

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université de Constantine 1-Frères Mentouri**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**



N° d'ordre : 23/DS/2021  
N° de série : 02/MB/2021

THÈSE

*En vue de l'obtention du*

DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES

*Spécialité : Microbiologie Appliquée et Biotechnologies Microbiennes*

Présentée par :

**KHENAKA Karima**

Thème de recherche

**Biodiversité bactérienne du sol rhizosphérique de *Capsicum annuum* :  
activités des PGPB et exploitation des endophytes pour l'amélioration  
de la croissance et le rendement.**

**Soutenue publiquement le 25/02/2021**

**Devant le jury :**

**Président : M<sup>r</sup> MA. HAMIDECHI** Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Directeur de thèse :  
M<sup>r</sup> A. BOULAHROUF** Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineurs :**  
**M<sup>r</sup> DE. BENOUARETH** Prof. Université 8 Mai 1945, Guelma.  
**M<sup>me</sup> N. ARAFA EP SAKHRI** MCA. Université des Frères Mentouri, Constantine 1.  
**M<sup>me</sup> L. AOUAR** MCA. Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi.  
**M<sup>me</sup> S. DAKHMOUCHE** MCA. Ecole Normale Supérieure Assia Djebar, Contantine.

**Année universitaire : 2020 – 2021**

## *Dédicaces*

*A la mémoire de mon cher Père,*

*Je dédie le fruit de tant d'années d'efforts, à la mémoire de mon défunt père, qui m'avait tant soutenu et encouragé, hélas partis sans voir le résultat final.*

*Mon cher père, tu es bien vivant dans ma mémoire, et jamais je n'oublierais tous les sacrifices que tu avais fait pour moi.*

*Retrouve avec ces modestes mots, le témoignage de mon affection et reconnaissance éternelle.*

*A ma chère mère,*

*A toi ma source de tendresse et d'amour, chez qui je trouve toujours le réconfort, mon adorable mère, je te dédie ce travail, que sans ton soutien et tes encouragements n'aura jamais vue le jour.*

*A mes frères et sœurs,*

*Ma chère et magnifique famille, qui m'a toujours soutenue, je vous aime tous sans condition.*

*A tous mes amis,*

*Je dédie ce travail.*

*Karima*

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, Je tiens à exprimer mes remerciements,*

*En premier lieu à mon encadrant Professeur BOULAHROUF Abderrahmane, d'avoir assuré la direction de mon travail de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé, pour son temps et sa patience ainsi que tous ces conseils précieux tout au long de ce travail, qu'il trouve ici, l'expression de ma reconnaissance, ma gratitude et mon grand respect.*

*Je tiens à remercier les membres de jury et à leur tête Professeur HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury qu'il trouve ma reconnaissance et mon respect les plus sincères.*

*Je suis très reconnaissante envers, Professeur BENOUARETH Djamel Eddine, Madame ARAFA EP SAKHRI Nedjouda, Madame AOUAR Lamia et Madame DAKHMOUCHE Schaherazed, qui ont bien voulu prendre le temps d'évaluer et examiner cette thèse, je tiens à leur exprimer ma considération la plus respectueuse.*

*J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements aux membres de l'équipe de l'Institut de recherche CRA-RPS de Rome, Italie, pour leurs accueils et leurs gentillesse, spécialement à Madame CANFORA Loredana pour sa disponibilité, ces conseils et son aide dans les corrections de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements également à Monsieur RODRIGUEZ CARVAJAL Miguel Angel, Professeur, de Département de chimie organique, Université de Séville, Espagne, pour son l'aide, ses conseils et pour les moyens mis à ma disposition assurant le bon déroulement de ce travail.*

*Un grand merci aussi aux membres de mon ancienne équipe professionnelle, mes collègues de l'Université 8 Mai 1945 Guelma, sans oublier ma nouvelle équipe de l'ENSB, qu'ils trouvent tous ici ma gratitude et mon entière considération pour les moments partagés ensemble, et pour tout leur soutien.*

*Je remercie particulièrement, mes amies et sœurs que je cite : Awatif, Asma, Besma, Nassima et Sofia, un grand merci pour votre présence et toute l'aide et le soutien dont vous m'avez fait part.*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir supporté et soutenu sans faille.*

# Valorisation des travaux de thèse

## **Publication Scientifique**

**Khenaka, K.**, Canfora, L., Benedetti, A., Leulmi, N., Boulahrouf, A., 2019. Effect of *Capsicum annuum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions. *Arch. Agron. Soil Sci.* <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1566711>.

**Karima Khenaka**, Miguel Ángel Rodríguez-Carvajal, Loredana Canfora, Nassima Leulmi, Abderrahmane Boulahrouf. Endophytic bacteria associated with the roots of *Capsicum annuum* cultivated in Algeria – *In vitro* and *In vivo* plant growth promoting abilities (**Article en soumission**).

## **Communications nationales et internationales**

**Khenaka, K.**, Canfora, L., Benedetti, A., Leulmi, N., Boulahrouf. Effet de trois géotypes de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques physico-chimiques et la diversité génétique du microbiote du sol. **Séminaire Nationale sur les Biotechnologies en Algérie, Quelles biotechnologies pour un développement durable ? 03-04 Décembre 2019. Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie "Toufik Khaznadar", Constantine, Algérie.**

**Karima Khenaka**, Miguel Ángel Rodríguez-Carvajal, Loredana Canfora, Nassima Leulmi, Abderrahmane Boulahrouf. Production de N-acylhomosérine lactones par des bactéries promotrices de la croissance des plantes isolées des racines de *Capsicum annuum*. **Congrès International Valorisation des Bio ressources : Application et Impact sur les Développement Durable. 26 et 27 novembre 2019. Université M'hamed Bougara-Boumerdes, Algérie.**

## Table des matières

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes.....	5
1.1. Généralités.....	5
1.2. Colonisation de la rhizosphère et des racines par les PGPB.....	5
1.3. Facteurs affectant la colonisation de la rhizosphère et des plantes par les PGPB.....	6
1.4. Méthodes d'étude des PGPB.....	7
2. Les activités des bactéries promotrices de la croissance des plantes.....	8
2.1. La production des auxines.....	8
2.1.1. Voies de biosynthèse des auxines chez les bactéries.....	9
2.1.2. Conjugaison et dégradation de l'IAA.....	12
2.1.3. L'auxine comme molécule de signal microbien.....	12
2.1.4. L'auxine dans les interactions plante/microorganismes.....	13
2.2. Production des sidérophores.....	15
2.2.1. Généralités.....	15
2.2.2. Types de sidérophores microbiens.....	16
2.2.3. Effet des sidérophores sur la croissance microbienne.....	19
2.2.4. Effet des sidérophores sur la croissance des plantes.....	19
2.3. Détection du quorum.....	20
2.3.1. Les N -acyl-homosérine lactones.....	21
2.4. L'inhibition des phytopathogènes.....	26
2.4.1. Le quorum quenching.....	26
2.4.2. La production des antibiotiques.....	28
2.4.3. Production des enzymes dégradant la paroi cellulaire.....	28
2.4.4. Production de cyanure d'hydrogène.....	28
2.4.5. Compétition et colonisation de la rhizosphère et des racines.....	29
2.4.6. Induction de la résistance systémique.....	29
2.5. Solubilisation du phosphate.....	30

2.5.1.	Généralités.....	30
2.5.2.	Mécanismes de solubilisation de phosphate par les PGPB .....	31
3.	Genres bactériens prometteurs pour les pratiques agricoles .....	32
3.1.	Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	32
3.1.1.	Mécanismes de la promotion de la croissance des plantes.....	33
3.1.2.	Le genre <i>Pseudomonas</i> comme inoculum.....	34
3.2.	Le genre <i>Streptomyces</i> .....	35
3.2.1.	Promotion de la croissance des plantes par le genre <i>Streptomyces</i> .....	36
3.2.2.	Le genre <i>Streptomyces</i> comme inoculum.....	37

## ETUDE EXPERIMENTALE

### Chapitre 1 : Effet de trois génotypes de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques physico-chimiques et la diversité génétique du microbiote du sol

<i>Matériel et méthodes</i> .....	39
1. Site d'échantillonnage.....	39
2. Prélèvement du sol rhizosphérique et non rhizosphérique.....	40
3. Analyses physico-chimiques des échantillons de sols .....	40
3.1. Mesure du pH.....	40
3.2. Mesure de la conductivité .....	40
3.3. Analyse granulométrique .....	40
3.4. Calcaire total .....	41
3.5. Phosphore total.....	41
3.6. Carbone organique et azote total.....	41
4. Extraction de l'ADN génomique à partir du sol .....	42
5. Quantification du gène de l'ARNr 16S par PCR quantitative.....	42
6. Analyse de la structure génétique des communautés bactériennes par T-RFLP.....	43
7. Analyses statistiques .....	43
<i>Résultats</i> .....	44
1. Propriétés physico-chimiques de la rhizosphère et des sols non-rhizosphériques .....	44
2. Estimation de la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique et non-rhizosphérique.....	46
3. Estimation de la diversité de la communauté bactérienne rhizosphérique et non-rhizosphérique.....	46
4. Analyse en composantes principales.....	48
<i>Discussion</i> .....	49

### Chapitre 2 : Effet de trois génotypes de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques des PGPB, et analyse de la dépendance entre les quatre activités promotrices de croissance

<i>Matériel et méthodes</i> .....	54
1. Isolement des bactéries du sol rhizosphérique et du sol non-rhizosphérique.....	54
2. Activités favorisant la croissance des plantes .....	55
2.1. Production des auxines.....	55

2.2.	Solubilisation du phosphate .....	55
2.3.	Production des sidérophores .....	55
2.3.1.	Chélation du fer du milieu de culture.....	55
2.3.2.	Analyse de la production des sidérophores .....	56
2.4.	Activité anti-phytopathogène .....	56
3.	Analyses statistiques .....	56
	<i>Résultats</i> .....	57
1.	Effet de <i>Capsicum annuum</i> sur les caractéristiques des PGPB.....	57
1.1.	Isolement des bactéries et évaluation des activités de promotion de croissance des plantes.....	57
1.2.	Evaluation de l'effet de <i>Capsicum annuum</i> sur les activités des PGPB .....	57
1.3.	Analyse en composantes principales.....	59
2.	Association entre les quatre activités de promotion de la croissance de plantes.....	59
2.1.	Analyse en composantes principales catégorielles.....	59
2.2.	Test d'indépendance du Khi-carré .....	61
	<i>Discussion</i> .....	62
<b>Chapitre 3 : Isolement des bactéries endophytes et étude <i>in vitro</i> de leurs activités de promotion de croissance des plantes.</b>		
	<i>Matériel et méthodes</i> .....	68
1.	Isolement des bactéries endophytes .....	68
2.	Production des auxines.....	69
2.1.	Analyse par dosage colorimétrique.....	69
2.2.	Analyse par GC-MS.....	69
3.	Production des sidérophores .....	70
3.1.	Production des sidérophores sur milieu solide.....	70
3.2.	Production des sidérophores sur milieu liquide .....	70
3.2.1.	Culture des isolats .....	70
3.2.2.	Dosage des hydroxamates .....	70
3.2.3.	Dosage des catécholates .....	70
3.2.4.	Analyse par UHPLC-MS/MS Q Exactive.....	70
4.	Détection et inhibition du quorum .....	71
4.1.	Culture des isolats et des biocapteurs.....	71
4.2.	Détection du quorum.....	71
4.2.1.	Détection biologique par biocapteurs.....	71
4.2.2.	Identification des AHL par HPLC-MS/MS .....	72
4.3.	Inhibition du quorum.....	73
5.	Solubilisation du phosphate par les bactéries endophytes .....	73
6.	Activité antifongique des isolats endophytes .....	73
7.	Analyses statistiques .....	73

<i>Résultats</i> .....	74
1. Isolement des bactéries endophytes .....	74
2. Production des auxines.....	74
3. Production des sidérophores .....	78
4. Détection du quorum.....	80
5. L'inhibition du quorum.....	82
6. Solubilisation de phosphate.....	84
7. Inhibition de <i>F. oxysporum</i> .....	85
8. Analyse en composantes principales.....	86
<i>Discussion</i> .....	87
<b>Chapitre 4 : Diversité des bactéries endophytes associées aux racines des trois variétés de <i>Capsicum annuum</i>. Identification et caractéristiques phénotypiques de quelques isolats.</b>	
<i>Matériel et méthodes</i> .....	96
1. Analyse de la diversité génétique par BOX-PCR .....	96
1.1. Extraction de l'ADN .....	96
1.2. Conditions d'amplification.....	97
1.3. Séparation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose .....	97
1.4. Analyse des résultats .....	98
2. Identification des isolats endophytes .....	98
2.1. Amplification de l'ADN ribosomique 16S .....	98
2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	98
2.3. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S.....	98
2.4. Etude phylogénétique.....	99
3. Etude de caractères biochimiques et physiologiques .....	99
3.1. Utilisation des composés glucidiques .....	99
3.2. Utilisation des sources d'azote.....	100
3.3. Les activités d'hydrolyse.....	100
3.4. La résistance aux antibiotiques .....	100
3.5. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques .....	101
<i>Résultats</i> .....	101
1. La diversité génétique par BOX-PCR.....	101
2. Identification des isolats endophytes .....	105
2.1. Isolats FEO15.....	105
2.2. Les isolats FEK22, KEK1, BEK8 et KEK36.....	106
3. Caractères biochimiques et physiologiques des isolats endophytes.....	107
<i>Discussion</i> .....	110
<b>Chapitre 5 : Effet de cinq isolats endophytes sur la croissance, <i>in vivo</i>, de <i>Capsicum annuum</i> ..</b>	
	114

<i>Matériel et méthodes</i> .....	114
1. Préparation et désinfection des graines .....	114
2. Préparation des inoculums .....	114
3. Expérience en jarres de Leonard .....	115
4. Culture de piment en pots pendant un mois .....	115
5. Culture de piment en pots pendant cinq mois .....	116
6. Analyses statistiques .....	116
<i>Résultats</i> .....	116
1. Impact des isolats sur la croissance du piment en conditions stériles .....	116
2. Impact des isolats sur la croissance du piment en pots après un mois de culture .....	118
3. Impact des isolats sur la croissance du piment en pots après cinq mois de culture .....	121
<i>Discussion</i> .....	124
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	127
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	131
<b>ANNEXES</b>	

## Résumé

Le présent travail s'intéresse à l'étude de la biodiversité bactérienne du sol rhizosphérique et la caractérisation des activités des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) associées aux racines de piment fort (*Capsicum annuum*).

Les échantillons du sol (rhizosphérique et non-rhizosphérique) et les racines de trois génotypes de piment industriel ont été collectés à partir d'un terrain agricole situé dans la Wilaya de Guelma. Par rapport au sol non-rhizosphérique, la rhizosphère des trois génotypes possède une texture de sol différente, un pH et une teneur en carbonates plus faibles. La croissance bactérienne est plus abondante autour des racines des trois génotypes avec des rapports rhizosphère/sol différents. L'analyse de la diversité génétique par T-RFLP montre que la diversité bactérienne a augmenté de manière significative seulement chez le génotype Biskra. Un total de 515 isolats bactériens, soit 301 et 214 isolats ont été collectés, respectivement, de l'ensemble des trois rhizosphères et des sols non-rhizosphériques. L'analyse des activités spécifiques aux PGPB révèle que la production de composés indoliques est stimulée dans la rhizosphère des trois cultivars. Cependant, l'activité anti-phytopathogène est stimulée seulement par un seul génotype.

L'isolement des bactéries à partir des racines des trois cultivars a permis la sélection de 83 isolats. L'amplification des séquences répétées par BOX-PCR a révélé une grande diversité génétique de ces isolats. Les endophytes ont présenté une grande capacité de promotion de la croissance des plantes *in vitro*. Tous les isolats bactériens produisent des auxines avec des voies de synthèse dépendantes du tryptophane. L'analyse par GC-MS montre que l'acide indole acétique est produit majoritairement par la voie IPyA. Les endophytes ont une grande aptitude à produire des sidérophores mais avec une capacité de chélation moins importante que celle du microbiote rhizosphérique. L'utilisation de l'UHPLC-MS/MS Q Exactive a permis la détection de 23 chélateurs de fer différents chez 21 isolats. La production des acyl-homosérine lactones (AHL) de longues chaînes est détectée chez 7 isolats endophytes. Cependant, la désactivation de l'auto-induction par les AHL est observée chez 22 isolats, dont 10 et 15 isolats ont inhibé l'auto-induction chez *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement. L'étude de l'activité antifongique révèle que 25 isolats parmi 83 peuvent inhiber la croissance de *F. oxysporum*. De même, 79 % des endophytes ont la capacité de solubiliser le phosphate inorganique.

Les isolats KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 et BEK8 ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie sur leurs effets. L'étude taxonomique basée sur l'amplification de l'ADNr 16S a classé l'isolat FEO15 comme membre du genre *Streptomyces* avec une grande similitude à l'espèce *S. caeruleatus*. Les isolats FEK22, BEK8, KEK36 et KEK1, sont classifiés comme souche appartenant au genre *Pseudomonas* très proches aux espèces : *P. moorei*, *P. japonica*, *P. granadensis* et *P. brassicacearum*, respectivement. *In vivo*, les cinq souches ont augmenté, de manière très significative, tous les paramètres de croissance des trois génotypes. Les isolats FEO15 et FEK22 ont été choisis pour étudier l'impact sur le rendement après cinq mois de culture, avec des inoculations séparées et conjuguées. Nos résultats montrent que le consortium est plus efficace que l'inoculation séparée. Le génotype Karam montre une amélioration de 199 % et 377 % du poids sec des fruits pour le traitement avec l'isolat FEO15 et le consortium, respectivement. De même, une augmentation de 58 % et 138 % est obtenue lors de l'inoculation du génotype Al-Fares avec l'isolat FEO15 et le mélange, respectivement.

A l'issue de cette étude, le consortium des isolats FEO15 et FEK22 s'avère prometteur pour une utilisation comme biofertilisants. Cependant, d'autres études complémentaires sont indispensables pour achever les étapes de formulation et d'application sur champs.

**Mots-clés :** piment fort, rhizosphère, rhizobactérie, diversité génétique, endophyte, activités PGPB.

## Abstract

This study was conducted to estimate the bacterial biodiversity of rhizospheric soil and to characterize the activities of plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated to the roots of chili pepper (*Capsicum annuum*).

Rhizospheric and non-rhizospheric soil samples and the roots of three industrial chili pepper genotypes were collected from an agricultural land in the Wilaya of Guelma. Compared to bulk soil, the rhizosphere of the three genotypes has different soil texture; low pH and low carbonate content. Bacterial growth is most abundant around the roots of the three genotypes with different rhizosphere/soil ratios. Analysis of genetic diversity through T-RFLP showed that bacterial diversity increased significantly only in the rhizosphere of Biskra genotype.

515 bacterial isolates were collected, 301 isolates from the three rhizospheres and 214 isolates from bulk soil. The analysis of PGPB specific activities revealed that the production of indole compounds was stimulated in the rhizosphere of the three cultivars; however, the anti-phytopathogenic activity was stimulated only by one genotype.

The bacterial isolation from the roots of the three cultivars yielded 83 endophytes. Amplification by BOX-PCR revealed high genetic diversity of the isolates. Endophytes have shown high plant growth promoting abilities *in vitro*. All isolates produce auxins via tryptophan-dependent synthetic pathways. GC-MS analysis shows that indole acetic acid is predominantly produced by IPyA pathway. Endophytes have important ability to produce siderophores but with a less chelating capacity than the rhizospheric microbiota. The use of UHPLC-MS/MS Q Exactive detect 23 different iron chelators in 21 isolates. The production of long-chain acyl-homoserine lactones (AHL) is detected in seven isolates. However, inhibition of AHL auto-induction is observed in 22 endophytes, among of which 10 and 15 isolates inhibited auto-induction in *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* NT1 respectively. Antifungal activity analysis revealed that 25 isolates could inhibit *F. oxysporum* growth. In addition, 79 % of endophytes have the capacity to solubilize inorganic phosphate.

The isolates KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 and BEK8 were selected for *in vivo* study effect. 16S rDNA amplification classified the isolate FEO15 as a member of the *Streptomyces* genus with high similarity to the species *S. caeruleatus*. The isolates FEK22, BEK8, KEK36 and KEK1, which belong to the genus *Pseudomonas*, are phylogenetically similar to the species: *P. moorei*, *P. japonica*, *P. granadensis* and *P. brassicacearum* respectively. *In vivo*, these five strains increased significantly the growth parameters for the three genotypes. FEO15 and FEK22 isolates were selected to study the impact on yield after five months in culture, with separate and combined inoculations. Our results show that the consortium is more efficient than separate inoculation. Karam genotype shows 199 % and 377 % improvement in fruit dry weight after the treatment by FEO15 isolate and the consortium respectively. In addition, an increase of 58 % and 138 % is reported after Al-Fares genotype inoculation with FEO15 isolate and the mixture respectively.

As a conclusion from this study, the consortium of FEO15 and FEK22 isolates showed promising results concerning their use as biostimulators. However, further studies are required to complete the formulation and field application steps.

**Keywords:** Chili pepper, rhizosphere, rhizobacteria, genetic diversity, endophyte, PGPB activities.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التنوع البيولوجي البكتيري للتربة الجذرية (rhizospheric soil) واختبار أنشطة البكتيريا المحفزة لنمو النبات (PGPB) التي تعيش على جذور الفليفلة الحولية (*Capsicum annuum*). تم جمع عينات من التربة الجذرية وغير الجذرية (التربة السائب، bulk soil) وجذور ثلاثة أنواع جينية من الفليفلة الحولية من أرض زراعية في ولاية قالمة.

مقارنة بالتربة السائبة، فإن التربة الجذرية للأنواع الجينية الثلاثة تتميز بنسيج مختلف؛ درجة حموضة منخفضة ومحتوى منخفض من كربونات. يتضح ان النمو البكتيري يكون أكثر وفرة حول جذور الأنماط الجينية الثلاث الى جانب اختلاف النسبة (تربة جذرية/ تربة) من صنف إلى آخر. أظهر تحليل التنوع الجيني من خلال اختبار (T-RFLP) أن التنوع البكتيري يزداد بشكل ملحوظ في النوع الوراثي بسكرة فقط.

تم جمع 515 عينة بكتيرية، منها 301 عينة معزولة من الجذور الثلاثة و 214 عينة معزولة من التربة السائبة. كشف تحليل الأنشطة المميزة لـ PGPB أنه قد تم تحفيز إنتاج مركبات الإندول في منطقة الجذور للأصناف الثلاثة، ومع ذلك، تم تحفيز النشاط المضاد للأمراض النباتية بنمط وراثي واحد فقط.

نتج عن عزل البكتيريا من جذور الأنماط الثلاثة ما مجموعه 83 عينة. كشفت عمليه مضاعفه التسلسلات المتكررة بواسطة BOX-PCR عن تنوع كبير في هذه العينات المعزولة. أظهرت الناوبات الداخلية (Endophytes) المعزولة فعالية كبيره في تعزيز نمو النبات مخبريا. تنتج جميع العينات البكتيرية الأوكسينات عبر مسارات تركيبية تعتمد على الترتوفان. يوضح تحليل GC-MS أن حمض الأستيتيك اندول ينتج في الغالب بواسطة مسار IPyA. تتمتع الناوبات الداخلية بقدرة كبيرة على إنتاج Siderophores ولكن بقدرة ارجاعيه أقل أهمية من البكتيريا الجذرية. أدى استخدام UHPLC-MS / MS Q Exactive إلى اكتشاف 23 نوعًا مختلفًا من مرجعات الحديد في 21 عينة. تم الكشف عن إنتاج سلسلة طويلة من اللاكتونات أسيل-هوموسيرين (AHL) في 7 عينات من الناوبات الداخلية. ومع ذلك، لوحظ تثبيط الحث الذاتي بواسطة AHL في 22 عينة، من بينها 10 و 15 عينة تثبط الحث الذاتي في *C. violaceum* CV026 و *A. tumefaciens* NT1 على التوالي. من جهة اخرى، كشفت دراسة النشاط المضاد للفطريات أن 25 عينة من بين 83 عينة يمكنها أن تمنع نمو *F. oxysporum* أيضا، الى جانب ان 79٪ من الناوبات الداخلية لديها القدرة على إذابة الفوسفات غير العضوي.

تم اختيار العينات KEK1 و KEK36 و BEK8 و FEK22 و FEO15 و BEK8 لاجل مزيد من الدراسة حول تأثيراتها. صنفت الدراسة التصنيفية المعتمده على مضاعفه (16S rDNA) للعينة FEO15 كنمط من نوع *Streptomyces* ووجود تشابه كبير مع النوع *S. caeruleatus*.

إن العينات KEK1 و KEK36 و BEK8 و FEK22 و FEO15 التي تنتمي إلى نوع *Pseudomonas* تشبه من الناحية التطورية الأنواع *P. moorei* و *P. japonica* و *P. granadensis* و *P. brassicacearum* على التوالي. أظهر اختبار العينات المعزولة على النبات (*in vivo*)، ان هذه الانواع الخمس حسنت بشكل كبير من معايير النمو للأنماط الجينية الثلاثة للفلل. تم اختيار العينات FEO15 و FEK22 لدراسة التأثير على المحصول بعد خمسة أشهر من الزرع، بعد معاملتها بلقاحات اما منفصلة او مختلطه (consortium). تظهر نتائجنا أن التلقيح المخلوط أكثر كفاءة من التلقيح المنفصل. أظهر النوع الوراثي "كرم" تحسناً بنسبة 199٪ و 377٪ في الوزن الجاف للثمار بعد المعاملة بعينه FEO15 و التلقيح المخلوط على التوالي. كما تم الحصول على زيادة بنسبة 58٪ و 138٪ عند تلقيح النوع الوراثي "الفارس" بعينه FEO15 و التلقيح المخلوط على التوالي.

نتيجة لهذه الدراسة، أظهر اتحاد عينات FEO15 و FEK22 نتائج واعدة فيما يتعلق باستخدامهما كسماد حيوي. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لإكمال خطوات التركيب والتطبيق الميداني.

**الكلمات المفتاحية:** الفليفلة الحولية، نطاق الجذور، البكتريا الجذرية، التنوع الوراثي، الناوبات الداخلي، أنشطة PGPB

## Liste des abréviations

- PGPB** : *Plant Growth Promoting Bacteria* (bactéries favorisant la croissance des plantes).
- IAA** : *Indole-3-Acetic Acid* (l'acide indole-3-acétique).
- T-RFLP** : *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminale).
- IAM** : *Indole-3-acetamide* (l'indole-3-acétamide).
- IPyA** : *Indole-3-Pyruvic Acid* (l'acide indole-3-pyruvique).
- IAAld** : *Indole-3-acetaldehyde* (l'indole-3-acétaldéhyde).
- IAN** : *Indole-3-Acetonitrile* (l'indole-3-acétonitrile).
- ILA** : *Indole-3-Lactic Acid* (l'acide indole-3-lactique).
- TOL** : *Tryptophol* (indole-3-éthanol).
- IBA** : *Indole-3-Butyric Acid* (l'acide indole-3-butyrique).
- IPA** : *Indole-3-Propionic Acid*, (l'acide indole-3-propionique).
- TRY** : Tryptamine.
- AHL** : Acyl Homosérine Lactones.
- HSL** : Cycle Lactonique.
- HCN** : *Hydrogen cyanide* (cyanure d'hydrogène).
- ISR** : *Induced systemic resistance* (Résistance systémique induite).
- OTU** : *Operational taxonomic unit* (Unité opérationnelle taxonomique).
- ACP** : Analyse en composante principale.
- CatPCA** : *Categorical principal component analysis* (analyse en composantes principales catégorielles).

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Principales voies de biosynthèse de l'IAA chez les bactéries.....	9
<b>Figure 2.</b> La voie de synthèse de l'IAA indépendante au tryptophane en comparaison avec la voie dépendante. ....	12
<b>Figure 3.</b> Mécanismes d'absorption des sidérophores chez les bactéries à Gram négatif les bactéries à Gram positif. ....	16
<b>Figure 4.</b> Structure des hydroxamates.....	17
<b>Figure 5.</b> Structure de quelques molécules de catécholates. ....	18
<b>Figure 6.</b> Structure générale des N-acyl homosérine lactones (AHL). ....	21
<b>Figure 7.</b> Auto-induction médiée par les protéines I et R. ....	23
<b>Figure 8.</b> Microscopie confocale représente la colonisation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par la souche <i>Streptomyces</i> sp. COA. ....	36
<b>Figure 9.</b> Exemple de profils T-RFLP obtenus à partir de la digestion de L'ADNr 16S par l'enzyme HpaII. ....	44
<b>Figure 10.</b> Quantification du gène de l'ARNr 16S d'origine bactérienne, pour les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques.....	46
<b>Figure 11.</b> Diagrammes de Venn comparant les OTU des sols rhizosphériques et les sols non-rhizosphériques. ....	47
<b>Figure 12.</b> Unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et <i>Shannon-Wiener index</i> ( $H'$ ) des sols rhizosphériques et des sols non-rhizosphériques. ....	48
<b>Figure 13.</b> Analyse en composantes principales basée sur les profils de la T-RFLP des populations bactériennes apparues dans la rhizosphère et le sol non-rhizosphérique. ....	49
<b>Figure 14.</b> Analyse en composantes principales basée sur, les profils T-RFLP, l'abondance bactérienne et les analyses physico-chimiques du sol. ....	49
<b>Figure 15.</b> Evaluation des activités promotrices de croissance des plantes des isolats bactériens. ....	58
<b>Figure 16.</b> Analyse en composantes principales basée sur les niveaux de production des quatre activités promotrices de croissance de plantes. ....	60
<b>Figure 17.</b> Analyse en composantes principales catégorielles reliant les quatre activités de promotion de croissance de plantes. ....	61
<b>Figure 18.</b> Analyse en composantes principales catégorielles exprimant les résultats selon le génotype et le type de sol.....	65
<b>Figure 19.</b> Aspect macroscopique de quelques isolats endophytes. ....	74
<b>Figure 20.</b> Détection des auxines par GC-MS. ....	75
<b>Figure 21.</b> Production des sidérophores sur milieu solide par quelques isolats endophytes. ..	78
<b>Figure 22.</b> <i>Box-plot</i> montre la production des hydroxamates et des catécholates par les isolats bactériens. ....	79
<b>Figure 23.</b> Détection des sidérophores par UHPLC-MS/MS Q Exactive chez les isolats BES3 et FEO15.....	79
<b>Figure 24.</b> La détection du quorum chez quelques isolats bactériens Gram négatif avec le biocapteur <i>A. tumefaciens</i> NT1.....	81
<b>Figure 25.</b> Détection des AHL par UHPLC-HRMS/MS chez l'isolat BEK8.....	82
<b>Figure 26.</b> Inhibition du quorum chez les isolats bactériens par l'utilisation des biocapteurs <i>C. violaceum</i> CV026 et <i>A. tumefaciens</i> NT1.....	82
<b>Figure 27.</b> Solubilisation du phosphate par quelques isolats endophytes.....	84

<b>Figure 28.</b> Analyse en composantes principales basée sur les résultats des analyses de la promotion de croissance des plantes <i>in vitro</i> .	87
<b>Figure 29.</b> Corrélation entre les concentrations des composés indoliques obtenus par dosage colorimétrique et par GC-MS.	88
<b>Figure 30.</b> <i>Box-plot</i> exprime la taille de l'halo sur milieu solide chez les isolats par rapport à la détection des sidérophores par UHPLC-MS/MS Q Exactive.	90
<b>Figure 31.</b> <i>Box-plot</i> exprime le pourcentage d'inhibition de <i>F. oxysporum</i> chez les isolats rhizosphériques et endophytes.	95
<b>Figure 32.</b> Représentation schématique des régions d'ADN séquencées par les quatre amorces.	99
<b>Figure 33.</b> Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % présentant la migration des amplicons de quelques isolats produits par BOX-PCR.	101
<b>Figure 34.</b> Dendrogrammes basés sur l'analyse des profils électrophorétiques de la BOX-PCR des 83 isolats bactériens.	103
<b>Figure 35.</b> Dendrogrammes basés sur l'analyse des profils électrophorétiques de la BOX-PCR des isolats bactériens selon le génotype de <i>C. annuum</i> .	104
<b>Figure 36.</b> Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, montrant la relation entre l'isolat FEO15 et de souches-types appartenant au genre <i>Streptomyces</i> .	106
<b>Figure 37.</b> Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, montrant la relation entre les isolats FEK22, KEK1, BEK8, KEK36 et de souches-types appartenant au genre <i>Pseudomonas</i> .	107
<b>Figure 38.</b> Effet des isolats bactériens sur la croissance de piment (génotype Karam).	117
<b>Figure 39.</b> Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenue à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en conditions stériles.	118
<b>Figure 40.</b> <i>Box-plot</i> révèle la biostimulation de la croissance de piment par les isolats bactériens.	119
<b>Figure 41.</b> Effet des isolats FEK22 et FEO15 sur la croissance de piment après un mois de culture en pot (génotype Karam).	119
<b>Figure 42.</b> <i>Box-plot</i> montrant la biostimulation des trois génotypes de piment par chaque isolat.	120
<b>Figure 43.</b> <i>Box-plot</i> montrant l'impact des isolats endophytes sur chaque paramètre de croissance.	121
<b>Figure 44.</b> Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenus à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en pots après un mois de culture.	122
<b>Figure 45.</b> Effet de inoculation du piment par les isolats FEK22, FEO15 et leurs consortium après cinq mois de croissance.	122
<b>Figure 46.</b> Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenue à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en pots après cinq mois de culture.	123

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les différentes molécules de N -acyl-homosérine lactones.....	22
<b>Tableau 2.</b> Les N -acyl-homosérine lactones produits par les PGPB et leurs effets sur les plantes. ....	25
<b>Tableau 3.</b> Principaux métabolites produits par le genre <i>Pseudomonas</i> . ....	33
<b>Tableau 4.</b> Produits commercialisés de la promotion de la croissance des plantes développés à partir des espèces appartenant au genre <i>Streptomyces</i> .....	38
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol rhizosphérique et non-rhizosphérique.....	45
<b>Tableau 6.</b> <i>Heat-map</i> montrant l'association entre le type du sol et les quatre activités des bactéries promotrices de croissance de plantes.....	58
<b>Tableau 7.</b> <i>Heat-map</i> montre l'association de la solubilisation du phosphate et la production des sidérophores et des auxines. ....	62
<b>Tableau 8.</b> Production des composés indoliques par les 83 isolats bactériens en présence de tryptophane. ....	75
<b>Tableau 9.</b> Production des sidérophores par les isolats endophytes. ....	79
<b>Tableau 10.</b> Détection du quorum chez les isolats Gram négatif par le biocapteur <i>A. tumefaciens</i> NT1. ....	81
<b>Tableau 11.</b> Inhibition du quorum chez les isolats endophytes. ....	83
<b>Tableau 12.</b> Solubilisation de phosphate par les isolats endophytes exprimé par la moyenne de la taille de l'halo produit. ....	84
<b>Tableau 13.</b> Inhibition de <i>F. oxysporum</i> par les isolats endophytes.....	85
<b>Tableau 14.</b> L'indice de diversité, l'abondance, l'équitabilité et la dominance des isolats des trois génotypes. ....	102
<b>Tableau 15.</b> Numéros d'accession des isolats déposés dans la base de données GenBank...	105
<b>Tableau 16.</b> Souches-types les plus proches à l'isolat FEO15. ....	105
<b>Tableau 17.</b> Souches-types les plus proches aux isolats FEK22, KEK1, BEK8 et KEK36. .	106
<b>Tableau 18.</b> Utilisation des sucres par les isolats étudiés. ....	108
<b>Tableau 19.</b> Utilisation des composés azotés organiques. ....	108
<b>Tableau 20.</b> Activité hydrolytique des isolats.....	109
<b>Tableau 21.</b> Sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	109
<b>Tableau 22.</b> Croissance des isolats étudiés en présence de différents inhibiteurs. ....	109
<b>Tableau 23.</b> Quelques caractéristiques physiologiques de l'isolat FEO15 et des souches apparentées.....	112
<b>Tableau 24.</b> Effet des isolats bactériens sélectionnés sur les différents paramètres de croissance de piment en conditions stériles.....	117
<b>Tableau 25.</b> Effet des isolats bactériens sélectionnés sur les différents paramètres de croissance de piment en pots après un mois. ....	120
<b>Tableau 26.</b> Comparaison entre les activités métaboliques des isolats FEK22 et FEO15. ...	126

## **INTRODUCTION**

---

**Introduction**

Chaque année les activités agricoles se sont intensifiées pour répondre aux exigences de la population mondiale (Adeleke *et al.*, 2020). L'application d'engrais chimiques et de pesticides a entraîné une amélioration de la productivité, assurant ainsi la sécurité alimentaire (Wolde-Meskel *et al.*, 2018). L'utilisation des produits agrochimiques, ayant un coût élevé, entraîne une pollution de l'environnement, une toxicité pour les microorganismes du sol et l'apparition de plusieurs maladies chez l'Homme (Campos *et al.*, 2019; Sandargo *et al.*, 2019). De même, leurs utilisations prolongées, réduit la qualité et la quantité des cultures, altère la fertilité du sol, provoque l'eutrophisation et affecte l'équilibre microbien dans l'environnement (Segaran et Sathiavelu, 2019).

Par conséquent, la production agricole est considérée comme un système à haut risque environnemental nécessitant l'application d'alternatives efficaces, sans risques sanitaires et respectueuses pour l'environnement. En effet, l'exploitation de la contribution du microbiote du sol semble être le moyen le plus prometteur (Igiehon et Babalola, 2017 ; Bargaz *et al.*, 2018). Les activités des microorganismes présents dans le sol sont multiples, ils sont capables de limiter les ravageurs et les maladies, faciliter la décomposition de la matière organique complexe, accélérer l'élimination des polluants toxiques et améliorer la fertilité des sols (Salam et Varma, 2019). D'une autre part, diverses interactions peuvent avoir lieu entre les plantes et le microbiote du sol (Welbaum *et al.*, 2004). Ces relations, qu'elles soient neutres, ou encore à l'origine de maladies ou de symbioses, ont toujours suscité un très grand intérêt dans le domaine de la recherche scientifique (Toumatia, 2015).

Par ailleurs, la rhizosphère est le sol entourant les racines des plantes colonisé par un sous-ensemble du microbiote du sol non-rhizosphérique appelé rhizobiome (Schmidt *et al.*, 2016 ; Sasse *et al.*, 2018). A ce niveau, les exsudats racinaires sont considérés comme le principal mécanisme permettant aux plantes de maintenir leur microbiote (Van Dam et Bouwmeester, 2016). En utilisant le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*, Micallef et ses collaborateurs ont rapporté une corrélation entre la variation du rhizobiome et les exsudats racinaires de huit accessions (Micallef *et al.*, 2009). Récemment, Mönchgesang et ses collaborateurs ont observé des profils d'exsudation distincts de 19 accessions (Mönchgesang *et al.*, 2016). Ainsi, l'amélioration des connaissances sur les associations plantes-microbes dans la rhizosphère sera une étape cruciale vers la gestion rationnelle de la biodiversité des sols et représentera un progrès durable dans la production et le rendement des plantes (Rillig *et al.*, 2018).

