Ruben Garrido-Oter, Eva Potthoff, Matthias Rott, Nina Dombrowski, et al. 2015. "Functional Overlap of the Arabidopsis Leaf and Root Microbiota." *Nature* 528 (7582): 364–69. <https://doi.org/10.1038/nature16192>.
- Balser, Teri C., Ann P. Kinzig, and Mary K. Firestone. 2002. "Linking Soil Microbial Communities and Ecosystem Functioning." *The Functional Consequences of Biodiversity: Empirical Progress and Theoretical Extensions*, 265–93.
- Barcellos, Fernando Gomes, Pâmela Menna, Jesiane Stefânia da Silva Batista, and Mariangela Hungria. 2007. "Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a Bradyrhizobium Japonicum Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs Sinorhizobium (Ensifer) Fredii and Bradyrhizobium Elkanii in a Brazilian Savannah Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (8): 2635–43. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-06>.
- Barelli, Larissa, Alison S. Waller, Scott W. Behie, and Michael J. Bidochka. 2020. "Plant Microbiome Analysis after Metarhizium Amendment Reveals Increases in Abundance of Plant Growth-Promoting Organisms and Maintenance of Disease-Suppressive Soil." *PLOS ONE* 15 (4): e0231150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231150>.
- Barnard, Romain L., Catherine A. Osborne, and Mary K. Firestone. 2013. "Responses of Soil Bacterial and Fungal Communities to Extreme Desiccation and Rewetting." *The ISME Journal* 7 (11): 2229–41. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.104>.
- Barnawal, Deepti, Rachna Singh, and Rana P. Singh. 2019. "Chapter Six - Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes." In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, edited by Amit Kishore Singh, Ajay Kumar, and Pawan Kumar Singh, 107–28. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00006-9>.
- Baudoin, Ezékiel, Emile Benizri, and Armand Guckert. 2003. "Impact of Artificial Root Exudates on the Bacterial Community Structure in Bulk Soil and Maize Rhizosphere." *Soil Biology and Biochemistry* 35 (9): 1183–92. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2).
- Bell, Terrence H, Saad El-Din Hassan, Aurélien Lauron-Moreau, Fahad Al-Otaibi, Mohamed Hijri, Etienne Yergeau, and Marc St-Arnaud. 2014. "Linkage between Bacterial and Fungal Rhizosphere Communities in Hydrocarbon-Contaminated Soils Is Related to

- Plant Phylogeny." *The ISME Journal* 8 (2): 331–43. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.149>.
- Bell, Terrence H., Franck O. P. Stefani, Katrina Abram, Julie Champagne, Etienne Yergeau, Mohamed Hijri, and Marc St-Arnaud. 2016. "A Diverse Soil Microbiome Degrades More Crude Oil than Specialized Bacterial Assemblages Obtained in Culture." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (18): 5530–41. <https://doi.org/10.1128/AEM.01327-16>.
- Berendsen, Roeland L., Corné M. J. Pieterse, and Peter A. H. M. Bakker. 2012. "The Rhizosphere Microbiome and Plant Health." *Trends in Plant Science* 17 (8): 478–86. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>.
- Berg, Gabriele, Katja Opelt, Christin Zachow, Jana Lottmann, Monika Götz, Rodrigo Costa, and Kornelia Smalla. 2006. "The Rhizosphere Effect on Bacteria Antagonistic towards the Pathogenic Fungus *Verticillium* Differs Depending on Plant Species and Site." *FEMS Microbiology Ecology* 56 (2): 250–61. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00025.x>.
- Bhattacharya, R. C., M. Maheswari, V. Dineshkumar, P. B. Kirti, S. R. Bhat, and V. L. Chopra. 2004. "Transformation of Brassica Oleracea Var. Capitata with Bacterial *Beta* Gene Enhances Tolerance to Salt Stress." *Scientia Horticulturae* 100 (1): 215–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.08.009>.
- Bloch, Sarah E, Rosemary Clark, Shayin S Gottlieb, L Kent Wood, Neal Shah, San-Ming Mak, James G Lorigan, et al. 2020. "Biological Nitrogen Fixation in Maize: Optimizing Nitrogenase Expression in a Root-Associated Diazotroph." *Journal of Experimental Botany* 71 (15): 4591–4603. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa176>.
- Bouskill, Nicholas J., Tana E. Wood, Richard Baran, Zaw Ye, Benjamin P. Bowen, HsiaoChien Lim, Jizhong Zhou, et al. 2016. "Belowground Response to Drought in a Tropical Forest Soil. I. Changes in Microbial Functional Potential and Metabolism." *Frontiers in Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00525>.
- Brophy, Jennifer A. N., Alexander J. Triassi, Bryn L. Adams, Rebecca L. Renberg, Dimitra N. Stratis-Cullum, Alan D. Grossman, and Christopher A. Voigt. 2018. "Engineered Integrative and Conjugative Elements for Efficient and Inducible DNA Transfer to Undomesticated Bacteria." *Nature Microbiology* 3 (9): 1043–53. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0216-5>.
- Budak, Hikmet, Bala Ani Akpınar, Turgay Unver, and Mine Turktas. 2013. "Proteome Changes in Wild and Modern Wheat Leaves upon Drought Stress by Two-Dimensional Electrophoresis and NanoLC-ESI-MS/MS." *Plant Molecular Biology* 83 (1–2): 89–103. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0024-5>.
- Bulgarelli, Davide. 2018. "How Manipulating the Plant Microbiome Could Improve Agriculture." *The Scientist*. February 1, 2018. <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/51422/title/How-Manipulating-the-Plant-Microbiome-Could-Improve-Agriculture/>.
- Bulgarelli, Davide, Ruben Garrido-Oter, Philipp C. Münch, Aaron Weiman, Johannes Dröge, Yao Pan, Alice C. McHardy, and Paul Schulze-Lefert. 2015. "Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley." *Cell Host & Microbe* 17 (3): 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>.
- Bulgarelli, Davide, Klaus Schlaeppi, Stijn Spaepen, Emiel Ver Loren van Themaat, and Paul Schulze-Lefert. 2013. "Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants." *Annual Review of Plant Biology* 64 (1): 807–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>.

- Camaille, Manon, Nicolas Fabre, Christophe Clément, and Essaid Ait Barka. 2021. "Advances in Wheat Physiology in Response to Drought and the Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Trigger Drought Tolerance." *Microorganisms* 9 (4): 687. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040687>.
- Campbell, A.b. 2013. "Blé | l'Encyclopédie Canadienne." 2013. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/ble-2>.
- Canada, Environment and Climate Change. 2018. "Changes in Precipitation." September 26, 2018. <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/climate-change/canadian-centre-climate-services/basics/trends-projections/changes-precipitation.html>.
- Chaudhry, Vasvi, Paul Runge, Priyamedha Sengupta, Gunther Doehlemann, Jane E Parker, and Eric Kemen. 2021. "Shaping the Leaf Microbiota: Plant–Microbe–Microbe Interactions." *Journal of Experimental Botany* 72 (1): 36–56. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa417>.
- Cheng, Zhenyu, Eunmi Park, and Bernard R. Glick. 2007. "1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from *Pseudomonas Putida* UW4 Facilitates the Growth of Canola in the Presence of Salt." *Canadian Journal of Microbiology* 53 (7): 912–18. <https://doi.org/10.1139/W07-050>.
- Chong, Jasmine, Peng Liu, Guangyan Zhou, and Jianguo Xia. 2020. "Using MicrobiomeAnalyst for Comprehensive Statistical, Functional, and Meta-Analysis of Microbiome Data." *Nature Protocols* 15 (3): 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>.
- Compant, Stéphane, Christophe Clément, and Angela Sessitsch. 2010. "Plant Growth-Promoting Bacteria in the Rhizo- and Endosphere of Plants: Their Role, Colonization, Mechanisms Involved and Prospects for Utilization." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (5): 669–78. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
- Copeland, Charles, and Paul Schulze-Lefert. 2020. "Leaf-Derived Bacterial Communities Adapt to the Local Environment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (2): 808–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920431117>.
- Côté, Jean-Philippe, Shawn French, Sebastian S. Gehrke, Craig R. MacNair, Chand S. Mangat, Amrita Bharat, and Eric D. Brown. 2016. "The Genome-Wide Interaction Network of Nutrient Stress Genes in *Escherichia Coli*." *MBio* 7 (6): e01714-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01714-16>.
- Couzigou, Jean-Malo, Olivier André, Bruno Guillotin, Marlène Alexandre, and Jean-Philippe Combier. 2016. "Use of MicroRNA-Encoded Peptide MiPEP172c to Stimulate Nodulation in Soybean." *New Phytologist* 211 (2): 379–81. <https://doi.org/10.1111/nph.13991>.
- Couzigou, Jean-Malo, Dominique Laressergues, Guillaume Bécard, and Jean-Philippe Combier. 2015. "MiRNA-Encoded Peptides (MiPEPs): A New Tool to Analyze the Roles of MiRNAs in Plant Biology." *RNA Biology* 12 (11): 1178–80. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094601>.
- Cox, Deborah Elizabeth, Steven Dyer, Ryan Weir, Xavier Cheseto, Matthew Sturrock, Danny Coyne, Baldwyn Torto, Aaron G. Maule, and Johnathan J. Dalzell. 2019. "ABC Transporter Genes ABC-C6 and ABC-G33 Alter Plant-Microbe-Parasite Interactions in the Rhizosphere." *Scientific Reports* 9 (1): 19899. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56493-w>.
- Csonka, L. N. 1989. "Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress." *Microbiological Reviews* 53 (1): 121–47.

- Curtis, B.C. 2022. "Le Blé Dans Le Monde - BC Curtis." 2022. <https://www.fao.org/3/Y4011E/y4011e04.htm#bm04>.
- David, Aaron S., Khum B. Thapa-Magar, Eric S. Menges, Christopher A. Searcy, and Michelle E. Afkhami. 2020. "Do Plant–Microbe Interactions Support the Stress Gradient Hypothesis?" *Ecology* 101 (8): e03081. <https://doi.org/10.1002/ecy.3081>.
- Defez, Roberto, Anna Andreozzi, Michael Dickinson, Adrian Charlton, Luca Tadini, Paolo Pesaresi, and Carmen Bianco. 2017. "Improved Drought Stress Response in Alfalfa Plants Nodulated by an IAA Over-Producing Rhizobium Strain." *Frontiers in Microbiology* 8 (December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02466>.
- Dellaporta, Stephen L., Jonathan Wood, and James B. Hicks. 1983. "A Plant DNA Minipreparation: Version II." *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4): 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>.
- Duggan, B. L., D. R. Domitruk, and D. B. Fowler. 2000. "Yield Component Variation in Winter Wheat Grown under Drought Stress." *Canadian Journal of Plant Science* 80 (4): 739–45. <https://doi.org/10.4141/P00-006>.
- Edgar, Robert C., Brian J. Haas, Jose C. Clemente, Christopher Quince, and Rob Knight. 2011. "UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection." *Bioinformatics* 27 (16): 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.
- Edwards, Joan E., Sharon A. Huws, Eun Joong Kim, and Alison H. Kingston-Smith. 2007. "Characterization of the Dynamics of Initial Bacterial Colonization of Nonconserved Forage in the Bovine Rumen." *FEMS Microbiology Ecology* 62 (3): 323–35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00392.x>.
- Edwards, Joseph, Cameron Johnson, Christian Santos-Medellín, Eugene Lurie, Natraj Kumar Podishetty, Srijak Bhatnagar, Jonathan A. Eisen, and Venkatesan Sundaresan. 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 (8): E911-920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>.
- Elsas, Jan Dirk van, Mario Chiurazzi, Cyrus A. Mallon, Dana Elhottová, Václav Křišťůfek, and Joana Falcão Salles. 2012. "Microbial Diversity Determines the Invasion of Soil by a Bacterial Pathogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4): 1159–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109326109>.
- Elton, Charles S. 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. University of Chicago Press. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/E/bo3614808.html>.
- Emami, Somayeh, Hossein Ali Alikhani, Ahmad Ali Pourbabaee, Hassan Etesami, Babak Motasharezadeh, and Fereydoon Sarmadian. 2020. "Consortium of Endophyte and Rhizosphere Phosphate Solubilizing Bacteria Improves Phosphorous Use Efficiency in Wheat Cultivars in Phosphorus Deficient Soils." *Rhizosphere* 14 (June): 100196. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196>.
- Eng, Alexander, and Elhanan Borenstein. 2016. "An Algorithm for Designing Minimal Microbial Communities with Desired Metabolic Capacities." *Bioinformatics* 32 (13): 2008–16. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw107>.
- Eng, Alexander, and Elhanan Borenstein. 2019. "Microbial Community Design: Methods, Applications, and Opportunities." *Current Opinion in Biotechnology, Systems Biology • Nanobiotechnology*, 58 (August): 117–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.002>.

- Erin, James-Abra. 2013. "Blé." *The Canadian Encyclopedia*. 2013. <http://www.encyclopediecanadienne.ca/fr/article/ble-2/>.
- Evans, Sarah E., and Matthew D. Wallenstein. 2014. "Climate Change Alters Ecological Strategies of Soil Bacteria." *Ecology Letters* 17 (2): 155–64. <https://doi.org/10.1111/ele.12206>.
- Farrar, Kerrie, David Bryant, and Naomi Cope-Selby. 2014. "Understanding and Engineering Beneficial Plant–Microbe Interactions: Plant Growth Promotion in Energy Crops." *Plant Biotechnology Journal* 12 (9): 1193–1206. <https://doi.org/10.1111/pbi.12279>.
- Faucon, Michel-Pierre, David Houben, and Hans Lambers. 2017. "Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services." *Trends in Plant Science* 22 (5): 385–94. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.005>.
- Figueiredo, Márcia V. B., Hélio A. Burity, Cosme R. Martínez, and Christopher P. Chanway. 2008. "Alleviation of Drought Stress in the Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) by Co-Inoculation with *Paenibacillus Polymyxa* and *Rhizobium Tropicum*." *Applied Soil Ecology* 40 (1): 182–88. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.005>.
- Firáková, Silvia, Mária Šturdíková, and Marta Múčková. 2007. "Bioactive Secondary Metabolites Produced by Microorganisms Associated with Plants." *Biologia* 62 (3): 251–57.
- Fournier, Bénédicte, André Klier, and Georges Rapoport. 2001. "The Two-Component System ArlS–ArlR Is a Regulator of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus Aureus*." *Molecular Microbiology* 41 (1): 247–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02515.x>.
- Fresneau, Chantal, Jaleh Ghashghaie, and Gabriel Cornic. 2007. "Drought Effect on Nitrate Reductase and Sucrose-Phosphate Synthase Activities in Wheat (*Triticum Durum* L.): Role of Leaf Internal CO₂." *Journal of Experimental Botany* 58 (11): 2983–92. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm150>.
- Fujita, Daiki, Ryuta Tobe, Hirotaka Tajima, Yukari Anma, Ryo Nishida, and Hisaaki Mihara. 2021. "Genetic Analysis of Tellurate Reduction Reveals the Selenate/Tellurate Reductase Genes *YnfEF* and the Transcriptional Regulation of *MoeA* by *NsrR* in *Escherichia Coli*." *The Journal of Biochemistry* 169 (4): 477–84. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa120>.
- Gagné-Bourque, François, Annick Bertrand, Annie Claessens, Konstantinos A. Aliferis, and Suha Jabaji. 2016. "Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum Pratense* L.) Colonized with *Bacillus Subtilis* B26." *Frontiers in Plant Science* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00584>.
- Garbeva, P., J. D. van Elsas, and J. A. van Veen. 2008. "Rhizosphere Microbial Community and Its Response to Plant Species and Soil History." *Plant and Soil* 302 (1): 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9432-0>.
- García-Jiménez, Beatriz, José Luis García, and Juan Nogales. 2018. "FLYCOP: Metabolic Modeling-Based Analysis and Engineering Microbial Communities." *Bioinformatics* 34 (17): i954–63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty561>.
- Gasch, Audrey P., Paul T. Spellman, Camilla M. Kao, Orna Carmel-Harel, Michael B. Eisen, Gisela Storz, David Botstein, Patrick O. Brown, and Pamela A. Silver. 2000. "Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes." *Molecular Biology of the Cell* 11 (12): 4241–57. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>.
- Giard-Laliberté, Charlotte, Hamed Azarbad, Julien Tremblay, Luke Bainard, and Étienne Yergeau. 2019. "A Water Stress-Adapted Inoculum Affects Rhizosphere Fungi, but

Not Bacteria nor Wheat.” *FEMS Microbiology Ecology*.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiz080>.

- Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja. 2010. “Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants.” *Plant Physiology and Biochemistry: PPB* 48 (12): 909–30. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.
- Giri, Samir, Shraddha Shitut, and Christian Kost. 2020. “Harnessing Ecological and Evolutionary Principles to Guide the Design of Microbial Production Consortia.” *Current Opinion in Biotechnology, Energy Biotechnology • Environmental Biotechnology*, 62 (April): 228–38. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.012>.
- Glick, Bernard R. 2014. “Bacteria with ACC Deaminase Can Promote Plant Growth and Help to Feed the World.” *Microbiological Research, Special Issue on Plant Growth Promotion.*, 169 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.
- Glick, Bernard R., Zhenyu Cheng, Jennifer Czarny, and Jin Duan. 2007. “Promotion of Plant Growth by ACC Deaminase-Producing Soil Bacteria.” *European Journal of Plant Pathology* 119 (3): 329–39. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9162-4>.
- Glick, Bernard R., Donna M. Penrose, and Jiping Li. 1998. “A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-Promoting Bacteria.” *Journal of Theoretical Biology* 190 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>.
- Glick, Bernard R., Biljana Todorovic, Jennifer Czarny, Zhenyu Cheng, Jin Duan, and Brendan McConkey. 2007. “Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase.” *Critical Reviews in Plant Sciences* 26 (5–6): 227–42. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>.
- Gouvernement du Canada, Agence canadienne d’inspection des aliments. 2012. “La biologie du *Triticum aestivum* L. (blé).” Matériel de référence. March 5, 2012. <http://www.inspection.gc.ca/vegetaux/vegetaux-a-caracteres-nouveaux/demandeurs/directive-94-08/documents-sur-la-biologie/triticum-aestivum-l/fra/1330982915526/1330982992440#b1>.
- Government of Canada, Statistics Canada. 2022. “The Daily — Farm Income, 2021.” May 25, 2022. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/220525/dq220525a-eng.htm>.
- Greenblum, Sharon, Hsuan-Chao Chiu, Roie Levy, Rogan Carr, and Elhanan Borenstein. 2013. “Towards a Predictive Systems-Level Model of the Human Microbiome: Progress, Challenges, and Opportunities.” *Current Opinion in Biotechnology, Nanobiotechnology • Systems biology*, 24 (4): 810–20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.001>.
- Gu, Yian, Ke Dong, Stefan Geisen, Wei Yang, Yaner Yan, Dalu Gu, Naisen Liu, Nikolai Borisjuk, Yuming Luo, and Ville-Petri Friman. 2020. “The Effect of Microbial Inoculant Origin on the Rhizosphere Bacterial Community Composition and Plant Growth-Promotion.” *Plant and Soil*.
- Haichar, Feth el Zahar, Christine Marol, Odile Berge, J. Ignacio Rangel-Castro, James I. Prosser, Jérôme Balesdent, Thierry Heulin, and Wafa Achouak. 2008. “Plant Host Habitat and Root Exudates Shape Soil Bacterial Community Structure.” *The ISME Journal* 2 (12): 1221–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>.
- Harcombe, William R., William J. Riehl, Ilija Dukovski, Brian R. Granger, Alex Betts, Alex H. Lang, Gracia Bonilla, et al. 2014. “Metabolic Resource Allocation in Individual Microbes Determines Ecosystem Interactions and Spatial Dynamics.” *Cell Reports* 7 (4): 1104–15. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.070>.