De nombreuses bactéries présentes dans le sol ont la capacité de faciliter la croissance des plantes et sont, par conséquent, appelées bactéries favorisant la croissance des plantes (*Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB). Il a été proposé d'assembler ce microbiote bénéfique en deux groupes, à savoir les rhizobactéries et les endophytes. Le premier groupe est constitué de bactéries bénéfiques colonisant la rhizosphère, tandis que les endophytes représentent le groupe ayant la capacité d'infecter les tissus de plantes (Gouda *et al.*, 2018). Depuis leur découverte, les endophytes ont été considérés comme une communauté jouant un rôle fondamental dans la croissance des plantes, car ils sont mieux protégés contre divers stress biotiques et abiotiques en comparaison avec les rhizobactéries (Puri *et al.*, 2017). Ces microorganismes associés peuvent être transmis de génération en génération en tant que partie intégrante de l'organisme végétal (Goswami *et al.*, 2014).

Les PGPB contribuent à la nutrition et à la protection des plantes à travers différents processus, tels que la production et la sécrétion de diverses substances régulatrices (phytohormones, *etc.*) (Ahemad et Mulugeta, 2014). Des études ont également rapporté que les PGPB favorisent directement la croissance des plantes en facilitant l'absorption de nutriments comme l'azote (Gaby et Buckley, 2011), le phosphore (Sharma *et al.*, 2013) et le fer *via* la production de sidérophores (Ahmed et Holmström, 2014). Les mécanismes indirects font référence à des mécanismes inhibant le fonctionnement d'un ou de plusieurs organismes phytopathogènes protégeant ainsi les cultures (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Ces dernières années, l'application des PGPB pour améliorer la croissance des plantes et réduire l'utilisation de produits chimiques en agriculture a fait l'objet de plusieurs études (Goudjal *et al.*, 2018, Afzal *et al.*, 2019), cependant, leur application souffre encore de plusieurs difficultés. En effet, il a été mentionné par Jansson et Hofmockel que la majorité des microorganismes du sol n'ont pas encore été isolés (Jansson et Hofmockel, 2018). D'une autre part, l'effet des PGPB varie en fonction de l'espèce végétale et dans certains cas, il dépend aussi du génotype.

Olanrewaju et ses collaborateurs ont suggéré que des travaux fondamentaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle des PGPB (Olanrewaju *et al.* 2017). Ainsi, plusieurs auteurs ont suggéré des études complémentaires basées sur la sélection de PGPB appropriées et sur l'exploration de leurs capacités (Gouda *et al.*, 2018 ; Goudjal *et al.*, 2018). D'autre part, des études récentes recommandent de développer de nouveaux consotiums de microorganismes coopératifs qui contribuent à l'amélioration de la croissance et la protection des cultures (Finkel *et al.*, 2017 ; Vurukonda *et al.*, 2018). De plus, seuls quelques travaux ont

rapporté les interactions entre les caractéristiques de PGPB (Da Costa *et al.*, 2014 ; Moreira *et al.*, 2016).

Par ailleurs, le piment fort (*Capsicum annuum*) est l'un des membres des *Solanacées* les plus cultivés au monde (Navarro *et al.*, 2006a). Il est largement utilisé comme condiment, colorant ou comme légume (Pugliese *et al.*, 2013). De plus, il représente une bonne source de composés phytochimiques tels que les phénols, les flavonoïdes et les capsaïcinoïdes (Materska et Perucka, 2005 ; Krzyzanowska *et al.*, 2010). Les cultures du piment industriel englobent une production mondiale annuelle de 30 millions de tonnes à travers une superficie de quatre millions d'hectares (Manzur *et al.*, 2014). Selon les statistiques du FAO, l'Algérie est classé en 9<sup>ème</sup> position à l'échelle mondiale avec une production de 675 milles tonnes au cours de l'année 2019 (FAO, 2019).

Des études ont déjà été menées sur la capacité des PGPB à améliorer la croissance et la protection de *C. annuum*, cependant, aucune étude n'a rapporté la variabilité de leurs effets entre les différents génotypes de cette plante. Dans le même contexte, notre étude est à l'heure actuelle considérée comme le premier rapport sur l'effet de la culture de *C. annuum* sur la diversité microbienne et les capacités du PGPB dans la rhizosphère en comparaison au sol non-rhizosphérique. Il s'agit également de la première étude qui caractérise les endophytes bactériens associés à *C. annuum* cultivé en Algérie.

La présente étude a pour objectifs l'évaluation de la biodiversité bactérienne du sol rhizosphérique et la caractérisation des activités des PGPB associées aux racines de *C. annuum* cultivés dans le Nord-est algérien, plus précisément dans la Wilaya de Guelma qui représente un pôle agricole très important dans la région. Afin d'aboutir à ces objectifs, nous avons adopté une méthodologie basée d'abord sur l'évaluation de l'effet de trois génotypes de *C. annuum* sur les caractéristiques physico-chimiques et la diversité génétique du microbiote du sol ainsi que sur les caractéristiques PGPB. Dans une deuxième étape de cette approche, une étude *in vitro* des activités de promotion de croissance des bactéries endophytes associées aux racines a été effectuée. Enfin, l'identification de quelques isolats et la valorisation de leur effet sur la croissance et le rendement de piment ont été réalisées.

Après une revue bibliographique portant sur les PGPB, leurs activités et leurs mécanismes d'actions, la partie expérimentale est structurée en cinq chapitres, qui décrivent tous un volet de l'approche expérimentale adoptée en commençant par la présentation du matériel

biologique, les méthodes utilisées puis la représentation des résultats suivie de leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives viennent finaliser la structure de cette thèse.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## **1. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes**

### **1.1.Généralités**

Les PGPB représentent un groupe de microorganismes bénéfiques qui sont capables d'améliorer la croissance des plantes et de les protéger contre le stress et de différentes maladies phytopathologiques (Grover *et al.*, 2011; Glick, 2012).

Les PGPB peuvent coloniser la rhizosphère, le rhizoplan et même les racines de plantes en devenant endophytes (Afzal *et al.*, 2019). En fait, les endophytes représentent un groupe de rhizobactéries spécialisé qui a acquis la capacité d'envahir les racines des plantes après avoir établi une population rhizosphérique (Compant *et al.*, 2010 ; Santoyo *et al.*, 2016). Ce groupe a l'avantage de vivre à l'intérieur des tissus végétaux, ce qui lui permettant d'être en contact étroit avec l'hôte végétal pour exercer facilement un effet bénéfique direct (Misko et Germida, 2002 ; Marquez-Santacruz *et al.*, 2010).

L'effet positif des PGPB est représenté par une série de mécanismes, notamment l'amélioration de la nutrition minérale, le renforcement de la tolérance des plantes au stress biotique et abiotique, la modification du développement racinaire et la suppression des maladies transmises par le sol (Afzal *et al.*, 2019). Les traits bactériens impliqués dans ces activités comprennent la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, la chélation du fer, la synthèse des phytohormones, la modulation des niveaux d'éthylène végétal et le contrôle des microorganismes phytopathogènes (Souza *et al.*, 2015).

### **1.2.Colonisation de la rhizosphère et des racines par les PGPB**

La colonisation de la rhizosphère et des racines est une tâche hautement compétitive pour les PGPB pour occuper les espaces et obtenir des nutriments (Raaijmakers *et al.*, 2002). Cette activité est liée à différents facteurs tels que la nature des exsudats racinaires des plantes, l'attachement et la motilité bactérienne, la détection du quorum bactérien, le taux de croissance bactérien et la production de métabolites favorisant la colonisation tels que les polysaccharides (Santoyo *et al.*, 2016 ; Afzal *et al.*, 2019).

Après la colonisation de la rhizosphère, les PGPB ont la capacité de coloniser le rhizoplan, les cellules bactériennes se fixent aux surfaces radiculaire en formant une chaîne cellulaire, les bactéries peuvent alors coloniser toute la surface radiculaire conduisant à la génération de micro-colonies ou biofilms (Benizri *et al.*, 2001). Certaines espèces ont la capacité de franchir la barrière racinaire et elles deviennent endophytes. En fait, le processus de colonisation des racines peut être passif ou actif. La pénétration passive peut se produire au niveau des fissures

présentes dans les zones d'émergence des racines, les extrémités des racines ou au niveau des fissures créées par des organismes délétères (Hardoim *et al.*, 2008). La pénétration active est réalisée au moyen d'un mécanisme dédié d'attachement et de prolifération, cela implique la présence de lipopolysaccharides, de flagelles, de pili, de motilité, de contraction et de détection du quorum (Böhm *et al.*, 2007 ; Suárez-Moreno *et al.*, 2010 ; Afzal *et al.*, 2019). De même, la sécrétion d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, principalement les pectinases et les cellulases, est connue pour être impliquée dans la pénétration et la propagation bactériennes à l'intérieur du système racinaire (Compant *et al.*, 2005). Il a été proposé que les bactéries endophytes produisent de faibles niveaux d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, par rapport aux phytopathogènes qui produisent des niveaux nocifs élevés, en évitant ainsi de déclencher les systèmes de défense des plantes (Elbeltagy *et al.*, 2000). De plus, une autre façon par laquelle les bactéries endophytes évitent d'être détectées comme pathogènes par la plante est de maintenir de faibles densités cellulaires par rapport aux bactéries pathogènes (Zinniel *et al.*, 2002).

### **1.3.Facteurs affectant la colonisation de la rhizosphère et des plantes par les PGPB**

La colonisation de la rhizosphère et des racines par les PGPB est influencée par l'espèce végétale, les exsudats racinaires et les propriétés physico-chimiques du sol (Lareen *et al.*, 2016). De même, à différents stades de croissance, les plantes peuvent également sélectionner et modifier la composition des communautés bactériennes rhizosphériques et endophytes (Depret et Laguerre, 2008). La colonisation, dépend aussi de la compétition entre les PGPB et les bactéries indigènes de la rhizosphère (Afzal *et al.*, 2019). Dans ce contexte, Weyens et ses collaborateurs ont montré que la colonisation de la souche *Pseudomonas putida* W619 est plus faible dans les sols non stériles que les sols stériles (Weyens *et al.*, 2012). Le succès de la colonisation bactérienne peut également dépendre d'un effet symbiotique au sein du microbiote promoteur de la croissance des plantes, Meena et ses collaborateurs ont rapporté que la présence du champignon symbiotique *Piroformospora indica* dans la rhizosphère augmente le taux de colonisation de l'espèce *Pseudomonas striata* (Meena *et al.*, 2010). Le pH du sol peut être un autre facteur pertinent affectant la colonisation et l'abondance des PGPB, Fernandez-Calvino et Baath (2010) ont rapporté que des variations de 1,7 unités en dessous ou au-dessus du pH optimal sont capables de réduire plus de 50 % de la croissance des communautés bactériennes dans les sols. La gestion des sols, comme la fertilisation, peut également affecter l'activité, la biomasse et la composition des communautés bactériennes et la capacité de colonisation des PGPB (Chen *et al.*, 2016 ; Luo *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2017).

#### **1.4.Méthodes d'étude des PGPB**

Les PGPB sont classiquement étudiées en utilisant des méthodes basées sur la culture (Ding *et al.*, 2013). Ces méthodes nécessitent la croissance des microorganismes en conditions de laboratoire, dont l'isolement des bactéries est réalisé soit à partir du sol rhizosphérique soit à partir des tissus végétaux. La procédure d'isolement doit être suffisamment sensible pour récupérer la plupart des bactéries cultivables, de ce fait, il est nécessaire d'utiliser des milieux de culture avec des sources de carbone variables. D'autre part, l'isolement des PGPB peut nécessiter un traitement des tissus végétaux principalement lors de l'isolement des endophytes, ce traitement doit être suffisamment efficace pour permettre l'isolement de la flore endophytique et pour éliminer toute la flore contaminante. Généralement, le protocole d'isolement nécessite une stérilisation de la surface tissulaire, suivie par leur macération, dilution en série, et étalement sur différents milieux de culture (Barac *et al.*, 2004). La stérilisation est réalisée principalement par des agents chimiques tels que l'hypochlorite de sodium, l'éthanol et le peroxyde d'hydrogène, généralement ces produits chimiques sont utilisés en série pour améliorer l'efficacité de la procédure de stérilisation (Romero *et al.*, 2001 ; Lodewyckx *et al.*, 2002). Le tissu stérilisé est lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les produits chimiques résiduels. La stérilisation est confirmée en plaçant une petite quantité d'eau distillée du dernier lavage sur le milieu de culture, où l'absence de croissance confirme l'efficacité de la procédure de stérilisation (Goudjal *et al.*, 2013).

Les PGPB sont identifiées à l'aide d'approches morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires (Ma *et al.*, 2011). En fait, les approches moléculaires sont les plus utilisées, tels que l'amplification de l'ADNr 16S qui est couramment utilisée pour l'identification et la détermination de la parenté phylogénétique (Srinivasan *et al.*, 2015). D'autres techniques basées sur l'étude de l'ADN bactérien sont utilisées pour évaluer le rapprochement entre les PGPB isolées. L'utilisation des méthodes telles que la BOX-PCR et ERIC-PCR est largement répandue, ces techniques sont principalement basées sur l'amplification de ces séquences répétées et conservées, permettant ainsi la discrimination entre les espèces (Qing *et al.*, 2011).

L'efficacité des bactéries isolées comme PGPB est analysée à travers un criblage basé sur les activités *in vitro* et/ou *in vivo* spécifiques à la promotion de la croissance des plantes (Souza *et al.*, 2015). Les techniques, *in vitro*, permettent l'étude de l'activité de la promotion de la croissance des plantes indirectement, soit par la recherche des molécules spécifiques telles que les auxines, les sidérophores, les enzymes, *etc.*, soit par l'utilisation des approches moléculaires basées sur la recherche des gènes spécifiques à chaque activité (Lareen *et al.*, 2016). D'autre

part, les techniques, *in vivo*, permettent l'évaluation directe de l'effet des bactéries, les travaux les plus réalisés sont l'étude de l'effet sur la germination, le poids et la longueur des différentes parties de la plante, de même plusieurs études ont recommandé d'analyser l'effet des PGPB en conditions stériles et non-stériles (Nair *et al.*, 2007 ; Leite *et al.*, 2013).

La quantification et la détermination de la diversité de la population bactérienne qui colonise la rhizosphère et/ou les tissus végétaux peuvent être utilisées pour étudier les PGPB. L'estimation des PGPB par les méthodes classiques liées à la culture a montré plusieurs inconvénients, tels que la nécessité de l'utilisation de plusieurs milieux de culture (Reiter *et al.*, 2002 ; Eevers *et al.*, 2015) et la difficulté de la croissance pour plusieurs espèces (Sessitsch *et al.*, 2002). En fait, ces méthodes conduisent à une sous-estimation du nombre total de bactéries présentes dans les tissus végétaux et/ou la rhizosphère (Bogas *et al.*, 2015), car les bactéries cultivables représentent, généralement, seulement 0,001 % à 1 % du nombre réel du microbiote total (Torsvik et Qvrees, 2002 ; Alain et Querellou, 2009).

Des méthodes indépendantes à la culture ont été développées pour analyser l'abondance et la diversité génétique des PGPB. La quantification est réalisée principalement par la q-PCR soit à travers l'estimation du microbiote totale par amplification de l'ADNr 16S, ou par quantification d'une population distincte à travers l'amplification d'un gène marqueur spécifique (Faleiro *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2014). La diversité génétique des PGPB est analysée principalement à l'aide de techniques d'empreintes génétiques comme l'analyse de restriction de l'ADNr amplifié (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, ARDRA), l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE), l'électrophorèse sur gel à gradient de température (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*, TGGE) et le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminale (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, T-RFLP) (Gomes *et al.*, 2001 ; Kour *et al.*, 2019).

## **2. Les activités des bactéries promotrices de la croissance des plantes**

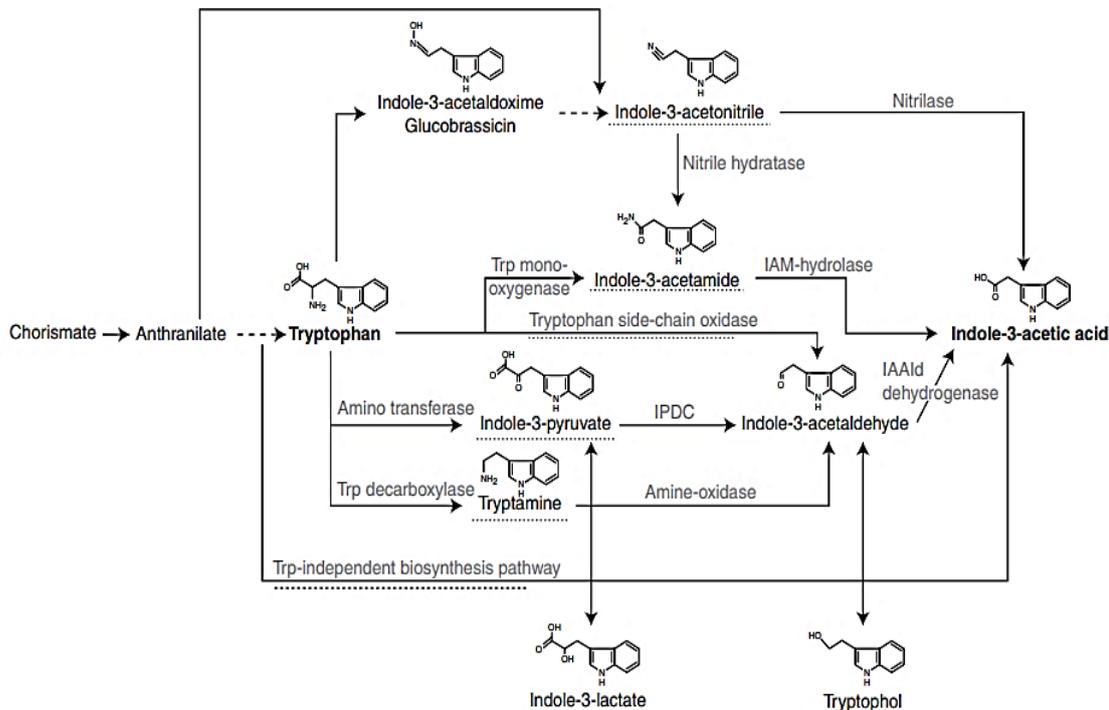
### **2.1. La production des auxines**

Chez les microorganismes, l'auxine a été identifiée la première fois autant que l'agent responsable de la formation des tumeurs induites par *Agrobacterium* sp. (Link et Eggers, 1941), dont l'IAA bactérien a favorisé la croissance tumorale en absence de régulateurs de croissance des plantes, qui sont normalement nécessaires pour inciter la croissance de cals à partir de tissus végétaux stériles (White et Braun, 1941). Par la suite, la production de l'IAA a été rapportée

chez plusieurs bactéries et champignons (Perley et Stowe, 1966 ; Libbert *et al.*, 1970 ; Arshad et Frankenberger, 1991 ; Costacurta et Vanderleyden, 1995). La production d'auxine a été révélée aussi chez les PGPB tels que *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. et *Streptomyces* sp. (Afzal *et al.*, 2019). Bien que le rôle de l'IAA chez les bactéries n'a pas été étudié de manière aussi détaillée, plusieurs études ont montré que l'IAA peut être une molécule de signalisation chez les microorganismes, à la fois chez les espèces productrices et non productrices et qu'elle peut avoir un impact majeur sur les interactions plante-microorganismes (Spaepen et Vanderleyden, 2011).

### 2.1.1. Voies de biosynthèse des auxines chez les bactéries

La production d'IAA a été observée chez de nombreuses espèces bactériennes. Il est rapporté que 80 % des microorganismes isolés de la rhizosphère de diverses cultures ont la capacité de synthétiser des auxines comme métabolites secondaires (Patten et Glick, 1996). Différentes voies métaboliques pour synthétiser l'IAA chez les bactéries ont été identifiées, un degré élevé de similitude a été observé entre ces voies et celles de biosynthèse de l'IAA chez les plantes (Patten et Glick, 1996 ; Woodward et Bartel, 2005 ; Spaepen *et al.*, 2007). La figure 1 représente un aperçu des voies de biosynthèse de l'IAA chez les bactéries.



**Figure 1.** Principales voies de biosynthèse de l'IAA chez les bactéries (Spaepen *et al.*, 2007).

Le tryptophane a été identifié comme un précurseur principal des voies de biosynthèse de l'IAA chez les bactéries. L'examen des intermédiaires métaboliques a conduit à l'identification de différentes voies utilisant le tryptophane comme précurseur, dont elles sont nommées en fonction de l'intermédiaire clé de chaque voie. Chez certains microorganismes plusieurs voies de synthèse de l'IAA sont présentes et actives en même temps.

- **Voie de l'indole-3-acétamide**

La voie de l'indole-3-acétamide (*Indole-3-acetamide*, IAM) est la voie la mieux caractérisée chez les bactéries, dont les gènes, les protéines et leur régulation sont bien définis. Elle est présente chez plusieurs agents pathogènes et peut contribuer à la virulence de ces souches en produisant de grandes quantités d'IAA (Jameson, 2000 ; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Le parcours se compose de deux étapes distinctes. Dans la première étape, la tryptophane monooxygénase (codée par le gène *iaaM*) convertit le tryptophane en IAM, alors que dans la deuxième étape, l'IAM est hydrolysé en IAA et en ammoniacque par une IAM hydrolase (codée par le gène *iaaH*). Les deux gènes ont été caractérisés chez de nombreux phytopathogènes tels que *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, et aussi chez des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Sekine *et al.*, 1989 ; Clark *et al.*, 1993 ; Morris, 1995 ; Theunis *et al.*, 2004).

La voie IAM a été décrite précédemment comme une voie spécifique aux bactéries, par la suite, l'IAM a été rapporté comme un composé endogène d'*Arabidopsis thaliana* démontrant ainsi la présence de cette voie chez les plantes (Piotrowski *et al.*, 2001 ; Pollmann *et al.*, 2002 ; Pollmann *et al.*, 2003).

- **Voie de l'indole-3-pyruvate**

La voie de l'indole-3-pyruvate (*Indole-3-pyruvic acid*, IPyA) est la voie majeure pour la biosynthèse d'IAA chez les plantes. Chez les bactéries, la production d'IAA via la voie IPyA a été décrite chez une large gamme d'espèces, telles que le phytopathogène *Pantoea agglomerans*, et chez des espèces bénéfiques appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* et *Rhizobium* (Spaepen *et al.*, 2007). Le parcours se compose de trois étapes, dans la première étape, le tryptophane est transaminé en IPyA par une aminotransférase, par la suite, l'IPyA est décarboxylé en indole-3-acétaldéhyde (*Indole-3-acetaldehyde*, IAAlD), qui est ensuite oxydé en IAA par une déshydrogénase. L'étape de décarboxylation est catalysée par l'enzyme clé qui est l'indole-3-pyruvate décarboxylase (Baca *et al.*, 1994).

- **Voie de la tryptamine**

Dans la voie de la tryptamine, le tryptophane est d'abord décarboxylé en tryptamine par une tryptophane décarboxylase, par la suite, la tryptamine est directement convertie en IAAld par une amine oxydase. Cette voie a été identifiée chez plusieurs espèces bactériennes telles que *Bacillus cereus* et *Azospirillum* sp. (Perley et Stowe, 1966 ; Hartmann *et al.*, 1983).

- **Voie de l'indole-3-acétonitrile**

La biosynthèse de l'IAA via la voie de l'indole-3-acétonitrile (*Indole-3-acetonitrile*, IAN) a été étudiée d'abord chez les plantes (Bartling *et al.*, 1992). Chez les bactéries, cette voie a été découverte à travers la détection des enzymes spécifiques à cette voie chez des espèces appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes* (Nagasawa *et al.*, 1990 ; Oberhansli *et al.*, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 1993 ; Kobayashi *et al.*, 1995).

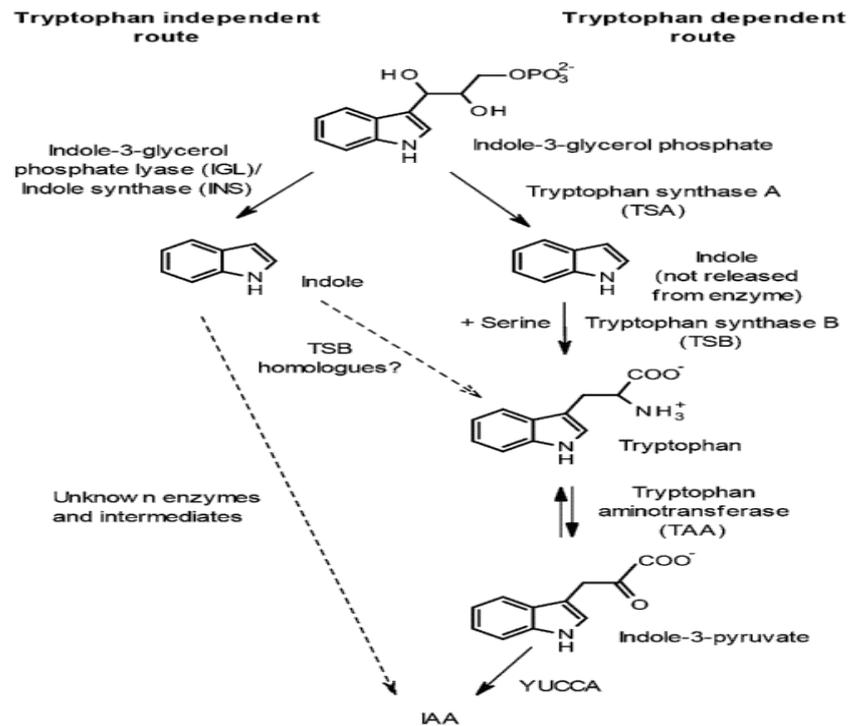
- **Voie d'oxydation de la chaîne latérale du tryptophane**

La voie d'oxydation de la chaîne latérale du tryptophane n'a pas été décrite chez les plantes, cependant, elle a été démontrée chez la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Dans cette voie, le tryptophane est directement converti en IAAld (Oberhansli *et al.*, 1991).

- **Voie indépendante au tryptophane**

Une voie bactérienne indépendante au tryptophane a pu être mise en évidence chez *Azospirillum brasilense*, cette voie est prédominante dans le cas de l'absence de tryptophane dans le milieu de culture (Prinsen *et al.*, 1993). La figure 2 montre la voie de synthèse d'IAA indépendante au tryptophane proposée.

Comme elle montre la figure, les enzymes spécifiques de cette voie n'ont pas encore été identifiées (Nonhebel, 2015). De plus, le point de branchement pour cette voie se pose au phosphate d'indole-3-glycérol ou à l'indole (Last *et al.*, 1991).



**Figure 2.** La voie de synthèse de l'IAA indépendante au tryptophane en comparaison avec la voie dépendante (Nonhebel, 2015).

### 2.1.2. Conjugaison et dégradation de l'IAA

Chez les plantes, le grand pourcentage de l'IAA produit se trouve sous une forme conjuguée à travers une liaison avec des sucres ou des acides aminés (Woodward et Bartel, 2005). Le rôle de cette liaison est principalement le contrôle de la concentration, le transport, le stockage et la protection de l'IAA (Seidel *et al.*, 2006). De plus, le stockage de l'IAA peut être assuré à travers la conversion en métabolites intermédiaires des voies de synthèse, les formes les plus répandues sont l'IAAld et l'acide indole-3-lactique (*Indole-3-lactic acid*, ILA) (Spaepen et Vanderleyden, 2011). Chez les bactéries, la présence de la forme conjuguée de l'IAA n'a été démontrée que chez *Pseudomonas savastanoi*, dont l'IAA forme une liaison avec la lysine, cette forme protège l'IAA contre la dégradation. Une fois absorbé, le complexe d'origine bactérien est hydrolysé à l'intérieur des cellules végétales en libérant de l'IAA biologiquement actif. D'autre part, le stockage de l'IAA chez les bactéries peut être assuré à travers la formation de certains intermédiaires des voies métaboliques tels que l'IPyA, l'IAAld, l'ILA et indole-3-éthanol (*Tryptophol*, TOL) (Spaepen *et al.*, 2007).

### 2.1.3. L'auxine comme molécule de signal microbien

L'IAA est une molécule omniprésente qui joue un rôle de régulateur chez de nombreux organismes vivants. Différents travaux ont rapporté des changements dans l'expression génique

bactérienne sous l'influence de l'IAA. Spaepen et Vanderleyden (2015) ont réalisé une étude portant sur la souche *A. brasilense* Sp245 et d'un mutant dont le gène *ipdC*, qui appartient à la voie de synthèse de l'IAA, est inactif. L'analyse protéomique a révélé la présence d'une différence entre les deux souches, l'étude a permis d'identifier huit protéines différentes impliquées dans la signalisation de l'auxine chez *A. brasilense*. La signalisation par l'IAA a été rapportée aussi pour le phytopathogène *A. tumefaciens*, Liu et Nester (2006) ont montré que l'IAA inactive l'expression du gène de virulence chez *Agrobacterium tumefaciens* après l'infection de la plante. Pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'IAA induit l'adhésion et la formation de filaments, en fait, la levure peut reconnaître l'IAA comme un signal spécifique de la plante pour déclencher des événements morphogénétiques ultérieurs tels que la formation de filaments qui va conduire à l'infection de la plante (Prusty *et al.*, 2004).

Dans une autre étude menée sur la souche modèle *Escherichia coli* K-12, 16 gènes ont montré un niveau d'expression altéré chez les cellules traitées par l'IAA (Bianco *et al.*, 2006). Un tiers de ces gènes codent pour des composants de l'enveloppe cellulaire ou des protéines impliquées dans l'adaptation bactérienne à des conditions environnementales défavorables, dont les cellules traitées par l'IAA ont augmenté la production de tréhalose, de lipopolysaccharide, d'exopolysaccharide et de biofilm, ce qui suggère que l'IAA déclenche un niveau accru d'alerte et de protection contre les conditions externes défavorables en améliorant de manière coordonnée différents systèmes de défense cellulaire.

#### **2.1.4. L'auxine dans les interactions plante/microorganismes**

L'IAA est une phytohormone majeure impliquée dans de nombreux processus physiologiques des plantes. Il s'agit notamment de la régulation du développement des plantes, de l'induction de systèmes de défense des plantes et de la signalisation cellulaire (Spaepen *et al.*, 2007 ; Gravel *et al.*, 2007 ; Navarro *et al.*, 2006). L'IAA peut même contrôler la synthèse d'autres hormones végétales comme l'éthylène (Woodward et Bartel, 2005). La modulation de la concentration de l'IAA des plantes est un trait important par lequel les microorganismes du sol peuvent améliorer la croissance des plantes. La production d'IAA par les bactéries peut entraîner une amélioration de la biomasse et de la surface racinaire des plantes (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004 ; Tsavkelova *et al.*, 2007 ; Dias *et al.*, 2009 ; Taghavi *et al.*, 2009). Plusieurs études ont rapporté l'effet de l'IAA produits par les PGPB sur la croissance des plantes (Afzal *et al.*, 2019). Goujal et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation du taux de germination et un allongement des racines de tomate après traitement avec l'IAA extrait de *Streptomyces* sp. (Goujal *et al.*, 2013). De même, Tsavkelova et ses collaborateurs ont révélé une stimulation

considérable de la formation et de la croissance des racines après le traitement des graines par l'IAA microbien (Tsavkelova *et al.*, 2007). Patten et Glick (2002a) ont montré que les racines primaires des plantes de canola provenant de graines traitées par la souche *Pseudomonas putida* GR12-2 ont en moyenne 35 à 50% plus longues que les racines de graines traitées avec le mutant déficient en IAA et les racines de graines non inoculées, ce qui suggère que l'IAA bactérien joue un rôle majeur dans le développement du système racinaire de la plante hôte. D'une autre part, Patten et Glick (2002b) ont montré aussi qu'un autre mutant de la souche *Pseudomonas putida* GR12-2, qui est caractérisé par une surproduction de l'IAA, a produit des racines beaucoup plus courtes.

L'auxine est impliquée aussi dans de nombreux processus de formation de nodules par les rhizobiums chez les légumineuses, telles que l'initiation et la différenciation des nodules, la formation de faisceaux vasculaires et le nombre de nodules (Afzal *et al.*, 2019). En général, les racines nodulées contiennent plus d'auxine que les racines non nodulées (Ghosh et Basu, 2006). Étant donné que de nombreux rhizobiums sont capables de produire de l'IAA par différentes voies, dont l'auxine produite par ces bactéries peut modifier l'équilibre de l'auxine à l'intérieur de la plante. De plus, les rhizobiums peuvent également influencer indirectement l'homéostasie de l'auxine en interférant avec le transport de l'auxine des plantes (Mathesius, 2008).

La production d'IAA n'est pas le seul moyen par lequel les PGPB peuvent améliorer la croissance des plantes hôtes. En effet, l'activité inverse, la dégradation de l'IAA, peut également jouer un rôle important dans l'amélioration de la croissance des plantes. Cela a été démontré par Leveau et Lindow (2005) avec une souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas putida* favorisant la croissance des plantes et dégradant l'IAA, cette souche a la capacité de dégrader l'IAA et de le produire en même temps en présence de tryptophane. Ainsi, des auteurs ont suggéré que ce double statut, permet à cette bactérie de contrôler finement les niveaux d'IAA pour produire un effet positif net sur la plante hôte. De même, Zuniga et ses collaborateurs ont montré que le mutant de la souche *Burkholderia phytofirmans* PsJN, qui est incapable de dégrader l'IAA, n'était pas en mesure d'atténuer les effets inhibiteurs de l'IAA exogène dans les racines d'*A. thaliana* comparativement à la souche sauvage (Zuniga *et al.*, 2013).

La production de l'IAA est considérée aussi comme stratégie de virulence de plusieurs bactéries pathogènes pour contourner le système de défense des plantes (Navarro *et al.*, 2006b ; Chen *et al.*, 2007 ; Jones et Dangl, 2006), cette phytohormone est produite en excès par plusieurs espèces bactériennes telles que *A. tumefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* et *Rhodococcus fascians* (Morris,

1995 ; Vandeputte *et al.*, 2005 ; Valls *et al.*, 2006). Selon la littérature, la virulence des bactéries pathogènes est liée aussi à la voie de synthèse de l'auxine, en fait, la voie IAM est principalement liée à la phytopathologie, tandis que la voie IPyA est plus répandue chez les PGPB (Spaepen et Vanderleyden, 2011). Manulis et ses collaborateurs ont réalisé une étude sur le phytopathogène *P. agglomerans*, cette espèce synthétise l'IAA via les deux voies IAM et IPyA, une réduction de la taille des galles provoquées par cette bactérie a été observée par l'inactivation de la voie IAM, alors que seule une réduction mineure de la pathogénicité a pu être observée lors de l'inactivation de la voie IPyA (Manulis *et al.*, 1998).

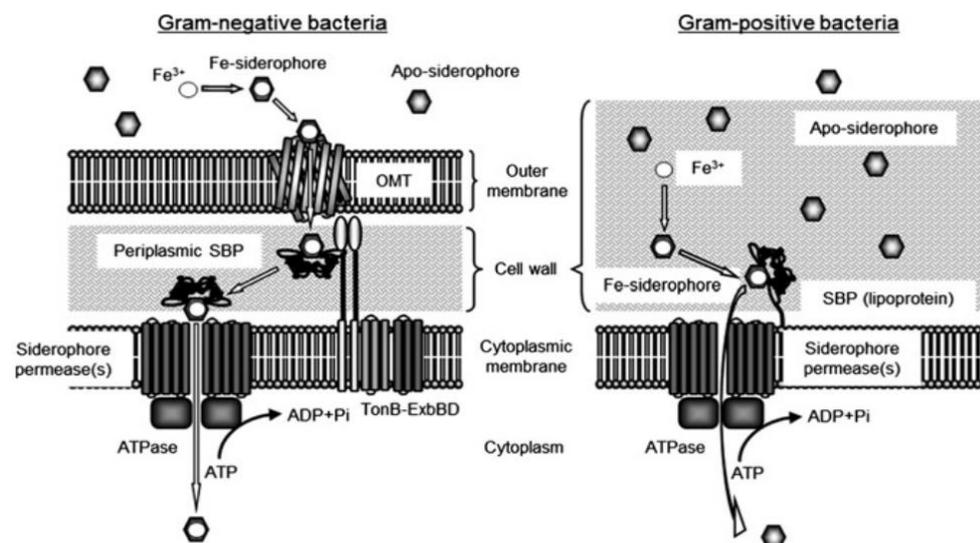
## **2.2. Production des sidérophores**

### **2.2.1. Généralités**

Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre (Gamit et Tank, 2014). Il s'agit d'un métal de transition qui peut exister en deux états d'oxydation,  $Fe^{3+}$  et  $Fe^{2+}$ . En raison de ses valences variables, le fer joue un rôle clé dans plusieurs processus métaboliques et principalement dans les réactions d'oxydoréduction (Taylor et Konhauser, 2011). À pH neutre, la forme ferreuse ( $Fe^{2+}$ ) du fer est soluble, tandis que la forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ) est insoluble (Bou-Abdallah, 2010). À cet intervalle de pH, plusieurs rapports ont montré que les concentrations de fer ferreux dissous se situent autour de  $10^{-10}$  à  $10^{-9}$  M (Poole et McKay, 2003 ; Kraemer, 2004), tandis que le niveau requis de fer ferreux par les organismes vivants est d'environ  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M (Poole et McKay, 2003 ; Matsumoto *et al.*, 2004). Afin de survivre dans un tel environnement appauvri en fer, les microorganismes ont développé deux stratégies principales d'acquisition du fer, l'une consiste à importer le fer à travers un hôte, alors que l'autre consiste à synthétiser des molécules à haute affinité pour le fer ferrique appelées «sidérophores» (Aznar, 2014). Les sidérophores (*sideros* signifiant fer et *phores* signifiant porteur) sont les agents chélateurs des métaux qui fonctionnent principalement pour capturer le fer ferrique insoluble de différents habitats (Nagoba et Vedpathak, 2011). La plupart des bactéries aérobies et anaérobies facultatives produisent des sidérophores dans des conditions de stress ferrique (Neilands, 1995). Cependant, la nature des sidérophores produits peut être variable selon les conditions de culture, à titre d'exemple, dans une étude réalisée par Essen et ses collaborateurs, les sidérophores produits par *Pseudomonas stutzeri* en condition aérobie diffèrent des sidérophores produits en conditions d'anaérobiose (Essen *et al.*, 2007).

Lorsque les cellules microbiennes perçoivent une carence en fer, l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des sidérophores est activée (Saha *et al.*, 2013). Après leur production, les sidérophores se lient d'abord étroitement avec le fer ( $Fe^{+3}$ ),

ensuite, ils sont transférés via la membrane cellulaire en utilisant des récepteurs spécifiques (Saha *et al.*, 2015). Selon la figure 3, les bactéries à Gram négatif utilisent des transporteurs de la membrane externe. Le processus de transport nécessite de l'énergie sous forme de force protonomotrice et un complexe de trois protéines de la membrane interne (*TonB-ExbB-ExbD*) (Fukushima *et al.*, 2013), ce système protéique est capable de déplacer le substrat à travers la membrane externe vers une protéine périplasmique spécifique (Koebnik, 2005). Par la suite, le complexe sidérophore-fer est transféré au système sidérophore-perméase-ATPase approprié pour être transporté à travers la membrane interne vers le cytoplasme. Pour les bactéries Gram positif, les transporteurs de la membrane externe sont remplacés par des lipoprotéines qui se lient aux complexes sidérophores-fer et les transfèrent vers le système sidérophore-perméase-ATPase (Ollinger *et al.*, 2006). Le système sidérophore-perméase-ATPase chez les bactéries Gram positif est similaire à celui des bactéries Gram négatif. Une fois que les sidérophores liés au fer ferrique se déplacent vers le cytosol, le fer ferrique est réduit en forme ferreuse. Après la libération du fer, les sidérophores sont dégradés ou recyclés par excrétion via le système de pompe à efflux (Saha *et al.*, 2015).