- Hardoim, Pablo R., Leo S. van Overbeek, and Jan Dirk van Elsas. 2008. "Properties of Bacterial Endophytes and Their Proposed Role in Plant Growth." *Trends in Microbiology* 16 (10): 463–71. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
- Harrison, Judith, Alexandre Jamet, Cecilia I. Muglia, Ghislaine Van de Sype, O. Mario Aguilar, Alain Puppo, and Pierre Frenedo. 2005. "Glutathione Plays a Fundamental Role in Growth and Symbiotic Capacity of *Sinorhizobium Meliloti*." *Journal of Bacteriology* 187 (1): 168–74. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.168-174.2005>.
- Hone, Holly, Ross Mann, Guodong Yang, Jatinder Kaur, Ian Tannenbaum, Tongda Li, German Spangenberg, and Timothy Sawbridge. 2021. "Profiling, Isolation and Characterisation of Beneficial Microbes from the Seed Microbiomes of Drought Tolerant Wheat." *Scientific Reports* 11 (1): 11916. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91351-8>.
- Hu, Jie, Zhong Wei, Ville-Petri Friman, Shao-hua Gu, Xiaofang Wang, Nico Eisenhauer, Yang Tianjie, et al. 2016. "Probiotic Diversity Enhances Rhizosphere Microbiome Function and Plant Disease Suppression." *MBio* 7 (December): e01790-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01790-16>.
- Huang, C. H., T. Hsiang, and J. T. Trevors. 2013. "Comparative Bacterial Genomics: Defining the Minimal Core Genome." *Antonie van Leeuwenhoek* 103 (2): 385–98. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9819-7>.
- Huang, Chien-Yu, Huan Wang, Po Hu, Rachael Hamby, and Hailing Jin. 2019. "Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions." *Cell Host & Microbe* 26 (2): 173–82. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>.
- Hubbard, Michelle. 2012. "Fungal Endophytes That Confer Heat and Drought Tolerance to Wheat." PhD. thesis, Saskatoon: University of Saskatchewan. <https://harvest.usask.ca/handle/10388/ETD-2012-09-716>.
- Hubbard, Michelle, James J. Germida, and Vladimir Vujanovic. 2014. "Fungal Endophyte Colonization Coincides with Altered DNA Methylation in Drought-Stressed Wheat Seedlings." *Canadian Journal of Plant Science* 94 (2): 223–34. <https://doi.org/10.4141/cjps2012-111>.
- Issa, Alaa, Qassim Esmaeel, Lisa Sanchez, Barbara Courteaux, Jean-Francois Guise, Yves Gibon, Patricia Ballias, et al. 2018. "Impacts of *Paraburkholderia phytofirmans* Strain PsJN on Tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.) Under High Temperature." *Frontiers in Plant Science* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01397>.
- Jacoby, Richard P, Anna Koprivova, and Stanislav Kopriva. 2021. "Pinpointing Secondary Metabolites That Shape the Composition and Function of the Plant Microbiome." *Journal of Experimental Botany* 72 (1): 57–69. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa424>.
- Jeong, Haeyoung, Soo-Keun Choi, Choong-Min Ryu, and Seung-Hwan Park. 2019. "Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus Polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health." *Frontiers in Microbiology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00467>.
- Jia, Xia, YongHua Zhao, WenKe Wang, and Yunhua He. 2015. "Elevated Temperature Altered Photosynthetic Products in Wheat Seedlings and Organic Compounds and Biological Activity in Rhizosphere Soil under Cadmium Stress." *Scientific Reports* 5 (September): 14426. <https://doi.org/10.1038/srep14426>.
- Kaminsky, Laura M., Ryan V. Trexler, Rondy J. Malik, Kevin L. Hockett, and Terrence H. Bell. 2019. "The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants." *Trends in Biotechnology* 37 (2): 140–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.011>.
- Kamo, Tsunashi, Syuntaro Hiradate, Ken Suzuki, Ichiro Fujita, Shinji Yamaki, Tadashi Yoneda, Motoo Koitabashi, and Shigenobu Yoshida. 2018. "Methylobamine, a UVA-

- Absorbing Compound from the Plant-Associated Bacteria *Methylobacterium* Sp.” *Natural Product Communications* 13 (2): 1934578X1801300208. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300208>.
- Kamran, Atif, Muhammad Iqbal, and Dean Spaner. 2014. “Flowering Time in Wheat (*Triticum Aestivum* L.): A Key Factor for Global Adaptability.” *Euphytica* 197 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1075-7>.
- Kasim, Wedad A., Mohamed E. H. Osman, Mohamed N. Omar, and Samar Salama. 2021. “Enhancement of Drought Tolerance in *Triticum Aestivum* L. Seedlings Using *Azospirillum Brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas Maltophilia* B11.” *Bulletin of the National Research Centre* 45 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00546-6>.
- Kaushal, Manoj, and Suhas P. Wani. 2016. “Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Drought Stress Alleviators to Ameliorate Crop Production in Drylands.” *Annals of Microbiology* 66 (1): 35–42.
- Kavroulakis, Nektarios, Georgios Doupis, Ioannis E. Papadakis, Constantinos Ehaliotis, and Kalliope K. Papadopoulou. 2018. “Tolerance of Tomato Plants to Water Stress Is Improved by the Root Endophyte *Fusarium Solani* FsK.” *Rhizosphere* 6 (June): 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>.
- Kempf, Bettina, and E. Bremer. 1998. “Uptake and Synthesis of Compatible Solutes as Microbial Stress Responses to High-Osmolality Environments.” *Archives of Microbiology* 170 (5): 319–30. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>.
- Khan, Irshad Ahmad, Shahbaz Ahmad, and Najma Ayub. 2003. “Response of Oat (*Avena Sativa*) to Inoculation with Vesicular Arbuscular Mycorrhizae (VAM) in the Presence of Phosphorus.” *Asian Journal of Plant Sciences*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012049763>.
- Khan, Naeem, Asghari Bano, M. Atikur Rahman, Jia Guo, Zhiyu Kang, and Md Ali Babar. 2019. “Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Induced by PGPR and PGRs.” *Scientific Reports* 9 (1): 2097. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38702-8>.
- Kim, Jeong-eun, Og-Geum Woo, Yoowon Bae, Hye Lim Keum, Sungran Chung, Woo Jun Sul, and Jae-Hoon Lee. 2020. “Enhanced Drought and Salt Stress Tolerance in *Arabidopsis* by *Flavobacterium Crocinum* HYN0056T.” *Journal of Plant Biology* 63 (1): 63–71. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09236-8>.
- Kim, Jihyun F., Haeyoung Jeong, Soo-Young Park, Seong-Bin Kim, Yon Kyoung Park, Soo-Keun Choi, Choong-Min Ryu, et al. 2010. “Genome Sequence of the Polymyxin-Producing Plant-Probiotic Rhizobacterium *Paenibacillus Polymyxa* E681.” *Journal of Bacteriology* 192 (22): 6103–4. <https://doi.org/10.1128/JB.00983-10>.
- Koprivova, Anna, Stefan Schuck, Richard P. Jacoby, Irene Klinkhammer, Bastian Welter, Lisa Leson, Anna Martyn, et al. 2019. “Root-Specific Camalexin Biosynthesis Controls the Plant Growth-Promoting Effects of Multiple Bacterial Strains.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (31): 15735–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818604116>.
- Korch, Shaleen B., and Thomas M. Hill. 2006. “Ectopic Overexpression of Wild-Type and Mutant *HipA* Genes in *Escherichia Coli*: Effects on Macromolecular Synthesis and Persister Formation.” *Journal of Bacteriology* 188 (11): 3826–36. <https://doi.org/10.1128/JB.01740-05>.
- Korenblum, Elisa, Yonghui Dong, Jędrzej Szymanski, Sayantan Panda, Adam Jozwiak, Hassan Massalha, Sagit Meir, Ilana Rogachev, and Asaph Aharoni. 2020. “Rhizosphere Microbiome Mediates Systemic Root Metabolite Exudation by Root-to-

- Root Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (7): 3874–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912130117>.
- Kour, Divjot, Kusam Lata Rana, Tanvir Kaur, Imran Sheikh, Ajar Nath Yadav, Vinod Kumar, Harcharan Singh Dhaliwal, and Anil Kumar Saxena. 2020. "Microbe-Mediated Alleviation of Drought Stress and Acquisition of Phosphorus in Great Millet (*Sorghum Bicolour* L.) by Drought-Adaptive and Phosphorus-Solubilizing Microbes." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23 (January): 101501. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101501>.
- Kour, Divjot, Kusam Lata Rana, Ajar Nath Yadav, Imran Sheikh, Vinod Kumar, Harcharan Singh Dhaliwal, and Anil Kumar Saxena. 2020. "Amelioration of Drought Stress in Foxtail Millet (*Setaria Italica* L.) by P-Solubilizing Drought-Tolerant Microbes with Multifarious Plant Growth Promoting Attributes." *Environmental Sustainability* 3 (1): 23–34. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00094-1>.
- Kowalchuk, George A., Etienne Yergeau, Johan H. J. Leveau, Angela Sessitsch, and Mark Bailey. 2010. "Plant-Associated Microbial Communities." In , edited by Wen-Tso Lui and Janet K. Jansson. New York: Caister Academic Press. <http://www.horizonpress.com/environmental-microbiology>.
- Krasensky, Julia, and Claudia Jonak. 2012. "Drought, Salt, and Temperature Stress-Induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks." *Journal of Experimental Botany* 63 (4): 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>.
- Kumar, Antul, Achla Sharma, Rajni Sharma, Anuj Choudhary, Puja Srivastava, Harmanjot Kaur, and Asish Kumar Padhy. 2022. "Morpho-Physiological Evaluation of *Elymus Semicostatus* (Nees Ex Steud.) Melderis as Potential Donor for Drought Tolerance in Wheat (*Triticum Aestivum* L.)." *Genetic Resources and Crop Evolution* 69 (1): 411–30. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01241-1>.
- Kumar, Vishal, Mehak Baweja, Puneet K. Singh, and Pratyosh Shukla. 2016. "Recent Developments in Systems Biology and Metabolic Engineering of Plant–Microbe Interactions." *Frontiers in Plant Science* 7. Camaille.
- Kusuma, Muhammad Syahril Badri, and Arno Adi Kuntoro. 2013. *Spatio Analysis of Hydrological for Regional Drought Index. Case Studies Citarum River Basin, West Java*.
- Lastochkina, Oksana, Darya Garshina, Sergey Ivanov, Ruslan Yuldashev, Regina Khafizova, Chulpan Allagulova, Kristina Fedorova, Azamat Avalbaev, Dilara Maslennikova, and Massimo Bosacchi. 2020. "Seed Priming with Endophytic *Bacillus Subtilis* Modulates Physiological Responses of Two Different *Triticum Aestivum* L. Cultivars under Drought Stress." *Plants* 9 (12): 1810. <https://doi.org/10.3390/plants9121810>.
- Lauressergues, Dominique, Jean-Malo Couzigou, Hélène San Clemente, Yves Martinez, Christophe Dunand, Guillaume Bécard, and Jean-Philippe Combier. 2015. "Primary Transcripts of MicroRNAs Encode Regulatory Peptides." *Nature* 520 (7545): 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature14346>.
- Lindow, Steven E., and Maria T. Brandl. 2003. "Microbiology of the Phyllosphere." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1875–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>.
- Ling, Jun, Hui Wang, Ping Wu, Tao Li, Yu Tang, Nawar Naseer, Huiming Zheng, Catherine Masson-Boivin, Zengtao Zhong, and Jun Zhu. 2016. "Plant Nodulation Inducers Enhance Horizontal Gene Transfer of *Azorhizobium Caulinodans* Symbiosis Island." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (48): 13875–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615121113>.

- Liu, Hongwei, Laura E. Brettell, Zhiguang Qiu, and Brajesh K. Singh. 2020. "Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants." *Trends in Plant Science* 25 (8): 733–43. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014>.
- Liu, Yupei, Aiping Zhu, Hongming Tan, Lixiang Cao, and Renduo Zhang. 2019. "Engineering Banana Endosphere Microbiome to Improve Fusarium Wilt Resistance in Banana." *Microbiome* 7 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0690-x>.
- Lopes, Lucas D., Michele de Cássia Pereira e Silva, and Fernando D. Andreote. 2016. "Bacterial Abilities and Adaptation Toward the Rhizosphere Colonization." *Frontiers in Microbiology* 7 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01341>.
- Lunn, John Edward, Ines Delorge, Carlos María Figueroa, Patrick Van Dijck, and Mark Stitt. 2014. "Trehalose Metabolism in Plants." *The Plant Journal* 79 (4): 544–67. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>.
- Madkour, Magdy A., Linda Tombras Smith, and Gary M. Smith. 1990. "Preferential Osmolyte Accumulation: A Mechanism of Osmotic Stress Adaptation in Diazotrophic Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9): 2876–81. <https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2876-2881.1990>.
- Magallon-Servin, Paola, Hani Antoun, Salma Taktek, and Luz E. de-Bashan. 2020. "Designing a Multi-Species Inoculant of Phosphate Rock-Solubilizing Bacteria Compatible with Arbuscular Mycorrhizae for Plant Growth Promotion in Low-P Soil Amended with PR." *Biology and Fertility of Soils* 56 (4): 521–36. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01452-1>.
- Mahapatra, Subhasmita, Radheshyam Yadav, and Wusirika Ramakrishna. 2022. "Bacillus Subtilis Impact on Plant Growth, Soil Health and Environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde." *Journal of Applied Microbiology* 132 (5): 3543–62. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>.
- Maheshwari, Meenu, Hussein H. Abulreesh, Mohammad Shavez Khan, Iqbal Ahmad, and John Pichtel. 2017. "Horizontal Gene Transfer in Soil and the Rhizosphere: Impact on Ecological Fitness of Bacteria." In *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, 111–30. Springer.
- Mahmood, Ahmad, Oğuz Can Turgay, Muhammad Farooq, and Rifat Hayat. 2016. "Seed Biopriming with Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Review." *FEMS Microbiology Ecology* 92 (8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>.
- Malchair, Sandrine, H. J. De Boeck, CMHM Lemmens, Roel Merckx, Ingrid Nijs, Reinhart Ceulemans, and Monique Carnol. 2010. "Do Climate Warming and Plant Species Richness Affect Potential Nitrification, Basal Respiration and Ammonia-Oxidizing Bacteria in Experimental Grasslands?" *Soil Biology and Biochemistry* 42 (11): 1944–51.
- Mallon, C. A., X. Le Roux, G. S. van Doorn, F. Dini-Andreote, F. Poly, and J. F. Salles. 2018. "The Impact of Failure: Unsuccessful Bacterial Invasions Steer the Soil Microbial Community Away from the Invader's Niche." *The ISME Journal* 12 (3): 728–41. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0003-y>.
- Marastoni, Laura, Luigi Lucini, Begoña Miras-Moreno, Marco Trevisan, Davide Segal, Anita Zamboni, and Zeno Varanini. 2020. "Changes in Physiological Activities and Root Exudation Profile of Two Grapevine Rootstocks Reveal Common and Specific Strategies for Fe Acquisition." *Scientific Reports* 10 (1): 18839. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75317-w>.
- Martins, Samuel Julio, Geisiane Alves Rocha, Hyrandir Cabral de Melo, Raphaela de Castro Georg, Cirano José Ulhôa, Érico de Campos Dianese, Leticia Harumi Oshiquiri, et al. 2018. "Plant-Associated Bacteria Mitigate Drought Stress in Soybean." *Environmental*

Science and Pollution Research International, March. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1610-5>.

- Marulanda, Adriana, José-Miguel Barea, and Rosario Azcón. 2009. "Stimulation of Plant Growth and Drought Tolerance by Native Microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness." *Journal of Plant Growth Regulation* 28 (2): 115–24. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9079-6>.
- Mawarda, Panji Cahya, Xavier Le Roux, Jan Dirk van Elsas, and Joana Falcao Salles. 2020. "Deliberate Introduction of Invisible Invaders: A Critical Appraisal of the Impact of Microbial Inoculants on Soil Microbial Communities." *Soil Biology and Biochemistry* 148 (September): 107874. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874>.
- Maxton, Ann, Poonam Singh, and Sam A. Masih. 2018. "ACC Deaminase-Producing Bacteria Mediated Drought and Salt Tolerance in *Capsicum Annuum*." *Journal of Plant Nutrition* 41 (5): 574–83. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1392574>.
- Mayak, Shimon, Tsipora Tirosh, and Bernard R. Glick. 2004a. "Plant Growth-Promoting Bacteria That Confer Resistance to Water Stress in Tomatoes and Peppers." *Plant Science* 166 (2): 525–30. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>.
- Mayak, Shimon, Tsipora Tirosh, and Bernard R Glick. 2004b. "Plant Growth-Promoting Bacteria Confer Resistance in Tomato Plants to Salt Stress." *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (6): 565–72. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>.
- Maymon, Maskit, Pilar Martínez-Hidalgo, Stephen Tran, Tyler Ice, Karena Craemer, Teni Anbarchian, Tiffany Sung, et al. 2015. "Mining the Phytomicrobiome to Understand How Bacterial Coinoculations Enhance Plant Growth." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00784>.
- Maynard, Donald N., and George J. Hochmuth. 2007. *Knott's Handbook for Vegetable Growers*. 5th ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Michel, Burlyn E., and Merrill R. Kaufmann. 1973. "The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000." *Plant Physiology* 51 (5): 914–16. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>.
- Middleton, Harriet, Étienne Yergeau, Cécile Monard, Jean-Philippe Combiér, and Abdelhak El Amrani. 2021. "Rhizospheric Plant–Microbe Interactions: MiRNAs as a Key Mediator." *Trends in Plant Science* 26 (2): 132–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.005>.
- Miranda, Victoria, Gloria Andrea Silva-Castro, Juan Manuel Ruiz-Lozano, Sebastian Fracchia, and Inmaculada García-Romera. 2023. "Fungal Endophytes Enhance Wheat and Tomato Drought Tolerance in Terms of Plant Growth and Biochemical Parameters." *Journal of Fungi* 9 (3): 384. <https://doi.org/10.3390/jof9030384>.
- Mitter, Birgit, Nikolaus Pfaffenbichler, Richard Flavell, Stéphane Compant, Livio Antonielli, Alexandra Petric, Teresa Berninger, et al. 2017. "A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds." *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00011>.
- Mitter, Birgit, Angela Sessitsch, and Muhammad Naveed. 2015. *Method for Producing Plant Seed Containing Endophytic Micro-Organisms*. Google Patents.
- Moghaieb, Reda E.A., Dalia S. Ahmed, Ahmed Gaber, and Abdelhadi A. Abdelhadi. 2021. "Overexpression of Bacterial KatE Gene Improves the Resistance of Modified Tomato Plant against *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*." *GM Crops & Food* 12 (1): 315–27. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1903374>.
- Mondy, Samuel, Aurore Lenglet, Amelie Beury-Cirou, Celestin Libanga, Pascal Ratet, Denis Faure, and Yves Dessaux. 2014. "An Increasing Opine Carbon Bias in Artificial Exudation Systems and Genetically Modified Plant Rhizospheres Leads to an