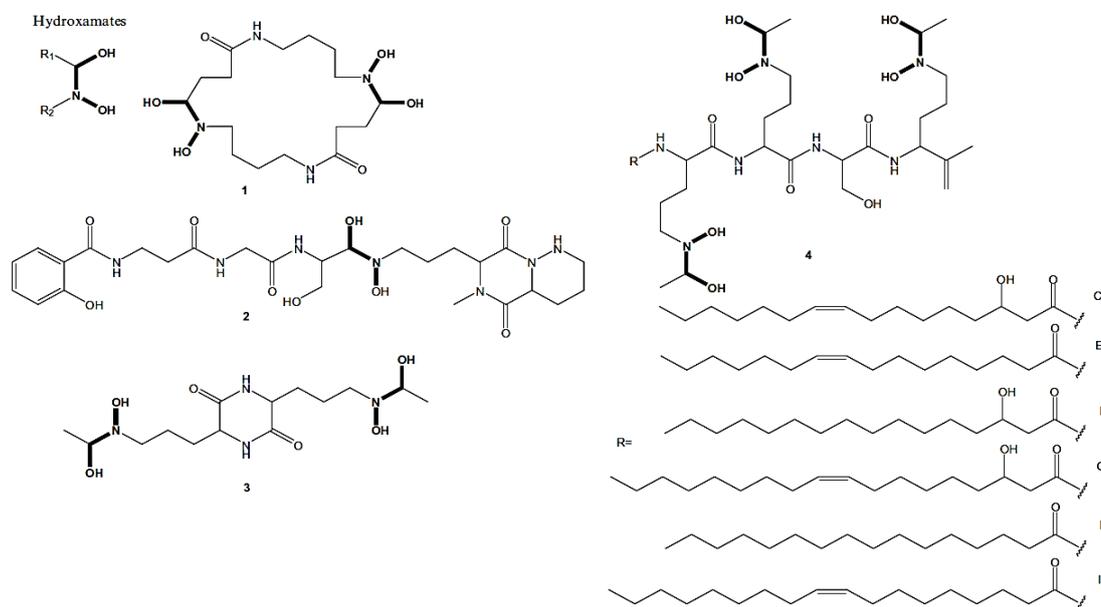
**Figure 3.** Mécanismes d'absorption des sidérophores chez les bactéries à Gram négatif les bactéries à Gram positif (Fukushima *et al.*, 2013).

### 2.2.2. Types de sidérophores microbiens

- **Les hydroxamates**

Les hydroxamates représentent le groupe le plus commun de sidérophores dans la nature. Comme elle montre la figure 4, les hydroxamates contiennent le groupement chimique C (=O) N-(OH) R, le radical « R » peut être soit un acide aminé ou un dérivé de celui-ci (Saha *et al.*, 2015 ; Rezanka *et al.*, 2018). Les hydroxamates se lient au fer ferrique à des constantes de

liaison comprises entre  $10^{22}$  et  $10^{32} \text{ M}^{-1}$ , dont deux molécules d'oxygène provenant de chaque groupe hydroxamate forment un ligand bidenté avec le fer. Cette forte liaison entre le fer ferrique et le sidérophore protège les complexes contre l'hydrolyse et la dégradation enzymatique dans l'environnement (Winkelmann, 2007).



**Figure 4.** Structure des hydroxamates. (1) Alcaligine; (2) Desferrimaduraferine; (3) Acide rhodotolurique; (4) Amphibactine (Rezanka *et al.*, 2018).

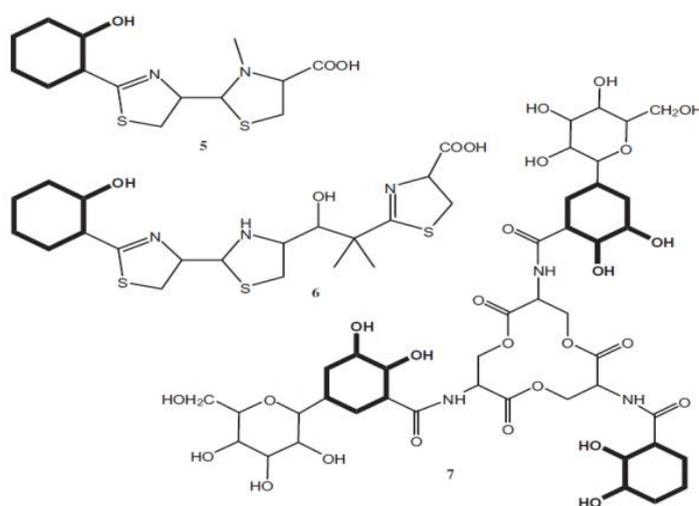
Les hydroxamates sont produits par plusieurs bactéries colonisant différents écosystèmes tels que les genres *Erwinia*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas* (Winkelmann, 2007 ; Saha *et al.*, 2015).

Les hydroxamates peuvent être détectés par plusieurs méthodes. Le dosage et la quantification par spectrophotométrie est réalisée principalement selon la méthode de Neilands (1995). La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (*Electrospray Ionization Mass Spectroscopy*, ESI-MS) a été largement utilisée pour détecter la structure des hydroxamates (Gledhill, 2001; McCormack *et al.*, 2003). Les hydroxamates peuvent être détectés aussi à travers des méthodes standards telles que la gélose au Chrome azurol S (Perez-Miranda *et al.*, 2007).

- **Les catécholates**

Les catécholates sont un groupe important des sidérophores, principalement produits par les bactéries. La structure du squelette peut être de la polyamine, un peptide ou un lactone macrocyclique (Saha *et al.*, 2015). Ces molécules peuvent porter un, deux ou trois groupes

chélateurs attachés à un squelette peptidique (figure 5) (Dave *et al.*, 2006). Le groupe le plus étudié de ces molécules est les entérochélines qui sont produits par les entérobactéries telles que *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* (Dertz *et al.*, 2006). Les entérochélines peuvent être étroitement liés à l'ion ferrique et ils possèdent une constante de liaison proche à  $10^{52} \text{ M}^{-1}$ . De ce fait, cette forte liaison entre l'entérochéline et le fer permet aux bactéries de capter le fer même dans un milieu contenant une très faible concentration de fer. Les catécholates peuvent être détectés par dosage colorimétrique Neilands (1995), par ESI-MS (Fiedler *et al.*, 2001) et par culture des bactéries sur la gélose contenant le Chrome azurol S (Perez-Miranda *et al.*, 2007).



**Figure 5.** Structure de quelques molécules de catécholates. (5) Pyocheline; (6) Yersiniabactine; (7) Salmocheline (Rezanka *et al.*, 2018).

- **Les carboxylates**

Ce sont des sidérophores contenant un groupe carboxylate, ils sont produits par plusieurs espèces bactériennes, ils sont principalement caractérisés chez les espèces appartenant aux genres *Rhizobium* et *Staphylococcus* (Saha *et al.*, 2015). Ce type de sidérophore se lie au fer via des groupes carboxyle et hydroxyle (Dave et Dube, 2000). La rhizobactine produite par l'espèce *Rhizobium meliloti*, est le sidérophore carboxylate le mieux caractérisé. La staphyloferrine A, un sidérophore de type carboxylate hautement hydrophile, a été isolée à partir de *Staphylococcus hyicus* lors de la culture en carence en fer, ce sidérophore peut transporter le fer non seulement vers la souche productrice mais également vers 37 autres souches de la même espèce (Meiwes *et al.*, 1990). Les carboxylates peuvent être détectés par spectrophotométrie (Shenker *et al.*, 1992), par dosage au chrome azurol S et par HPLC-MS (Perez-Miranda *et al.*, 2007).

### 2.2.3. Effet des sidérophores sur la croissance microbienne

Selon la littérature, la chélation du fer permet aux sidérophores d'être classés comme un facteur de croissance favorisant le développement de plusieurs microorganismes. Il a été signalé que plusieurs microorganismes non-cultivables ont été cultivés au laboratoire grâce à la présence de sidérophores produits par d'autres microorganismes (Saha *et al.*, 2015). Dans ce contexte, D'Onofrio et ses collaborateurs ont rapporté que la souche *Micrococcus luteus* KLE1011 est capable de synthétiser cinq nouveaux sidérophores d'acyl des ferrioxamine dont chacun favorise la croissance d'une autre souche bactérienne non cultivable (D'Onofrio *et al.*, 2010). Dans une autre étude, il a été constaté que l'ajout de sidérophores a permis la croissance d'espèces bactériennes non cultivables (Guan et Kamino, 2001 ; Lewis *et al.*, 2010).

### 2.2.4. Effet des sidérophores sur la croissance des plantes

Le fer est un micronutriment nécessaire à la biosynthèse de la chlorophylle, aux réactions redox et à certaines activités physiologiques importantes chez les plantes (Briat *et al.*, 1995). Par conséquent, le manque de fer réduit considérablement la quantité et la qualité de la production agricole. Selon la littérature, la concentration de fer requise pour la croissance des plantes à pH neutre est d'environ 10 à 17 mol/L, tandis que celle nécessaire pour les microorganismes est seulement  $10^{-6}$  mol/L dans des conditions similaires (Omidvari *et al.*, 2010). Depuis plusieurs années, le rôle des sidérophores dans la croissance des plantes a été révélé à travers l'amélioration de la croissance de plantes après inoculation par des souches appartenant au genre *Pseudomonas*. Des années plus tard, les pyoverdines produites par ces isolats ont été considérés comme l'un des facteurs stimulant la croissance des plantes (Kloepper *et al.*, 1980 ; Gamalero et Glick, 2011). Dans une étude réalisée par Masalha et ses collaborateurs, les plantes cultivées dans des conditions non stériles ont été bien développées en présentant des concentrations en fer plus élevées dans les racines comparativement aux plantes cultivées en conditions stériles (Masalha *et al.*, 2000), ainsi ils ont prouvé que la suppression de la production des sidérophores microbiens réduit la concentration de fer dans les racines de plantes. Dans une étude réalisée par Rungin et ses collaborateurs, la souche sauvage *Streptomyces* sp. GMKU et un mutant déficient de la production des sidérophores ont été utilisés pour inoculer le blé et l'haricot, l'expérience de culture en pot a révélé que les plantes inoculées avec le type sauvage montrent une augmentation considérable de la biomasse, la longueur des racines et des tiges par rapport aux témoins traités avec le mutant déficient en sidérophores (Rungin *et al.*, 2012). Dans une étude réalisée par Kumar et ses collaborateurs, l'utilisation d'un consortium des trois souches rhizosphériques (*Aneurinibacillus*

*aneurinilyticus* WBC1, *Aeromonas* sp. WBC4 et *Pseudomonas* sp. WBC10), fortement productrices de sidérophores, a augmenté de manière significative la germination, la longueur des racines et des tiges et aussi le poids frais et sec de blé par rapport aux témoins non inoculés (Kumar *et al.*, 2018). Mahmoud et Abd-Alla (2001) ont rapporté que les hydroxamates produits par *Pseudomonas* sp améliorent la nodulation et la fixation de l'azote d'haricot par rapport aux plantes inoculées par une souche du genre *Bradyrhizobium*. Marques et ses collaborateurs ont démontré que la production de sidérophores par des PGPB est fortement corrélée avec l'amélioration de la croissance de Maïs, y compris la biomasse des tiges et des racines (Marques *et al.*, 2010). L'effet des sidérophores sur la croissance des plantes a été prouvé aussi en conditions de croissance difficile, en fait, Radzki et ses collaborateurs ont démontré que les sidérophores bactériens fournissent efficacement du fer aux tomates pendant la croissance en culture hydroponique (Radzki *et al.*, 2013). Qi et Zhao (2013) ont rapporté qu'une souche productrice de sidérophores appartenant à l'espèce *Trichoderma asperellum* possède la capacité d'améliorer la croissance du concombre sous stress salin.

### **2.3.Détection du quorum**

Les microorganismes ont développé des systèmes de communication complexes pour produire et, à leur tour, répondre aux signaux extracellulaires qui sont sécrétés par d'autres microorganismes (Brown et Johnstone, 2001 ; Hogan, 2006 ; Foster *et al.*, 2007). Cette notion a été contestée la première fois au début des années 1970, avec la découverte et la description d'un système de communication chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970 ; Nealson et Hastings, 1979). Ce système de communication microbien, appelé «quorum sensing», est la capacité de détecter leur densité de population par la synthèse et la sécrétion de petites molécules, appelées auto-inducteurs. Le quorum sensing est impliqué dans le contrôle de fonctions comportementales ou physiologiques très diverses, y compris la bioluminescence, le transfert de plasmide par conjugaison, la production d'antibiotiques et de bactériocines, l'expression de facteurs de virulence, la formation de biofilms, la motilité, la production de polysaccharides, *etc.* Toutes ces fonctions ont en commun de ne s'exécuter que si le nombre de cellules dans la population de microorganismes est suffisamment élevée pour assurer le succès du processus (Fuqua *et al.*, 1994).

Les auto-inducteurs sont de petites molécules qui diffusent librement à travers la membrane cellulaire bactérienne (bien qu'elles puissent parfois être activement transportées) vers l'extérieur de la cellule (Aendekerk *et al.*, 2002). La concentration externe de ces molécules augmente en fonction de la densité cellulaire. Les bactéries ont la capacité de détecter la

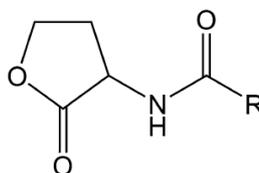
concentration seuil des auto-inducteurs autant qu'un signal, qui en réponse expriment certains gènes et donc certains phénotypes ou comportements bactériens (Henke et Bassler, 2004). Ce système signal-réponse va permettre aux bactéries de synchroniser leur comportement et d'agir comme des organismes multicellulaires (Waters et Bassler, 2005).

Les bactéries utilisent plusieurs systèmes de régulation du quorum sensing, ces systèmes impliquent diverses molécules, les plus connues sont les acyl homosérine lactones (AHL) chez les bactéries Gram négatif et la signalisation à base de peptides (production des phéromones) existant chez plusieurs espèces Gram positif (Parsek et Greenberg, 2005 ; Kendall et Sperandio, 2007 ; LaSarre et Federle, 2013).

### 2.3.1. Les N -acyl-homosérine lactones

#### 2.3.1.1. Définition

La plupart des bactéries Gram négatif, qui sont capables de détecter le quorum, possèdent des mécanismes similaires à ceux décrits pour *V. fischeri*, dont la spécificité de chaque mécanisme réside dans les gènes activés. C'est pourquoi le groupe des auto-inducteurs le plus important est celui des AHL. Ces molécules sont constituées d'un groupe conservé commun qui est le cycle lactonique (HSL), sur lequel est attaché une chaîne latérale variable de type acyle (figure 6) (Schikora *et al.*, 2016).



**Figure 6.** Structure générale des N-acyl homosérine lactones (AHL). La chaîne R-acyle peut aller de 4 à 18 atomes de carbone ; il peut y avoir un groupe hydroxyle ou un groupe carbonyle à l'atome C3 et /ou une double liaison dans la chaîne acyle (Schikora *et al.*, 2016).

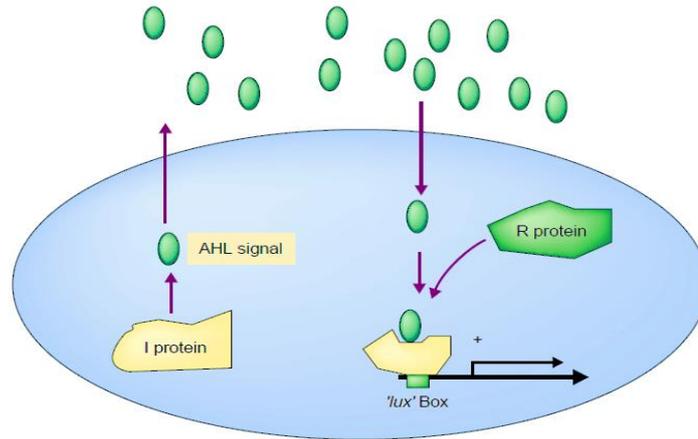
Selon la longueur de la chaîne acyle latérale, les AHL peuvent être classés en AHL à chaîne courte (entre 4 et 8 carbones dans la chaîne latérale) et AHL à longue chaîne (entre 10 et 18 carbones). En plus de la longueur de la chaîne latérale, la variabilité au sein des AHL est définie aussi par le degré de saturation de la chaîne, sur le carbone en position 3 qui est caractérisé par la présence ou non d'un groupement substitué (oxo ou hydroxy) (tableau 1) (Pérez-Montaño, 2012). Du point de vue fonctionnel, la spécificité des AHL est liée au degré d'activité des isomères, dans ce contexte, McClean et ses collaborateurs ont rapporté que l'isomère (L) de la 3-oxo-C6-HSL est 60 fois plus actif que l'isomère (D) (McClean *et al.*, 1997).

**Tableau 1.** Les différentes molécules de N -acyl-homosérine lactones (Pérez-Montaño, 2012).

Composé chimique	N° de C	Abbréviation
N-butyryl-homosérine lactone	4C	C4-HSL
N-hexanoyl-homosérine lactone	6C	C6-HSL
N-octanoyl-homosérine lactone	8C	C8-HSL
N-decanoyl-homosérine lactone	10C	C10-HSL
N-dodecanoyl-homosérine lactone	12C	C12-HSL
N-tetradecanoyl-homosérine lactone	14C	C14-HSL
N-hexadecanoyl-homosérine lactone	16C	C16-HSL
N-octodécanoyl-homosérine lactone	18C	C18-HSL
N-(3-oxo-hexanoyl)-homosérine lactone	6C	3-oxo-C6-HSL
N-(3-oxo-octanoyl)-homosérine lactone	8C	3-oxo-C8-HSL
N-(3-oxo-decanoyl)-homosérine lactone	10C	3-oxo-C10-HSL
N-(3-oxo-dodecanoyl)-homosérine lactone	12C	3-oxo-C12-HSL
N-(3-oxo-tetradecanoyl)-homosérine lactone	14C	3-oxo-C14-HSL
N-(3-oxo-hexadecanoyl)-homosérine lactone	16C	3-oxo-C16-HSL
N-(3-oxo-octodécanoyl)-homosérine lactone	18C	3-oxo-C18-HSL
N-(3-hydroxy-butyryl)-homosérine lactone	4C	3-OH-C4-HSL
N-(3-hydroxy-hexanoyl)-homosérine lactone	6C	3-OH-C6-HSL
N-(3-hydroxy-octanoyl)-homosérine lactone	8C	3-OH-C8-HSL
N-(3-hydroxy-decanoyl)-homosérine lactone	10C	3-OH-C10- HSL
N-(3-hydroxy-dodecanoyl)-homosérine lactone	12C	3-OH-C12- HSL
N-(3-hydroxy-tetradecanoyl)-homosérine lactone	14C	3-OH-C14- HSL
N-(3-hydroxy-hexadecanoyl)-homosérine lactone	16C	3-OH-C16- HSL
N-(3-hydroxy-octodécanoyl)-homosérine lactone	18C	3-OH-C18- HSL

### 2.3.1.2. Synthèse des AHL et régulation génique

Le modèle de base pour la régulation des gènes médiée par l'AHL implique un régulateur transcriptionnel (protéine R) et une AHL synthase (protéine I) (figure 7). La protéine R peut reconnaître des séquences promotrices spécifiques et elle stimule l'expression des gènes uniquement lorsqu'elle est complexée avec un signal AHL. Typiquement, l'AHL synthase est exprimée à des faibles niveaux et, à des faibles densités cellulaires, il existe une AHL intracellulaire insuffisante pour activer la protéine R. À mesure que la population bactérienne augmente, les AHL s'accumulent jusqu'à un seuil d'AHL intracellulaire qui entraîne la liaison de la protéine R à ses séquences promotrices cibles (Loh *et al.*, 2002 ; Pérez-Montaño, 2012).



**Figure 7.** Auto-induction médiée par les protéines I et R (Loh *et al.*, 2002).

La protéine I synthase est l'enzyme responsable de la synthèse des AHL chez *V. fischeri*. De plus, plusieurs homologues de cette enzymes existent chez d'autres genres bactériens tels que : *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia* et *Burkholderia*, (Pérez-Montaño, 2012).

### 2.3.1.3. Méthodes de détection des AHL

- **Utilisation des biocapteurs bactériens**

Une façon de détecter la présence des AHL est d'utiliser des biocapteurs bactériens. Ces bactéries détectent un grand nombre d'AHL à de très faibles concentrations. Cependant un résultat négatif n'implique pas l'absence d'AHL dans l'échantillon, mais peut-être dû à la limite de détection du biocapteur.

Un biocapteur bactérien à AHL doit avoir 3 éléments principaux : i) une protéine de type R ; ii) une séquence de promoteur cible régulée par l'homologue *LuxR* et iii) un gène rapporteur fusionné à cette séquence, comme le *lacZ*. D'autre part, la souche bactérienne doit être dépourvue de l'AHL synthase, de sorte que le gène rapporteur ne sera activé qu'en présence d'un AHL exogène. En raison de la spécificité de ces systèmes, il est préconisé d'utiliser différentes souches simultanément pour détecter une large gamme d'AHL (Pérez-Montaño, 2012).

L'un des biocapteurs largement utilisés est la souche *Chromobacterium violaceum* CV026, l'origine de cet biocapteur est la souche sauvage *C. violaceum* ATCC 31532 qui produit la C6-HSL, le quorum sensing chez cette bactérie régule la production de violacéine (Morohoshi *et al.*, 2008). La souche *C. violaceum* CV026 est le résultat d'une double mutation de la souche sauvage, par insertion de transposon mini Tn5 (Throup *et al.*, 1995). Le mutant obtenu manque

de CVII synthase impliquée dans la production d'auto-inducteur (C6-HSL) qui induit la production de la violacéine. Cependant, la production de pigment est rétablie en présence d'un inducteur externe, dont l'induction est détectée principalement en présence d'AHL à chaîne courte tels que : C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL et 3-oxo-C8-HSL (McClellan *et al.*, 1997).

La souche *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) est un autre biocapteur qui est particulièrement sensible à une large gamme d'inducteur, car il détecte : C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL ainsi que leurs dérivés (oxo et hydroxy) (Farrand *et al.*, 2002).

La souche *A. tumefaciens* NT1, à laquelle il manque le plasmide Ti, possède le plasmide pZLR4 contenant une fusion *traG :: lacZ* et le gène *traR* du plasmide pTiC58 (Cha *et al.*, 1998). Il s'agit donc d'une souche incapable de produire son propre auto-inducteur et dans laquelle la fusion *lacZ* ne s'exprime qu'en présence d'un inducteur exogène. La présence d'un AHL exogène permet l'expression des gènes et l'apparition d'un halo bleu résultant de la dégradation du substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) contenant dans le milieu culture.

- **Autres méthodes pour la détection des AHL**

La détection des AHL par chromatographie sur couche mince est réalisée après une extraction par des solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane, après migration, les AHL peuvent être détectés après la croissance du biocapteur sur la surface de la plaque (McClellan *et al.*, 1997). En utilisant une telle méthodologie, les AHL peuvent être identifiés par comparaison avec des molécules de référence. Bien que cette méthode ne nécessite pas beaucoup de moyens, elle ne peut pas fournir une identification sans équivoque en particulier lorsque l'échantillon contient plusieurs types d'AHL (Ortori *et al.*, 2007).

En raison du très grand nombre de molécules de signalisation structurellement apparentées, et pour quantifier avec précision même les faibles concentrations de molécules, d'autres techniques basées sur une séparation préliminaire en utilisant l'HPLC sont utilisées. L'identification et la quantification sont ensuite effectuées par spectrométrie de masse couplée à l'HPLC.

D'autres chercheurs ont adapté l'utilisation de l'ELISA pour la détection des AHL ainsi que leurs produits de dégradation. La technique de détection repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal qui a l'avantage de se lier à la fois aux AHL et à leurs produits de dégradation avec différentes affinités.

### 2.3.1.4. Effet des AHL sur la croissance des plantes

Le quorum sensing bactérien est non seulement utilisé pour la communication au sein de la même espèce, mais il est aussi impliqué dans la diaphonie avec d'autres espèces bactériennes et également avec l'hôte et les organismes de différents règnes (Williams, 2007). En fait, les AHL, produits par une large gamme de bactéries colonisant les racines des plantes, participent au maintien de la relation plantes/microorganismes. A travers le quorum sensing assuré par ces molécules, les bactéries sont capables d'accomplir différentes activités liées à la promotion de la croissance des plantes (tableau 2).

En fait les activités des AHL ne sont pas seulement liées à la densité bactérienne, selon la littérature, L-homosérine aide les plantes à absorber plus d'eau et de minéraux et à améliorer par conséquent leur croissance. De plus, les AHL peuvent entraîner des modifications sur les profils protéiques des plantes, en variant des protéines responsables sur différentes fonctions telles que les protéines liées à la production des phytohormones, à la défense et à la gestion du stress et à la régulation métabolique (Mathesius *et al.*, 2003).

**Tableau 2.** Les N -acyl-homosérine lactones produits par les PGPB et leurs effets sur les plantes.

AHL	Effet sur la plante	Référence
C4-HSL	Améliore la concentration de calcium chez <i>A. thaliana</i> .	Song <i>et al.</i> (2011)
C6-HSL	Modulation du rapport auxine/cytokinine chez <i>A. thaliana</i> .	Von Rad <i>et al.</i> (2008)
C6-HSL C8-HSL C12-HSL	Stimule la teneur en potassium dans les racines de l'orge.	Rankl <i>et al.</i> (2016)
C6-HSL C8-HSL C10-HSL	Amélioration de l'activité antioxydante enzymatique dans les racines de l'orge.	Götz-Rösch <i>et al.</i> (2015)
C6-HSL C8-HSL	Améliore la croissance racinaire et augmente la biomasse de la plante chez <i>A. thaliana</i> .	Schenk <i>et al.</i> (2012)
C4-HSL C6-HSL C8-HSL	Module la croissance racinaire chez <i>A. thaliana</i> .	Liu <i>et al.</i> (2012), Von Rad <i>et al.</i> (2008)
C4-HSL C6-HSL	Améliore la résistance contre les phytopathogènes chez la tomate.	Schuhegger <i>et al.</i> (2006)
C4-, C6-, C8-, C10-, C12- et C14- HSL	Induit la résistance à la salinité chez la tomate.	Barriuso <i>et al.</i> (2008)
3-oxo-C8- HSL	Module la formation des racines et le taux de l'éthylène chez <i>A. thaliana</i> .	Palmer <i>et al.</i> (2014)

<b>3-oxo-C8-HSL</b>	Modification du profil protéique chez <i>A. thaliana</i> .	Miao <i>et al.</i> (2012)
<b>3-oxo-C6-HSL</b>	Module la formation des racines chez <i>A. thaliana</i> .	Zhao <i>et al.</i> (2016)
<b>3-oxo-C10-HSL</b>	Induit la colonisation des racines et la défense par l'accumulation des flavonoïdes chez d'orge.	Han <i>et al.</i> (2016)
<b>3-oxo-C10-HSL</b>	Stimule la formation de racines adventives et l'expression de gènes de réponse aux auxines chez <i>Vigna radiata</i> .	Bai <i>et al.</i> (2012)
<b>3-oxo-C10-HSL</b>	Améliore le développement des racines chez <i>A. thaliana</i> .	Ortiz-Castro <i>et al.</i> (2008)
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	Stimule la formation des nodules chez <i>M. truncatula</i> .	Veliz-Vallejos <i>et al.</i> (2014)
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	Amélioration de la résistance contre les phytopathènes et module les gènes de défense chez <i>A. thaliana</i> et l'orge.	Schikora <i>et al.</i> (2011)
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	Améliore la défense contre les phytopathogènes chez <i>A. thaliana</i> .	Zarkani <i>et al.</i> (2013)
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	Améliore la défense contre les phytopathogènes chez <i>A. thaliana</i> .	Schenk <i>et al.</i> (2014)
<b>3-oxo-C14-HSL</b>	Induit la protection contre les phytopathogènes chez le blé, l'orge et la tomate.	Hernández-Reyes <i>et al.</i> (2014)

## 2.4.L'inhibition des phytopathogènes

### 2.4.1. Le quorum quenching

De nombreuses bactéries à Gram négatif phytopathogènes produisent des AHL en tant que molécules de signal. A travers ces molécules, les bactéries pathogènes peuvent déclencher plusieurs activités, telles que le transfert des gènes de virulence vers la plante hôte, la production des exopolysaccharides et la dégradation de la paroi cellulaire végétale (Piper et Farrand, 2000 ; Nasser *et al.*, 2013 ; Jang *et al.*, 2014).

A travers un phénomène qui s'appelle le quorum quenching, plusieurs PGPB peuvent interférer dans le quorum sensing des phytopathogènes à travers la production des inhibiteurs de détection de quorum. Hentzer et ses collaborateurs ont rapporté que la funanone affecte la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et le processus améliore le détachement bactérien, conduisant à une perte de la production de biomasse bactérienne (Hentzer *et al.*, 2002). D'autre part, Kinoshita *et al.* (1997) et Martinelli *et al.* (2004) ont montré que les butyrolactones produits par *Streptomyces* sp. sont capables de réduire le quorum sensing chez *C. violaceum* CV026. En fait, les molécules utilisées pour inhiber la détection du quorum doivent être hautement spécifiques

sans aucun effet inhibiteur sur le microbiote du sol et/ou les PGPB, de plus elles doivent être chimiquement stables (Kalia, 2013).

Un autre moyen d'inhiber le quorum sensing chez les phytopathogènes est la production des enzymes. Les PGPB appartenant aux genres *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* et *Mesorhizobium* ont montré une capacité de dégradation des AHL (Mahmoudi *et al.*, 2011). Fondamentalement, les AHL sont dégradés par trois types d'enzymes qui sont l'oxydoréductase, l'acylase et la lactonase (Fekete *et al.*, 2010). Les lactonases sont des enzymes qui peuvent cliver le cycle lactone de la molécule signal (Shastry et Rai, 2017). Plusieurs espèces appartenant au genre *Bacillus* ont la capacité de produire des lactonases inhibant des phytopathogènes (Dong *et al.*, 2002 ; Han *et al.*, 2010 ; Huma *et al.*, 2011 ; Mani *et al.*, 2012 ; Yin *et al.*, 2012). De même, certaines espèces du genre *Rhizobium* peuvent produire des lactonases capables d'inhiber la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Krysciak *et al.*, 2011). Les acylases également appelées amidase ou aminohydrolase peuvent cliver les AHL en homosérine lactone et une chaîne latérale acyle. Il a été signalé que les acylases ont plus d'action sur les AHL à longue chaîne (Fetzner, 2015 ; Utari *et al.*, 2017). Park *et al.* (2005) ont rapporté la production d'une acylase par *Streptomyces* sp. qui est capable de dégrader les AHL contenant plus de 8 carbones. L'autre groupe d'enzymes qui réagissent sur les AHL est les AHL-oxydoréductases, ces enzymes ne dégradent pas la molécule AHL comme les lactonases ou les acylases, mais elles remplacent seulement le groupe oxo en position carbone C3 par un groupe hydroxyle, qui sont facilement dégradables par les amidohydrolases par la suite (Chen *et al.*, 2013). La production des AHL-oxydoréductases a été rapportée chez l'espèce *Rhodococcus erythropolis* et *Burkholderia* spp. (Uroz *et al.*, 2005 ; Chan *et al.*, 2011).

Ces dernières années, l'utilisation du quorum quenching pour inhiber les phytopathogènes est largement étudiée (Vesuna et Nerurkar, 2018). Ceci a été validé chez des plantes transgéniques qui porte un gène de la dégradation des AHL (Dong *et al.*, 2001 ; Helman et Chernin, 2015). Un autre type d'application a été réalisé par Wang *et al.* (2010), dont la protection a été obtenue grâce à la multiplication naturelle de la bactérie *Microbacterium testaceum* à la surface des feuilles de la pomme de terre, cette bactérie possède la capacité de dégrader les AHL produits par les phytopathogènes. D'autres part, des travaux ont rapportées que les genres *Bacillus* et *Rhodococcus* sont capables de dégrader les AHL, ainsi ils sont capables d'abolir les symptômes des agents pathogènes en inactivant leurs signaux sans inhiber leur croissance (Grandclement *et al.*, 2015 ; Vesuna et Nerurkar, 2018).

### 2.4.2. La production des antibiotiques

L'antibiose est un mode d'action très efficace des PGPB pour la suppression des effets délétères des phytopathogènes (Raaijmakers et Mazzola, 2012). Certains de ces antibiotiques endommagent la membrane d'agents pathogènes et/ou inhibe la formation de zoospores (De Souza *et al.*, 2003). D'autres, comme les phénazines, inhibent le transport d'électrons et endommagent les lipides et autres macromolécules (Haas et Defago, 2005). En général, le rôle des antibiotiques chez les PGPB pour la suppression des phytopathogènes est révélé par deux types d'expériences (De Jesus Sousa et Olivares, 2016). D'une part, à travers l'obtention de souches mutantes qui ne produisent pas d'antibiotiques et qui perdent l'activité de biocontrôle comparativement à la souche sauvage (Heimpel et Mills, 2017). D'autre part, par la purification des antibiotiques spécifiques qui possèdent le même spectre d'activité anti-phytopathogène que la souche productrice (Glick, 2015).

### 2.4.3. Production des enzymes dégradant la paroi cellulaire

Les enzymes dégradant la paroi cellulaire, telles que la glucanase, la chitinase, la cellulase et la protéase, sécrétées par plusieurs espèces de PGPB exercent un effet inhibiteur direct sur la croissance de plusieurs phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Compant *et al.*, 2005 ; Gortari et Hours, 2008 ; Friedrich *et al.*, 2012). Ces enzymes affectent l'intégrité structurale du pathogène cible (Budi *et al.*, 2000). Someya *et al.* (2000) ont rapporté les effets de l'activité chitinolytique de *Streptomyces marcescens* B2 sur *R. solani* et *F. oxysporum*, le mycélium des deux phytopathogènes a révélé diverses anomalies telles que le gonflement, l'enroulement et l'éclatement des hyphes.

Les agents de lutte biologique potentiels ayant une grande activité lytique de la paroi cellulaire appartiennent principalement au genre *Bacillus* tels que, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans* et *B. thuringiensis* (Sadfi *et al.*, 2001). D'autres bactéries à Gram négatif, telles que *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*, ont aussi une grande activité enzymatique (Nelson et Sorenson, 1999).

### 2.4.4. Production de cyanure d'hydrogène

Certaines PGPB ont la capacité de produire le cyanure d'hydrogène (*Hydrogen cyanide*, HCN) qui a une activité antimicrobienne contre plusieurs microorganismes, cependant, le faible niveau de production par la plupart des PGPB rend cette activité moins efficace pour empêcher la prolifération de la majorité des phytopathogènes. En fait, il arrive souvent que les PGPB productrices de l'HCN synthétisent en parallèle d'autres molécules bioactives telles que les antibiotiques et/ou les enzymes dégradant la paroi cellulaire (Ramette *et al.*, 2006). De ce fait,

il a été observé que l'HCN synthétisé par les PGPB améliore l'efficacité de la lutte biologique. Ainsi, HCN semble agir en synergie avec d'autres méthodes de biocontrôle employées par la même bactérie. De nombreux genres bactériens tels que *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* et *Aeromonas* se sont révélés producteurs de l'HCN (Ahmad *et al.*, 2008 ; Das *et al.*, 2017 ; Zachow *et al.*, 2017).

#### **2.4.5. Compétition et colonisation de la rhizosphère et des racines**

Certaines PGPB de lutte biologique peuvent surpasser les phytopathogènes, soit pour les nutriments, soit pour les sites de liaison à la racine de la plante (Barahona *et al.*, 2011 ; Innerebner *et al.*, 2011). Une telle concurrence peut agir pour limiter la liaison du phytopathogène à la plante, ce qui la rend difficile pour qu'il prolifère. En fait, Olanrewaju *et al.* (2017) rapportent que la compétitivité des PGPB fonctionne avec d'autres mécanismes de lutte biologique pour contrecarrer le fonctionnement des phytopathogènes. L'une des approches utilisées pour révéler la capacité des PGPB dans la compétition est l'utilisation de gènes marqueurs codant pour des protéines fluorescentes. Les bactéries transformées peuvent être surveillées et visualisées en utilisant la microscopie confocale à balayage laser (Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

#### **2.4.6. Induction de la résistance systémique**

La résistance systémique induite (*Induced Systemic Resistance*, ISR) est le processus par lequel certain nombre de PGPB atténuent les effets délétères des agents phytopathogènes en activant les mécanismes de résistance chez les plantes (Olanrewaju *et al.*, 2017). L'ISR permet à la plante à réagir plus rapidement et plus fortement à une attaque ultérieure de pathogène (Mhatre *et al.*, 2019). L'ISR ainsi permet une augmentation de l'expression des gènes de défense (racinaires en particulier) et un dépôt de callose et de pectine au niveau des feuilles (Verhagen *et al.*, 2004). Ce mode d'action doit être distingué de la résistance systémique acquise qui est induite par les agents pathogènes (Bakker *et al.*, 2003). Bien que l'ISR semble phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise, les deux systèmes n'utilisent pas les mêmes voies de signalisation. De plus, contrairement à la résistance systémique acquise dont la persistance d'action est de l'ordre de quelques semaines, les mécanismes de résistance dans l'ISR atteignent leur efficacité maximale entre quatre et cinq jours après l'application de l'agent inducteur, puis diminuent progressivement avec le temps (Zamioudis et Pieterse, 2012). D'autre part, l'ISR ne cible pas des agents pathogènes spécifiques mais stimule plutôt la plante contre une gamme d'agents pathogènes différents (Olanrewaju *et al.*, 2017 ; Mhatre *et al.*, 2019). Les PGPB conduisent à l'ISR chez les plantes en augmentant la résistance physique et

mécanique de la paroi cellulaire ainsi qu'en modifiant les réactions physiologiques et biochimiques de l'hôte. Il en résulte la synthèse de molécules chimiques de défense tels que les enzymes (Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Nandakumar *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2004).

## 2.5. Solubilisation du phosphate

### 2.5.1. Généralités

Le phosphore est un micronutriment majeur et crucial pour les réactions enzymatiques responsables de nombreux processus physiologiques des plantes (Ahemad et Mulugeta, 2014). En moyenne, la teneur en phosphore du sol est d'environ 0,05 % (P/P) ; alors que, seulement 0,1 % de ce phosphore est disponible pour les plantes (Zhu *et al.*, 2011). Le défi de la carence en phosphore du sol est relevé par l'application d'engrais, cependant, l'ajout d'engrais inorganiques en excès peut entraîner des problèmes environnementaux tels que la contamination des eaux souterraines et l'eutrophisation (Kang *et al.*, 2011).