- Increasing Reshaping of Bacterial Populations.” *Molecular Ecology* 23 (19): 4846–61. <https://doi.org/10.1111/mec.12890>.
- Moroenyane, I., L. Mendes, J. Tremblay, B. Tripathi, and É. Yergeau. 2021. “Plant Compartments and Developmental Stages Modulate the Balance between Niche-Based and Neutral Processes in Soybean Microbiome.” *Microbial Ecology*, January. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01688-w>.
- Moroenyane, Itumeleng, Julien Tremblay, and Etienne Yergeau. 2021. “Soybean Microbiome Recovery after Disruption Is Modulated by the Seed and Not the Soil Microbiome.” *Phytobiomes Journal*, May. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-21-0008-R>.
- Mudgett, M B, and S Clarke. 1994. “Hormonal and Environmental Responsiveness of a Developmentally Regulated Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase in Wheat.” *Journal of Biological Chemistry* 269 (41): 25605–12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47293-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47293-6).
- Müller, Daniel B., Christine Vogel, Yang Bai, and Julia A. Vorholt. 2016. “The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives.” *Annual Review of Genetics* 50 (1): 211–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>.
- Murillo-Roos, Mariana, Hafiz Syed M. Abdullah, Mossaab Debbar, Nico Ueberschaar, and Matthew T. Agler. 2022. “Cross-Feeding Niches among Commensal Leaf Bacteria Are Shaped by the Interaction of Strain-Level Diversity and Resource Availability.” *The ISME Journal* 16 (9): 2280–89. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01271-2>.
- NDMC. 2023. “Types of Drought | National Drought Mitigation Center.” University of Nebraska-Lincoln. National Drought Mitigation Center. 2023. <https://drought.unl.edu/Education/DroughtIn-depth/TypesofDrought.asp>
- Ngumbi, Esther, and Joseph Kloepper. 2016. “Bacterial-Mediated Drought Tolerance: Current and Future Prospects.” *Applied Soil Ecology* 105 (September): 109–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>.
- Nunan, Naoise, Timothy J. Daniell, Brajesh K. Singh, Artemis Papert, James W. McNicol, and James I. Prosser. 2005. “Links between Plant and Rhizoplane Bacterial Communities in Grassland Soils, Characterized Using Molecular Techniques.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 6784–92. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6784-6792.2005>.
- O’Callaghan, Maureen. 2016. “Microbial Inoculation of Seed for Improved Crop Performance: Issues and Opportunities.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (13): 5729–46.
- Osakabe, Yuriko, Keishi Osakabe, Kazuo Shinozaki, and Lam-Son Tran. 2014. “Response of Plants to Water Stress.” *Frontiers in Plant Science* 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00086>.
- Pande, Pranav M., Hamed Azarbad, Julien Tremblay, Marc St-Arnaud, and Etienne Yergeau. 2022. “Metatranscriptomic Response of the Wheat Holobiont to Decreasing Soil Water Content.” *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.29.510153>.
- Paredes, Sur Herrera, Tianxiang Gao, Theresa F. Law, Omri M. Finkel, Tatiana Mucyn, Paulo José Pereira Lima Teixeira, Isaí Salas González, et al. 2018. “Design of Synthetic Bacterial Communities for Predictable Plant Phenotypes.” *PLOS Biology* 16 (2): e2003962. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003962>.
- Paul, Diby, and Sudha Nair. 2008. “Stress Adaptations in a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with Increasing Salinity in the Coastal Agricultural Soils.” *Journal of Basic Microbiology* 48 (5): 378–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700365>.

- Pausch, Johanna, and Yakov Kuzyakov. 2018. "Carbon Input by Roots into the Soil: Quantification of Rhizodeposition from Root to Ecosystem Scale." *Global Change Biology* 24 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>.
- Penrose, Donna M., and Bernard R. Glick. 2003. "Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria." *Physiologia Plantarum* 118 (1): 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>.
- Perez-Garcia, Octavio, Gavin Lear, and Naresh Singhal. 2016. "Metabolic Network Modeling of Microbial Interactions in Natural and Engineered Environmental Systems." *Frontiers in Microbiology* 7: 673. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00673>.
- Perrineau, M. M., C. Le Roux, A. Galiana, A. Faye, R. Duponnois, D. Goh, Y. Prin, and G. Béna. 2014. "Differing Courses of Genetic Evolution of Bradyrhizobium Inoculants as Revealed by Long-Term Molecular Tracing in Acacia Mangium Plantations." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (18): 5709–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02007-14>.
- Poelarends, Gerrit J., Marga Wilkens, Michael J. Larkin, Jan Dirk van Elsas, and Dick B. Janssen. 1998. "Degradation of 1,3-Dichloropropene by Pseudomonas Cichorii 170." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (8): 2931–36. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.2931-2936.1998>.
- Porte, Anne de la, Ruth Schmidt, Étienne Yergeau, and Philippe Constant. 2020. "A Gaseous Milieu: Extending the Boundaries of the Rhizosphere." *Trends in Microbiology* 28 (7): 536–42. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.016>.
- Qi, Mingsheng, Jeffrey C. Berry, Kira Velej, Lily O'Connor, Omri M. Finkel, Isai Salas-González, Molly Kuhs, et al. 2021. "Identification of Beneficial and Detrimental Bacteria That Impact Sorghum Responses to Drought Using Multi-Scale and Multi-System Microbiome Comparisons." bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.437608>.
- Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jörg Peplies, and Frank Oliver Glöckner. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D590–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Quiza, Liliana, Marc St-Arnaud, and Etienne Yergeau. 2015. "Harnessing Phytomicrobiome Signaling for Rhizosphere Microbiome Engineering." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00507>.
- Quiza, Liliana, Julien Tremblay, Antoine P. Pagé, Charles W. Greer, Curtis J. Pozniak, Rong Li, Brenda Haug, Sean M. Hemmingsen, Marc St-Arnaud, and Etienne Yergeau. 2022. "The Effect of Wheat Genotype on Its Microbiome Is More Evident in Roots than Rhizosphere and Is Strongly Influenced by Time." bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.11.10.515967>.
- Radhakrishnan, Ramalingam, Abdul Latif Khan, Sang Mo Kang, and In-Jung Lee. 2015. "A Comparative Study of Phosphate Solubilization and the Host Plant Growth Promotion Ability of Fusarium Verticillioides RK01 and Humicola Sp. KNU01 under Salt Stress." *Annals of Microbiology* 65 (1): 585–93. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0894-z>.
- Radhouane, Leila. 2008. "[Hydrous characteristics of pearl millet (Pennisetum glaucum (L.) R. Br.) under drought]." *Comptes Rendus Biologies* 331 (3): 206–14. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.12.004>.
- Rashid, Urooj, Humaira Yasmin, Muhammad Nadeem Hassan, Rabia Naz, Asia Nosheen, Muhammad Sajjad, Noshin Ilyas, et al. 2022. "Drought-Tolerant Bacillus Megaterium Isolated from Semi-Arid Conditions Induces Systemic Tolerance of Wheat under

- Drought Conditions.” *Plant Cell Reports* 41 (3): 549–69. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02640-x>.
- Rassaa, Neila, Halim Ben Haj Salah, and Kaouther Latiri. 2008. “Thermal Responses of Durum Wheat Triticum Durum to Early Water Stress. Consequence on Leaf and Flower Development.” *Comptes Rendus Biologies* 331 (5): 363–71. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.005>.
- Ravanbakhsh, Mohammadhossein, Rashmi Sasidharan, Laurentius ACJ Voesenek, George A. Kowalchuk, and Alexandre Jousset. 2018. “Microbial Modulation of Plant Ethylene Signaling: Ecological and Evolutionary Consequences.” *Microbiome* 6 (1): 52.
- Ravel, C., C. Courty, A. Coudret, and G. Charmet. 1997. “Beneficial Effects of Neotyphodium Lolii on the Growth and the Water Status in Perennial Ryegrass Cultivated under Nitrogen Deficiency or Drought Stress.” *Agronomie* 17 (3): 173–81. <https://doi.org/10.1051/agro:19970304>.
- Rawat, Laxmi, Y. Singh, N. Shukla, and J. Kumar. 2011. “Alleviation of the Adverse Effects of Salinity Stress in Wheat (*Triticum Aestivum* L.) by Seed Biopriming with Salinity Tolerant Isolates of *Trichoderma Harzianum*.” *Plant and Soil* 347 (1): 387–400. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0858-z>.
- Ray, Prasun, Venkatachalam Lakshmanan, Jessy L. Labbé, and Kelly D. Craven. 2020. “Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture.” *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622926>.
- Redman, Regina S., Yong Ok Kim, Claire J. D. A. Woodward, Chris Greer, Luis Espino, Sharon L. Doty, and Rusty J. Rodriguez. 2011. “Increased Fitness of Rice Plants to Abiotic Stress Via Habitat Adapted Symbiosis: A Strategy for Mitigating Impacts of Climate Change.” *PLOS ONE* 6 (7): e14823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014823>.
- Riaz, Umair, Ghulam Murtaza, Wajiha Anum, Tayyaba Samreen, Muhammad Sarfraz, and Muhammad Zulqernain Nazir. 2021. “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers and Biopesticides.” In *Microbiota and Biofertilizers: A Sustainable Continuum for Plant and Soil Health*, edited by Khalid Rehman Hakeem, Gowhar Hamid Dar, Mohammad Aneesul Mehmood, and Rouf Ahmad Bhat, 181–96. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11.
- Riis, V., H. Lorbeer, and W. Babel. 1998. “Extraction of Microorganisms from Soil: Evaluation of the Efficiency by Counting Methods and Activity Measurements.” *Soil Biology and Biochemistry* 30 (12): 1573–81. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00232-0).
- Rizaludin, Muhammad Syamsu, Nejc Stopnisek, Jos M. Raaijmakers, and Paolina Garbeva. 2021. “The Chemistry of Stress: Understanding the ‘Cry for Help’ of Plant Roots.” *Metabolites* 11 (6): 357. <https://doi.org/10.3390/metabo11060357>.
- Rodríguez-Salazar, Julieta, Ramón Suárez, Jesús Caballero-Mellado, and Gabriel Iturriaga. 2009. “Trehalose Accumulation in *Azospirillum Brasilense* Improves Drought Tolerance and Biomass in Maize Plants.” *FEMS Microbiology Letters* 296 (1): 52–59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01614.x>.
- Rohrbacher, Fanny, and Marc St-Arnaud. 2016. “Root Exudation: The Ecological Driver of Hydrocarbon Rhizoremediation.” *Agronomy* 6 (1): 19. <https://doi.org/10.3390/agronomy6010019>.
- Ronda, Carlotta, Sway P. Chen, Vitor Cabral, Stephanie J. Yaung, and Harris H. Wang. 2019. “Metagenomic Engineering of the Mammalian Gut Microbiome in Situ.” *Nature Methods* 16 (2): 167–70. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0301-y>.