Les PGPB peuvent augmenter la disponibilité du phosphore pour les plantes en solubilisant les phosphates précipités, elles convertissent le phosphate organique et inorganique insoluble en une forme utilisable par les plantes (Behera *et al.*, 2014 ; Alori *et al.*, 2017). Selon la littérature, les espèces bactériennes les plus connues appartiennent au genre *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, (Babalola et Glick, 2012), *Azotobacter* (Kumar *et al.*, 2014), *Bacillus* (Jahan *et al.*, 2013 ; David *et al.*, 2014), *Burkholderia* (Mamta *et al.*, 2010 ; Istina *et al.*, 2015), *Enterobacter*, *Kushneria* (Zhu *et al.*, 2011), *Paenibacillus* (Fernández Bidondo *et al.*, 2011), *Ralstonia*, *Rhizobium* (Tajini *et al.*, 2012), *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bradyrhizobium*, *Sinomonas* et *Thiobacillus* (Postma *et al.*, 2010 ; David *et al.*, 2014). De plus, plusieurs actinobactéries ont la capacité de solubiliser le phosphate, y compris les genres *Actinomyces*, *Micromonospora* et *Streptomyces* (Alori *et al.*, 2017).

De nombreuses études d'inoculation par les PGPB qui solubilisent le phosphate ont montré à la fois une amélioration du rendement des plantes et une augmentation de l'absorption du phosphore dans les expériences en pot et de culture en plein champs. Pour plusieurs plantes une stimulation de la croissance des racines et des tiges, une amélioration de la longueur des racines et des tiges, une augmentation du poids frais et sec, ont été observées (Behera *et al.*, 2014 ; Alori *et al.*, 2017). De plus, plusieurs espèces de PGPB qui solubilisent le phosphate ont présenté un effet synergique considérable sur la croissance et le développement des plantes (Tallapragada et Gudimi, 2011).

### 2.5.2. Mécanismes de solubilisation de phosphate par les PGPB

Comme observé dans de nombreuses expériences, le principal mécanisme de la solubilisation de phosphate est la production de composés dissolvant les minéraux tels que les acides organiques, les sidérophores, les protons et les ions hydroxyles (Alori *et al.*, 2017 ; Olanrewaju *et al.*, 2017 ; Afzal *et al.*, 2019).

Il est généralement admis que le mécanisme de solubilisation du phosphate minéral par les PGPB est associé à la libération d'acides organiques de faible poids moléculaire (Goldstein, 1995 ; Kim *et al.*, 1997). En fait, les acides organiques, notamment l'acétate, le lactate, le malate, l'oxalate, le succinate, le citrate, le gluconate, le céto gluconate, *etc.*, peuvent former des complexes avec le fer ou l'aluminium des phosphates ferriques et d'aluminium, libérant ainsi du phosphate dans le sol (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Les acides organiques peuvent également augmenter la disponibilité du phosphate en bloquant les sites d'absorption du phosphate sur les particules du sol ou en formant des complexes avec des cations à la surface minérale du sol (Bianco et Defez, 2010).

Les substances chélatantes et les acides inorganiques tels que l'acide sulfurique, l'acide nitrique et l'acide carbonique, sont considérés comme d'autres mécanismes de solubilisation du phosphate. Cependant, leurs efficacités et leurs contributions à la libération de phosphate dans les sols semblent inférieures à celles des acides organiques (Behera *et al.*, 2014 ; Alori *et al.*, 2017).

L'acidification du milieu de culture qui conduit à la solubilisation du phosphate n'est pas seulement liée à la production des acides organiques, Illmer et Schinner (1995) ont rapporté l'absence des acides organiques dans le milieu de culture d'une souche, qui solubilise le phosphate, appartenant au genre *Pseudomonas*. Il a été rapporté que l'acidification du milieu peut être le résultat de l'excrétion des H<sup>+</sup> provenant de l'assimilation de l'ammoniaque ou de la production respiratoire de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Juriank *et al.*, 1986 ; Parks *et al.*, 1990).

D'autre côté, le phosphate peut être libéré à travers la dégradation enzymatique. Les trois groupes d'enzymes les plus répandus sont : (1) les phosphatases (phosphohydrolase), qui effectuent la déphosphorylation des liaisons phospho-ester ou phosphoanhydride dans la matière organique (Rodríguez *et al.*, 2006) ; (2) les phytases, qui provoquent spécifiquement la libération de phosphate à partir de l'acide phytique (Alori *et al.*, 2017) ; (3) les phosphonatasés qui effectuent le clivage de la liaison C-P dans les organophosphonates (Behera *et al.*, 2014).

De plus, les PGPB peuvent empêcher l'adsorption et la fixation du phosphate dans des conditions limitant le phosphate en assimilant le phosphore solubilisé (Khan et Joergensen, 2009). Ainsi, ces bactéries peuvent agir comme un puits pour fournir du phosphore aux plantes quand elles en ont besoin.

### **3. Genres bactériens prometteurs pour les pratiques agricoles**

L'utilisation d'inoculum contenant des PGPB, qui favorisent la croissance et le rendement des plantes, a augmenté ces dernières années, principalement pour remplacer l'utilisation des engrais chimiques et des pesticides qui sont coûteux et qui peuvent endommager l'environnement (Afzal *et al.*, 2019).

Les microorganismes appartenant aux genres, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Planomonospora*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces*, sont largement exploités dans ce domaine. Ces divers groupes de microorganismes sont des éléments clés des systèmes sol-plante, où ils sont engagés dans un réseau intense d'interactions rhizosphère / endophyte / phyllosphère (Oleńska *et al.*, 2020).

#### **3.1. Le genre *Pseudomonas***

Le genre *Pseudomonas* représente un groupe de bactéries à Gram négatif qui appartient à la sous-classe des  $\gamma$  protéobactéries. Les membres de ce genre sont non sporulés, généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Mezaache, 2012).

En raison de leur grande polyvalence métabolique, ces bactéries sont capables d'utiliser la plupart des sources de carbone. Le genre *Pseudomonas* est largement répandu dans l'environnement colonisant ainsi la plupart des écosystèmes, tels que les sols, les eaux, en plus de ses associations avec les végétaux et les animaux (Özen et Ussery, 2012).

*Pseudomonas* est l'un des principaux genres des PGPB qui a reçu une large attention de la communauté scientifique, étant reconnu pour son biocontrôle et son potentiel agricole (Hayat *et al.*, 2010 ; Beneduzi *et al.*, 2012 ; Bhattacharyya et Jha, 2012). En fait, ces bactéries sont très abondantes dans le sol et la rhizosphère, dans certains cas, elles représentent plus de 60 % du microbiote bactérien totale du sol. Leurs interactions symbiotiques avec les plantes résident dans leurs capacités à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments, et à produire différents métabolites secondaires qui participent dans la protection et l'amélioration de la croissance des

plantes (Garbaye, 1994 ; Lugtenberg *et al.*, 2002). Ces bactéries sont connues aussi pour leurs aptitudes d'adhésion aux particules du sol et à coloniser les racines grâce à leurs mobilités et leurs productions d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991 ; De Weger *et al.*, 1994).

### 3.1.1. Mécanismes de la promotion de la croissance des plantes

Le genre *Pseudomonas* produit de nombreux types de métabolites secondaires, telles que les molécules antifongiques, antimicrobiennes, herbicides, nématocides et des molécules de détection de quorum (tableau 3).

**Tableau 3.** Principaux métabolites produits par le genre *Pseudomonas*.

Molécules	Espèce	activités	Référence
Phenazine	<i>P. chlororaphis</i>	Antifongique	Pierson et Pierson (2010)
Phenazine carboxamide	<i>P. aeruginosa</i>	Antifongique	Shanmugaiah <i>et al.</i> (2010)
Pyrrrolnitrine	<i>P. chlororaphis</i>	Antifongique ; nematicide	Nandi <i>et al.</i> (2015)
Pyoluteorine	<i>P. fluorescens</i>	Antifongique ; herbicide	Kidarsa <i>et al.</i> (2011)
Amphicine	<i>Pseudomonas</i> sp.	Antifongique	Sørensen <i>et al.</i> (2001)
Orfamide A	<i>Pseudomonas</i> sp.	Antifongique	Ma <i>et al.</i> (2016)
Pyoverdine	<i>P. fluorescens</i>	Chélation de fer	Zhang et Rainey (2013)
Pyocheline	<i>P. fluorescens</i>	Chélation de fer	Deveau <i>et al.</i> (2016)
Achromobactine	<i>P. chlororaphis</i>	Chélation de fer	Berti et Thomas (2009)
Pseudomonine	<i>P. fluorescens</i>	Chélation de fer	Djavaheri <i>et al.</i> (2012)
Maculosine	<i>P. aurantiaca</i> ; <i>P. stutzeri</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Antibactérienne ; Antifongique	Mehnaz <i>et al.</i> (2013) ; Thongsri <i>et al.</i> (2014) ; Vázquez-Rivera <i>et al.</i> (2015).
Quinolones	<i>P. aeruginosa</i>	Antibactérienne	Sams <i>et al.</i> (2016) ; Wells <i>et al.</i> (2017)

Plusieurs sidérophores produits par le genre *Pseudomonas* ont été caractérisés (Ferreira *et al.*, 2019), les plus importants sont les pyoverdines (Zhang et Rainey, 2013 ; Deveau *et al.*, 2016), les pyochelines et les pseudomonines (Djavaheri *et al.*, 2012 ; Deveau *et al.*, 2016). En fait, grâce à la grande production de sidérophores par ce genre, il a été proposé d'utiliser le typage des sidérophores comme forme d'identification de l'espèce (Meyer *et al.*, 2002).

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont connues pour leurs activités antifongiques permettant de supprimer plusieurs maladies phytopathogènes (Ferreira *et al.*, 2019). Plusieurs travaux ont rapportés une activité contre un large éventail de basidiomycètes, de

deutéromycètes et d'ascomycètes, y compris *F. oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* et *Sclerotinia sclerotiorum* (Ligon *et al.*, 2000 ; Sulochana *et al.*, 2014 ; Ait Bahadou *et al.*, 2018 ; Deori *et al.*, 2018). Ces bactéries suppriment les pathogènes fongiques en produisant des métabolites tels que l'aspyolutorine, la pyrrolnitrine, les phénazines et le 2, 4-di-acétylphloroglucinol (Deepti et Johri, 2003). L'inhibition des phytopathogènes par le genre *Pseudomonas* a été observée aussi à travers la production de l'HCN (Subramanian et Satyan, 2014). De plus, la protection des plantes par plusieurs espèces de ce genre a été rapportée à travers la production des composés qui déclenchent la résistance systémique chez les plantes hôtes (Alstrom, 1991).

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* ont été rapportées pour leurs capacités, de solubilisation de phosphate (Subramanian et Satyan, 2014), de fixer l'azote (Pham *et al.*, 2017), et de produire l'ACC-désaminase qui améliore la résistance des plantes en conditions de stress (Glick *et al.*, 1994). De même, plusieurs espèces ont été rapportées pour leurs productions des phytohormones telles que les auxines et les cytokinines (Garcia de Salmone *et al.*, 2001 ; Patten et Glick, 2002 ; Berta *et al.*, 2014 ; Bona *et al.*, 2017).

### 3.1.2. Le genre *Pseudomonas* comme inoculum

Le genre *Pseudomonas* a été testé pour son potentiel en tant qu'inoculant, des études ont été menées sur des cultures telles que le tournesol (Pourbabae *et al.*, 2018), la tomate (Nagata, 2017), le pois chiche (Sulochana *et al.*, 2014 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2017), le blé (Rasouli-Sadaghiani *et al.*, 2014), le riz (García de Salamone *et al.*, 2012). Ainsi, il a été signalé une augmentation, de la concentration en fer (Rasouli-Sadaghiani *et al.*, 2014 ; Nagata, 2017 ; Pourbabae *et al.*, 2018), de la biomasse (García de Salamone *et al.*, 2012 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2017), de la longueur des tiges et de la longueur des racines (Montero-Calasanz *et al.*, 2013 ; Sulochana *et al.*, 2014 ).

Sur la base des propriétés bénéfiques, plusieurs souches de ce genre ont déjà été commercialisées en tant que biofertilisants commerciaux et produits de lutte biologique. Par exemple, «Blightban A506» (NuFarm Inc. USA), composé de la souche *P. fluorescens* A506, protège les amandes, les pommes, les abricots, les bleuets, les cerises, les pêches, les poires, les fraises, les tomates et les pommes de terre contre *Erwinia amylovora*. «Cedomon » et « Cerall » (BioAgri AB, Suède) sont composés une souche appartenant à l'espèce *P. chlororaphis* qui offre une protection contre *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*, *Tilletia caries*, *Septoria*

*nodorum* et *Fusarium* sp. (O'Callaghan, 2016). «At-Eze» contient la souche *P. chlororaphis* 63-28, il est efficace contre plusieurs moisissures (Fravel, 2005).

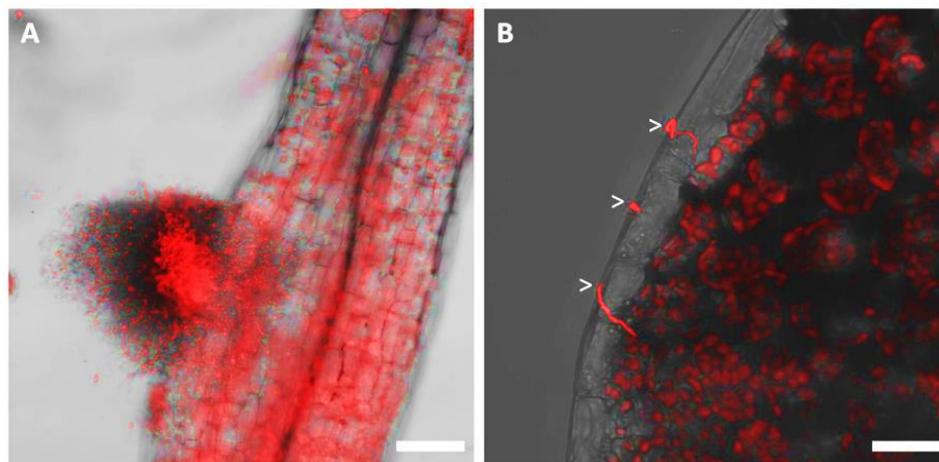
### 3.2. Le genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* appartient à la famille *Streptomycetaceae* et à l'ordre *Streptomycetales*. Cet ordre appartient à la fois au phylum et à la classe *Actinobacteria* (Ludwig *et al.*, 2012). Les membres du genre *Streptomyces* sont des bactéries aérobies, Gram positif, qui se développent sous forme de filaments ramifiés constitués de mycélium végétatif et d'hyphes aériens (Dworkin et Falkow, 2006 ; Petrus et Claessen, 2014). La présence de LL-diaminopimélique dans leurs parois cellulaires confère une caractéristique chimiotaxonomique typique à tous les membres de ce genre (Tatar *et al.*, 2014 ; Weidenmaier et Peschel *et al.*, 2008). La paroi cellulaire du genre *Streptomyces* peut inclure aussi d'autres polymères comme l'acide teichuronique et l'acide teichulosonique (Shashkov *et al.*, 2002 ; Acharyabhatta *et al.*, 2013). Les espèces du genre *Streptomyces* sont généralement chimiorganotrophes avec une grande polyvalence pour métaboliser une large gamme de sources de carbone (Antony-Babu *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2009). De plus, certaines propriétés morphologiques et physiologiques, ainsi que la capacité de produire une large gamme de pigments, ont été utilisées pour classer les espèces du genre *Streptomyces* et pour étudier sa distribution écologique et son potentiel biotechnologique (Pridham *et al.*, 1958 ; Tresner *et al.*, 1961 ; Atalan *et al.*, 2000 ; Forar *et al.*, 2006).

Le genre *Streptomyces* représente le groupe des actinobactéries mycéliennes le plus étudié (De Jesus Sousa et Olivares, 2016). En fait, parmi les 23 000 métabolites secondaires bioactifs produits par les microorganismes, les deux tiers sont produits par les actinobactéries et majoritairement par les membres du genre *Streptomyces* (Olano *et al.*, 2008). Il a été bien démontré que les métabolites secondaires produits par le genre *Streptomyces* augmentent l'adaptation aux facteurs biologiques, et aux contraintes physiques et chimiques (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Ces dernières années, le genre *Streptomyces* a suscité un intérêt particulier en tant que promoteur de la croissance des plantes (Shivlata et Satyanarayana, 2015). En fait, seulement une minorité d'espèces qui appartient à ce genre qui est phytopathogène, qui sont principalement *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* et *S. ipomoeae* (Lin *et al.*, 2012). En revanche, plusieurs espèces établissent des interactions bénéfiques avec les plantes (Meschke et Schrempf, 2010 ; Rungin *et al.*, 2012). Les espèces du genre *Streptomyces* sont capables de coloniser efficacement la rhizosphère et le rhizoplan, de même elles peuvent

devenir endophytes en colonisant les tissus internes de la plante hôte (Duncan *et al.*, 2015). La capacité de certaines espèces du genre *Streptomyces* à accéder aux tissus racinaires et à instaurer un mode de vie endophytique a été rapportée dans plusieurs études, ces bactéries ont la capacité d'infecter les racines sans causer des dommages ou des symptômes visibles à la plante hôte (figure 8) (Van der Meij *et al.*, 2018). Le genre *Streptomyces* colonise principalement les espaces intercellulaires, les cellules sclérenchymateuses et les cellules xylémiques. De plus, il peut coloniser différents organes de la plante hôte (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits et graines) (Qin *et al.*, 2011).



**Figure 8.** Microscopie confocale représente la colonisation d'*Arabidopsis thaliana* par la souche *Streptomyces* sp. COA. (A) racine latérale colonisée, barre d'échelle: 50  $\mu$ M ; (B) bord de la feuille, barre d'échelle: 15  $\mu$ M. Les échantillons sont colorés par l'iodure de propidium (Van der Meij *et al.*, 2018).

### 3.2.1. Promotion de la croissance des plantes par le genre *Streptomyces*

Plusieurs espèces du genre *Streptomyces* telles que *S. nobilis*, *S. kunmingensis*, *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei*, *S. griseoviridis*, *S. lydicus*, *S. djakartensis*, *S. griseorubens*, *S. globisporus*, *S. caviscabies* et *S. enissocaesilis* (Mahadevan et Crawford, 1997 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2015a, 2015b, 2015c ; Anwar *et al.*, 2016) ont été rapporté pour leurs production des phytohormones. Plusieurs études ont montré que la production de l'IAA par le genre *Streptomyces* améliore la croissance des plantes en augmentant la germination des graines, la longueur et le poids sec des tiges et des racines de plusieurs plantes telles que les pois (Tokala *et al.*, 2002), l'haricots (Nassar *et al.*, 2003), la tomate (El-Tarabily, 2008; Passari *et al.*, 2016), le blé (Sadeghi *et al.*, 2012), le piment (Passari *et al.*, 2015b) et le riz (Gopalakrishnan *et al.*, 2013).

De nombreuses espèces du genre *Streptomyces*, isolées de la rhizosphère, se sont révélées capables d'améliorer la croissance des plantes grâce à leurs solubilisations du phosphate

(Amaresan *et al.*, 2018). Les espèces *S. thermolilacinus*, *S. youssoufiensis*, *S. rochei* et *S. carpinensis* ont été rapportées parmi les meilleurs espèces en solubilisation de phosphate (Hamdali *et al.*, 2011 ; Sadeghi *et al.*, 2012 ; Jog *et al.*, 2014 ; Sreevidya *et al.*, 2016).

De nombreuses espèces du genre *Streptomyces* sont bien connues comme agents de lutte biologique antifongique qui inhibent plusieurs champignons phytopathogènes (Joo, 2005 ; Errakhi *et al.*, 2007). Le mécanisme de lutte biologique par ce genre est principalement la synthèse d'antibiotiques et la production d'enzymes hydrolytiques (Dhanasekaran *et al.*, 2008). De plus, certaines espèces sont révélées actives contre plusieurs phytopathogènes en même temps (Sabaratnam et Traquair, 2015). Il a été rapporté que certaines espèces appartenant au genre *Streptomyces* sont connues pour produire l'H<sub>2</sub>CN. La production de ce composé volatil par ces bactéries a contribué à la suppression de plusieurs maladies phytopathogènes (Hastuti *et al.*, 2012 ; Passari *et al.*, 2015b ; Aydi-Benabdallah *et al.*, 2016 ; Goudjal *et al.*, 2016). Le genre *Streptomyces* est connu aussi par sa capacité de production de différents types d'enzymes, il est connu pour produire des enzymes mycolytiques comme la chitinase et la protéase (Shekhar *et al.*, 2006 ; Han *et al.*, 2009 ; Singh et Chhatpar, 2011). Ces enzymes ont été rapportées comme des agents de lutte contre plusieurs phytopathogènes (El-Tarabily *et al.*, 2009 ; Singh et Chhatpar, 2011 ; Palaniyandi *et al.*, 2013).

Plusieurs travaux ont rapporté la production des sidérophores par le genre *Streptomyces* (Amaresan *et al.*, 2018). Jog *et al.* (2012) ont suggéré que les espèces *S. rochei*, *S. carpinensis* et *S. thermolilacinus* ont la capacité de produire des sidérophores sur le milieu gélosé contenant le chrome azurol S. Ce genre est connu aussi par la production de différents types d'hydroxamates et des catécholates (Khamna *et al.*, 2009 ; Amaresan *et al.*, 2018).

### **3.2.2. Le genre *Streptomyces* comme inoculum**

Plusieurs bioinoculants commerciaux ont été développés pour améliorer la stimulation de la croissance des plantes (tableau 4) (Hamedi et Mohammadipanah, 2015 ; De Jesus Sousa et Olivares, 2016). Le premier défi pour produire un bioinoculant à l'aide de PGPB est de trouver la meilleure souche de (formulation unique) ou sa combinaison avec d'autres microbes (formulation mixte). Les études de dépistage impliquent différents dosages expérimentaux au laboratoire et en serre. Les souches choisies doivent être testées dans différentes conditions environnementales et pour différentes espèces végétales et différents génotypes d'une culture cible (De Jesus Sousa et Olivares, 2016). À la suite de ces étapes, il est nécessaire de développer des formulations bioinoculantes spécifiques, qui impliquent de déterminer les caractéristiques physiques et chimiques requises du support, et de déterminer quels additifs et métabolites

peuvent augmenter la viabilité, l'activité et les performances du micro-organisme lorsqu'il est introduit dans des conditions de terrain (Bashan *et al.*, 2014).

Le tableau ci-dessous, résume les principaux produits, développés à partir des espèces appartenant au genre *Streptomyces* avec une formulation unique, qui sont déjà commercialisés. Selon ces données la plupart des produits élaborés sont utilisés pour la protection contre les phytopathogènes.

**Tableau 4.** Produits commercialisés de la promotion de la croissance des plantes développés à partir des espèces appartenant au genre *Streptomyces* (De Jesus Sousa et Olivares, 2016).

Espèce	produit commercialisé	Culture cible	Effet
<i>S. lydicus</i>	Actinovate®SP Actinovate®AG	Herbe, plantes ornementales, cultures en serres, <i>etc.</i>	Protection contre les phytopathogènes.
	Micro108®	Cultures vivrières, plantes ornementales, gazon, <i>etc.</i>	Améliore la croissance des plantes et favorise des systèmes racinaires plus vigoureux.
	Actino-iron®	Culture sous la serre, pépinière, gazon, plante ornementale, <i>etc.</i>	Protection contre les phytopathogènes.
<i>S. avermitilis</i>	AVID® 0.15EC	Culture sous la serre, plantes ornementales, <i>etc.</i>	Protection contre les phytopathogènes.
	VERMITEC® AGRI-MEK®	Coton, agrumes, fruits à pépins, noix et légumes.	Protection contre les phytopathogènes
	PROCLAIM® AFFIRM® DENIM™	Légumes, fruits et coton.	Protection contre les phytopathogènes.
	AVICTA®	Coton, maïs et soja.	Biocontrôle des nématodes.
<i>S. griseovirii</i>	Mycostop®	Production de semis, légumes, herbes et plantes ornementales.	Protection contre les phytopathogènes.

## **ETUDE EXPERIMENTALE**

---

## Chapitre 1 : Effet de trois géotypes de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques physico-chimiques et la diversité génétique du microbiote du sol

La rhizosphère est connue en tant que compartiment du sol influencé par la plante, principalement, par le biais de la rhizodéposition qui renforce l'activité microbienne dans la rhizosphère par rapport au sol non-rhizosphérique (Butler *et al.*, 2003). En fait, l'analyse de la communauté microbienne est un indicateur important qui reflète les interactions entre la plante et le sol. De telles informations aident à connaître l'effet des cultures sur les propriétés du sol, comme elles permettent l'amélioration de la production et la gestion. Ainsi, l'étude de la diversité microbienne à l'interface racine-sol sera une étape cruciale vers l'exploitation rationnelle du microbiote à des fins agricoles.

Selon la littérature, plusieurs facteurs déterminent la nature du microbiome de la rhizosphère (Van Dam et Bouwmeester, 2016), cependant, les preuves expérimentales appuyant sur l'effet du géotype de la plante sont encore rares,

L'objectif de ce chapitre est, d'une part, étudier l'influence de trois géotypes de *Capsicum annuum* sur les propriétés physico-chimiques du sol racinaire environnant par rapport au sol non-rhizosphérique, et d'autre part, d'évaluer les particularités de l'abondance et la diversité microbiennes de la rhizosphère par rapport au sol non-rhizosphérique.

### Matériel et méthodes

#### 1. Site d'échantillonnage

L'échantillonnage est effectué à partir de la commune de Belkheir, Daïra Guelaat Bou Sbaa (N36291664/E07303445), située à 2 kilomètres à l'est de la commune de Guelma. Cette localité se caractérise par un climat méditerranéen chaud avec une pluviométrie annuelle moyenne de 600 mm, une température d'air moyenne de 10,6 °C en Janvier et de 26,7 °C en Août (Station météorologique, Guelma). Le terrain choisi porte trois parcelles sous-jacentes de deux hectares pour chacune, sur lesquelles sont cultivés trois géotypes différents de piment fort (*C. annuum*). Il s'agit des cultivars : Biskra, Karam et Al-Fares. Les trois géotypes ont été plantés en Mai 2014.

## 2. Prélèvement du sol rhizosphérique et non rhizosphérique

Les échantillons du sol sont prélevés après cinq mois de croissance de *C. annuum* (En stade de fructification). Pour chaque variété, trois échantillons indépendants sont réalisés en regroupant cinq sous-échantillons. Le sol attaché aux racines est enlevé par agitation douce et le sol adhérent à 5 mm de la surface racinaire est utilisé comme échantillon de sol rhizosphérique. Le sol non-rhizosphérique est pris à la même profondeur que le sol rhizosphérique. Les échantillons de sol sont placés dans des sacs stériles en polyéthylène, stockés à 4 °C jusqu'à l'analyse.

## 3. Analyses physico-chimiques des échantillons de sols

Les analyses physico-chimiques sont réalisées par le laboratoire d'analyses physico-chimiques des matériaux (Ain M'lila, Oum El Bouaghi) et le laboratoire des analyses physicochimique du centre de recherche pour l'agriculture et l'environnement, (Rome, Italie).

### 3.1. Mesure du pH

Pour la mesure du pH, 20 g de sol séché (Diamètre < 2 mm) sont introduits dans un homogénéisateur contenant 50 ml d'eau distillée. Après agitation pendant 15 min et décantation, le pH du surnageant est déterminé. L'interprétation des résultats est réalisée selon Hazelton et Murphy (2007).

### 3.2. Mesure de la conductivité

La mesure de la conductivité est réalisée de la même manière que la mesure du pH à la seule différence que les 20 g de sol séché (Diamètre < 2mm) sont homogénéisés dans 100 ml d'eau distillée. L'interprétation des résultats est réalisée selon Hazelton et Murphy (2007).

### 3.3. Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique a pour but de déterminer quantitativement la distribution des particules du sol par classes de diamètres. L'analyse granulométrique dans cette étude est réalisée par la technique de la pipette de Robinson. La méthode consiste à la décarbonatation et la destruction de la matière organique contenu dans le sol, puis la dispersion des particules par l'hexamétaphosphate de sodium. Ensuite, l'échantillon du sol ainsi traité est prélevé à l'aide de pipette de Robinson. La récupération de l'aliquote à une profondeur et à un moment donné permet d'identifier une classe de particules spécifique lorsque toutes les particules plus grosses que le diamètre sélectionné sont éliminées (Pansu et Gautheyrou, 2006).

### **3.4. Calcaire total**

Le contenu en calcaire total est déterminé par le calcimètre de Bernard, cette méthode consiste à décomposer le carbonate de calcium, contenu dans l'échantillon de sol, par un acide fort (acide chlorhydrique), le volume de gaz carbonique dégagé par la réaction est mesuré à l'aide d'une burette à gaz. Un poids connu de carbonate de calcium pur pour analyse est traité de la même manière. En comparant les deux volumes, le taux de carbonates, exprimé en carbonate de calcium dans un échantillon de sol, est déterminé (Mathieu et Pieltain, 2003).

### **3.5. Phosphore total**

Le dosage du phosphate total est réalisé selon la méthode de Dabin (1967), cité par Mathieu et Pieltain (2003). Cette méthode commence par une calcination à 550 °C pendant deux heures. Après refroidissement des cendres, l'acide nitrique concentré est ajouté. L'attaque est conduite pendant cinq heures à ébullition lente. Après refroidissement, le culot est repris par l'acide sulfurique. L'objectif recherché est la mise sous forme de pyrophosphate ( $P_2O_5$ ) de toutes les formes de phosphore. Avec deux reprises à l'acide sulfurique, le pyrophosphate est hydrolysé en phosphate qui est la seule forme du phosphore réagissant avec le molybdate d'ammonium.

### **3.6. Carbone organique et azote total**

Les teneurs en azote total et en carbone organique sont déterminées par l'utilisation de LECO analyzer (RC-612) et LECO analyzer (FP-528), respectivement. Les deux appareils fonctionnent selon le principe de Dumas cité par Buckee (1994). Cette méthode de chimie analytique est basée sur la combustion d'un échantillon en présence d'oxygène, le carbone et l'azote, étant convertis en  $CO_2$  et  $NO_x$ , sont séparés par chromatographie et mesurés dans une cellule à conductivité thermique. Contrairement aux autres méthodes, la méthode Dumas est plus rapide et ne nécessite pas de produits chimiques. En fait, le temps total d'analyse, après la préparation et l'étalonnage de l'équipement est d'environ 10 min par échantillon. La méthode Dumas est relativement facile à réaliser, dont la préparation de l'échantillon est limitée à la pesée de l'échantillon dans des creusets en porcelaine (Wright et Bailey, 2001).

Pour effectuer cette analyse, 0,1 g de chaque échantillon de sol est déposé dans un creuset en porcelaine, qui a été transféré dans la chambre de combustion (850 °C). Les quantités en carbone organique et en azote sont déduites à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par un échantillon de sol de calibration (Leco corporation, Saint Joseph, Michigan USA) qui contient (2,44 % de carbone et 0,207 % d'azote).

#### 4. Extraction de l'ADN génomique à partir du sol

L'extraction est effectuée à l'aide d'un kit, « PowerSoil », d'isolement d'ADN génomique provenant d'échantillons environnementaux conformément au protocole du fabricant : des échantillons de 0,35 g de sol sont remis dans des tubes de 2 ml *Power bead Tubes Type C* contenant déjà des billes en zirconium/silice et 750 µl de la solution de lyse. Les tubes sont soumis à une agitation pendant 4 min dans un broyeur cellulaire *FastPrep*. Après centrifugation, les surnageants sont transférés dans des tubes de 2 ml, puis ils sont traités par les solutions C2, C3 et C4, respectivement. Les surnageants sont filtrés par l'utilisation des *PowerSoil Spin Filters*, la membrane subit alors plusieurs lavages successifs, enfin, l'ADN est élué dans 100 µl de tampon d'éluion.

Pour chaque échantillon du sol, l'ADN est extrait en double. La concentration de l'ADN est mesurée par *Qubit® 2.0 Fluorometer* en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ont été stockés à -20 °C jusqu'à utilisation.

#### 5. Quantification du gène de l'ARNr 16S par PCR quantitative

La quantification de l'ADNr 16S est réalisée, par PCR quantitative (q-PCR), afin d'estimer le nombre de copies de gènes présent, permettant, ainsi, d'approximer le nombre de bactéries présentes par µg d'ADN extrait. L'ADN bactérien est amplifié en utilisant les paires d'amorces de Muyzer, qui amplifient un fragment de 193 pb, comme indiqué par Nadkarni *et al.* (2002). Le mélange réactionnel est effectué pour un volume final de 25 µl contenant 10 µl d'ADN matrice (2 ng.µl<sup>-1</sup>), 12,5 µl de *Quantifast Syber Green Master Mix PCR*, 1,2 µM d'amorce et 1,3 µl d'eau milli-Q stérile. L'expérience est répétée deux fois. L'amplification est effectuée dans un Stratagene Mx3000P qPCR (Agilent Technologies) avec un cycle de : dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, 35 cycles à : 95 °C pendant 15 s ; hybridation à 30 °C pendant 58 s ; élongation à 78 °C pendant 30 s ; suivie d'une quantification de la fluorescence à la fin avec une étape effectuée à 84 °C pendant 15 s. Les courbes étalons ont été obtenues par amplification des échantillons d'ADN du sol pour chaque génotype (Canfora *et al.*, 2017). À la fin, les produits amplifiés sont purifiés et quantifiés à l'aide de *Qubit® 2.0* et dilués pour minimiser le biais de PCR (Towe *et al.*, 2010). Les étalons sont obtenus en utilisant une série des dilutions décimales de 10<sup>3</sup> à 10<sup>9</sup> copies de gènes. Le nombre de copies de gènes pour chaque échantillon a été calculé en utilisant la formule suivante : **Nombre de copies de gènes** = (ng × nombre / mole) / (pb × ng / g × g mole de pb). Dont (ng) représente la quantité de l'ADN et (pb) représente la longueur de la matrice. Les résultats sont exprimés en nombre de copies de gènes par gramme de sol sec.

## 6. Analyse de la structure génétique des communautés bactériennes par T-RFLP

Cette technique repose sur l'amplification d'un fragment d'ADN à l'aide d'amorces marquées, les fragments obtenus sont digérés par des enzymes de restriction appropriées. On obtient alors des fragments de restriction terminaux marqués de longueurs différentes (Liu *et al.*, 1997). Cette différence de taille est due à une différence du nombre de sites de restriction qui varie selon les individus. Cette méthode permet l'analyse de communautés complexes en fournissant des informations sur la diversité puisqu'une bande représente une seule unité opérationnelle taxonomique (*operational taxonomic unit*, OTU) (Tiedje, 1999).

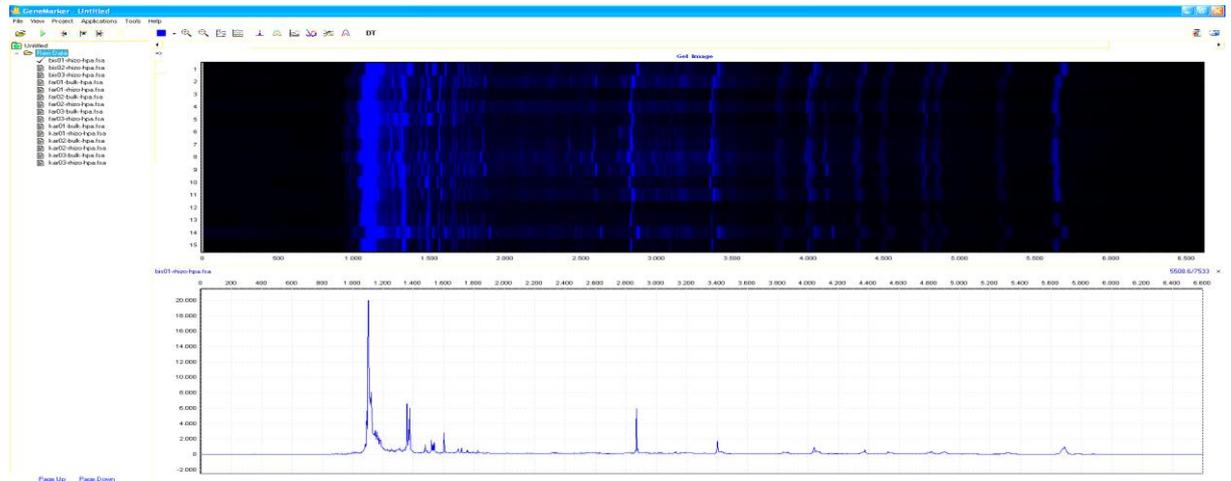
L'ADNr 16S est amplifié en utilisant les amorces 63f (AGGCCTAACACATGCAAGTC) marqué avec le VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein) et 1087r (CTCGTTGCGGGACTTACCCC) (Liu *et al.*, 1997). L'amplification est réalisée dans un volume de 50 µl avec 25 ng de la matrice d'ADN et 5 U d'ADN polymérase Taq (Promega) avec les conditions suivantes : 95 °C pendant 5 min ; une répétition de 30 cycles de 95 °C pendant 30 s, 55 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 1 min ; et une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Les produits de PCR sont séparés sur un gel de 1,5 % d'agarose, puis ils sont purifiés en utilisant le kit minElute. Deux répétitions sont réalisées sur chaque échantillon. 300 ng d'ADNr 16S amplifié est digérée avec 20 U de TaqI, AluI ou HpaII (Promega) pendant 5 h. Les produits digérés sont analysés par électrophorèse capillaire sur un analyseur génétique ABI3500 en utilisant le « LIZ600 Applied Biosystems » comme standard de taille. Des tailles de fragment de 55 à 600 pb sont prises en compte pour l'analyse du profil. Les électrophorégrammes obtenus sont soumis à une analyse avec les logiciels GenMapper v4.1 (Applied Biosystems) et GeneMarker (SoftGenetics) permettant de déterminer les tailles des fragments détectés (Figure 9). Les profils obtenus sont regroupés dans une matrice pour analyse postérieure.

## 7. Analyses statistiques

La diversité de la communauté bactérienne dans les échantillons de sol est estimée à partir des résultats de l'analyse T-RFLP, comme il a été déjà montré par Canfora *et al.* (2015). Les nombres OTU sont calculés en comptant le nombre de TRF. Les paramètres de diversité microbienne (indice de *Shannon-Wiener* et les numéros OTU) sont calculés à l'aide du logiciel Past 3 (PAleontological STatistics, version 3.25, University of Oslo).

Les résultats sont comparés à l'aide de test de Tukey après une analyse de la variance (ANOVA) à  $P \leq 0,05$  en utilisant XLStat 2014 (addinsoft, Paris).

Les résultats des analyses physico-chimiques et de la diversité microbienne sont soumis à une analyse en composante principale (ACP) par IBM SPSS statistics 21.



**Figure 9.** Exemple de profils T-RFLP obtenus après la digestion de L'ADNr 16S par l'enzyme HpaII.

## Résultats

### 1. Propriétés physico-chimiques de la rhizosphère et des sols non-rhizosphériques

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons du sol rhizosphérique est non-rhizosphérique des trois génotypes, prélevés au mois de Novembre, sont illustrés dans le tableau 5.