- Sallam, Ahmed, Ahmad M. Alqudah, Mona F. A. Dawood, P. Stephen Baenziger, and Andreas Börner. 2019. "Drought Stress Tolerance in Wheat and Barley: Advances in Physiology, Breeding and Genetics Research." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (13): 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms20133137>.
- Sandhya, V., Ali SK Z, Minakshi Grover, Gopal Reddy, and B. Venkateswarlu. 2009. "Alleviation of Drought Stress Effects in Sunflower Seedlings by the Exopolysaccharides Producing Pseudomonas Putida Strain GAP-P45." *Biology and Fertility of Soils* 46 (1): 17–26. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0401-z>.
- Sangiorgio, Daniela, Antonio Cellini, Irene Donati, Chiara Pastore, Claudia Onofrietti, and Francesco Spinelli. 2020. "Facing Climate Change: Application of Microbial Biostimulants to Mitigate Stress in Horticultural Crops." *Agronomy* 10 (6): 794. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060794>.
- Saravanakumar, D., and R. Samiyappan. 2007. "ACC Deaminase from Pseudomonas Fluorescens Mediated Saline Resistance in Groundnut (Arachis Hypogea) Plants." *Journal of Applied Microbiology* 102 (5): 1283–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>.
- Sasse, Joelle, Enrico Martinoia, and Trent Northen. 2018. "Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?" *Trends in Plant Science* 23 (1): 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>.
- Saxena, A. K., M. Kumar, H. Chakdar, N. Anuroopa, and D. J. Bagyaraj. 2020. "Bacillus Species in Soil as a Natural Resource for Plant Health and Nutrition." *Journal of Applied Microbiology* 128 (6): 1583–94. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>.
- Schimel, Joshua, Teri C. Balsler, and Matthew Wallenstein. 2007. "MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR ECOSYSTEM FUNCTION." *Ecology* 88 (6): 1386–94. <https://doi.org/10.1890/06-0219>.
- Schmidt, Ruth, Victor de Jager, Daniela Zühlke, Christian Wolff, Jörg Bernhardt, Katarina Cankar, Jules Beekwilder, et al. 2017. "Fungal Volatile Compounds Induce Production of the Secondary Metabolite Sodorifen in Serratia Plymuthica PRI-2C." *Scientific Reports* 7 (1): 862. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00893-3>.
- Schmidt, Ruth, and Mahasweta Saha. 2021. "Infochemicals in Terrestrial Plants and Seaweed Holobionts: Current and Future Trends." *New Phytologist* 229 (4): 1852–60. <https://doi.org/10.1111/nph.16957>.
- Schütz, Lukas, Andreas Gattinger, Matthias Meier, Adrian Müller, Thomas Boller, Paul Mäder, and Natarajan Mathimaran. 2018. "Improving Crop Yield and Nutrient Use Efficiency via Biofertilization—A Global Meta-Analysis." *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02204>.
- Senapati, Nimai, and Mikhail A. Semenov. 2020. "Large Genetic Yield Potential and Genetic Yield Gap Estimated for Wheat in Europe." *Global Food Security* 24 (March): 100340. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.100340>.
- Sheik, Cody S., William Howard Beasley, Mostafa S. Elshahed, Xuhui Zhou, Yiqi Luo, and Lee R. Krumholz. 2011. "Effect of Warming and Drought on Grassland Microbial Communities." *The ISME Journal* 5 (10): 1692–1700. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.32>.
- Shukla N., Awasthi R.P., Rawat L., and Kumar J. 2014. "Seed Biopriming with Drought Tolerant Isolates of Trichoderma Harzianum Promote Growth and Drought Tolerance in Triticum Aestivum." *Annals of Applied Biology* 166 (2): 171–82. <https://doi.org/10.1111/aab.12160>.

- Shulse, Christine N., Mansi Chovatia, Carolyn Agosto, Gaoyan Wang, Matthew Hamilton, Samuel Deutsch, Yasuo Yoshikuni, and Matthew J. Blow. 2019. "Engineered Root Bacteria Release Plant-Available Phosphate from Phytate." Edited by Alfons J. M. Stams. *Applied and Environmental Microbiology* 85 (18): e01210-19, /aem/85/18/AEM.01210-19.atom. <https://doi.org/10.1128/AEM.01210-19>.
- Simmons, Tuesday, Alexander B. Styer, Grady Pierroz, Antonio Pedro Gonçalves, Ramji Pasricha, Amrita B. Hazra, Patricia Bubner, and Devin Coleman-Derr. 2020. "Drought Drives Spatial Variation in the Millet Root Microbiome." *Frontiers in Plant Science* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00599>.
- Singh, Sarvajeet Singh Gill, and Narendra Tuteja. 2011. "Unraveling the Role of Fungal Symbionts in Plant Abiotic Stress Tolerance." *Plant Signaling & Behavior* 6 (2): 175–91. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14146>.
- Singh, Rajnish P., and Prabhat N. Jha. 2017. "The PGPR *Stenotrophomonas Maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants." *Frontiers in Microbiology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01945>.
- Souza, Rafael Soares Correa de, Jaderson Silveira Leite Armanhi, and Paulo Arruda. 2020. "From Microbiome to Traits: Designing Synthetic Microbial Communities for Improved Crop Resiliency." *Frontiers in Plant Science* 11 (August): 1179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01179>.
- Stocker, Thomas F, Dahe Qin, Gian-Kasper Plattner, Melinda M B Tignor, Simon K Allen, Judith Boschung, Alexander Nauels, Yu Xia, Vincent Bex, and Pauline M Midgley. 2013. "Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change." In *Climate Change 2013. The Physical Science Basis.*, 14. Cambridge, UK: Cambridge University press.
- Subramanian, K. S., C. Charest, L. M. Dwyer, and R. I. Hamilton. 1995. "Arbuscular Mycorrhizas and Water Relations in Maize under Drought Stress at Tasselling." *New Phytologist* 129 (4): 643–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03033.x>.
- Sugawara, Masayuki, Shin Okazaki, Noriyuki Nukui, Hiroshi Ezura, Hisayuki Mitsui, and Kiwamu Minamisawa. 2006. "Rhizobitoxine Modulates Plant–Microbe Interactions by Ethylene Inhibition." *Biotechnology Advances*, Ethylene biology: A tribute to Edward C. Sisler, 24 (4): 382–88. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.004>.
- Suzuki, M T, and S J Giovannoni. 1996. "Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 625–30. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.2.625-630.1996>.
- Taghavi, Safiyh, Tanja Barac, Bill Greenberg, Brigitte Borremans, Jaco Vangronsveld, and Daniel van der Lelie. 2005. "Horizontal Gene Transfer to Endogenous Endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8500–8505. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8500-8505.2005>.
- Tardif, Stacie, Étienne Yergeau, Julien Tremblay, Pierre Legendre, Lyle G. Whyte, and Charles W. Greer. 2016a. "The Willow Microbiome Is Influenced by Soil Petroleum-Hydrocarbon Concentration with Plant Compartment-Specific Effects." *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01363>.
- Timmusk, Salme, Viiu Paalme, Tomas Pavlicek, Jonas Bergquist, Ameraswar Vangala, Triin Danilas, and Eviatar Nevo. 2011. "Bacterial Distribution in the Rhizosphere of Wild Barley under Contrasting Microclimates." *PLOS ONE* 6 (3): e17968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017968>.

- Timmusk, and E. G. Wagner. 1999. "The Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus Polymyxa* Induces Changes in *Arabidopsis Thaliana* Gene Expression: A Possible Connection between Biotic and Abiotic Stress Responses." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 12 (11): 951–59. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.951>.
- Tirry, N., N. Tahri Joutey, H. Sayel, A. Kouchou, W. Bahafid, M. Asri, and N. El Ghachtouli. 2018. "Screening of Plant Growth Promoting Traits in Heavy Metals Resistant Bacteria: Prospects in Phytoremediation." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16 (2): 613–19. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.004>.
- Tondo, María Laura, Roger de Pedro-Jové, Agustina Vandecaveye, Laura Piskulic, Elena G. Orellano, and Marc Valls. 2020. "KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia Solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival to Hydrogen Peroxide." *Frontiers in Plant Science* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.01156>.
- Tran, Lam-Son Phan, Takeshi Urao, Feng Qin, Kyonoshin Maruyama, Tatsuo Kakimoto, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. 2007. "Functional Analysis of AHK1/ATHK1 and Cytokinin Receptor Histidine Kinases in Response to Abscisic Acid, Drought, and Salt Stress in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51): 20623–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706547105>.
- Tremblay, Julien, and Etienne Yergeau. 2019. "Systematic Processing of Ribosomal RNA Gene Amplicon Sequencing Data." *GigaScience* 8 (12). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz146>.
- Tsolakidou, Maria-Dimitra, Ioannis A. Stringlis, Natalia Fanega-Sleziak, Stella Papageorgiou, Antria Tsalakou, and Iakovos S. Pantelides. 2019. "Rhizosphere-Enriched Microbes as a Pool to Design Synthetic Communities for Reproducible Beneficial Outputs." *FEMS Microbiology Ecology* 95 (fiz138). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz138>.
- Vannette, Rachel L., and Tadashi Fukami. 2014. "Historical Contingency in Species Interactions: Towards Niche-Based Predictions." *Ecology Letters* 17 (1): 115–24. <https://doi.org/10.1111/ele.12204>.
- Vellend, Mark. 2016. *The Theory of Ecological Communities (MPB-57)*. <https://press.princeton.edu/books/hardcover/9780691164847/the-theory-of-ecological-communities-mpb-57>.
- Vessey, J. Kevin. 2003. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers." *Plant and Soil* 255 (2): 571–86.
- Vílchez, Juan I., Karsten Niehaus, David N. Dowling, Jesús González-López, and Maximino Manzanera. 2018. "Protection of Pepper Plants from Drought by *Microbacterium* Sp. 3J1 by Modulation of the Plant's Glutamine and α -Ketoglutarate Content: A Comparative Metabolomics Approach." *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00284>.
- Vives-Peris, Vicente, Carlos de Ollas, Aurelio Gómez-Cadenas, and Rosa María Pérez-Clemente. 2020. "Root Exudates: From Plant to Rhizosphere and Beyond." *Plant Cell Reports* 39 (1): 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>.
- Voges, Mathias J. E. E., Yang Bai, Paul Schulze-Lefert, and Elizabeth S. Sattely. 2019. "Plant-Derived Coumarins Shape the Composition of an *Arabidopsis* Synthetic Root Microbiome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (25): 12558–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820691116>.

- Vries, Franciska T. de, Rob I. Griffiths, Christopher G. Knight, Oceane Nicolitch, and Alex Williams. 2020. "Harnessing Rhizosphere Microbiomes for Drought-Resilient Crop Production." *Science* 368 (6488): 270–74. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5192>.
- Vries, Franciska T. de, Alex Williams, Fiona Stringer, Robert Willcocks, Rosie McEwing, Holly Langridge, and Angela L. Straathof. 2019. "Changes in Root-Exudate-Induced Respiration Reveal a Novel Mechanism through Which Drought Affects Ecosystem Carbon Cycling." *New Phytologist* 224 (1): 132–45. <https://doi.org/10.1111/nph.16001>.
- Wagner, Maggie R., Posy E. Busby, and Peter Balint-Kurti. 2020. "Analysis of Leaf Microbiome Composition of Near-Isogenic Maize Lines Differing in Broad-Spectrum Disease Resistance." *New Phytologist* 225 (5): 2152–65. <https://doi.org/10.1111/nph.16284>.
- Wagner, Maggie R., Derek S Lundberg, Tijana G. del Rio, Susannah G. Tringe, Jeffery L. Dangl, and Thomas Mitchell-Olds. 2016. "Host Genotype and Age Shape the Leaf and Root Microbiomes of a Wild Perennial Plant." *Nature Communications* 7 (July): 12151. <https://doi.org/10.1038/ncomms12151>.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, and James R. Cole. 2007. "Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wang, Xiao-Bo, Hamed Azarbad, Laura Leclerc, Jessica Dozois, Eugenie Mukula, and Étienne Yergeau. 2022. "A Drying-Rewetting Cycle Imposes More Important Shifts on Soil Microbial Communities than Does Reduced Precipitation." *MSystems* 7 (4): e00247-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00247-22>.
- Wang, Xiao-Bo, Ruth Schmidt, Étienne Yergeau, and Philippe Constant. 2020. "Field H₂ Infusion Alters Bacterial and Archaeal Communities but Not Fungal Communities nor Nitrogen Cycle Gene Abundance." *Soil Biology and Biochemistry* 151 (December): 108018. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108018>.
- Wang, Yongfan, Shixiao Yu, and Jiang Wang. 2007. "Biomass-Dependent Susceptibility to Drought in Experimental Grassland Communities." *Ecology Letters* 10 (5): 401–10. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01031.x>.
- Weiberg, Arne, and Hailing Jin. 2015. "Small RNAs—The Secret Agents in the Plant-Pathogen Interactions." *Current Opinion in Plant Biology* 26 (August): 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.033>.
- Williams, Alex, and Franciska T. de Vries. 2020. "Plant Root Exudation under Drought: Implications for Ecosystem Functioning." *New Phytologist* 225 (5): 1899–1905. <https://doi.org/10.1111/nph.16223>.
- Winter, Christian, Thierry Bouvier, Markus G. Weinbauer, and T. Frede Thingstad. 2010. "Trade-Offs between Competition and Defense Specialists among Unicellular Planktonic Organisms: The 'Killing the Winner' Hypothesis Revisited." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 74 (1): 42–57. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-09>.
- Wipf, Heidi M.-L., Thảo-Nguyên Bùi, and Devin Coleman-Derr. 2020. "Distinguishing Between the Impacts of Heat and Drought Stress on the Root Microbiome of Sorghum Bicolor." *Phytobiomes Journal*, October, PBIOMES-07-20-0052-R. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-07-20-0052-R>.
- Wu, Jiaojiao, Jingyan Wang, Wenkai Hui, Feiyan Zhao, Peiyun Wang, Chengyi Su, and Wei Gong. 2022. "Physiology of Plant Responses to Water Stress and Related Genes: A Review." *Forests* 13 (2): 324. <https://doi.org/10.3390/f13020324>.

- Xie, Zhicai, Yuankui Chu, Wenjin Zhang, Duoyong Lang, and Xinhui Zhang. 2018. "Bacillus Pumilus Alleviates Drought Stress and Increases Metabolite Accumulation in Glycyrrhiza Uralensis Fisch." *Environmental and Experimental Botany* 158 (November). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.021>.
- Xiong, Chao, Yong-Guan Zhu, Jun-Tao Wang, Brajesh Singh, Li-Li Han, Ju-Pei Shen, Pei-Pei Li, et al. 2021. "Host Selection Shapes Crop Microbiome Assembly and Network Complexity." *New Phytologist* 229 (2): 1091–1104. <https://doi.org/10.1111/nph.16890>.
- Xu, Ling, and Devin Coleman-Derr. 2019. "Causes and Consequences of a Conserved Bacterial Root Microbiome Response to Drought Stress." *Current Opinion in Microbiology, Environmental Microbiology*, 49 (June): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.07.003>.
- Xu, Ling, Dan Naylor, Zhaobin Dong, Tuesday Simmons, Grady Pierroz, Kim K. Hixson, Young-Mo Kim, et al. 2018. "Drought Delays Development of the Sorghum Root Microbiome and Enriches for Monoderm Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (18): E4284–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717308115>.
- Xue, Han, Yan Tu, Tengfei Ma, Ning Jiang, Chungeng Piao, and Yong Li. 2023. "Taxonomic Study of Three Novel Paenibacillus Species with Cold-Adapted Plant Growth-Promoting Capacities Isolated from Root of Larix Gmelinii." *Microorganisms* 11 (1): 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010130>.
- Yadav, Vinod Kumar, Neeta Bhagat, and Sushil K. Sharma. 2022. "Modulation in Plant Growth and Drought Tolerance of Wheat Crop upon Inoculation of Drought-Tolerant-Bacillus Species Isolated from Hot Arid Soil of India." *Journal of Pure and Applied Microbiology* 16 (1): 246–63.
- Yang, Jungwook, Joseph W. Kloepper, and Choong-Min Ryu. 2009. "Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress." *Trends in Plant Science* 14 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>.
- Yano-Melo, Adriana Mayumi, Orivaldo José Saggin, and Leonor Costa Maia. 2003. "Tolerance of Mycorrhized Banana (Musa Sp. Cv. Pacovan) Plantlets to Saline Stress." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 95 (1): 343–48. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00044-0).
- Yasmin, Humaira, Urooj Rashid, Muhammad Nadeem Hassan, Asia Nosheen, Rabia Naz, Noshin Ilyas, Muhammad Sajjad, Ammar Azmat, and Mohammed Nasser Alyemeni. 2021. "Volatile Organic Compounds Produced by Pseudomonas Pseudoalcaligenes Alleviated Drought Stress by Modulating Defense System in Maize (Zea Mays L.)." *Physiologia Plantarum* 172 (2): 896–911. <https://doi.org/10.1111/pp.13304>.
- Yergeau, Etienne, Terrence H. Bell, Julie Champagne, Christine Maynard, Stacie Tardif, Julien Tremblay, and Charles W. Greer. 2015. "Transplanting Soil Microbiomes Leads to Lasting Effects on Willow Growth, but Not on the Rhizosphere Microbiome." *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01436>.
- Yergeau, Étienne, Liliana Quiza, and Julien Tremblay. 2020. "Microbial Indicators Are Better Predictors of Wheat Yield and Quality than N Fertilization." *FEMS Microbiology Ecology* 96 (fiz205). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz205>.
- Yergeau, Etienne, Julien Tremblay, Simon Joly, Michel Labrecque, Christine Maynard, Frederic E. Pitre, Marc St-Arnaud, and Charles W. Greer. 2018. "Soil Contamination Alters the Willow Root and Rhizosphere Metatranscriptome and the Root–Rhizosphere Interactome." *The ISME Journal* 12 (3): 869–84. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0018-4>.