En se référant à Hazelton et Murphy (2007), les résultats des analyses des sols non-rhizosphériques montrent que le terrain étudié se caractérise par : un sol limoneux sableux ; sub-alcain ; faiblement calcaire ; une teneur faible en azote et une teneur modérée en carbone organique.

Une diminution significative du pH dans la rhizosphère des génotypes Biskra et Al-Fares est enregistrée (Tableau 5). La teneur en carbonate de calcium est significativement diminuée ( $P < 0,001$ ) dans la rhizosphère des trois cultivars de *C. annuum*.

Aucune différence significative n'est observée pour la conductivité électrique, le phosphore total, l'azote total, le carbone organique total et le rapport C/N. Le sable est la particule du sol dominante dans la rhizosphère (55,05 à 69,56 %) et dans les sols non-rhizosphériques (65,33 à 71,33 % de la masse totale du sol), cette particule est significativement plus faible dans la rhizosphère du génotype Al-Fares. La teneur en argile est significativement plus élevée dans les trois sols de la rhizosphère. Autour des racines des trois génotypes, la texture du sol est passée de limon sableux à limon sablo-argileux.

**Tableau 5.** Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol rhizosphérique et non-rhizosphérique.

<b>Génotype</b>	<b>Sol</b>	<b>pH</b>	<b>ECe</b> ( $\mu\text{S/cm}$ )	<b>CaCO<sub>3</sub></b> (g/kg)	<b>PT</b> (g/kg)	<b>AT</b> (g/kg)	<b>COT</b> (g/kg)	<b>C/N</b>	<b>Argile</b> (g/kg)	<b>Limon</b> (g/kg)	<b>Sable</b> (g/kg)	<b>Classe de texture</b>
<b>Biskra</b>	<b>R</b>	7,94b ( $\pm 0,07$ )	188a ( $\pm 12,52$ )	46,9b ( $\pm 3,80$ )	2,03a ( $\pm 0,15$ )	1,34a ( $\pm 0,25$ )	18,32a ( $\pm 1,15$ )	13,95a ( $\pm 1,92$ )	208,33a ( $\pm 10,79$ )	121a ( $\pm 12,77$ )	667,33a ( $\pm 17,47$ )	<i>Argileux, limono-sableux</i>
	<b>NR</b>	8,10a ( $\pm 0,04$ )	199a ( $\pm 21,16$ )	73,17a ( $\pm 0,51$ )	1,90a ( $\pm 0,36$ )	1,34a ( $\pm 0,24$ )	16,04b ( $\pm 0,78$ )	12,11a ( $\pm 1,46$ )	187,67b ( $\pm 2,31$ )	157a ( $\pm 33,05$ )	652,67a ( $\pm 32,56$ )	<i>Limono-sableux</i>
<b>Karam</b>	<b>R</b>	8,00a ( $\pm 0,06$ )	180a ( $\pm 9,64$ )	60,9b ( $\pm 1,49$ )	2,07a ( $\pm 0,15$ )	1,28a ( $\pm 0,22$ )	17,59a ( $\pm 1,02$ )	13,95a ( $\pm 1,56$ )	210a ( $\pm 12,29$ )	92a ( $\pm 18,61$ )	695a ( $\pm 28,48$ )	<i>Argileux, limono-sableux</i>
	<b>NR</b>	8,05a ( $\pm 0,20$ )	187a ( $\pm 28,79$ )	74,96a ( $\pm 8,32$ )	1,83a ( $\pm 0,11$ )	0,99a ( $\pm 0,03$ )	15,27b ( $\pm 0,94$ )	15,44a ( $\pm 0,83$ )	185,33a ( $\pm 5,03$ )	124,33a ( $\pm 17,01$ )	689,33a ( $\pm 21,39$ )	<i>Limono-sableux</i>
<b>Al-Fares</b>	<b>R</b>	7,83b ( $\pm 0,06$ )	214a ( $\pm 21,07$ )	52,13b ( $\pm 9,15$ )	1,93a ( $\pm 0,20$ )	1,07a ( $\pm 0,10$ )	15,72a ( $\pm 1,31$ )	14,86a ( $\pm 2,15$ )	208a ( $\pm 15,10$ )	238a ( $\pm 5,29$ )	550b ( $\pm 19,67$ )	<i>Argileux, limono-sableux</i>
	<b>NR</b>	8,18a ( $\pm 0,05$ )	196a ( $\pm 20,22$ )	79,96a ( $\pm 8,93$ )	1,90a ( $\pm 0,30$ )	1,02a ( $\pm 0,19$ )	15,57a ( $\pm 0,54$ )	15,51a ( $\pm 2,16$ )	182,67b ( $\pm 2,08$ )	100,33b ( $\pm 8,74$ )	713,67a ( $\pm 9,07$ )	<i>Limono-sableux</i>

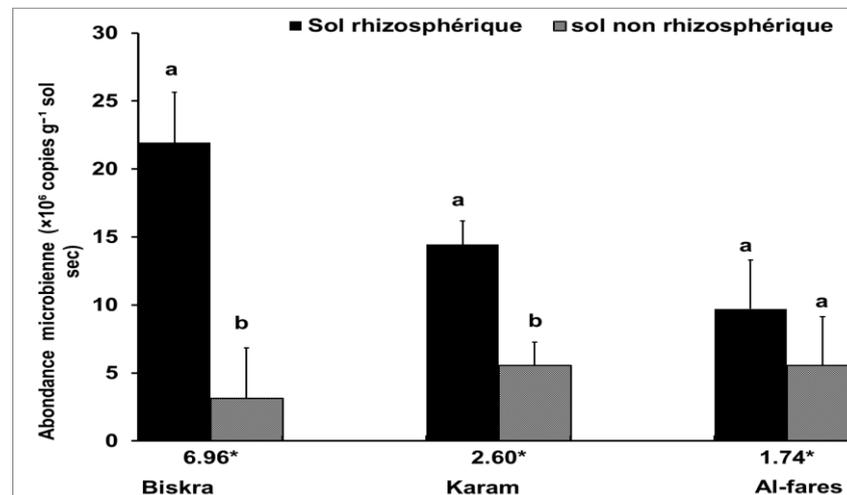
(R) : sol rhizosphérique ; (NR) : sol non-rhizosphérique ; (COT) : carbone organique total ; (AT) : azote total ; (PT) : phosphore total.

Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ( $\pm$ erreur standard).

Les lettres en indices des moyennes indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$  après une analyse de la variance.

## 2. Estimation de la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique et non-rhizosphérique

Le nombre de copie de l'ADNr 16S varie entre  $5,07 \times 10^6$  et  $3,09 \times 10^7$  copies de gènes par gramme de sol sec dans les échantillons de sol rhizosphérique, et entre  $5,67 \times 10^5$  et  $1,33 \times 10^7$  copies de gènes par gramme de sol dans les sols non-rhizosphériques. La figure 10 montre une augmentation significative de l'abondance microbienne autour des racines de deux génotypes (Biskra et Karam). Un rapport rhizosphère/sol (R:S) est introduit pour définir l'effet des exsudats racinaires sur l'abondance microbienne du sol environnant. En général, ce rapport est calculé comme le paramètre mesuré dans le sol de la rhizosphère divisé par la valeur de la même mesure dans un sol de contrôle non rhizosphérique voisin (Dazzo et Ganter, 2009). Selon ce ratio, l'abondance bactérienne est environ sept fois plus élevée dans la rhizosphère du génotype Biskra et deux fois plus élevée dans la rhizosphère du génotype Karam.



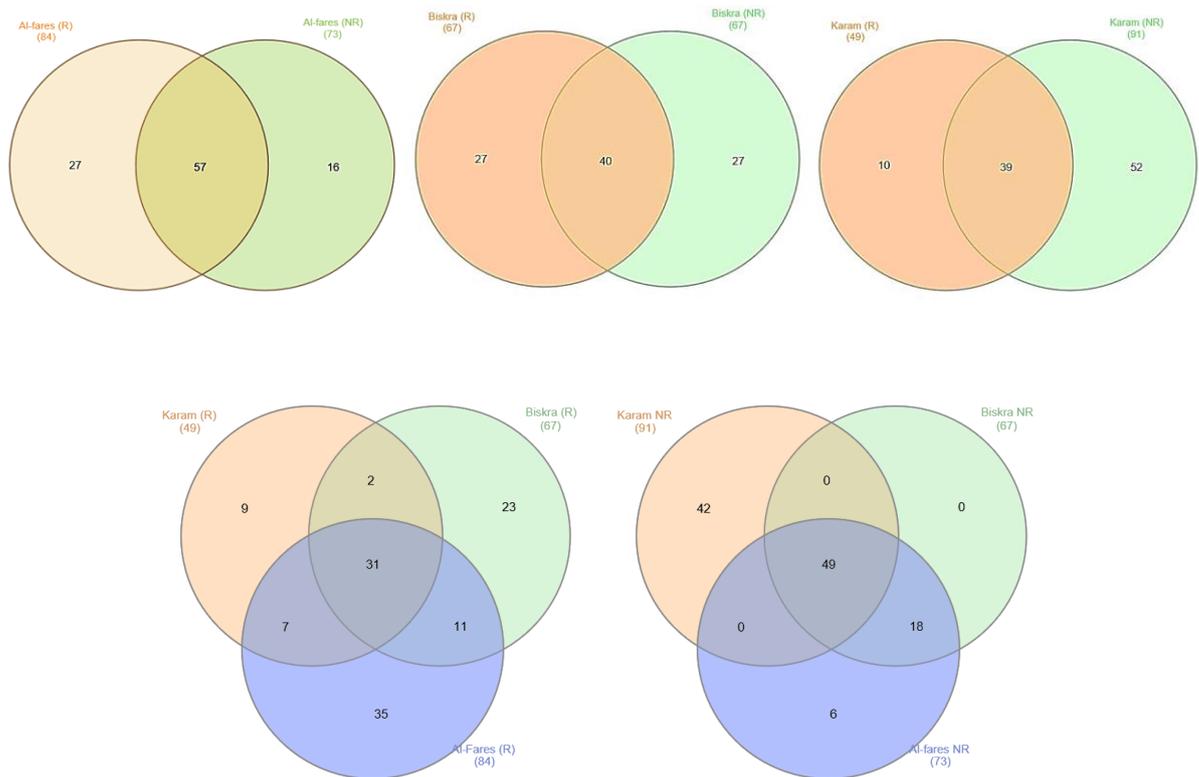
**Figure 10.** Quantification du gène de l'ARNr 16S d'origine bactérienne, pour les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard des répliques. Les lettres a et b indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$  déduite par test de Tukey suivant ANOVA. \* Valeurs du rapport rhizosphère/sol non-rhizosphérique (R:S).

## 3. Estimation de la diversité de la communauté bactérienne rhizosphérique et non-rhizosphérique

La structure de la communauté bactérienne a été déterminée, pour les sols rhizosphériques des trois génotypes et comparé à celle des sols non-rhizosphériques, par une analyse de type T-RFLP ciblant l'ADNr 16S.

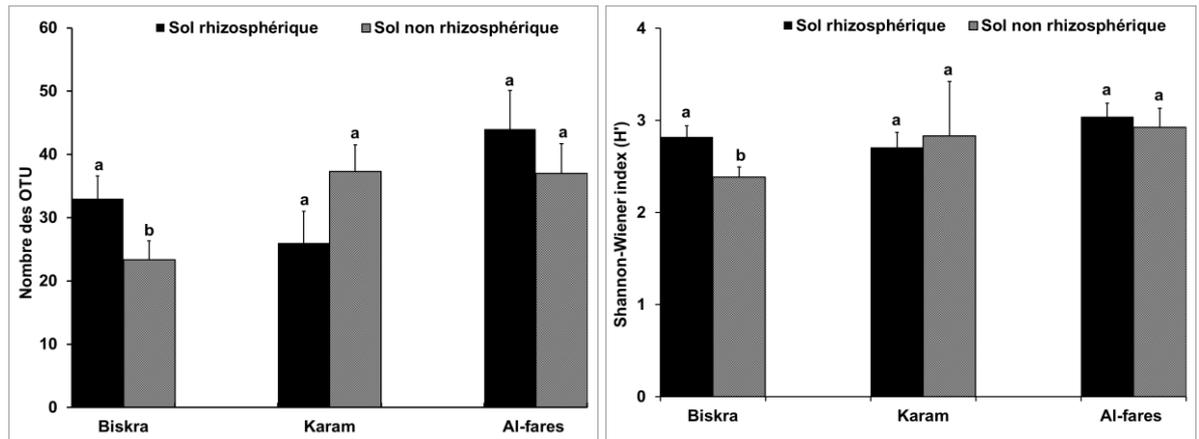
L'analyse d'un total de 18 échantillons avec trois répétitions a permis l'identification de 119 OTUs différentes. La répartition des OTUs sur les trois génotypes et les unités spécifiques de la rhizosphère par rapport au sol environnant sont illustrées dans la Figure 11. D'après ces

diagrammes de Venn, les rhizosphères des génotypes Biskra, El-fares et Karam, montrent une spécificité de 29 %, 27 % et 10 % respectivement. En parallèle, les trois types de sol rhizosphériques présentent seulement 26 % de ressemblance contre 43% de ressemblance entre les sols non-rhizosphériques.



**Figure 11.** Diagrammes de Venn comparant les OTUs des sols rhizosphériques et les sols non-rhizosphériques.

La moyenne des OTUs varie de 18 à 67 pour les sols non-rhizosphériques et de 20 à 54 pour les sols rhizosphériques. La différence en OTUs et en indice de diversité (indice de *Shannon-Wiener*) sont significativement plus élevés ( $P < 0,005$ ), comparativement au sol non-rhizosphérique, seulement pour un seul génotype (Biskra) (Figure 12).



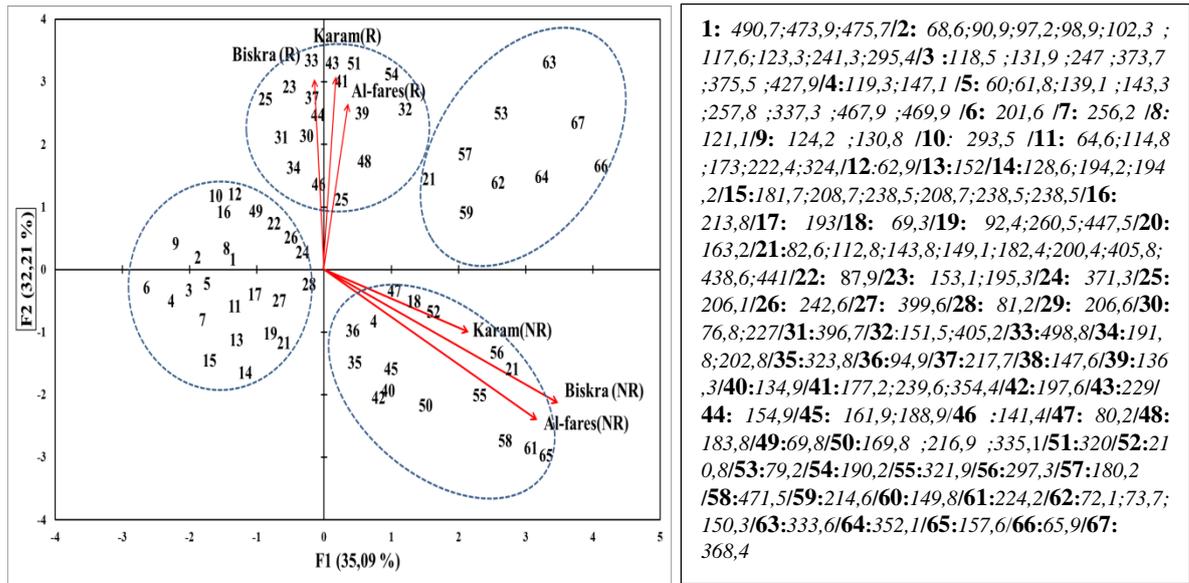
**Figure 12.** Unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et *Shannon-Wiener index* ( $H'$ ) des sols rhizosphériques et des sols non-rhizosphériques. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard des répliques. Les lettres a et b indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$  déduite par test de Tukey suivant ANOVA.

#### 4. Analyse en composantes principales

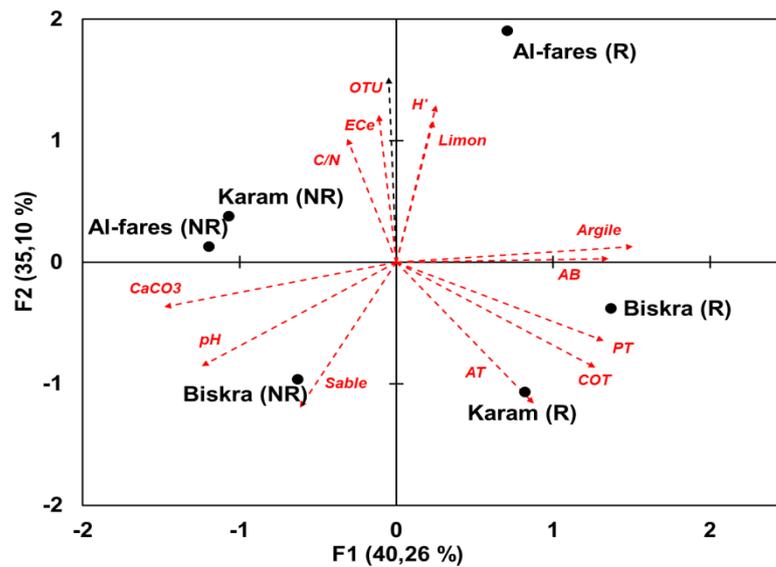
Des analyses en composantes principales ont été réalisées en utilisant les résultats des analyses physico-chimiques, de l'abondance microbienne et des données de la T-RFLP.

Une première ACP a été réalisée par l'utilisation de la fréquence relative de chaque OTU (figure 13). Les axes F1 et F2 représentent respectivement 35,09 et 32,21 % de la variabilité totale. La diversité des populations entre la rhizosphère et le sol non-rhizosphérique est principalement décrite par la deuxième composante, alors que le premier axe distingue la rhizosphère du génotype Biskra, signifie qu'une population spécifique est stimulée par ses exsudats racinaires. Il ressort de cette analyse que l'ensemble des points représentatifs des échantillons a permis de distinguer quatre groupes de populations de bactéries : une population spécifique à la rhizosphère ; une liée au sol non-rhizosphérique ; une commune entre le sol rhizosphérique et non-rhizosphérique et une dernière population très hétérogène.

Une deuxième ACP est réalisée englobant toutes les données précédentes (figure 14). Les deux premières composantes expliquent 75,36 % de la variation totale. Les composantes 1 et 2 représentent 40,26 % et 35,10 %, respectivement. Selon cette analyse, seulement le premier axe permet une bonne séparation entre la rhizosphère et les sols non-rhizosphériques. La construction de cet axe est principalement liée à l'abondance bactérienne ( $r = 0,874$ ) et à la teneur en argile ( $r = 0,973$ ). Cet axe est également corrélé négativement avec le pH ( $r = -0,800$ ) et la teneur en carbonates ( $r = -0,954$ ).



**Figure 13.** Analyse en composantes principales basée sur les profils de la T-RFLP des populations bactériennes apparues dans la rhizosphère et le sol non-rhizosphérique.



**Figure 14.** Analyse en composantes principales basée sur, les profils T-RFLP, l'abondance bactérienne et les analyses physico-chimiques du sol.

**Discussion**

Il a été montré que les systèmes racinaires assurent l'ancrage et permettent la capture de l'eau et des nutriments (Jin *et al.*, 2017). Pour atteindre ces objectifs, les plantes modulent les caractéristiques du sol environnant par le biais des exsudats racinaires (Sasse *et al.*, 2018).

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'effet de trois génotypes de *C. annuum* sur l'abondance et la diversité de la communauté bactérienne et des propriétés physico-chimiques du sol rhizosphérique en comparaison avec le sol non-rhizosphérique environnant.

Ainsi, une diminution de pH est observée dans la rhizosphère des trois génotypes. En fait, les plantes peuvent modifier le pH du sol pour influencer la forme chimique, la concentration et la disponibilité des substrats (Beneduzi *et al.*, 2013). Lambers *et al.* (2008) ont rapporté qu'une diminution du pH pourrait augmenter la disponibilité des micronutriments dans le sol. Comme mentionné par Hinsinger *et al.* (2003), l'extrusion de protons par les racines peut réduire le pH de la rhizosphère de plus de 2 unités par rapport à celui d'un sol non-rhizosphérique. Plusieurs études ont établi un lien entre la valeur du pH et les activités microbiennes dans le sol (Fierer et Jackson, 2006 ; Beneduzi *et al.*, 2008). Ainsi, les plantes peuvent moduler le pH du sol pour stimuler la croissance microbienne autour des racines, dont le pH optimal pour la plupart des microorganismes est proche de la gamme neutre (Smith et Doran, 1996).

La teneur en carbonates est significativement diminuée dans la rhizosphère avec 35,90 %, 18,75 % et 34,80 % pour les génotypes Biskra, Karam et Al-Fares, respectivement, ce qui suggère l'importance du calcium pour la croissance de *C. annuum*. Saure (2005) a également signalé le rôle du calcium dans la croissance des plantes, le développement des fruits et de nombreux processus biochimiques et physiologiques.

La rhizosphère des trois génotypes étudiés de *C. annuum* présente une teneur élevée en argile par rapport aux sols non-rhizosphériques. Whiteley (1989) a expliqué la forte proportion d'argile près des racines de *Pisum sativum* par la sécrétion du mucilage, qui augmente le potentiel hydrique du sol et génère par conséquent une teneur élevée en argile dans la rhizosphère. En effet, pour atteindre leur croissance, les racines des plantes peuvent modifier la structure du sol avec divers mécanismes, notamment l'ancrage, l'extraction de l'eau et l'exsudation (Jin *et al.*, 2017). Elles produisent généralement différents composés organiques tels que les sucres et les polysaccharides, les acides, les facteurs de croissance, les hormones et le mucilage (Neumann et Römheld, 2007). Certaines de ces substances visqueuses, telles que les polysaccharides, les composés phénoliques et l'acide polygalacturonique, contribuent grandement à la cohésion des petites particules de sol à la surface des racines (Song *et al.*, 2015).

Une quantification de l'ADNr 16S a été réalisée par PCR en temps réel, afin de déterminer le nombre de copies du gène 16S présent dans les échantillons de sol prélevés. En fait, les

techniques de PCR en temps réel se sont, ces dernières années, imposées comme des techniques de références pour la mesure de la densité des communautés microbiennes dans différents écosystèmes, tels que les sols, l'eau ou les sédiments (Stults *et al.*, 2001 ; Bach *et al.*, 2002 ; Dionisi *et al.*, 2003 ; Harms *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2006). Ainsi, nous nous sommes intéressés à la communauté bactérienne, en raison de leur dominance et de leur rôle majeur dans les différents cycles biogéochimiques par le biais de plusieurs processus tels que la décomposition, la minéralisation et la promotion de croissance des plantes (Hayat *et al.*, 2010). En se basant sur la quantité de copies de gènes, les valeurs obtenues sont inférieures à celles obtenues par d'autres auteurs (Cregut, 2009 ; Wessén *et al.*, 2010), ces valeurs peuvent être attribuées à la faible teneur en azote et/ou la teneur modérée en carbone organique. L'augmentation significative du nombre de copies de gènes autour des racines des deux génotypes (Biskra et Karam) de *C. annuum* a prouvé la stimulation de la croissance autour des racines des plantes, ce qui confirme les résultats des études précédentes sur la population microbienne de la rhizosphère de différentes espèces végétales (Jones *et al.*, 2004 ; Wessén *et al.*, 2010 ; Rachid *et al.*, 2013 ; Navarrete *et al.*, 2015 ; Breidenbach *et al.*, 2016). En fait, dans la rhizosphère, les plantes libèrent jusqu'à 10 % de carbone fixé et 15 % d'azote (Venturi et Keel, 2016), y compris un ensemble de molécules nutritives susceptibles de favoriser la croissance du rhizobiome, à la différence du sol non-rhizosphérique, qui est rapidement épuisé par les microorganismes hétérotrophes.

La diversité microbienne est un bio-indicateur robuste et sensible pour décrire la qualité microbiologique des sols agricoles dans des contextes très variés. Cet indicateur permet de mettre en évidence tout changement ou impact sur le sol, il peut donc représenter un outil performant pour l'évaluation des systèmes agricoles, aidant ainsi à une amélioration de leur mode de gestion et, à long terme, permettant une utilisation durable des ressources fournies par ces sols (Bourgeois, 2016). Les techniques d'empreintes génétiques sont devenues populaires pour caractériser la diversité, la structure et la dynamique des communautés microbiennes du sol (Wu *et al.*, 2015). La technique de T-RFLP devient l'une des approches les plus utiles en écologie microbienne pour la comparaison et le profilage rapides de la diversité de la population microbienne dans la rhizosphère (Szoboszlay *et al.*, 2015 ; Zhai *et al.*, 2018). Elle permet d'analyser la structure d'un large éventail de microorganismes avec une grande reproductibilité. De plus, elle constitue un moyen pratique pour comparer différents échantillons (Rincon-Florez *et al.*, 2013).

Dans notre étude, par rapport à d'autres systèmes agricoles, les valeurs de l'indice de diversité (indice de *Shannon-Wiener*) et des OTU sont proches à ceux rapportées par García-Salamanca *et al.* (2013) qui ont analysé le sol rhizosphérique et non- rhizosphérique d'une culture de Maïs. La caractérisation de la communauté microbienne par l'approche moléculaire, nous a permis d'identifier des différences majeures aux seins des populations bactériennes chez le génotype Biskra. Décrits dans la littérature, les exsudats racinaires ont un effet sur la diversité microbienne (Micallef *et al.*, 2009). Sasse *et al.* (2018) ont conclu que la quantité et la composition des exsudats racinaires modulent la biodiversité microbienne dans la rhizosphère. De même, Steinauer *et al.* (2016) ont signalé que l'inoculation avec divers mélanges d'exsudats augmente la diversité microbienne. D'autres parts, les variations de la population microbienne au sein de la rhizosphère peuvent être le résultat d'une réponse de défense induite par des molécules associées aux microorganismes ou aux agents pathogènes. En réalité certaines molécules et enzymes bactériennes telles que la flageline, le peptidoglycane, la chitine, la superoxyde dismutase, *etc*, sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de formes localisés à la surface des cellules végétales, activant ainsi des réponses de défense induites (Newman *et al.*, 2013) ; de ce fait, les molécules antimicrobiennes produites à travers ce phénomène sont capables d'influencer, indirectement, la diversité microbienne dans la rhizosphère. De plus, selon Ofek-Lalzar *et al.* (2014) et Haney *et al.* (2015), le profil de cette réponse peut varier selon les espèces des plantes et selon les accessions d'une même espèce.

Les rhizosphères des génotypes Karam et Biskra ont présenté des diversités microbiennes statistiquement similaires à celles des sols non rhizosphériques, ce qui peut être expliqué par une faible exsudation ou par sa diminution au cours des stades de développement de la plante. En réalité, il a été rapporté que la nature et la quantité des composés exsudés varient au cours du temps et la rhizodéposition diminue, en particulier, lors des stades de reproduction des végétaux. En effet, lors de la floraison de la plante, les organes reproducteurs constituent des organes puits limitant la rhizodéposition dans le sol (Kuzyakov et Domanski, 2000). D'autres auteurs suggèrent que la diffusion des composés ne peut être pertinente que dans les tissus racinaires jeunes et que l'exsudation chez certaines plantes diminue avec le stade de développement à cause d'une altération de quelques transporteurs vacuolaires, ce qui, par conséquent, change les concentrations vacuolaires et cytosoliques en réduisant ainsi l'exsudation (Sasse *et al.*, 2018).

Les trois cultivars de *C. annuum* analysés ont exercé un effet différent sur la diversité bactérienne, suggérant la différence d'exsudats de racines pour les membres de la même espèce

végétale, ce qui démontre que la génétique de l'hôte contribue à l'assemblage du microbiote de la plante. Par analyse de 12 acides aminés et 7 sucres, Naqvi et Chauhan (1980) ont observé des différences quantitatives et qualitatives remarquables entre les exsudats racinaires de trois cultivars de *C. annuum*. Cependant, une faible variation est enregistrée entre le stade végétatif et le stade de floraison pour chaque génotype. Selon Sasse *et al.* (2018), la différence entre les exsudats racinaires des génotypes peut être le résultat d'une différence au niveau de la régulation de transport des exo-métabolites ; ces métabolites nécessitent de traverser au minimum une membrane pour passer du cytoplasme des cellules radiculaires à la rhizosphère. Dans ce contexte, Okwuchukwu *et al.* (2014) ont révélé quelques différences morphologiques dans des coupes histologiques de cinq génotypes de *C. annuum* telles que l'épaisseur du parenchyme et sa morphologie ainsi que le nombre des vaisseaux. Bien que notre étude soit la première qui exploite l'influence du génotype de *C. annuum* sur le microbiote du sol, des travaux précédents ont montré l'effet du génotype chez d'autres plantes, Bouffaud *et al.* (2012) ont indiqué que cinq génotypes de *Zea mays* ont influencé différemment la diversité des rhizobiomes chez des plantules âgées de 21 jours. Les mêmes résultats ont été obtenus en analysant la diversité microbienne des accessions d'*A. thaliana* (Micallef *et al.*, 2009 ; Mönchgesang *et al.*, 2016). D'autre part, d'autres études ont signalé des rhizobiomes similaires à ceux du sol non-rhizosphérique en analysant la rhizosphère du riz et de l'orge (Bulgarelli *et al.*, 2015 ; Edwards *et al.*, 2015).

En conclusion, ce chapitre a contribué à l'explication des principaux changements de la rhizosphère de *C. annuum* par rapport au sol non-rhizosphérique. Les résultats ont montré que la rhizosphère possède une texture de sol différente, un pH bas et une faible teneur en carbonates. La croissance bactérienne est plus abondante autour des racines, cependant, la diversité bactérienne a augmenté de manière significative avec un seul génotype (Biskra). Cette étude a montré l'effet du génotype de *C. annuum* sur la modulation des caractéristiques microbiologiques de la rhizosphère. Ces résultats pourraient être utiles en ce qui concerne la compréhension de la relation sol/racines de l'agro-écosystème de *C. annuum*.

## Chapitre 2 : Effet de trois génotypes de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques des PGPB, et analyse de la dépendance entre les quatre activités promotrices de croissance

À travers la rhizodéposition, les racines des plantes peuvent stimuler et moduler le microbiote du sol (Mhlongo *et al.*, 2018). Les exsudats racinaires des plantes stimulent principalement les PGPB, ces bactéries contribuent à la nutrition et à la protection des plantes par divers processus. Des études ont montré que les PGPB favorisent la croissance des plantes par la production des phytohormones (Glick, 2012), et en facilitant l'absorption d'éléments nutritifs tels que l'azote (Gaby et Buckley, 2011), le phosphore et le fer (Sharma *et al.*, 2013 ; Ahmed et Holmström, 2014). Les mécanismes de protection font référence à l'inhibition d'un ou de plusieurs organismes phytopathogènes (Olanrewaju *et al.*, 2017).

En fait, l'analyse de la fonction et l'activité de la communauté microbienne rhizosphérique est un indicateur important qui exprime les interactions entre la plante et le sol. De plus, seulement quelques travaux ont rapporté les interactions et la dépendance entre les caractéristiques des PGPB (Da Costa *et al.*, 2014 ; Moreira *et al.*, 2016).

L'objectif de ce chapitre est, d'une part, d'évaluer les particularités des activités de promotion de croissance des plantes dans la rhizosphère des trois génotypes de *C. annuum*, à savoir la solubilisation du phosphate, l'inhibition de phytopathogène, la production de composés indoliques et la production de sidérophores, et d'autre part, d'étudier la dépendance et l'association entre ces quatre activités.

### Matériel et méthodes

#### 1. Isolement des bactéries du sol rhizosphérique et du sol non-rhizosphérique

Des suspensions mères sont préparées par introduction de 10 g de chaque échantillon de sol dans des flacons contenant 90 ml d'eau physiologique stérile (0,85 % de NaCl). Les suspensions sont agitées à 100 rpm pendant une heure, à température ambiante. L'isolement des bactéries est réalisé sur cinq milieux de culture gélosés (annexe 1) : la gélose *LB* (Atlas 2004) ; la gélose *B* de King (Kurabachew et Wydra, 2013) ; *ISP*<sub>2</sub> (Badji *et al.*, 2005) ; *SCA* (Jeffrey, 2008) et *Olsen* (Atlas, 2004). Pour chaque échantillon, des dilutions décimales de 10<sup>-1</sup> jusqu'à 10<sup>-4</sup> sont préparées à partir des solutions mères. Par la suite, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur chaque milieu de culture. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C et elles sont vérifiées quotidiennement jusqu'à trois semaines. Les colonies présentant des aspects macroscopiques différents sont repiquées sur le même milieu d'isolement. Après trois à quatre repiquage, les

isolats purs sont conservés dans des milieux de culture liquide additionnés de glycérol à raison de 20 % (V/V) puis les tubes sont conservés à -20 °C.

## **2. Activités favorisant la croissance des plantes**

### **2.1. Production des auxines**

La production des composés indoliques est réalisée selon le protocole de Patten et Glick (1996). Les isolats bactériens sont cultivés dans un bouillon *LB* (annexe 1) additionné de L-tryptophane (1 mg/ml), l'inoculation du milieu de culture est réalisée par 50 µl d'une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Après quatre jours d'incubation, les cultures sont centrifugées à 9000 g pendant 15 min. 2 ml de réactif de Salkowsky (annexe 2) ont été ajoutés à 2 ml de surnageant et incubés à 28 °C à l'obscurité. Après une heure, l'absorbance est mesurée à 530 nm. La quantité des composés indoliques est déduite à partir d'une courbe étalon tracée en utilisant l'IAA authentique. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat.

### **2.2. Solubilisation du phosphate**

La solubilisation de phosphate est évaluée selon la méthode de Pikovskaya (1948). 5 µl d'une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC/ml sont déposés à la surface du milieu Pikovskaya (annexe 1), les boîtes de Pétri sont incubées à 29 °C pendant 8 jours. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat. Les résultats sont exprimés en mesurant le diamètre de l'halo clair autour de la culture.

### **2.3. Production des sidérophores**

La production des sidérophores est étudiée selon le protocole de Pérez-Miranda *et al.* (2007), qui consiste àensemencer un microorganisme à la surface d'un milieu de culture exempt de fer, puis, après croissance, le milieu est couvert d'une couche du milieu gélosé contenant le complexe fer/Chrome Azurol S. L'apparition d'un halo orange autour des colonies indique la production des sidérophores.

#### **2.3.1. Chélation du fer du milieu de culture**

La gélose Czapek modifiée (annexe 1) est utilisée pour tester la production des sidérophores. Le fer est éliminé du milieu de culture à travers la chélation par 8-hydroxyquinoline selon le protocole de Barton et Hemming (1993). Dans une ampoule à décanter, deux litres de milieu de culture à pH 9 sont mélangés avec 50 ml de 8-hydroxyquinoline (1 % dans le chloroforme, pH 9). Après une agitation vigoureuse, la phase du chloroforme est retirée, cette étape est répétée trois fois jusqu'à la disparition de la couleur vert-jaune de la couche du chloroforme qui caractérise la fixation du fer par le 8-

hydroxyquinoline. Le pH du milieu est abaissé jusqu'à pH 7 avec une solution d'HCl (1N), puis il est porté à l'ébullition à l'intérieur d'une hotte chimique pour éliminer les traces du chloroforme dans le milieu. Le milieu est additionné de l'agar et il est stérilisé et conservé à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

### 2.3.2. Analyse de la production des sidérophores

5 µl d'une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC/ml sont déposés à la surface du milieu de culture *Czapek* sans fer réparti en boîtes de Pétri. Après sept jours d'incubation à 30 °C, les cultures bactériennes sont additionnées de 15 ml de la gélose fer/Chrome azurol S (annexe 1). La production des sidérophores est déterminée après une heure d'incubation à température ambiante par le changement de couleur du milieu de recouvrement (du bleu à l'orange). Trois répétitions sont effectuées pour chaque isolat. Les résultats sont exprimés en mesurant le diamètre de l'halo orange.

### 2.4. Activité anti-phytopathogène

L'activité antagoniste des isolats bactériens est évaluée, contre *Fusarium oxysporum*, obtenu auprès de l'Institut National de la Protection des Végétaux (Station régionale pour la protection des végétaux, El Tarf, Algérie), en utilisant la méthode de Ji *et al.* (2014). Un cylindre de 5 mm d'une culture de ce champignon est placé sur un côté de la gélose PDA (annexe 1). Les isolats bactériens sont ensemencés par strie dans l'autre côté opposé de la boîte. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant sept jours à 28 °C. Trois répétitions sont utilisées pour chaque isolat. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, comme décrit par Khamna *et al.* (2009), en utilisant la formule suivante :

$$(C - T)/C \times 100$$

C : représente le développement du mycélium, perpendiculairement, entre le cylindre et la culture bactérienne,

T : représente le développement du mycélium dans la boîte contrôle.

## 3. Analyses statistiques

Le test de khi-carré et l'ACP sont réalisés par XLStat 2014 (addinsoft, Paris). L'analyse en composantes principales catégorielles (*Categorical principal component analysis*, CatPCA) est réalisée par IBM SPSS statistics 21.

## Résultats

### 1. Effet de *Capsicum annuum* sur les caractéristiques des PGPB

#### 1.1. Isolement des bactéries et évaluation des activités de promotion de croissance des plantes

Au total, 515 isolats bactériens, morphologiquement, différents sont isolés à partir de l'ensemble des sites d'échantillonnage, soit 301 et 214 isolats proviennent, respectivement, de l'ensemble des trois rhizosphères et des sols non-rhizosphériques. Tous les isolats bactériens ont été évalués pour leur capacité à réaliser quatre activités importantes des PGPB.