- Yuan, Jun, Jun Zhao, Tao Wen, Mengli Zhao, Rong Li, Pim Goossens, Qiwei Huang, et al. 2018. "Root Exudates Drive the Soil-Borne Legacy of Aboveground Pathogen Infection." *Microbiome* 6 (1): 156. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0537-x>.
- Zhai, Zhiyang, Jantana Keereetaweep, Hui Liu, Regina Feil, John E. Lunn, and John Shanklin. 2021. "Expression of a Bacterial Trehalose-6-Phosphate Synthase OtsA Increases Oil Accumulation in Plant Seeds and Vegetative Tissues." *Frontiers in Plant Science* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.656962>.
- Zhang, Xinhui, Zhicai Xie, Duoyong Lang, Yuankui Chu, Gaochang Cui, and Xiaoxia Jia. 2021. "Bacillus Pumilus Improved Drought Tolerance in Glycyrrhiza Uralensis G5 Seedlings through Enhancing Primary and Secondary Metabolisms." *Physiologia Plantarum* 171 (3): 388–99. <https://doi.org/10.1111/ppl.13236>.
- Zhang, Xuechen, David D. Myrold, Lingling Shi, Yakov Kuzyakov, Hongcui Dai, Duyen Thi Thu Hoang, Michaela A. Dippold, et al. 2021. "Resistance of Microbial Community and Its Functional Sensitivity in the Rhizosphere Hotspots to Drought." *Soil Biology and Biochemistry* 161 (October): 108360. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108360>.
- Zhang, Z, C J Schofield, J E Baldwin, P Thomas, and P John. 1995. "Expression, Purification and Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase from Tomato in Escherichia Coli." *Biochemical Journal* 307 (Pt 1): 77–85.
- Zilber-Rosenberg, Ilana, and Eugene Rosenberg. 2021. "Microbial-Driven Genetic Variation in Holobionts." *FEMS Microbiology Reviews* 45 (6): fuab022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab022>.
- Zolla, Gaston, Dayakar V. Badri, Matthew G. Bakker, Daniel K. Manter, and Jorge M. Vivanco. 2013. "Soil Microbiomes Vary in Their Ability to Confer Drought Tolerance to Arabidopsis." *Applied Soil Ecology* 68 (June): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.007>.

7 ANNEXE I

Tableau 7-1 Indicator OTUs for the 25% and 100% precipitation treatments from the 16S rRNA gene amplicon dataset

OTU#	Indval	P-value	Freq.	Taxonomy
<i>Indicators for 25%</i>				
1117	0,27	0,001	10	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Desulfurellales; f__Desulfurellaceae;g__H16 ;
550	0,44	0,003	23	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Thermoactinomycetaceae ;
44	0,75	0,005	61	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Nocardiaceae;g__Rhodococcus ;
279	0,58	0,005	38	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Rhizobiaceae;g__Kaistia ;
13	0,65	0,006	55	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Stenotrophomonas ;
312	0,29	0,007	15	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Caulobacterales;f__Caulobacteraceae;g__Brevundimonas ;
509	0,41	0,008	28	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Adhaeribacter ;
1254	0,32	0,01	18	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium ;
2182	0,30	0,01	17	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas ;
646	0,31	0,011	15	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium ;
1263	0,25	0,011	12	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Segetibacter ;
670	0,40	0,012	28	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__env.OPS 17;g__env.OPS 17FA ;
366	0,42	0,013	31	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__B1-7BS;f__B1-7BSOR;g__B1-7BSOR ;
405	0,44	0,013	37	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptococcaceae;g__Desulfosporosinus ;
1632	0,25	0,013	13	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Oligoflexales;f__O319-6G20;g__O319-6G20FA ;
3028	0,23	0,014	10	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Holophagae;o__Subgroup 7;f__Subgroup 7OR;g__Subgroup 7OR ;
1105	0,40	0,015	31	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Micrococcales;f__Microbacteriaceae;g__Microbacterium ;
1303	0,39	0,016	30	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Legionellales;f__Coxiellaceae;g__Aquicella ;
1914	0,20	0,017	9	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Sphingobacteriaceae;g__Pedobacter ;

3	0,81	0,018	69	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas ;
344	0,41	0,019	33	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Hymenobacter ;
977	0,26	0,019	14	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__OPB35 soil group; o__OPB35 soil groupCL; f__OPB35 soil groupCL; g__OPB35 soil groupCL;
106	0,61	0,021	65	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Propionibacteriales;f__Nocardioideaceae;g__Kribbella ;
503	0,39	0,022	30	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Nitrosomonadales;f__Nitrosomonadaceae;g__Nitrosospira ;
3076	0,20	0,022	9	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Solirubrobacterales;f__Elev-16S-1332;g__Elev-16S-1332FA ;
513	0,31	0,023	21	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae; g__Nibribacter;
1679	0,16	0,023	6	k__Archaea; p__Thaumarchaeota; c__Soil Crenarchaeotic Group (SCG); o__Soil Crenarchaeotic Group (SCG) CL; f__Soil Crenarchaeotic Group (SCG) CL; g__Soil Crenarchaeotic Group (SCG) CL;
1868	0,21	0,023	11	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Myxococcales; f__Blfdi19;g__Blfdi19FA ;
808	0,16	0,025	6	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Pseudonocardiales;f__Pseudonocardiaceae;g__Amycolatopsis ;
2245	0,26	0,025	16	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Oligoflexales;f__0319-6G20;g__0319-6G20FA ;
3771	0,16	0,026	6	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Thermoactinomycetaceae;g__Shimazuella ;
650	0,38	0,027	24	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae;g__Paracoccus ;
1814	0,16	0,027	6	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae ;
594	0,61	0,028	39	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Micrococcales;f__Microbacteriaceae;g__Lysinimonas ;
493	0,38	0,03	27	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Ohtaekwangia ;
51	0,56	0,031	37	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Chryseobacterium ;
284	0,54	0,035	56	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__JG34-KF-361;g__JG34-KF-361FA ;
315	0,27	0,036	18	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylobacteriaceae;g__Methylobacterium ;
322	0,32	0,036	21	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium ;
720	0,31	0,036	22	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Parasegetibacter ;
721	0,25	0,036	15	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales;f__Gemmatimonadaceae;g__Gemmatimonas ;

1529	0,18	0,038	8	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Kineosporiales;f__Kineosporiaceae;g__Angustibacter ;
1617	0,25	0,038	15	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales;f__Gemmatimonadaceae;g__Gemmatimonas ;
1011	0,36	0,039	29	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfurellales;f__Desulfurellaceae;g__H16 ;
942	0,27	0,04	19	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Lysobacter ;
330	0,49	0,042	39	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Bradyrhizobiaceae;g__Tardiphaga ;
510	0,48	0,042	48	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Oligoflexales;f__O319-6G20;g__O319-6G20FA ;
1387	0,36	0,042	27	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales;f__Gemmatimonadaceae;g__Gemmatimonas ;
604	0,52	0,044	45	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Dokdonella ;
434	0,47	0,045	46	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Taibaiella ;
491	0,49	0,045	47	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Pontibacter ;
1055	0,17	0,045	8	k__Bacteria; p__Acidobacteria; c__Acidobacteria; o__Acidobacteriales; f__Acidobacteriaceae (Subgroup 1);g__uncultured-Acidobacteriaceae (Subgroup 1);
4285	0,14	0,045	5	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Frankiales; f__Nakamurellaceae;g__Nakamurella ;
936	0,23	0,047	13	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Longimicrobia;o__Longimicrobiales;f__Longimicrobiaceae;g__LongimicrobiaceaeFA ;
1061	0,31	0,047	23	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Oligoflexales;f__O319-6G20;g__O319-6G20FA ;
2034	0,19	0,047	10	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales ;
3904	0,16	0,047	8	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Beijerinckiaceae;g__Camelimonas ;
4448	0,17	0,047	8	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Solimonadaceae;g__Fontimonas ;
412	0,36	0,048	27	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Chitinophaga ;
1540	0,14	0,049	5	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Chitinophaga ;
416	0,50	0,05	48	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Gaiellales;f__Gaiellaceae;g__Gaiella ;
635	0,14	0,05	5	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Dyella ;
700	0,33	0,05	24	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Chitinophagaceae; g__Niastella;

Indicators of 100%

2628	0,27	0,002	11	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales;f__Chitinophagaceae;g__Ferruginibacter ;
2919	0,17	0,01	6	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Myxococcales;f__Archangiaceae ;
1423	0,30	0,016	20	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Sporocytophaga ;
3959	0,14	0,021	5	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Bdellovibrionales;f__Bdellovibrionaceae;g__OM27 clade;
4009	0,16	0,023	7	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Legionellales;f__Legionellaceae;g__Legionella ;
2917	0,14	0,03	5	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales;f__Gemmatimonadaceae;g__uncultured-Gemmatimonadaceae;
704	0,40	0,031	30	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Myxococcales;f__Haliangiaceae;g__Haliangium ;
3795	0,16	0,035	7	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__XanthomonadaceaeFA ;
1424	0,33	0,036	25	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Myxococcales;f__27F-1492R;g__27F-1492RFA ;
662	0,28	0,037	19	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Paenibacillaceae;g__Ammoniphilus ;
2622	0,20	0,037	10	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Gaiellales ;
3952	0,16	0,037	7	k__Bacteria;p__FBP;c__FBPPH;o__FBPPH;f__FBPPH;g__FBPPH ;
3058	0,16	0,039	7	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Holophagae;o__Subgroup 7;f__Subgroup 7OR;g__Subgroup 7OR ;
2641	0,11	0,041	4	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus ;
2059	0,11	0,042	4	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Subgroup 22;o__Subgroup 22CL;f__Subgroup 22CL;g__Subgroup 22CL ;
2260	0,11	0,044	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas ;
2298	0,11	0,044	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Legionellales;f__Legionellaceae;g__Legionella ;
3097	0,11	0,044	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae;g__Amaricoccus ;
913	0,32	0,045	25	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__OPB35 soil group; o__OPB35 soil groupCL; f__OPB35 soil groupCL; g__OPB35 soil groupCL;
2149	0,18	0,045	9	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Novosphingobium ;
1508	0,25	0,047	17	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Lysobacter ;
3601	0,21	0,047	12	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Gaiellales;f__Gaiellaceae;g__Gaiella ;
2378	0,11	0,048	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae;g__Amaricoccus ;

2814	0,11	0,048	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Legionellales;f__Legionellaceae;g__Legionella ;
2664	0,11	0,049	4	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae ;
4083	0,20	0,049	12	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales; f__Gemmatimonadaceae; g__uncultured-Gemmatimonadaceae;

OTUs highlighted in yellow matched with microbial isolated that were able to grow in 30% PEG.