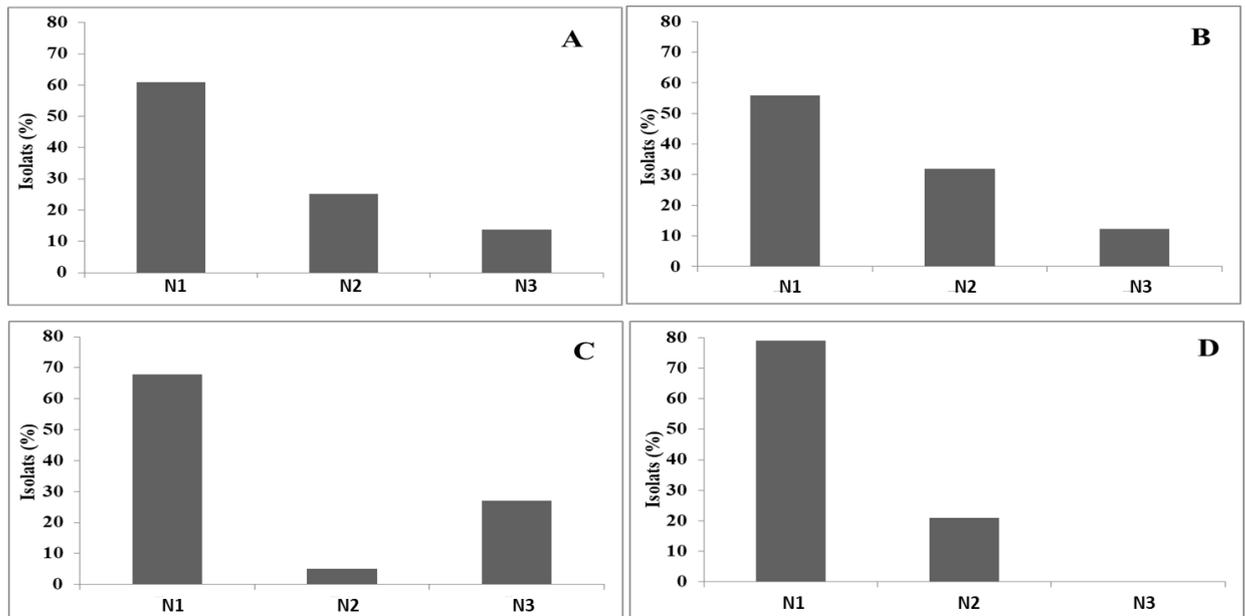
Afin de faciliter l'analyse des résultats, les quatre différentes activités stimulatrices de la croissance des plantes sont classées en trois niveaux (N).

- La production de composés indoliques est classée en : N1 (0-15) µg/ml, N2 (15–50) µg/ml et N3 (plus de 50) µg/ml.
- La production de sidérophores et la solubilisation du phosphate sont classées comme suit : N1 (sans halo), N2 (halo de 0,1 à 10) mm de diamètre et N3 (halo de plus de 10) mm de diamètre.
- L'activité anti-phytopathogène a été classée comme suit : N1 (0 à 10) %, N2 (10 à 35) % et N3 (plus de 35) %.

Les isolats produisant des auxines avec une concentration supérieure à 15 µg/ml constituent 40 %, alors que ceux produisant des sidérophores atteignent 32 % dont 63 isolats ont une production élevée (plus de 10 mm de diamètre d'halo). L'activité de solubilisation du phosphate est, relativement, la plus faible, 21 % des isolats solubilisent le phosphate et ils appartiennent tous au niveau 2 (N2= 0,1–10 mm de diamètre de halo). L'activité la plus abondante est l'inhibition du phytopathogène *F. oxysporum*, elle est présente chez 227 isolats sur 515 soit (44 %) avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 10 % pour tous les isolats actifs (Figure 15).

#### 1.2. Évaluation de l'effet de *Capsicum annuum* sur les activités des PGPB

Le tableau 6 montre la répartition des isolats bactériens par rapport aux génotypes, la nature du sol et les activités promotrices de croissance des plantes. À titre d'exemple de spécificité, le nombre d'isolats, dont la production d'auxines est du niveau 2 (15–50 µg/ml), dans les rhizosphères est, en moyenne, quatre fois supérieur à celui observé dans les sols non-rhizosphériques.



**Figure 15.** Evaluation des activités promotrices de croissance des plantes des isolats bactériens. (A) Production des auxines [N1 (0–15), N2 (15–50) et N3 (plus de 50) µg de IAA ml<sup>-1</sup>]; (B) Inhibition de *F. oxysporum* [N1 (0–10), N2 (10–35) et N3 (plus de 35) % d’inhibition]; (C) Production des sidérophores [N1 (pas d’halo), N2 (0,1–10) et N3 (plus de 10) mm de diamètre d’halo]; (D) Solubilisation de phosphate [N1 (pas d’halo), N2 (0,1–10) et N3 (plus de 10) mm de diamètre d’halo].

**Tableau 6.** Heat-map montrant l’association entre le type du sol et les quatre activités des bactéries promotrices de croissance de plantes.

Echantillonnage		Production des auxines			Inhibition de <i>F. oxysporum</i>			Production des Sidérophores			solubilisation de phosphate	
		N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2
Biskra	(NR)	50	12	7	35	29	5	46	5	18	54	15
	(R)	55	39	10	51	32	21	70	5	29	87	17
Karam	(NR)	57	5	17	47	22	10	53	3	23	59	20
	(R)	54	37	6	54	35	8	57	5	35	79	18
Al-Fares	(NR)	48	9	9	42	15	9	43	4	19	49	17
	(R)	50	28	22	59	31	10	81	4	15	79	21
Total	(NR)	155	26	33	124	66	24	142	12	60	162	52
	(R)	159	104	38	164	98	39	208	14	79	245	56

Production des auxines [N1 (0–15), N2 (15–50) et N3 (plus de 50) µg de IAA ml<sup>-1</sup>].

Inhibition de *F. oxysporum* [N1 (0–10), N2 (10–35) et N3 (plus de 35) % d’inhibition].

Production des sidérophores et Solubilisation de phosphate [N1 (pas d’halo), N2 (0,1–10) et N3 (plus de 10) mm de diamètre d’halo].

(R) : sol rhizosphérique. (NR) : sol non-rhizosphérique.

(Cellules de couleur) :

-Rouge (effectif observé plus élevé que l’effectif théorique).

-Verte (effectif théorique plus élevé que l’effectif observé).

-Jaune (pas de différence significative entre l’effectif théorique et l’effectif observé).

Afin de déterminer la spécificité de la rhizosphère de chaque génotype, le test de khi-carré d'indépendance est utilisé pour analyser l'association entre deux variables, qui sont présentées dans notre étude par la nature du sol (rhizosphérique et non-rhizosphérique) et le niveau de production de chaque activité promotrice de croissance des plantes. Les tables de contingence empirique et les tables de contingence théorique sont présentées dans l'annexe 4. Les différences entre les deux tables sont évaluées à travers les valeurs de Khi-carré de Pearson, le degré de liberté. La probabilité et le V de Cramer sont présentés aussi dans la même annexe.

Ainsi, le test de Khi-carré révèle la dépendance entre le type de sol (sol rhizosphérique ou sol non-rhizosphérique) et le niveau de production des composés indoliques pour les trois génotypes, et entre le type de sol et l'inhibition de *F. oxysporum* seulement chez un seul cultivar (Biskra). Aucune liaison n'est observée entre la nature du sol et le niveau de production des sidérophores et la solubilisation du phosphate.

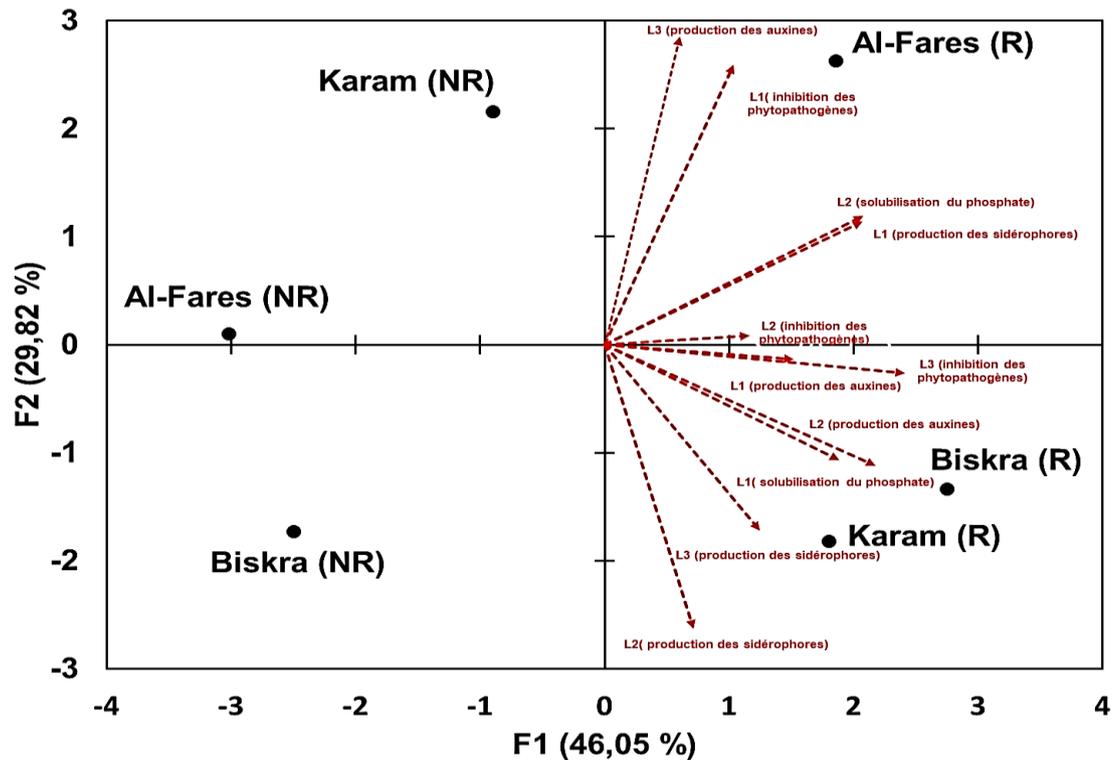
### **1.3. Analyse en composantes principales**

L'ACP élaborée par l'utilisation des résultats des quatre activités (figure 16) montre que les axes F1 et F2 représentent, respectivement, 46,09 % et 29,82 % de la variabilité totale. Selon cette analyse, le premier axe (F1) sépare les sols rhizosphériques des sols non-rhizosphériques. Le résultat de cette analyse est très similaire au résultat de l'ACP réalisée au dépend du profil génétique (T-RFLP) et les analyses physicochimiques du sol, ce qui révèle l'importance de l'analyse des activités promotrices de croissance des plantes dans la rhizosphère et la possibilité de prendre en considération les niveaux de production comme un caractère de distinction de la rhizosphère par rapport au sol non-rhizosphérique.

## **2. Association entre les quatre activités de promotion de la croissance de plantes**

### **2.1. Analyse en composantes principales catégorielles**

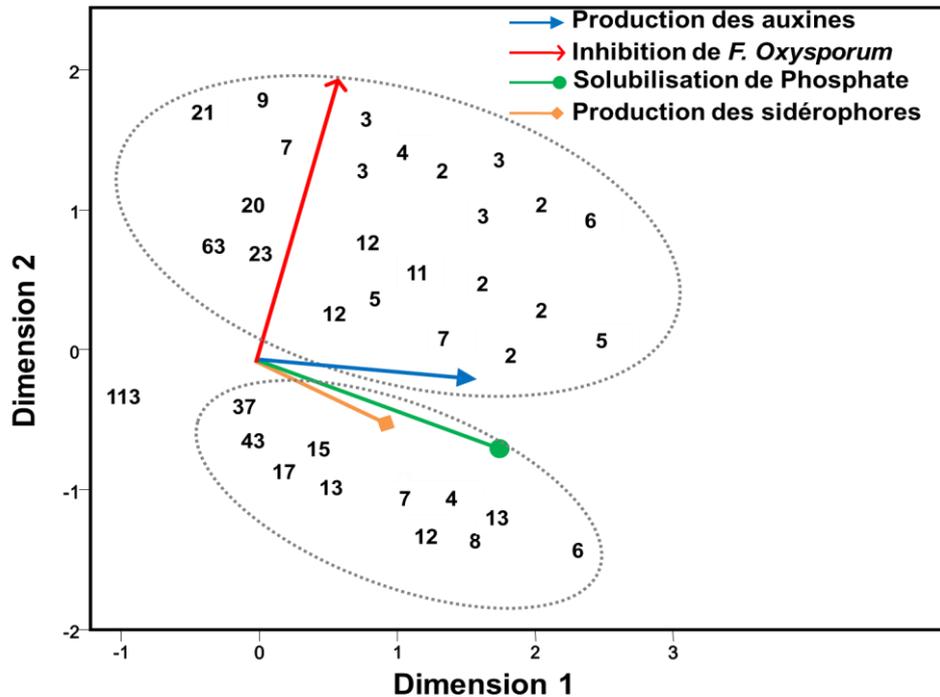
Afin de déterminer la corrélation statistique entre les quatre caractéristiques des PGPB, une Analyse en composantes principales catégorielles (CatPCA) a été utilisée. Cette méthode est très utile, elle permet de mieux observer les résultats lors du regroupement de différentes questions de recherche. De plus, la classification en catégories réduit la complexité des résultats lorsqu'ils sont exprimés avec plusieurs unités différentes. Cette analyse quantifie simultanément des variables catégorielles en réduisant la dimensionnalité des données. Le but d'une telle analyse est de réduire un groupe original de variables en un groupe plus petit de composantes non corrélées représentant la plupart des informations rencontrées dans les variables d'origine.



**Figure 16.** Analyse en composantes principales basée sur les niveaux de production des quatre activités promotrices de croissance de plantes.

La CatPCA diffère de la ACP car elle permet d'analyser un ensemble de données continues et catégoriques, mais elle ne permet pas de calculer le pourcentage d'explication de chaque dimension en raison de la présence de variables catégorielles et/ou nominales (Da Costa *et al.*, 2014).

La figure 17 représente le résultat de la CatPCA obtenu par l'analyse des quatre activités. L'indice alpha de Cronbach est de l'ordre de 0,762, ce qui est satisfaisant, puisqu'il dépasse le seuil minimum requis de 0,70 (Nunnally, 1978). Les quatre vecteurs augmentent vers les valeurs positives de la première dimension, alors que seule l'inhibition de *F. oxysporum* évolue avec la deuxième dimension, ce qui démontre que l'activité anti-phytopathogène n'est pas associée aux autres activités. Le vecteur de la solubilisation du phosphate est très proche à ceux de la production des composés indoliques et de la production des sidérophores. L'ensemble des isolats bactériens est séparé en deux groupes de taille différente, le groupe le plus chargé est associé avec l'activité anti-phytopathogène et à la production de composés indoliques, et le petit groupe est associé à la production des sidérophores et à la solubilisation du phosphate.



**Figure 17.** Analyse en composantes principales catégorielles reliant les quatre activités de promotion de croissance de plantes. Indice alpha de Cronbach égale à 0,762. Les flèches indiquent la direction des vecteurs. Les chiffres indiquent la position et le nombre d'isolats bactériens présentant les mêmes caractéristiques.

## 2.2. Test d'indépendance du Khi-carré

La CatPCA, est une méthode qui ne teste pas les hypothèses et ne renvoie pas les valeurs de probabilité pour les associations ou les corrélations, de ce fait, pour déterminer la dépendance entre les variables, le test de khi-carré est utilisé pour tester directement une hypothèse. Le tableau 7 montre une Heat-map qui exprime la liaison entre les activités.

Les tables de contingence empirique et les tables de contingence théorique, associées à cette analyse, sont présentées dans l'annexe 4. Les différences entre les deux tables sont évaluées à travers les valeurs de Khi-carré de Pearson, le degré de liberté, la probabilité et le V de Cramer qui sont présentés aussi dans l'annexe 4. Selon ces résultats, les niveaux de solubilisation du phosphate ont à la fois une dépendance avec les niveaux de production des sidérophores et les niveaux de production des auxines. Pour les autres activités, aucune association entre les niveaux de production n'est observée.

**Tableau 7.** Heat-map montre l'association de la solubilisation du phosphate et la production des sidérophores et des auxines.

		Solubilisation du phosphate			Production des auxines			Production des sidérophores			Inhibition du phytopathogène		
		N1	N2		N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Solubilisation du phosphate	N1			270	98	39	293	17	97	229	132	46	
	N2			44	32	32	57	9	42	59	32	17	
Production des auxines	N1						219	16	79	181	98	35	
	N2						86	7	37	69	45	16	
	N3						45	3	23	38	21	12	
Production des sidérophores	N1									198	113	39	
	N2									17	9	0	
	N3									73	42	24	

Production des auxines [N1 (0–15), N2 (15–50) et N3 (plus de 50) µg de IAA ml<sup>-1</sup>].

Production des sidérophores et de Solubilisation de phosphate [N1 (pas d'halo), N2 (0,1–10) et N3 (plus de 10) mm de diamètre d'halo].

(Cellules de couleur) :

-Rouge (effectif observé plus élevé que l'effectif théorique).

-Verte (effectif théorique plus élevé que l'effectif observé).

-Jaune (pas de différence significative entre l'effectif théorique et l'effectif observé).

## Discussion

Un total de 515 isolats bactériens a été obtenu à partir de l'ensemble des échantillons de sol, les isolats ont été soumis à une analyse de quatre caractéristiques des bactéries promotrices de croissance des plantes, il s'agit de la production des auxines et des sidérophores, la solubilisation de phosphate et l'inhibition de *F. oxysporum* par ces isolats. Les résultats nous ont mené à étudier les caractéristiques du microbiote rhizosphérique par rapport au microbiote du sol environnant et de déterminer le type de liaison entre les niveaux de production des quatre activités.

Le phosphore est l'un des nutriments les plus importants pour la croissance et le développement des plantes. Dans le sol, une fraction importante de phosphore est insoluble et relativement indisponible pour les plantes. Les bactéries solubilisant le phosphate inorganique ont la capacité d'augmenter la disponibilité de phosphore (Bhattacharyya et Jha, 2012). Plusieurs théories ont expliqué les mécanismes de la solubilisation du phosphate inorganique. Comme observé dans de nombreuses expériences, le mécanisme principal est la production de composés dissolvant les minéraux tels que les acides organiques, les sidérophores, les protons, les ions hydroxydes et le CO<sub>2</sub> (Alori *et al.*, 2017). Dans notre étude, la solubilisation du phosphate est l'activité la plus faible observée à la fois dans la rhizosphère et dans les sols non-rhizosphériques. Ce

résultat peut être attribué à la fertilisation régulière des sols agricoles par le phosphate. En effet, Moreira *et al.* (2016) ont analysé la communauté microbienne de la rhizosphère du blé et ils ont observé que la solubilisation du phosphate est la capacité la plus rare et ne s'est produite que chez 55 isolats sur 346, dont le sol a été soumis à un régime régulier de fertilisation au phosphate. En analysant le microbiote bactérien isolé de sept zones de production de riz, seulement 22 parmi 296 isolats ont été capables de solubiliser le phosphate (Beneduzi *et al.*, 2008). Da Costa *et al.* (2014) ont signalé que la capacité de solubilisation du phosphate par les bactéries augmente lorsque la richesse du sol en nutriment diminue, Hu *et al.* (2009) ont constaté que les bactéries solubilisant le phosphate sont plus métaboliquement actives dans les sols en déficience de phosphate. Ainsi, nos résultats sont en accord avec ces études.

Le criblage pour la production des composés indoliques montre qu'un grand pourcentage d'isolats est capable de produire ces régulateurs de croissance, leur quantification montre que les concentrations observées sont supérieures aux valeurs précédemment relevées par Khalid *et al.* (2004), Yasmin *et al.* (2007), Ng *et al.* (2012) et Ji *et al.* (2014). En fait, la production des auxines est un caractère commun entre plusieurs espèces microbiennes du sol. Les microorganismes producteurs des auxines sont connus pour favoriser l'élongation des racines et la croissance des plantes (Patten et Glick, 2002). Les composés indoliques, tels que l'IAA, contrôlent de nombreux processus physiologiques importants, notamment l'élargissement et la division des cellules, la différenciation des tissus et les réponses à la lumière (Khalid *et al.*, 2004 ; Frey-Klett *et al.*, 2005 ; Leveau et Lindow, 2005).

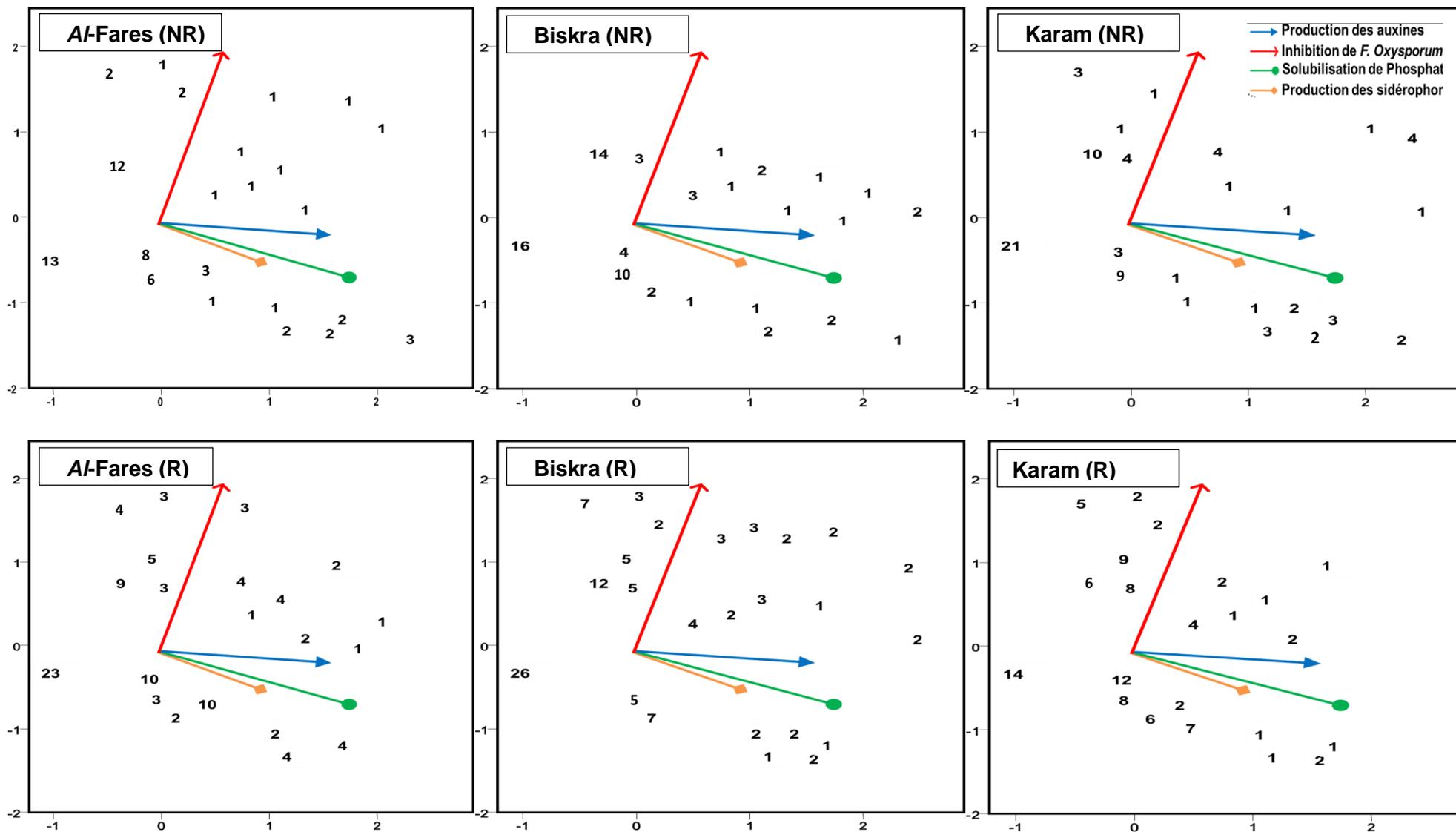
La production élevée des sidérophores par plusieurs isolats peut être liée à la légère alcalinité de nos sols. En fait, dans les sols alcalins, le fer est présent principalement sous forme de  $Fe^{3+}$ , qui est insoluble et donc inaccessible (Gómez-Galera *et al.* 2012), par conséquent, les microorganismes du sol déclenchent la production des sidérophores pour permettre de piéger ce métal (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

L'inhibition du phytopathogène *F. oxysporum* est l'activité la plus abondante parmi les 515 isolats, cela est peut-être dû à la diversité des mécanismes employés par les bactéries du sol pour le contrôle des agents phytopathogènes, qui sont, majoritairement, la production d'enzymes extra-cellulaires hydrolysant la paroi cellulaire fongique, la compétition pour les nutriments et la production de plusieurs types de composants antifongiques (Etesami et Maheshwari, 2018).

Il a été démontré, par nos travaux, qu'il existe une différence fonctionnelle entre les isolats de la rhizosphère et ceux du sol non-rhizosphérique. La CatPCA exprime les différences selon la nature du sol et le type du génotype. Les isolats sont affichés, visuellement, pour chaque type, alors que les autres sont masqués (figure 18). Cette analyse montre une répartition différente des isolats de la rhizosphère par comparaison au sol environnant de chaque génotype. La répartition la plus hétérogène est observée pour le génotype Biskra montrant ainsi le contrôle du microbiote par ce cultivar. L'analyse de la dépendance entre les deux types de sol (rhizosphérique et non-rhizosphérique) et le niveau de production des composés indoliques montre la stimulation de la production de ces composés par le microbiote rhizosphérique des trois génotypes. De même, Beneduzi et ses collaborateurs, ont également montré, d'une part, que les isolats de la rhizosphère produisent plus d'auxines que les isolats du sol non-rhizosphérique (Beneduzi *et al.*, 2008), et d'autre part, ils ont mis en évidence que la majorité des souches bactériennes isolées de la rhizosphère produisent des composés indoliques (Beneduzi *et al.*, 2013). En fait, les exsudats racinaires servent de messagers entre les racines et les rhizobactéries dans la rhizosphère (Walker, 2003), il a été rapporté que les rhizobactéries peuvent produire un ou plusieurs types de phytohormones, et que les gènes responsables de cette activité peuvent être activés par des composants organiques qui sont abondants dans les coiffes racinaires et les zones d'élongations (Hassan *et al.*, 2019). Dans le même contexte, Lakshmanan *et al.* (2013) ont rapporté que le traitement des racines d'*A. thaliana* par une souche de *B. subtilis* a exprimé plusieurs gènes chez cette bactérie, incluant les gènes de régulation du métabolisme des auxines.

Une association entre le type de sol et le niveau d'inhibition de *F. oxysporum* est observée juste avec le génotype Biskra, ce qui suggère la stimulation d'un microbiote rhizosphérique, distincts. Ce résultat corrobore avec celui du premier chapitre où on a démontré un microbiote rhizosphérique génétiquement différent pour ce cultivar.

La stimulation d'un microbiote actif contre les phytopathogènes est liée à la nature des exsudats racinaires. Dans ce contexte, Rudrappa *et al.* (2008) ont constaté qu'une exsudation accrue de l'acide malique dans la rhizosphère favorise la croissance de *Bacillus subtilis*, qui colonise ensuite la rhizosphère et même la plante, en formant un biofilm et en protégeant ainsi les racines contre toute agression par les phytopathogènes.



**Figure 18.** Analyse en composantes principales catégorielles exprimant les résultats selon le génotype et le type de sol. Les flèches indiquent la direction des vecteurs. Les chiffres indiquent la position et le nombre d'isolats bactériens présentant les mêmes caractéristiques.

Le test de khi-carré a montré la dépendance entre les niveaux de solubilisation du phosphate et la production des sidérophores. En fait, dans la littérature les liaisons entre la solubilisation du phosphate et la production des sidérophores sont multiples, Des études ont rapporté la libération de sidérophores par des bactéries solubilisant le phosphate (Vassilev *et al.*, 2006 ; Caballero-Mellado *et al.*, 2007 ; Hamdali *et al.*, 2008 ; Scagliola *et al.*, 2016). À son tour, le phosphate libéré par les bactéries solubilisant le phosphate est considéré comme une molécule chélatrice du fer. La dépendance entre la solubilisation du phosphate et la production des sidérophores peut être liée à la nature des molécules qui assurent les deux activités, en fait, quelques acides tels que l'acide citrique peut chélater le fer comme il peut solubiliser le phosphate en même temps (Osorio, 2011 ; Desai et Archana, 2011). De plus, les sidérophores peuvent assurer la solubilisation du phosphate inorganique à travers la chélation du fer et/ou d'autres métaux qui sont associés avec le phosphore ce qui le rend disponible indirectement (Sharma *et al.*, 2013 ; Alori *et al.*, 2017). Notre étude a confirmé celle de Da Costa *et al.* (2014) qui ont montré l'association de la production de sidérophores à la solubilisation du phosphate.

Le test de khi-carré a permis de visualiser une dépendance entre les niveaux de solubilisation du phosphate et la production des composés indoliques. Une association entre la production de composés indoliques et les niveaux de solubilisation du phosphate a déjà été observée dans les travaux de Chaiharn et Lumyong (2011) qui ont montré que les meilleurs isolats producteurs de composés indoliques présentent une solubilisation élevée du phosphate. Cette dépendance est peut-être dû la nature acide des composés indoliques et de leurs intermédiaires métaboliques (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Bien que plusieurs études ont rapporté l'activité antimicrobienne des sidérophores (Kline *et al.*, 2000 ; Ahmed et Holmström 2014), et la grande sensibilité de *F. oxysporum* à ces molécules (Maindad *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2017), les résultats de la CatPCA et du test de khi-carré ont indiqué que l'inhibition de *F. oxysporum* et la production des sidérophores sont indépendantes. Ce résultat plutôt inattendu, peut être expliqué par les conditions de production et de libération des sidérophores dans le milieu. Selon la littérature, les sidérophores ne sont sécrétés qu'en état de carence en fer (Ahmed et Holmström, 2014), ce qui suggère que ces molécules n'ont pas été utilisées en tant qu'agent inhibiteur dans un milieu riche en nutriments, et que les bactéries ont utilisé d'autres mécanismes de défense tels que la synthèse d'un ou de plusieurs antibiotiques et/ou antifongiques et la production des enzymes lytiques (Leelasuphakul *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.*, 2011 ; Olanrewaju *et al.*, 2017).

En conclusion, cette étude a contribué à l'explication des principaux changements de quatre activités de promotion de la croissance des plantes dans la rhizosphère de trois cultivars de *C. annuum* par rapport au sol non-rhizosphérique. Parmi les quatre caractéristiques de PGPB analysées, seule la production de composés indoliques est stimulée dans la rhizosphère des trois cultivars. L'activité anti-phytopathogène n'est stimulée que par un seul génotype. Les interactions entre les caractéristiques des PGPB ont révélé que l'activité anti-phytopathogène n'est pas associée aux autres caractéristiques ; par contre, la solubilisation du phosphate est associée aux productions des sidérophores et des composés indoliques.

### Chapitre 3 : Isolement des bactéries endophytes et étude *in vitro* de leurs activités de promotion de croissance des plantes.

Les bactéries endophytes sont considérées comme une sous-classe de bactéries rhizosphériques. Il s'agit en fait d'un groupe spécialisé de rhizobactéries qui ont acquis la capacité d'envahir leur hôte végétal. Ils partagent tous les traits importants compatibles avec la promotion de la croissance de la plante hôte trouvée chez les rhizobactéries. Cependant, les effets bénéfiques fournis par les bactéries endophytes aux plantes hôtes sont généralement supérieurs à ceux fournis par de nombreuses bactéries rhizosphériques (Afzal *et al.*, 2019).

L'objectif de ce chapitre est l'évaluation des capacités de la promotion de la croissance des plantes, *in vitro*, des endophytes cultivables des racines de trois génotypes. Cette partie vise une étude approfondie sur les activités les plus importantes, telles que la voie métabolique utilisée pour la production des phytohormones, la nature des sidérophores produits et la nature des molécules participant dans le quorum sensing des isolats endophytes.

#### Matériel et méthodes

##### 1. Isolement des bactéries endophytes

L'isolement des bactéries endophytes est réalisé à partir des rhizomes de trois génotypes de *C. annuum* (Karam, Al-Fares et Biskra).

La désinfection des racines est réalisée selon le protocole de Coa *et al.* (2004) avec modification. Un mélange de racines de 10 cm de longueurs, avec un poids total de 10 g, est lavé abondamment avec l'eau de robinet pour éliminer le sol attaché. La désinfection des parties racinaires est réalisée par une immersion successive dans de l'éthanol à 70 % pendant 5 min, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % pendant 10 min. Les racines sont lavées cinq fois avec l'eau distillée stérile. Sous une hotte microbiologique, les racines sont coupées en petits morceaux, puis broyées à l'aide d'un mortier stérile, ensuite, à l'aide d'une pince stérile, les broyats sont transférés à des flacons contenant 90 ml de l'eau physiologique stérile. Pour assurer le bon détachement des bactéries endophytes, les flacons sont mis en agitation à 180 rpm pendant une heure à température ambiante. Des aliquotes de 50 µl sont étalés à la surface de cinq milieux de culture gélosés (annexe 1) : la gélose *LB* (Atlas, 2004) ; la gélose *B* de *King* (Kurabachew et Wydra, 2013) ; *ISP*<sub>2</sub> (Badji *et al.*, 2005) ; *SCA* (Jeffrey, 2008) et *Olsen* (Atlas, 2004).

Afin de vérifier la bonne désinfection, quelques morceaux des racines désinfectées, ainsi que l'eau distillée du dernier lavage, sontensemencées à la surface des milieux d'isolement. Une absence de croissance après une semaine indique la réussite de la procédure de désinfection.

## 2. Production des auxines

Les isolats bactériens sont cultivés sur milieu *TSB* (Annexe 1). La production des composés indoliques est étudiée en absence et en présence de 500 µg/ml de L-tryptophane. Après centrifugation à 6000 g pendant 15 min, le surnageant est utilisé pour le dosage des composés indoliques.

### 2.1. Analyse par dosage colorimétrique

L'analyse par dosage colorimétrique est réalisée selon la méthode de Patten et Glick (1996) (cf. § 2.1. de Matériel et Méthodes, chapitre 2).

### 2.2. Analyse par GC-MS

100 µl de surnageant sont lyophilisés et additionnés d'un mélange de BSTFA et pyridine (V/V). Après chauffage à 60 °C pendant deux heures, le mélange est analysé par GC-MS en utilisant un système GC 7890A interfacé à un spectromètre quadripolaire 5975C MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) qui est équipé d'une source d'ionisation à impact électronique (EI) de 70 eV. Les analyses sont effectuées à l'aide d'une colonne capillaire Agilent HP-5MS (95 % diméthyl/5 % phenyl polysiloxane, 30 m × 0,25 mm, avec une épaisseur de film de 0,25 µm). Le volume injecté est 1 µl en mode Split (25:1). La température de l'injecteur d'entrée est 230 °C et la température de la ligne de transfert est de 280 °C. La température de la source d'ions est réglée à 250 °C. Les conditions de four utilisées sont les suivantes : une température initiale de 250 °C, un gradient de 6 °C/min jusqu'à 280 °C, 10 min à 280 °C. L'hélium est le gaz vecteur circulant à 1,1 ml/min. Les échantillons sont analysés avec les deux modes « *Full scan* » et « *Selected ion monitoring, SIM* ». Les résultats sont analysés par comparaison à une base de données créée par l'utilisation de différents composés indoliques purs, principalement : IAM, IAN, ILA, TOL, IAA, IPyA, acide indole-3-butyrique (*Indole-3-butyric acid, IBA*), acide indole-3-propionique (*Indole-3-propionic acid, IPA*), tryptamine (TRY). De plus, indole-3-acétique acide méthylé (2,4,7-Triméthyl-1H-indol-3-yl-acétique acide) est utilisé en tant qu'étalon interne. Les courbes étalons, permettant de quantifier les composés indoliques les plus abondants, sont mentionnées dans l'annexe 3.

### 3. Production des sidérophores

#### 3.1. Production des sidérophores sur milieu solide

La production des sidérophores est étudiée selon le protocole de Pérez-Miranda *et al.* (2007) (cf. § 2.3. de Matériel et Méthodes, chapitre 2).

#### 3.2. Production des sidérophores sur milieu liquide

Une fois la production de sidérophores est confirmée par le test CAS, des tests supplémentaires sont utilisés pour déterminer le type des sidérophores.

##### 3.2.1. Culture des isolats

Les isolats bactériens sont mis en culture dans 5 ml du milieu *FMM* pour les bactéries à Gram positif et le milieu succinate pour les bactéries à Gram négatif (Annexe 1). La production des sidérophores est étudiée à une concentration de 0,04  $\mu\text{M}$  de fer, dont les milieux de culture sont préparés avec l'eau ultra-pure. Afin d'éliminer la contamination par le fer, toute la verrerie utilisée est rincée avec du HCl 3M puis avec de l'eau ultra-pure. Après centrifugation à 6000 g pendant 15 min, le surnageant est utilisé pour la recherche des sidérophores par dosage colorimétrique et par UHPLC-MS/MS.

##### 3.2.2. Dosage des hydroxamates

Les sidérophores de type hydroxamates peuvent être détectés en utilisant le dosage du perchlorate de fer (Atkin *et al.*, 1970). 0,5 ml de surnageant sont ajoutés à 2,5 ml d'une solution contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  dans 0,1 M de  $\text{HClO}_4$ . Après une bonne agitation, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 5 min. L'absorbance est mesurée à 480 nm et les concentrations sont déduites à partir d'une courbe étalon produite par la desferrioxamine B.

##### 3.2.3. Dosage des catécholates

Le deuxième test colorimétrique utilisé pour déterminer le type de sidérophore est le test d'Arnou (Arnou, 1937) qui détecte la présence de groupes fonctionnels de catécholates en produisant un complexe de couleur jaune. 1 ml de surnageant est additionné à, 1 ml de HCl (0,5M), 1 ml de réactif de nitrite-molybdate (10 g de nitrite de sodium et 10 g de molybdate de sodium dans 100 ml ddH<sub>2</sub>O) et 1 ml de NaOH (1M). Le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 500 nm et les concentrations sont déduites à partir d'une courbe étalon préparée par l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque.

##### 3.2.4. Analyse par UHPLC-MS/MS Q Exactive

Les surnageants des cultures des isolats sont utilisés pour la détermination du type des sidérophores par UHPLC-MS/MS Q Exactive. Toutes les analyses sont effectuées à l'aide d'un

système de chromatographie en phase liquide Thermo Scientific composé d'un UHPLC binaire Dionex Ultimate 3000 RS connecté à un spectromètre de masse hybride quadripôle orbitrap Q Exactive (ThermoFisher Scientific) avec une sonde d'ionisation HESI. Le logiciel Xcalibur est utilisé pour le contrôle des instruments et l'acquisition et l'analyse des données. La séparation est effectuée sur une colonne C18 Kinetex EVO C18 (2,1 x 100 mm, 2,6 µm, 100A) (Phenomenex). Le volume d'injection est 5 µl et le débit est 0,4 mL/minute. Deux solvants différents sont utilisés comme phase mobile : l'eau (solvant A) et le méthanol (solvant B), les deux avec 0,1 % d'acide formique. Le gradient suivant est utilisé : 10 % B (1 min), gradient linéaire jusqu'à 100 % B (14 min), puis 10 % B pour revenir aux conditions initiales.

Le mode balayage « *Full scan* » est utilisée avec une résolution de 70 000 FWHM (FWHM–Largeur à mi-hauteur, *Full width at half maximum*) à  $m/z$  200. Les paramètres de la source ionisation électrospray chauffée (HESI) sont les suivants : tension de pulvérisation, 3,5 kV; niveau de l'objectif S, 50; température capillaire, 275 °C; flux de gaz de gaine, auxiliaire et de balayage, 48, 11 et 2 (unités arbitraires), respectivement; et température du chauffage de la sonde, 400 °C. Pour le traitement des données, le logiciel TraceFinder 3.3 est utilisé. L'identification est faite en comparant (écart maximal de 5 ppm) les masses exactes de l'ion pseudomoléculaire avec les données contenues dans une base de données des sidérophores. Des scores de motifs isotopiques « *Isotopic pattern scores* » supérieurs à 80 % sont également requis.

#### **4. Détection et inhibition du quorum**

##### **4.1. Culture des isolats et des biocapteurs**

Les isolats bactériens sont mis en culture sur milieu *TSB* (Annexe 1) jusqu'à la phase stationnaire. Après centrifugation à 6000 g pendant 15 min, le surnageant est utilisé pour la recherche de la détection et/ou l'inhibition du quorum.

Les souches tests utilisées sont *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) et *C. violaceum* CV026. Les deux biocapteurs sont cultivés auparavant dans un bouillon *YM* (annexe 1) jusqu'à la phase stationnaire.

##### **4.2. Détection du quorum**

###### **4.2.1. Détection biologique par biocapteurs**

La détection des AHL est réalisée pour les bactéries à Gram négatif en adaptant la méthode de Cha *et al.* (1998).

La méthode consiste à fixer des cylindres métalliques stériles de 0,8 cm de diamètre à la surface de boîte de Pétri. Une couche du milieu gélosé *YM* à 1,2 % d'agar est coulée, cette première couche sert comme support. La deuxième couche est formée d'un mélange de 20 ml du milieu *YM* à 2 % d'agar et 20 ml du bouillon *YM* contenant le biocapteur. Pour la souche *A. tumefaciens* NT1, ce mélange est additionné de 180 µl de l'*X-Gal* à une concentration de 40 mg/ml. Après solidification, les cylindres métalliques sont retirés délicatement et les puits formés sont remplis par 250 µl de surnageant des isolats bactériens. Le C6-HSL et le 3-oxo-C8-HSL sont utilisés comme contrôle positif avec le biocapteur *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement. Le bouillon *TSB* stérile est utilisé comme contrôle négatif. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28 °C pendant 48 h. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'un halo bleu foncé autour des puits pour le test avec le biocapteur *A. tumefaciens* NT1 et par un halo violet foncé pour le test avec le biocapteur *C. violaceum* CV026.

#### 4.2.2. Identification des AHL par HPLC-MS/MS

L'isolat présentant le meilleur résultat dans la détection du quorum est utilisé pour l'identification des AHL par HPLC-MS/MS. L'isolat est cultivé dans un volume de un litre du milieu *TSB* jusqu'à la phase stationnaire. Après centrifugation, le surnageant est extrait deux fois avec un volume de dichlorométhane. Les fractions organiques sont mélangées, séchées à l'aide de sulfate de sodium anhydre, puis concentrées à sec par évaporation rotative sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 50 % de méthanol contenant 0,1 % d'acide formique. L'extrait est filtré (0,45 µm), et analysé par UHPLC-HRMS/MS avec un système de chromatographie en phase liquide Thermo Scientific composé d'un UHPLC binaire Dionex RS connecté à un quadripôle-orbite QExactive Spectromètre de masse hybride (ThermoFisher Scientific, USA) avec sonde d'ionisation HESI. Le logiciel Xcalibur est utilisé pour le contrôle des instruments et l'acquisition de données. La séparation est effectuée en utilisant une colonne Kinetex C18 (150 x 2,1 mm ; 2,6 µm ; 100 Å) (Phenomenex) à un débit de 0,5 ml/min. Un gradient binaire composé de (A) eau et (B) méthanol, contenant tous les deux 0,1 % d'acide formique, est utilisé avec le profil d'éluion suivant : 5 % B (2 min), gradient linéaire à 100 % B (8 min), 100 % B (2 min), et enfin 5 % B (3 min). Le volume d'injection est de 5 µl. La méthode *Parallel Reaction Monitoring* (PRM) est utilisée en mode positif à la résolution 70 000 FWHM à *m/z* 200. Les espèces et masses surveillées (*M+H*) sont : C4-HSL (172.09682), C6-HSL (200.12812), C7-HSL (214.14377), C8-HSL (228.15942), C10-HSL (256.19072), C12-HSL (284.22202), C14-HSL (312.25332), 3-oxo-C6-HSL (214.10738), 3-oxo-C8-HSL (242.13868), 3-oxo-C10-HSL (270.16998), 3-oxo-C12-HSL (298.20128), 3-oxo-C14-HSL

(326.23258), 3-OH-C12-HSL (300.21693) et 3-OH-C14-HSL (328.24824). Les paramètres de la source HESI sont les suivants : tension de pulvérisation, 3,5 kV; niveau de l'objectif S, 50; température capillaire, 269 °C; flux de gaz de gaine, auxiliaire et de balayage, 53, 14 et 3 (unités arbitraires) respectivement; et température de la sonde de chauffage, 438 °C. Pour le traitement des données, le logiciel TraceFinder 3.3 est utilisé.

#### **4.3. Inhibition du quorum**

La détection du quorum quenching est réalisée pour tous les isolats bactériens en adoptant la méthode de McClean *et al.* (1997).

Des puits de 0,8 cm de diamètre sont créés à l'aide des cylindres métalliques stériles. Une couche du milieu gélosé *YM* à 1,2 % d'agar est coulée dans chaque boîte de Pétri. La deuxième couche est formée d'un mélange de 20 ml du milieu *YM* à 2 % d'agar, 20 ml du bouillon *YM* contenant le biocapteur et 6 µl de C6-HSL à une concentration de 50 µg/ml. Pour la souche *A. tumefaciens* NT1, ce mélange est additionné de 180 µl de l'*X-Gal* à une concentration de 40 mg/ml. Les puits sont remplis par 250 µl de surnageant des isolats bactériens. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28 °C pendant 48 h. La croissance des biocapteurs est accompagnée par l'apparition d'un tapis bleu pour la souche *A. tumefaciens* NT1 et un tapis violet pour la souche *C. violaceum* CV026. L'inhibition du quorum est révélée par l'apparition d'un halo clair autour des puits avec présence de la croissance du biocapteur autour des puits.

#### **5. Solubilisation du phosphate par les bactéries endophytes**

La solubilisation de phosphate est évaluée selon la méthode de Pikovskaya (1948) (cf. § 2.2. de Matériel et Méthodes, chapitre 2).

#### **6. Activité antifongique des isolats endophytes**

L'activité antagoniste des isolats bactériens endophytes est évaluée contre *F. oxysporum* en utilisant la méthode de Ji *et al.* (2014) (cf. § 2.4. de Matériel et Méthodes, chapitre 2).

#### **7. Analyses statistiques**

Les *Box-pot* et l'ACP sont réalisés par XLStat 2014 (addinsoft, Paris).

## Résultats

### 1. Isolement des bactéries endophytes

L'isolement des endophytes a été effectué à travers la culture sur cinq milieux de culture qui sont : la gélose *LB* ; la gélose B de *King* ; *ISP*<sub>2</sub> ; *SCA* et *Olsen*. Pour chaque génotype, le criblage a été réalisé par observation à l'œil nu et au microscope optique. Au total, 83 isolats endophytes issus des trois cultivars sont choisis, dont 26, 24 et 33 isolats sont obtenus à partir des génotypes Karam, Al-Fares et Biskra, respectivement. Les isolats ont présentés des morphologies macroscopiques et microscopiques très diversifiées, parmi ces derniers nous avons noté la présence de 16 isolats avec les caractéristiques des actinomycètes. D'autre part, 30 isolats ont présentés des fluorescences variées sous lumière UV (figure 19).



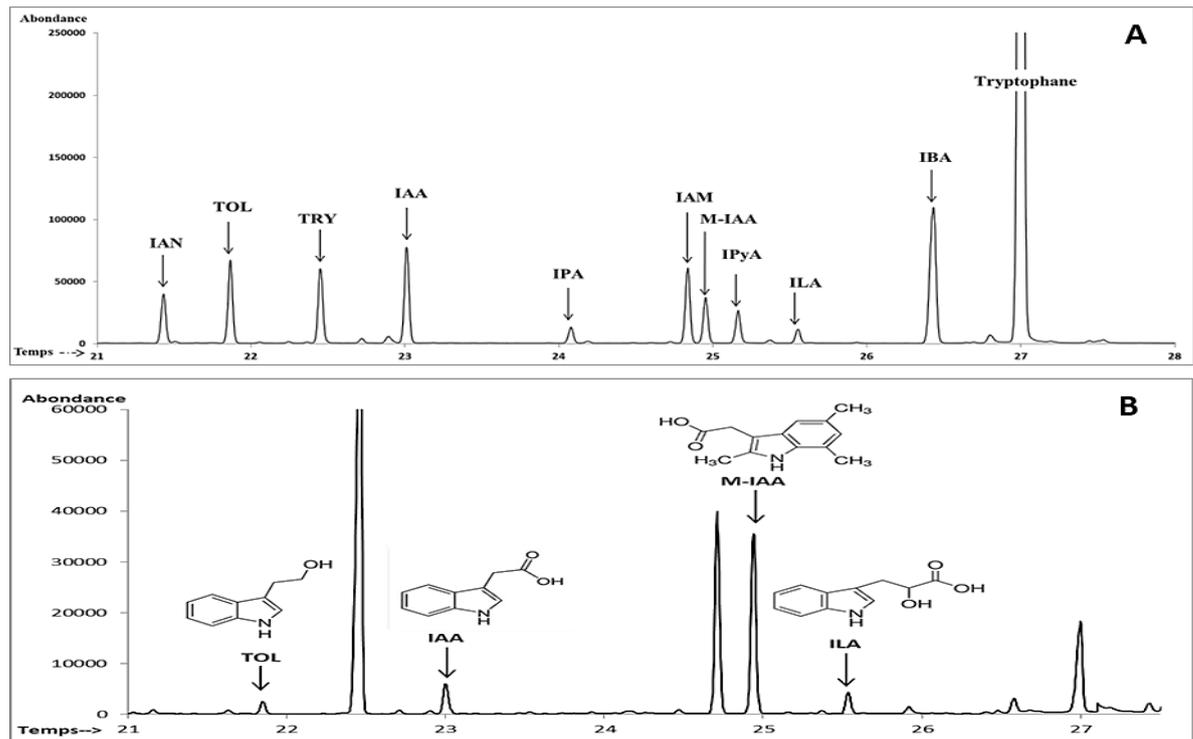
**Figure 19.** Aspect macroscopique de quelques isolats endophytes.

### 2. Production des auxines

En absence de tryptophane, la concentration des composés indoliques, par analyse colorimétrique, varie de 2,35 à 8,32  $\mu\text{g/ml}$ , de même, en absence de précurseur aucun composé n'a été détecté par GC-MS, de ce fait, seulement les résultats de la production des auxines en présence de tryptophane sont mentionnés sur le tableau 8.

En présence de précurseur, le dosage colorimétrique révèle des productions qui varient de 7,36 à 91,5  $\mu\text{g/ml}$ . L'analyse par GC-MS en modes « *Full scan* » et « *SIM* » montre la détection des 8 composés indoliques recherchés sous forme de pics distincts avec des temps de rétentions différents (figure 20).

L'ensemble des résultats résumés dans le tableau 8 révèle que l'IAA, l'ILA, l'IBA, l'TOL et le TRY sont détectés chez 96 ; 73 ; 93 ; 13 et 6 % des isolats, respectivement. Alors que l'IAM, l'IPA, l'IAN et l'IPyA n'ont pas été détectés. Par rapport à la quantification, seulement l'IAA, l'ILA et le TOL sont quantifiés, les autres composants indoliques n'ont pas été quantifiés à cause de la faible surface des pics détectés.



**Figure 20.** Détection des auxines par GC-MS. (A) Mélange de molécules pures à 0,1 M préparé dans le milieu de culture ; (B) Détection des auxines chez l’isolat FEO15.

**Tableau 8.** Production des composés indoliques par les 83 isolats bactériens en présence de tryptophane.

Isolats	Type de Gram	Analyse colorimétrique (µg/ml)	Analyse par GC-MS (µg/ml)				
			IAA	ILA	TOL	IBA	TRY
FEO1	+	31,1	0,23	0,42	ND	D	ND
FEO4	+	36,9	0,45	0,34	ND	D	ND
FEO9	+	45,9	0,65	0,64	ND	D	ND
FEO11	+	50,4	0,9	0,34	ND	D	ND
FEO14	+	29,8	0,17	0,47	ND	D	ND
FEO15	+	43,3	0,51	0,8	0,43	D	ND
BEO1	+	41,7	0,62	0,31	ND	D	ND
BEO2	+	25,4	0,18	ND	ND	D	ND
BEO8	+	33,1	0,3	0,41	0,46	D	D
BEO9	+	28,9	0,19	0,32	ND	D	ND

<b>KEO5</b>	+	9,1	ND	ND	ND	ND	ND
<b>KEO6</b>	+	52,2	0,9	0,52	ND	D	ND
<b>BEI1</b>	+	33,8	0,34	0,36	0,42	D	ND
<b>BEI2</b>	+	31	0,21	0,47	ND	D	ND
<b>BEI3</b>	+	44,7	0,74	0,25	ND	D	ND
<b>BEI4</b>	+	42,4	0,63	0,35	0,52	D	ND
<b>KEI1</b>	+	38,6	0,54	0,24	ND	D	ND
<b>KEI5</b>	+	76	1,65	0,65	ND	D	ND
<b>KEI6</b>	+	31,3	0,23	0,44	ND	D	ND
<b>BES1</b>	+	79,4	1,8	0,54	ND	ND	ND
<b>BES2</b>	+	75	1,65	0,55	ND	D	ND
<b>BES3</b>	+	39,4	0,54	0,32	ND	D	ND
<b>BES4</b>	+	48,3	0,87	0,22	0,41	D	D
<b>BES5</b>	+	36	0,32	0,64	ND	D	ND
<b>BES6</b>	+	7,36	ND	ND	ND	ND	ND
<b>FES1</b>	+	8,1	ND	ND	ND	ND	ND
<b>FES2</b>	+	46,1	0,87	ND	ND	D	ND
<b>KES1</b>	+	39,5	0,65	ND	ND	ND	ND
<b>KES2</b>	+	42,2	0,74	ND	ND	D	ND
<b>BEL5</b>	+	47	0,9	ND	0,41	D	ND
<b>BEL6</b>	+	62	1,4	ND	ND	D	ND
<b>KEL1</b>	+	50,6	1,02	ND	ND	D	ND
<b>KEL2</b>	+	64,1	1,47	ND	ND	D	ND
<b>FEK2</b>	-	46,1	0,87	ND	ND	D	ND
<b>FEK3</b>	-	30,2	1,2	0,81	ND	D	ND
<b>FEK4</b>	-	30,2	0,94	0,37	ND	D	ND
<b>FEK5</b>	-	30,2	0,71	0,41	ND	D	ND
<b>FEK12</b>	-	69,15	0,5	0,72	ND	D	ND
<b>FEK8</b>	-	41,5	0,61	0,32	ND	D	ND
<b>FEK10</b>	-	41,2	0,57	0,41	0,45	D	ND
<b>FEK16</b>	-	68,2	0,49	1,9	ND	D	ND
<b>FEK20</b>	-	68,2	0,47	0,7	ND	D	ND
<b>FEK21</b>	-	68,2	0,36	0,84	ND	D	D

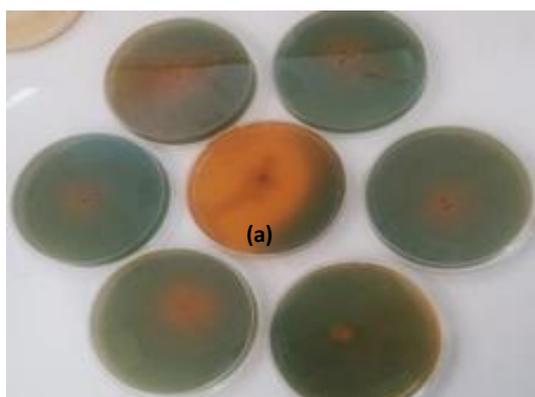
<b>FEK22</b>	-	77,9	0,35	1,17	ND	D	ND
<b>BEK1</b>	-	68,2	0,47	0,34	ND	D	ND
<b>BEK2</b>	-	68,2	0,52	0,54	ND	D	ND
<b>BEK3</b>	-	42,3	1,3	0,7	ND	D	ND
<b>BEK12</b>	-	69,5	1,65	ND	ND	D	D
<b>BEK4</b>	-	32,5	0,31	0,18	ND	D	ND
<b>BEK11</b>	-	50,6	0,87	0,45	ND	D	ND
<b>BEK5</b>	-	46,6	0,64	0,74	0,63	D	ND
<b>BEK6</b>	-	85,9	1,98	0,65	ND	D	D
<b>BEK7</b>	-	91,5	2,1	0,85	ND	D	ND
<b>BEK8</b>	-	49,36	2,07	0,14	ND	D	ND
<b>BEK9</b>	-	73,4	1,65	0,39	ND	D	ND
<b>BEK10</b>	-	64,7	1,41	0,24	ND	D	ND
<b>KEK1</b>	-	77,97	0,9	1,35	ND	D	ND
<b>KEK2</b>	-	63,1	1,23	0,62	ND	D	ND
<b>KEK3</b>	-	87,3	2,03	0,64	ND	D	ND
<b>KEK6</b>	-	47,9	0,5	1,01	ND	D	ND
<b>KEK5</b>	-	36,5	0,4	0,45	ND	D	ND
<b>KEK7</b>	-	53,7	0,9	0,67	ND	D	ND
<b>KEK12</b>	-	67,5	0,45	0,37	ND	D	ND
<b>KEK28</b>	-	63,4	1,32	0,38	ND	D	ND
<b>KEK10</b>	-	39,3	0,7	0,84	ND	D	ND
<b>KEK30</b>	-	29,6	1,07	0,84	ND	D	ND
<b>KEK34</b>	-	61,5	1,3	0,25	ND	D	ND
<b>KEK35</b>	-	32	0,4	ND	ND	D	ND
<b>KEK36</b>	-	88,8	2,4	0,63	ND	D	ND
<b>FEL5</b>	-	51,3	0,45	1,78	ND	D	ND
<b>FEL6</b>	-	41,7	0,32	1,21	0,4	D	ND
<b>FEL7</b>	-	36,8	0,36	0,6	ND	D	ND
<b>FEL8</b>	-	43,1	0,47	0,9	ND	D	ND
<b>FEL9</b>	-	47,5	0,35	0,34	ND	D	ND
<b>BEL4</b>	-	51,5	0,87	0,54	ND	D	ND
<b>BEL5</b>	-	49,1	0,97	ND	0,63	D	ND

<b>BEL7</b>	-	36,2	0,54	ND	ND	ND	ND
<b>BEL8</b>	-	39,2	0,64	ND	ND	D	ND
<b>BEL9</b>	-	25,7	0,19	ND	0,3	D	ND
<b>KEL3</b>	-	29,6	0,32	ND	ND	D	ND
<b>KEL4</b>	-	33,5	0,45	ND	ND	D	ND
<b>KEL5</b>	-	39,5	0,65	ND	ND	D	ND
<b>KEL6</b>	-	41	0,7	ND	ND	D	ND

(ND) non détecté ; (D) détecté.

### 3. Production des sidérophores

Les résultats de la production des sidérophores sont résumés dans le tableau 9. 44 isolats sont capables de produire des sidérophores sur milieu solide. La taille de l'halo est supérieure à 10 mm pour trois isolats seulement, dont les isolats BEK8 et FEO15 possèdent la production la plus élevée. La figure 21 représente l'halo formé par l'isolat FEO15.



**Figure 21.** Production des sidérophores sur milieu solide par quelques isolats endophytes. (a) isolat FEO15.

Le dosage colorimétrique, réalisé pour les 44 isolats producteurs de sidérophores sur milieu solide, a révélé une production des hydroxamates avec des concentrations de 0,41 à 60,68 mg/ml, et des catécholates avec des concentrations de 0,3 à 92,16 mg/ml. Comme le montre la figure 22, la production des catécholates est plus répandue chez les isolats étudiés.

L'analyse par UHPLC-MS/MS Q Exactive a permis la détection de 23 composants différents chez un total de 21 isolats. Toutes les molécules détectées ont présenté un score de motif isotopique de 100 %. Selon les résultats mentionnés sur le tableau 9, 80 % de ces isolats ont la capacité de produire deux types sidérophores différents. Les isolats BES3 et FEO15 possèdent le nombre le plus élevé des composants détectés, soit trois et quatre composants pour FEO15 et BES3, respectivement. La figure 23 résume les composants détectés chez les deux isolats.

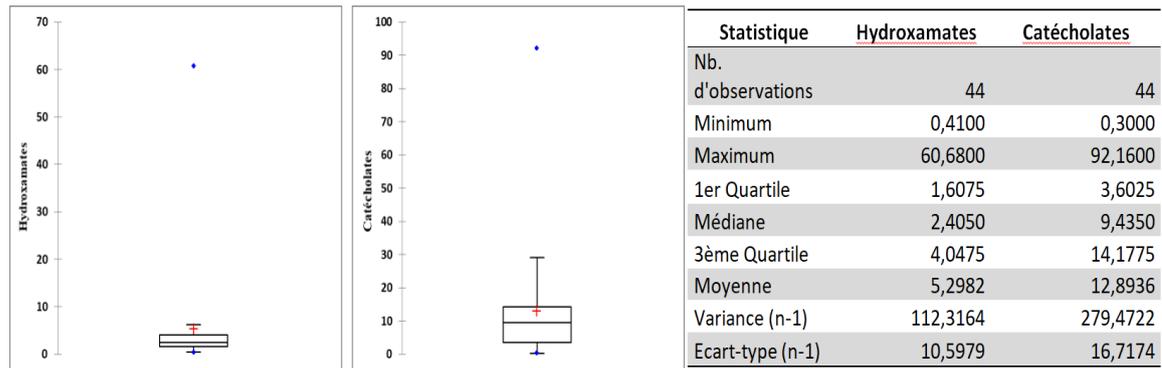


Figure 22. Box-plot montre la production des hydroxamates et des catécholates par les isolats bactériens.

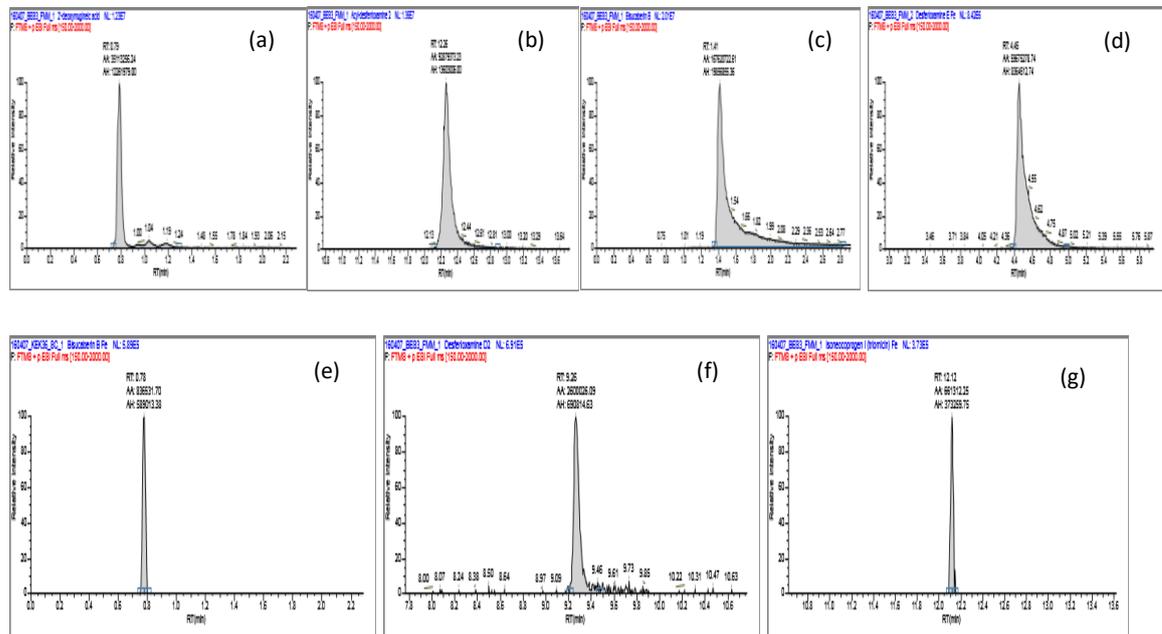


Figure 23. Détection des sidérophores par UHPLC-MS/MS Q Exactive chez les isolats BES3 et FEO15. [(Acide 2'-deoxymugineique (a) ; Acyl-desferrioxamine 2 (b) ; Bisucaberine B (c) ; Desferrioxamine E (d) Citrate (e) ; Desferrioxamine X4 (f) ; Desferrioxamine B (g)].

Tableau 9. Production des sidérophores par les isolats endophytes.

Isolat	Milieu Chrome azurol S (mm)	Hydroxamates (mg/ml)	Catécholates (mg/ml)	Molécules détectées par UHPLC- MS/MS Q Exactive
FEO1	5	14,2	10,36	Acide rhodolurique ; Desferrithiocine
FEO4	10	10,01	0,30	Acide 2'-deoxymugineique ; Aminocheline
FEO9	2	2,35	4,98	ND
FEO11	3	4,69	4,87	ND
FEO15	45	40,4	65,41	Citrate ; Desferrioxamine X4 ; Desferrioxamine B
BEO8	3	4,25	6,32	ND

<b>BEO9</b>	4	6,2	9,47	Schizokinene ; Desferrioxamine D2
<b>KEO5</b>	6	3,41	3,46	Desferrioxamine B ; Rhizobactine
<b>KEO6</b>	2	1,65	1,65	ND
<b>BEI2</b>	3	2,4	0,98	ND
<b>KEI1</b>	4	1,65	1,78	ND
<b>KEI5</b>	3	2,78	5,61	ND
<b>KEI6</b>	4	1,65	2,45	ND
<b>BES1</b>	3	0,65	3,78	ND
<b>BES3</b>	10	4,3	6,98	Acide 2'-deoxymugineique ; Acyl-desferrioxamine 2 ; Bisucaberin B ; Desferrioxamine E ;
<b>BES5</b>	4	1,35	10,98	ND
<b>FES2</b>	6	2,41	14,35	Deoxyschizokinène ; Desferrioxamine B
<b>KES2</b>	3	2,32	13,46	ND
<b>BEL6</b>	4	0,54	13,47	Pseudomonine; acide salicylique
<b>KEL2</b>	2	0,95	15,34	Thioquinolobactine ; Quinolobactine
<b>FEK3</b>	3	1,64	2,94	ND
<b>FEK5</b>	2	0,7	7,64	ND
<b>FEK10</b>	4	0,98	12,74	ND
<b>FEK20</b>	6	3,98	16,47	Acide 3,4-dihydroxibenzoïque ; acide 2,3-Dihydroxybenzoïque
<b>FEK21</b>	8	9,45	30,74	Citrate ; Quinolobactine
<b>FEK22</b>	4	3,78	10,65	Desferrioxamine N ; Pseudomonine
<b>BEK1</b>	10	8,74	19,47	Thioquinolobactine
<b>BEK3</b>	3	0,41	3,45	ND
<b>BEK11</b>	4	0,47	3,25	ND
<b>BEK6</b>	20	5,36	29,10	Cepabactine ; Quinolobactine
<b>BEK8</b>	45	60,68	92,16	Pseudomonine ; Quinolobactine
<b>KEK1</b>	5	2,36	6,45	Desferrioxamine N
<b>KEK3</b>	5	1,47	10,47	Desferrioxamine D2 ; Citrate
<b>KEK6</b>	6	0,98	13,68	Pseudomonine ; acide salicylique
<b>KEK7</b>	7	2,74	9,71	ND
<b>KEK12</b>	8	2,65	16,98	Citrate ; Cepabactine
<b>KEK10</b>	4	2,36	14,12	Ornicorrugatine ; Pseudomonine
<b>KEK30</b>	2	2,78	0,47	ND
<b>KEK36</b>	10	1,51	32,68	Citrate ; Quinolobactine
<b>FEL6</b>	2	1,65	3,65	ND
<b>FEL8</b>	4	2,87	9,40	ND
<b>BEL8</b>	3	3,14	2,64	ND
<b>KEL4</b>	3	2,61	5,14	ND
<b>KEL6</b>	6	1,65	17,32	ND

#### 4. Détection du quorum

La recherche du quorum sensing montre une détection seulement avec la souche *A. tumefaciens* NT1, dont les résultats sont résumés dans le tableau 10. La production des AHL est révélée par l'apparition d'un halo bleu foncé autour du surnageant des isolats bactériens

(figure 24). Parmi les 50 isolats Gram négatif, 7 isolats sont capables de produire les AHL. La production la plus importante est observée pour l'isolat BEK8.



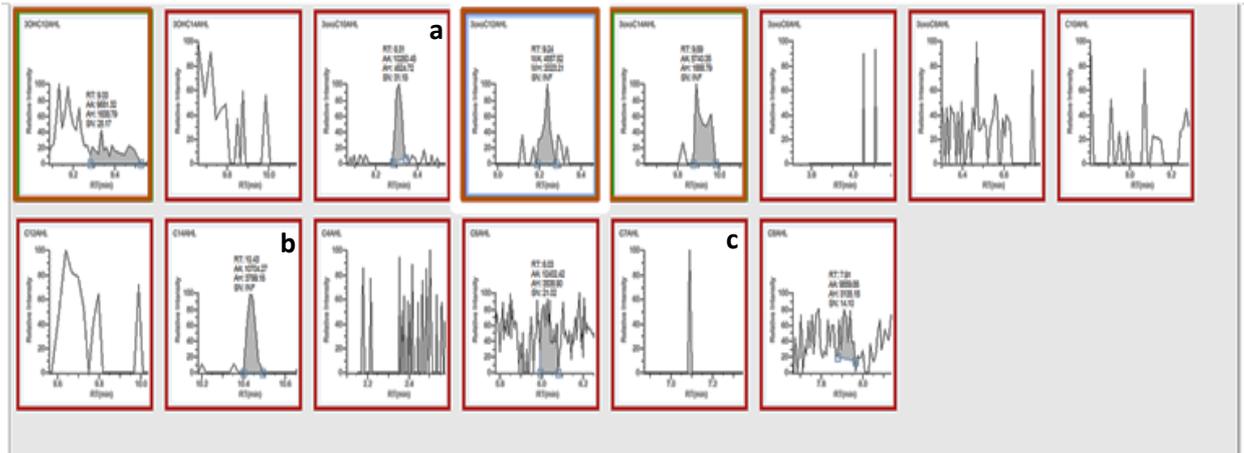
**Figure 24.** La détection du quorum chez quelques isolats bactériens Gram négatif avec le biocapteur *A. tumefaciens* NT1.

**Tableau 10.** Détection du quorum chez les isolats Gram négatif par le biocapteur *A. tumefaciens* NT1.

Isolats	Détection	Isolats	Détection	Isolats	Détection
<b>FEK2</b>	-	<b>BEK12</b>	-	<b>KEK36</b>	-
<b>FEK3</b>	-	<b>BEK4</b>	-	<b>FEL5</b>	-
<b>FEK4</b>	+	<b>BEK11</b>	-	<b>FEL6</b>	++
<b>FEK5</b>	-	<b>BEK5</b>	-	<b>FEL7</b>	-
<b>FEK12</b>	-	<b>BEK6</b>	-	<b>FEL8</b>	-
<b>FEK8</b>	-	<b>BEK7</b>	-	<b>KEK7</b>	-
<b>FEK10</b>	-	<b>BEK8</b>	+++	<b>KEK12</b>	-
<b>FEK16</b>	+	<b>BEK9</b>	-	<b>KEK28</b>	+
<b>FEK20</b>	-	<b>BEK10</b>	-	<b>KEK10</b>	-
<b>FEK21</b>	-	<b>KEK1</b>	-	<b>KEK30</b>	-
<b>FEK22</b>	-	<b>KEK2</b>	-	<b>KEK34</b>	-
<b>BEK1</b>	-	<b>KEK3</b>	-	<b>KEK35</b>	-
<b>BEK2</b>	+	<b>KEK6</b>	+	<b>BEL8</b>	-
<b>BEK3</b>	-	<b>KEK5</b>	-	<b>BEL9</b>	-
<b>FEL9</b>	-	<b>BEL5</b>	-	<b>KEL3</b>	-
<b>BEL4</b>	-	<b>BEL7</b>	-	<b>KEL4</b>	-
<b>KEL5</b>	-	<b>KEL6</b>	-		

(-) Réaction négatif ; (+) Production faible ; (++) Production modérée ; (+++) Production élevée.

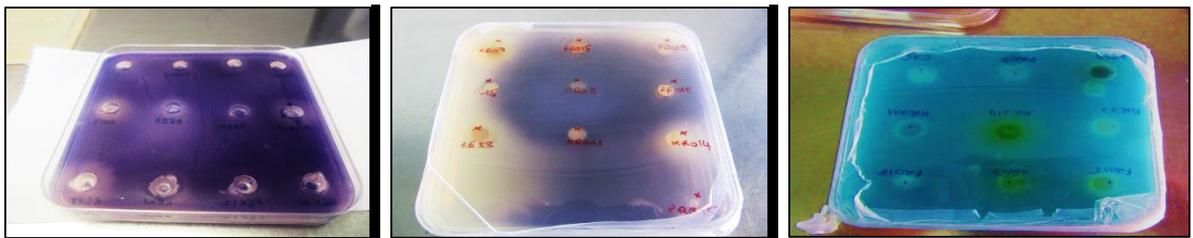
Le résultat de la détection des AHL par UHPLC-HRMS/MS chez l'isolat BEK8 est présenté dans la figure 25, trois molécules sont détectées : C14-HSL; 3-oxo-C10-HSL; 3-oxo-C14-HSL.



**Figure 25.** Détection des AHL par UHPLC-HRMS/MS chez l'isolat BEK8. (a) 3-oxo-C14-HSL ; (b) C14-HSL ; (c) 3-oxo-C10-HSL.

### 5. L'inhibition du quorum

L'inhibition du quorum est détectée avec les deux biocapteurs. Le quorum quenching est révélé par l'apparition d'un halo clair autour des puits sans inhibition de la croissance du biocapteur (figure 26).



**Figure 26.** Inhibition du quorum chez les isolats bactériens par l'utilisation des biocapteurs *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1.

L'inhibition du quorum est détectée chez 10 et 15 isolats pour les deux biocapteurs *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement (Tableau 11). Les trois isolats FEO14, FEO15 et KEO5 ont la capacité à inhiber le quorum chez les deux biocapteurs. Selon ces résultats, les bactéries à Gram positif ont plus de capacité à inhiber le quorum par les AHL que les bactéries à Gram négatif.

**Tableau 11.** Inhibition du quorum chez les isolats endophytes.

Isolats	Inhibition		Isolats	Inhibition		Isolats	Inhibition	
	C	A		C	A		C	A
<b>FEO1</b>	+	-	<b>KES2</b>	-	+	<b>KEK1</b>	-	-
<b>FEO4</b>	-	-	<b>BEL5</b>	+	-	<b>KEK2</b>	-	-
<b>FEO9</b>	++	-	<b>BEL6</b>	-	-	<b>KEK3</b>	-	-
<b>FEO11</b>	-	-	<b>KEL1</b>	-	-	<b>KEK6</b>	-	-
<b>FEO14</b>	+	+	<b>KEL2</b>	-	-	<b>KEK5</b>	-	-
<b>FEO15</b>	+++	+	<b>FEK2</b>	-	+	<b>KEK7</b>	-	-
<b>BEO1</b>	-	-	<b>FEK3</b>	-	-	<b>KEK12</b>	-	-
<b>BEO2</b>	+	-	<b>FEK4</b>	-	-	<b>KEK28</b>	-	-
<b>BEO8</b>	-	-	<b>FEK5</b>	-	-	<b>KEK10</b>	-	-
<b>BEO9</b>	-	+	<b>FEK12</b>	+	-	<b>KEK30</b>	-	-
<b>KEO5</b>	+	+	<b>FEK8</b>	-	-	<b>KEK34</b>	-	+
<b>KEO6</b>	+	-	<b>FEK10</b>	-	-	<b>KEK35</b>	-	-
<b>BEI1</b>	-	-	<b>FEK16</b>	-	-	<b>KEK36</b>	-	-
<b>BEI2</b>	+	-	<b>FEK20</b>	-	-	<b>FEL5</b>	-	-
<b>BEI3</b>	-	-	<b>FEK21</b>	-	-	<b>FEL6</b>	-	-
<b>BEI4</b>	-	-	<b>FEK22</b>	-	-	<b>FEL7</b>	-	+
<b>KEI1</b>	+	-	<b>BEK1</b>	-	-	<b>FEL8</b>	-	-
<b>KEI5</b>	-	-	<b>BEK2</b>	-	-	<b>FEL9</b>	-	-
<b>KEI6</b>	-	-	<b>BEK3</b>	-	-	<b>BEL4</b>	-	+
<b>BES1</b>	-	-	<b>BEK12</b>	-	-	<b>BEL5</b>	-	-
<b>BES2</b>	-	-	<b>BEK4</b>	-	-	<b>BEL7</b>	-	-
<b>BES3</b>	++	-	<b>BEK11</b>	-	-	<b>BEL8</b>	-	-
<b>BES4</b>	+	-	<b>BEK5</b>	+	-	<b>BEL9</b>	-	-
<b>BES5</b>	-	-	<b>BEK6</b>	-	-	<b>KEL3</b>	-	-
<b>BES6</b>	-	-	<b>BEK7</b>	-	-	<b>KEL4</b>	-	-
<b>FES1</b>	+	-	<b>BEK8</b>	-	-	<b>KEL5</b>	-	-
<b>FES2</b>	-	-	<b>BEK9</b>	-	-	<b>KEL6</b>	-	-
<b>KES1</b>	-	-	<b>BEK10</b>	-	+			

(A) *A. tumefaciens* NT1 ; (C) *C. violaceum* CV026 ; (-) réaction négatif ; (+) Inhibition faible ; (++) Inhibition modérée ; (+++) Inhibition élevée.

## 6. Solubilisation de phosphate

Les résultats de la solubilisation du phosphate par les isolats endophytes sont résumés dans le tableau 12 et présentés dans la figure 27. 79 % des isolats ont présenté un halo clair autour des colonies, cependant les moyennes de la taille de l'halo calculées sont très petites allant de 1,33 à 5 mm, ce qui exprime une solubilisation très faible.



**Figure 27.** Solubilisation du phosphate par quelques isolats endophytes.

**Tableau 12.** Solubilisation de phosphate par les isolats endophytes exprimé par la moyenne de la taille de l'halo produit.

Isolats	Solubilisation du phosphate (mm)	Isolats	Solubilisation du phosphate (mm)	Isolats	Solubilisation du phosphate (mm)
<b>FEO1</b>	1,66	<b>KES2</b>	2	<b>KEK1</b>	1
<b>FEO4</b>	3	<b>BEL5</b>	2,5	<b>KEK2</b>	2,5
<b>FEO9</b>	2,5	<b>BEL6</b>	1	<b>KEK3</b>	3
<b>FEO11</b>	0	<b>KEL1</b>	0	<b>KEK6</b>	3
<b>FEO14</b>	3	<b>KEL2</b>	3	<b>KEK5</b>	2
<b>FEO15</b>	0	<b>FEK2</b>	0	<b>KEK7</b>	2,33
<b>BEO1</b>	1,5	<b>FEK3</b>	2,66	<b>KEK12</b>	2,66
<b>BEO2</b>	2,5	<b>FEK4</b>	2,33	<b>KEK28</b>	1,5
<b>BEO8</b>	1,5	<b>FEK5</b>	0	<b>KEK10</b>	2,66
<b>BEO9</b>	0	<b>FEK12</b>	2,66	<b>KEK30</b>	3,33
<b>KEO5</b>	2,66	<b>FEK8</b>	2,33	<b>KEK34</b>	3,66
<b>KEO6</b>	1,33	<b>FEK10</b>	1,66	<b>KEK35</b>	2,5
<b>BEI1</b>	0	<b>FEK16</b>	2	<b>KEK36</b>	5
<b>BEI2</b>	0	<b>FEK20</b>	2,66	<b>FEL5</b>	2,33
<b>BEI3</b>	0	<b>FEK21</b>	3,33	<b>FEL6</b>	1,5
<b>BEI4</b>	0	<b>FEK22</b>	0	<b>FEL7</b>	2,5

<b>KEI1</b>	2,5	<b>BEK1</b>	1,33	<b>FEL8</b>	0
<b>KEI5</b>	2,66	<b>BEK2</b>	1,66	<b>FEL9</b>	0
<b>KEI6</b>	2	<b>BEK3</b>	0	<b>BEL4</b>	1,66
<b>BES1</b>	1,33	<b>BEK12</b>	2,33	<b>BEL5</b>	2
<b>BES2</b>	1,66	<b>BEK4</b>	2,33	<b>BEL7</b>	2,66
<b>BES3</b>	2,25	<b>BEK11</b>	0	<b>BEL8</b>	1,75
<b>BES4</b>	1,66	<b>BEK5</b>	3,5	<b>BEL9</b>	1,25
<b>BES5</b>	2,66	<b>BEK6</b>	3,66	<b>KEL3</b>	0
<b>BES6</b>	2,5	<b>BEK7</b>	0,66	<b>KEL4</b>	0
<b>FES1</b>	3,5	<b>BEK8</b>	2	<b>KEL5</b>	0
<b>FES2</b>	1,33	<b>BEK9</b>	1,33	<b>KEL6</b>	1,66
<b>KES1</b>	2,33	<b>BEK10</b>	2,6		

### 7. Inhibition de *F. oxysporum*

La capacité des isolats rhizosphériques à inhiber *F. oxysporum* est présentée dans le tableau 13. 25 isolats (soit 30 %) possèdent une activité antifongique, avec maximum de 40 % d'inhibition observé pour l'isolat FEO15.

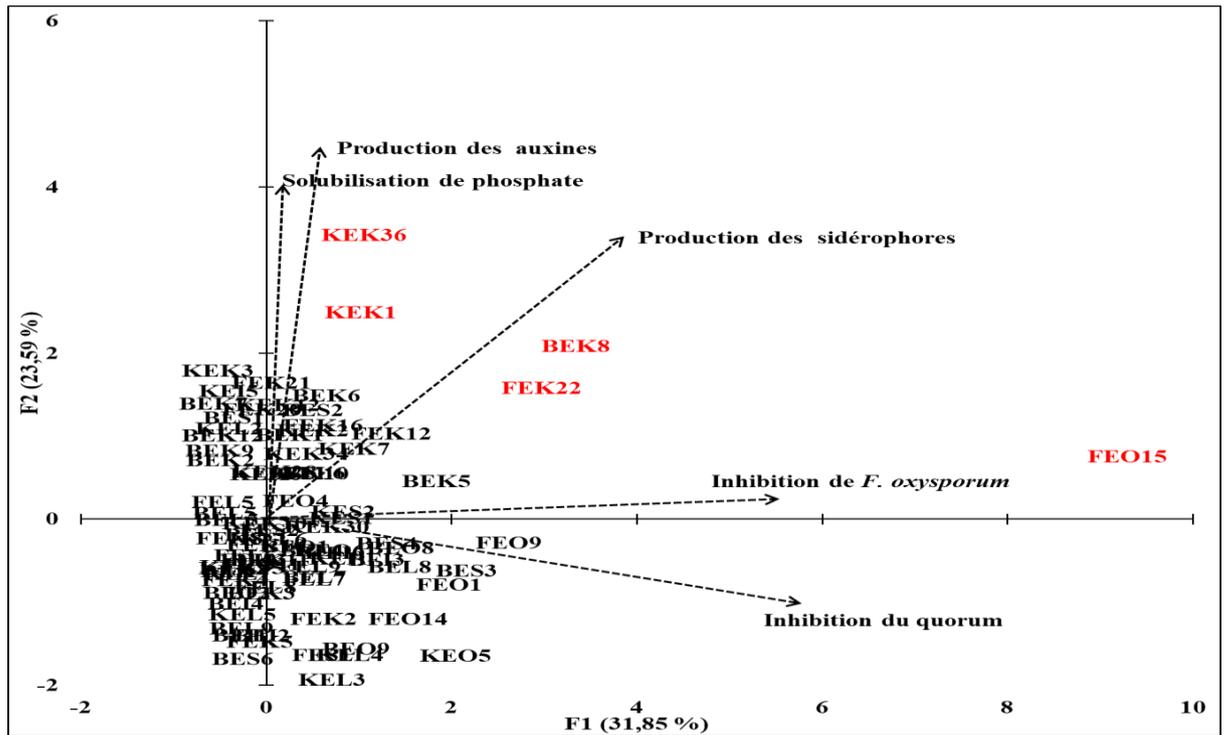
**Tableau 13.** Inhibition de *F. oxysporum* par les isolats endophytes.

<b>Isolats</b>	<b>Inhibition de <i>F. oxysporum</i> (%)</b>	<b>Isolats</b>	<b>Inhibition de <i>F. oxysporum</i> (%)</b>	<b>Isolats</b>	<b>Inhibition de <i>F. oxysporum</i> (%)</b>
<b>FEO1</b>	15	<b>KES2</b>	15	<b>KEK1</b>	16
<b>FEO4</b>	0	<b>BEL5</b>	0	<b>KEK2</b>	15
<b>FEO9</b>	16	<b>BEL6</b>	10	<b>KEK3</b>	0
<b>FEO11</b>	0	<b>KEL1</b>	0	<b>KEK6</b>	0
<b>FEO14</b>	0	<b>KEL2</b>	0	<b>KEK5</b>	0
<b>FEO15</b>	40	<b>FEK2</b>	0	<b>KEK7</b>	13
<b>BEO1</b>	10	<b>FEK3</b>	0	<b>KEK12</b>	0
<b>BEO2</b>	0	<b>FEK4</b>	0	<b>KEK28</b>	7
<b>BEO8</b>	23	<b>FEK5</b>	0	<b>KEK10</b>	0
<b>BEO9</b>	0	<b>FEK12</b>	14	<b>KEK30</b>	12
<b>KEO5</b>	14	<b>FEK8</b>	0	<b>KEK34</b>	0
<b>KEO6</b>	0	<b>FEK10</b>	0	<b>KEK35</b>	0
<b>BEI1</b>	0	<b>FEK16</b>	16	<b>KEK36</b>	10

<b>BEI2</b>	0	<b>FEK20</b>	0	<b>FEL5</b>	0
<b>BEI3</b>	23	<b>FEK21</b>	0	<b>FEL6</b>	0
<b>BEI4</b>	0	<b>FEK22</b>	30	<b>FEL7</b>	0
<b>KEI1</b>	0	<b>BEK1</b>	0	<b>FEL8</b>	0
<b>KEI5</b>	0	<b>BEK2</b>	0	<b>FEL9</b>	12
<b>KEI6</b>	12	<b>BEK3</b>	0	<b>BEL4</b>	0
<b>BES1</b>	0	<b>BEK12</b>	0	<b>BEL5</b>	0
<b>BES2</b>	16	<b>BEK4</b>	0	<b>BEL7</b>	0
<b>BES3</b>	0	<b>BEK11</b>	0	<b>BEL8</b>	10
<b>BES4</b>	12	<b>BEK5</b>	21	<b>BEL9</b>	0
<b>BES5</b>	0	<b>BEK6</b>	0	<b>KEL3</b>	0
<b>BES6</b>	0	<b>BEK7</b>	0	<b>KEL4</b>	0
<b>FES1</b>	0	<b>BEK8</b>	0	<b>KEL5</b>	0
<b>FES2</b>	0	<b>BEK9</b>	0	<b>KEL6</b>	0
<b>KES1</b>	18	<b>BEK10</b>	0		

### 8. Analyse en composantes principales

Une ACP a été réalisée à partir des données générées par tous les tests précédents (figure 28), cette analyse vise à regrouper les performances de la promotion de la croissance des plantes, *in vitro*, des 83 isolats. Les deux premiers plans, F1 et F2, expliquent 55,44 % de la variabilité totale (31,85 % pour F1 et 23,59 % pour F2). L'ACP a permis de séparer les isolats KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 et BEK8 par rapport aux autres. En fait, parmi les 83 isolats, KEK36 possède la production de l'IAA et la solubilisation de phosphate les plus élevées, les deux isolats FEO15 et BEK8 possèdent la production des sidérophores la plus élevée, de même, les isolats FEK22 et KEK1 possèdent la capacité de produire des auxines et des sidérophores comme ils sont capables d'inhiber le phytopathogène *F. oxysporum*.



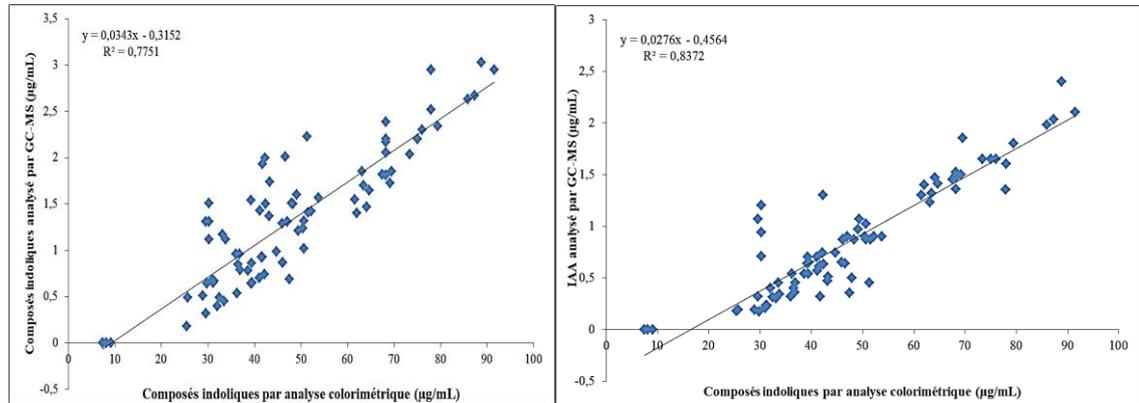
**Figure 28.** Analyse en composantes principales basée sur les résultats des analyses de la promotion de croissance des plantes *in vitro*.

## Discussion

Les bactéries endophytes sont isolées à partir des racines de trois cultivars de piment. L'utilisation de cinq milieux de culture a permis l'isolement d'un total de 83 isolats morphologiquement distincts, montrant la capacité de ces espèces bactériennes à gagner les racines de piment. De plus, la grande diversité morphologique suggère l'importance de l'interaction plante-endophytes pour ces génotypes. En fait, les cellules bactériennes se fixent aux surfaces radiculaires pour former une chaîne de cellules (Hansen *et al.*, 1997), par la suite, les bactéries peuvent coloniser toute la surface radiculaire en formant, dans certains cas, des micro-colonies ou des biofilms (Benizri *et al.*, 2001). Selon la nature des exsudats racinaires, et les capacités métaboliques des différentes espèces bactériennes, les endophytes peuvent infecter les racines. Selon Zachow *et al.* (2010) chaque espèce possède sa propre méthode d'infection et son propre site de colonisation.

Les bactéries favorisant la croissance des plantes peuvent produire les auxines par diverses voies métaboliques (Duca *et al.*, 2014). À travers ces voies, différents composés intermédiaires sont produits (Goswami *et al.*, 2014). Nos résultats montrent que les composés indoliques ont été produits seulement en présence de tryptophane, ce qui suggère que tous les isolats bactériens utilisent des voies de synthèse dépendantes du tryptophane.

La production des composés indoliques, analysée par dosage colorimétrique, montre une corrélation avec la concentration totale des composés détectés par GC-MS ainsi qu'avec la concentration de l'IAA (figure 29).



**Figure 29.** Corrélation entre les concentrations des composés indoliques obtenus par dosage colorimétrique et par GC-MS.

L'analyse par GC-MS montre que l'IAA est le produit terminal le plus important des voies métaboliques utilisées par les isolats. L'ILA, produit de la réduction enzymatique de l'IPyA, est produit par 73 % des isolats, ce qui signifie que la biosynthèse de l'IAA implique la voie IPyA. Il a été rapporté que l'IPyA, principal intermédiaire dans la voie IPyA, est un composé instable et ne s'accumule pas dans les cultures microbiennes (Lin *et al.*, 2015). Le TOL, le produit de réduction enzymatique d'IAAld, est produit par 13 % des isolats. Selon la littérature, l'IAAld est un métabolite intermédiaire de plusieurs voies métaboliques, principalement, la voie IPyA, la voie TRY et la voie tryptophane-chaines-latérales-oxydase (Spaepen et Vanderleyden, 2011). D'autre part, l'absence de détection de l'IAM et l'AIN signifie qu'aucun isolat n'utilise les voies IAM et AIN. Dans notre étude, l'IBA est détecté chez 93 % des isolats, des travaux précédents ont rapporté la détection de cette molécule chez le microbiote associé aux plantes (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Karakurt *et al.*, 2009 ; Goswami *et al.*, 2015). En fait, l'IBA possède plusieurs caractéristiques en liaison avec le développement des plantes (Martínez-Morales *et al.*, 2003) : (1) Il est capable d'améliorer le développement racinaire ; (2) Il est moins sensible à la dégradation enzymatique ; (3) Il peut lentement se transformer en IAA, fournissant ainsi un supplément d'IAA.

Il a été rapporté que divers PGPB peuvent avoir une, deux ou même trois voies de biosynthèse d'IAA fonctionnelles (Olanrewaju *et al.*, 2017). Duca *et al.* (2018) ont rapporté que les systèmes biosynthétiques multivoies fournissent une assurance de production de l'IAA pour la bactérie, ce qui suggère que la synthèse de l'IAA est clairement très importante dans la vie et le

fonctionnement de plusieurs espèces bactériennes associées aux plantes. Selon la littérature, plusieurs études ont rapporté les voies impliquées dans la biosynthèse de l'IAA chez les bactéries à Gram négatif (Li *et al.*, 2018). Cependant, peu de travaux ont discuté les voies de biosynthèse utilisées par les bactéries Gram positif. Dans notre étude, la voie d'IPyA est la plus abondante chez les bactéries Gram négatif et Gram positif. Comme décrit par Spaepen et Vanderleyden (2011), cette voie IPyA est très répandue chez diverses espèces favorisant la croissance des plantes, tandis que chez les bactéries phytopathogènes la voie la plus utilisée est la voie IAM (Manulis *et al.*, 1994 ; Spaepen et Vanderleyden, 2011).

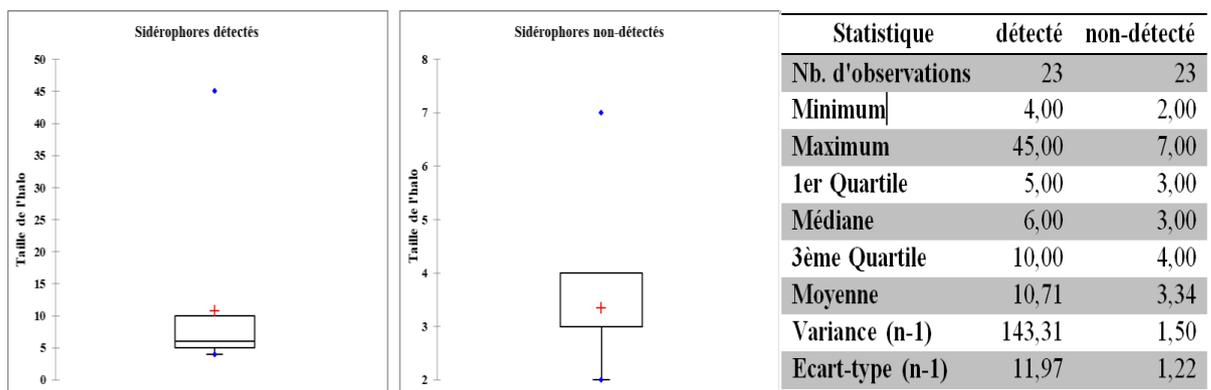
Les sidérophores sont des agents chélateurs spécifiques du fer ferrique, ils sont produits par plusieurs types de microorganismes dans des conditions limitant en fer (Neilands, 1995). La production des sidérophores microbiens possède une corrélation positive avec la promotion de la croissance des plantes ; par conséquent, la production de sidérophores est l'un des facteurs clés à considérer pour le dépistage primaire (Crowley *et al.*, 1991 ; Glick *et al.*, 1999). Dans cette étude, la production des sidérophores a été révélée par plusieurs tests. L'analyse de production de ces chélateurs de fer sur milieu solide montre que plus de 52 % des isolats endophytes produisent des sidérophores sur milieu solide, ce pourcentage est très proche à celui rapporté par López *et al.* (2018) qui ont analysé la production des sidérophores par les endophytes associés aux racines de *Medicago sativa*.

Par comparaison à la production des sidérophores par le microbiote rhizosphérique rapportée dans le chapitre 2, il semble que le pourcentage des isolats endophytes produisant des sidérophores est plus élevé que celui du microbiote rhizosphérique. En fait, sur un total de 301 isolats rhizosphériques, seulement 31 % ont la capacité de produire des sidérophores. Par ailleurs, un halo supérieur à 10 mm est observé chez 85 % et 7 % des isolats rhizosphériques et des endophytes producteurs de sidérophores, respectivement. Ce qui suggère que le microbiote cultivable colonisant les racines de *C. annuum* possèdent plus d'aptitude à produire des sidérophores mais avec une concentration et/ou une capacité de chélation moins importante que celui du microbiote rhizosphérique.

L'analyse quantitative des sidérophores en milieu liquide montre la production des hydroxamates et des catécholates par les isolats endophytes. La production de ces deux types de molécules ne présente aucune corrélation ( $r < 0,5$ ) avec la chélation du fer sur milieu solide, ce qui suggère que les isolats produisent d'autres types de sidérophores hors les hydroxamates et les catécholates. En fait, les groupes fonctionnels des sidérophores microbiens sont majoritairement des hydroxamates, des catécholates ou d'autres tels que : les carboxylates, le

citrate et l'éthylènediamine (Laschat *et al.*, 2017). Ces groupes fonctionnels peuvent être présents séparément ou sous une forme combinée sur une seule molécule de sidérophore (Olanrewaju *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que la production des catécholates est plus répandue chez les isolats bactériens par rapport aux hydroxamates, ce qui est en concordance avec la littérature. Glick (2015) et Saha *et al.* (2015) ont rapporté que les sidérophores de type hydroxamate sont plus répandus chez les champignons, tandis que les catécholates, qui lient le fer plus étroitement que les hydroxamates, sont communs chez les bactéries. De plus, selon Saha *et al.* (2015) les sidérophores produits par PGPB ont une affinité beaucoup plus élevée pour le fer que les sidérophores produits par les plantes ou les champignons, de sorte que les sidérophores des PGPB peuvent séquestrer des quantités infimes de fer.

Nos résultats montrent la production de 23 composants différents chez 21 isolats bactériens. L'utilisation de UHPLC-MS/MS Q Exactive pour la détection des sidérophores semble être une méthode simple et rapide pour la recherche des chélateurs de fer directement dans le surnageant des cultures microbiennes. L'absence de la détection des sidérophores chez les autres isolats est peut être lié à leurs faible production, nécessitant ainsi une étape d'extraction afin de faciliter la détection des sidérophores, comme il montre le *Box-plot* dans la figure 30, la valeur moyenne de la taille de l'halo pour les isolats présentant une détection des sidérophores est de 10,71 mm et elle est de 3,34 mm pour les isolats qui n'ont pas présentés une détection. De plus, et en liaison à la grande diversité structurale des sidérophores, il s'ajoute la possibilité de la présence d'autres molécules non enregistrées sur la base de données utilisées, il s'agit principalement le cas des isolats KEK7 et KEL6.



**Figure 30.** *Box-plot* exprime la taille de l'halo sur milieu solide chez les isolats par rapport à la détection des sidérophores par UHPLC-MS/MS Q Exactive.

Le rôle des sidérophores a été largement rapporté dans la littérature. Masalha *et al.* (2000) ont prouvé que la teneur en fer augmente chez les plantes cultivées dans un sol non-stérile

comparativement au sol stérile. De plus, à travers cette expérience, Masalha *et al.* (2000) ont montré l'absence de la production des sidérophores microbiens en conditions stériles. Ainsi, ils ont conclu que ces molécules peuvent être considérées comme une source de fer efficace pour les plantes. Dans le même contexte, Crowley (2006) a montré que les sidérophores microbiens représentent une source majeure du fer chez les plantes.

Les sidérophores microbiens purs ont été exploités au début comme un traitement qui assurent la détoxification chez l'Homme, principalement contre le fer et l'aluminium (Brown *et al.*, 1982 ; Malluche *et al.*, 1984 ; Allain *et al.*, 1987). Peu d'études ont exprimé l'effet des sidérophores purs sur la croissance des plantes. Ces dernières années, ces molécules sont utilisées en association avec les plantes pour améliorer la bioremédiation des sols contaminés (Saha *et al.*, 2015). Selon Bultreys (2007) la production de plusieurs types de sidérophores est généralement spécifique au niveau du genre. Parmi les molécules détectées dans notre étude, six sont des dérivés de la desferrioxamine et elles sont détectées chez 9 isolats. Selon la littérature cette famille de molécules est produite principalement par des bactéries à Gram positif appartenant au genre *Streptomyces* (Sathya *et al.*, 2016). Selon Řezanka *et al.* (2019), plus la chélation du fer, les desferrioxamines sont capables de chélater plusieurs métaux tels que Ni, Cd, Ga, Al, V, et Pu. Ces molécules sont largement utilisées dans le domaine médical (Bennett et Brown, 2008 ; Hider et Kong, 2010 ; De Serrano, 2017), et aussi dans la bioremédiation (Dimkpa *et al.*, 2009). La Desferrithiocine, produite par l'isolat FEO1, a été détectée par Anderegg et Raber (1990) chez l'espèce *Streptomyces antibioticus*. Selon Kaviani *et al.* (2017), cette molécule est capable d'établir des liaisons avec plusieurs métaux (Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu et Zn). L'acide salicylique produit par les isolats BEL6 et KEK6 est largement connu dans l'induction de la résistance systémique chez les plantes (Höfte et Bakker, 2007). Plus de l'acide salicylique, les deux isolats produits aussi la pseudomonine, en fait, une étude réalisée par Mercado-Blanco *et al.* (2001) montre que la synthèse de l'acide salicylique chez la souche *Pseudomonas fluorescens* WCS374 est génétiquement associée à la synthèse de la pseudomonine, d'autre part, Bultreys (2007) a rapporté que la pseudomonine est produite à partir de l'acide salicylique ou de la pyoverdine. La quinolobactine, produite par les isolats KEL2, FEK21, BEK1, BEK6, BEK8 et KEK36, représente un sidérophore secondaire qui possède une faible constante d'affinité pour le fer, elle est généralement produite par l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (Neuenhaus *et al.*, 1980 ; Mossialos *et al.*, 2000), selon Bultreys (2007), elle est produite dans les premières heures de stress ferrique avant d'être remplacée par la pyoverdine. La ornicorrugatine (produite par l'isolat KEK10) et la cepabactine (produite par les isolats BEK6

et KEK12) sont aussi détectées chez plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* (Meyer *et al.*, 1989 ; Mossialos *et al.*, 2000 ; Matthijs *et al.*, 2008). La rhizobactine, détectée chez l'isolat KE05, appartient à la famille des carboxylates et elle est produite par l'espèce *Sinorhizobium meliloti* (Smith *et al.*, 1985 ; Carson *et al.*, 2000). En parallèle, l'aminochéline, qui appartient au groupe des catécholates, est produite principalement par *Azotobacter vinelandii* (Cornish et Page, 1995). Les autres sidérophores détectés représentent des molécules communes produites par plusieurs espèces en même temps, tels que : la Schizokinène est produite par *Bacillus* sp et *Rhizobium* sp (Mullis *et al.*, 1971 ; Storey *et al.*, 2006), et l'acide 2,3-Dihydroxybenzoïque qui est produit par *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. et *Bacillus* sp. (Saxena *et al.*, 1986 ; Duhme *et al.*, 1998 ; Wilson *et al.*, 2006).

Notre étude montre la détection de la production des AHL par 7 isolats endophytes, ce qui suggère l'importance de ces molécules dans l'interaction plante-endophyte pour les deux partenaires. Calatrava-Morales *et al.* (2018) ont conclu que les AHL représentent des molécules de signalisation intraspécifiques et interspécifiques, fournissant une signalisation complexe et dynamique entre plusieurs partenaires de l'habitat naturel. Elasri *et al.* (2001) ont rapporté que la production des AHL semble être plus courante parmi les espèces de *Pseudomonas* sp associées aux plantes que les espèces du sol non-rhizosphérique. Les molécules d'AHL sont, jusqu'à présent, la classe la mieux documentée de composés signaux des PGPB qui présentent des effets sur les plantes. Il a été signalé que la détection du quorum régule de nombreuses fonctions bactériennes, telles que la densité cellulaire, la fixation de l'azote et la production des antibiotiques (Latour *et al.*, 2008). De même, Wei et Zhang (2006) ont montré que la détection du quorum est impliquée dans la colonisation des racines et l'activité de lutte biologique. De plus, d'autres études ont rapporté le rôle des AHL dans l'élongation des racines (Liu *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2015).

Dans cette étude la détection du quorum est obtenue seulement avec *A. tumefaciens* NT1, ce qui signifie que les AHL produits par ces isolats sont des AHL de longues chaînes. En fait, *A. tumefaciens* NT1 représente un biocapteur particulièrement sensible à plusieurs AHL, principalement : C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL et leurs dérivés (Farrand *et al.*, 2002). Cependant, *C. violaceum* CV026 détecte généralement les AHL à chaîne courte : C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL et 3-oxo-C8-HSL (McClellan *et al.*, 1997). De ce fait, en se référant à la littérature, les AHL produits par les sept isolats sont des C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL ou de leurs dérivés. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse HPLC-MS/MS de l'extrait de l'isolat BEK8, dont les trois AHL détectés sont : C14-HSL, 3-oxo-C10-HSL et

3-oxo-C14-HSL. Dans des travaux antérieurs, Bai *et al.* (2012) ont rapporté que le 3-oxo-C10-HSL peut activer la formation des racines. De même, Ortiz-Castro *et al.* (2008) ont constaté que le 3-oxo-C10-HSL améliore le développement racinaire et la formation des poils racinaires. D'autre part, Schenk *et al.* (2014) ont constaté que le 3-oxo-C14-HSL améliore la défense contre les agents pathogènes chez *Arabidopsis*. D'autre part, Veliz-Vallejos *et al.* (2014) ont démontré une amélioration de la nodulation dans les racines de *Medicago truncatula* après un traitement par le 3-oxo-C14-HSL. Parallèlement à ces observations, plusieurs études ont montré la capacité du 3-oxo-C14-HSL à renforcer la défense contre les agents pathogènes biotrophes (Schikora *et al.*, 2011 ; Schenk *et al.*, 2014 ; Hernández-Reyes *et al.*, 2014).

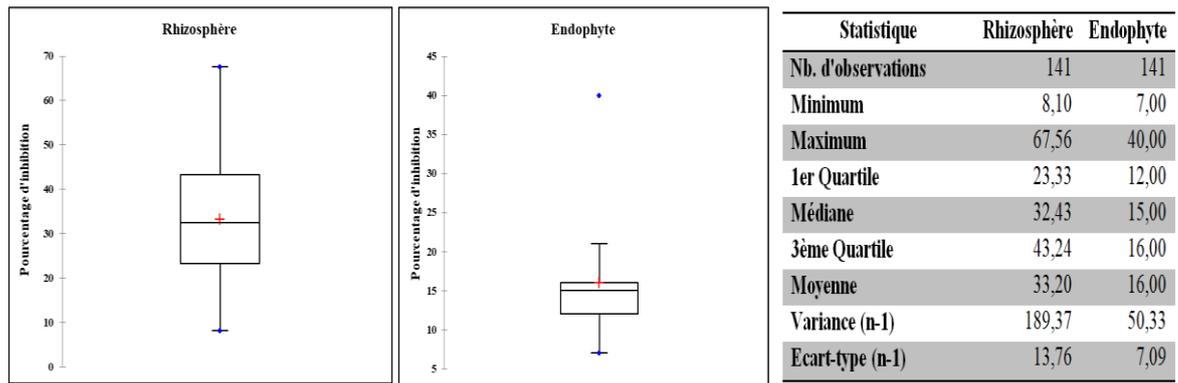
Grâce à la détection du quorum, les microorganismes pathogènes peuvent infecter les racines des plantes. La détection du quorum des phytopathogènes peut être contrôlée par l'inhibition de leurs molécules auto-inductrices (Shastry et Rai, 2017). Selon nos résultats, la désactivation de l'auto-induction par les AHL est observée sur 22 isolats, dont 10 et 15 isolats ont inhibé l'auto-induction chez *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement. La grande activité des bactéries Gram positif par rapport aux bactéries Gram négatif est liée à la nature des molécules ciblées, qui sont produits principalement par les bactéries Gram négatif. En fait selon la littérature, cette inhibition peut être liée à plusieurs facteurs. Vesuna et Nerurkar (2018) ont rapporté que *Streptomyces* sp. peut produire de l'acylase, une enzyme dégradant l'AHL et qui inhibe les facteurs de virulence des agents pathogènes. De plus, Shastry et Rai (2017) ont montré que les bactéries produisant l'oxydoréductase et la lactonase peuvent dégrader les AHL. Outre l'activité enzymatique, d'autres études ont montré une activité de désactivation du quorum à travers différents types de molécules, Miao *et al.* (2017) ont démontré que *Streptomyces parvulus* peut inhiber de façon significative la production de violaceine de *C. violaceum* 12472 et aussi la formation de biofilm de quatre souches bactériennes, où le composant actif est l'actinomycine D, Kang *et al.* (2016) ont montré une inhibition de l'auto-induction chez *C. violaceum* CV026 par la piericidine A et la glucopiericidine produites par *Streptomyces xanthocidicus*. De plus, les buténolides et l'acide 1H-pyrrole-2-carboxylique produits par *Streptomyces antibioticus* et *Streptomyces coelicoflavus*, respectivement, sont avérés capable de réduire la détection du quorum chez *C. violaceum* CV026 (Martinelli *et al.*, 2004 ; Hassan *et al.*, 2016).

Nos résultats montrent la capacité des isolats endophytes à solubiliser le phosphate. En fait, les bactéries endophytes peuvent augmenter la disponibilité du phosphore pour les plantes en solubilisant les phosphates précipités, en utilisant des mécanismes comme l'acidification, la

chélation, l'échange d'ions et la production d'acides organiques (Nautiyal *et al.*, 2000 ; Jain et Pundir, 2017). Ils peuvent également augmenter la disponibilité du phosphore dans le sol en sécrétant de la phosphatase qui peut minéraliser le phosphore organique (Van Der Heijden *et al.*, 2008). De plus, les bactéries endophytes peuvent empêcher l'adsorption et la fixation du phosphate dans des conditions limitantes en assimilant le phosphore solubilisé (Khan et Joergensen, 2009). Ainsi, ces bactéries peuvent servir de puits pour fournir du phosphore aux plantes quand elles en ont besoin. Nos résultats montrent que 79 % des isolats solubilisent le phosphate, ce qui est en concordance avec plusieurs travaux cités dans la littérature, dont environ 59 à 100 % des populations endophytes de cactus, fraise, tournesol, soja et autres légumineuses sont capables de solubiliser le phosphate inorganique (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004 ; Forchetti *et al.*, 2007 ; Dias *et al.*, 2009 ; Puente *et al.*, 2009 ; Palaniappan *et al.*, 2010). Malgré le grand pourcentage des isolats endophytes solubilisant le phosphate, la taille de l'halo produit est très petite indiquant une solubilisation faible, ce qui est similaire aux résultats de la solubilisation de phosphate des isolats rhizosphériques et non-rhizosphériques, étudié dans le chapitre 2, et dont la taille de l'halo n'a pas dépassé 10 mm.

La recherche du pouvoir antifongique chez les isolats endophytes a été effectuée sur milieu solide. Cette analyse a révélé la production de composés antifongiques chez 25 isolats parmi 83. En fait, les phytopathogènes fongiques et microbiens peuvent être ciblés par les bactéries endophytes (Lodewyckx *et al.*, 2002), elles peuvent produire des substances antagonistes telles que les antibiotiques, les enzymes hydrolytiques et d'autres composés organiques (Zarei *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012 ; Sheoran *et al.*, 2015). Il a été démontré que les bactéries endophytes suppriment avec succès les maladies fongiques chez plusieurs plantes comme le poivre noir, la pomme de terre, le blé, *etc.* (Coombs *et al.*, 2004 ; Sessitsch *et al.*, 2004 ; Aravind *et al.*, 2009).

La figure 31 montre un *Box-plot* qui exprime l'inhibition du *F. oxysporum* par les isolats rhizosphériques rapportés dans le chapitre 2 et les isolats endophytes des trois génotypes. Selon cette figure, il est important de noter que les isolats rhizosphériques ont une capacité d'inhibition plus importante avec une moyenne de 33,2 %, comparativement à celle des bactéries endophytes qui est seulement de 16 %.



**Figure 31.** *Box-plot* exprime le pourcentage d'inhibition de *F. oxysporum* chez les isolats rhizosphériques et endophytes.

Ce résultat est peut être liés aux mécanismes de défense utilisés par les deux microbiotes. En liaison à nos résultats et à la méthode utilisée pour étudier l'activité antifongique, Il est possible de conclure que le microbiote rhizosphérique possède plus de capacité à produire des substances antifongiques et des enzymes hydrolytiques. D'autre part, selon la littérature, les endophytes utilisent d'autre systèmes de défense, tels que l'ISR, ce système peut protéger l'hôte contre les pathogènes fongiques, bactériens et même viraux (Alvin *et al.*, 2014). Les bactéries endophytes peuvent initier l'ISR en utilisant différentes molécules, telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Pieterse *et al.*, 2012), dont la production de l'acide salicylique est déjà observée par deux de nos isolats endophytes.

En conclusion, 83 isolats ont été obtenus à partir des racines de trois génotypes de piment industriel. Selon le travail réalisé, les isolats présentent une grande capacité de promotion de la croissance des plantes. L'ACP réalisée à partir des résultats a permis la mise en évidence des cinq isolats KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 et BEK8. Les différentes techniques de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse semblent être très prometteuses pour la quantification des auxines et l'identification des voies métaboliques utilisées dans leurs biosynthèses directement à partir du surnageant, de même ces techniques semblent être utiles dans l'identification de plusieurs type de sidérophores et des AHL produits par les endophytes. Afin de valoriser l'importance de ces bactéries dans la croissance des trois génotypes de piments, il est nécessaire : d'étudier la diversité génétique des isolats endophytes ; d'identifier, par approche moléculaire, les isolats sélectionnés ; l'étude de l'activité de promotion de la croissance des isolats sur les trois cultivars de piment *in vivo*.

## **Chapitre 4 : Diversité des bactéries endophytes associées aux racines des trois variétés de *Capsicum annuum*. Identification et caractéristiques phénotypiques de quelques isolats**

Les endophytes sont taxonomiquement, métaboliquement et aussi génétiquement diverses (Afzal *et al.*, 2019). L'étude de la diversité génétique des bactéries endophytes est non seulement importante pour comprendre leur rôle écologique dans les interactions plante-microorganismes, mais aussi pour l'étude de leur application biotechnologique (Li *et al.*, 2008 ; Rashid *et al.*, 2012 ; Beghalem *et al.*, 2017).

Récemment, les techniques basées sur l'amplification des séquences répétitives d'ADN sont largement appliquées pour évaluer la diversité génétique des endophytes de différentes plantes (Beghalem *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2008). Parmi ces techniques, figure la BOX-PCR qui est basée sur l'utilisation des amorces ciblant des séquences d'ADN répétitives hautement conservées chez les espèces bactériennes (Rademaker *et al.*, 2000 ; Lanoot *et al.*, 2004).

Ce chapitre représente, à notre reconnaissance, la première évaluation de la diversité génétique des endophytes isolées à partir du piment industriel cultivé en Algérie. D'autre part, cette partie, qui représente une suite pour le chapitre précédent (chapitre 03), vise l'identification par l'amplification de l'ADNr 16s des isolats les plus prometteurs et la détermination de leurs profils métaboliques.

### **Matériel et méthodes**

#### **1. Analyse de la diversité génétique par BOX-PCR**

##### **1.1.Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN est réalisée selon le protocole de Chachaty et Saulnier (2000) avec modification. Les isolats bactériens sont d'abord cultivés dans un bouillon nutritif pendant 24 h à 37 °C pour les isolats non-filamenteux et dans un bouillon *ISP*<sub>2</sub> (annexe 1), pendant une semaine à 30 °C pour les isolats filamenteux. 1 ml de la suspension cellulaire est centrifugée à 4000 rpm pendant 15 min, cette étape est répétée, quand c'est nécessaire, jusqu'à la formation d'un culot dense. Pour les bactéries Gram négatif, le culot est dissocié par pipetage répété dans un volume de 567 µl de tampon TE (10 mM Tris-Cl : 1 mM EDTA, pH 8). Cependant, pour les bactéries Gram positif, le culot est additionné de 557 µl de tampon TE et de 10 µl de lysozyme (20 mg/ml), les tubes sont incubés 40 min à 37 °C afin d'assurer l'action de lysozyme sur la paroi.

Pour les isolats avec les deux types de paroi, 30 µl de SDS à 10 % et 3 µl de la protéinase K (20 mg/ml) sont ajoutés aux tubes, ces derniers sont bien mélangés et incubés pendant 60 min à 37 °C. Après incubation, 100 µl de NaCl (5M) sont ajoutés, après agitation, 80 µl de la solution CTAB/NaCl (10 % CTAB préparé dans 0,7 M NaCl) sont ajoutés au mélange, Après agitation, les tubes Eppendorf sont incubés pendant 10 min à 65 °C dans un bain sec. Après l'incubation, 700 µl de la solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) sont ajoutés, ensuite les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min, la phase aqueuse est transférée à un nouveau tube Eppendorf et elle est traitée par un volume de la solution chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Après une centrifugation pendant 15 min à 14000 rpm, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube Eppendorf et elle est additionnée de 600 µl d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est rincé par un volume d'éthanol à 70 %, ensuite, il est séché sous la hotte. L'ADN extrait est dissocié dans 100 µl du tampon TE puis il est conservé à -20 °C. La quantité et la qualité de l'ADN extrait sont vérifiées par spectrophotométrie en utilisant un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific).

### 1.2. Conditions d'amplification

L'amplification est réalisée selon le protocole de Kaschuk *et al.* (2006), par l'utilisation de l'amorce BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') et en adaptant un volume final de 25 µl contenant : 5 µl de dNTPs (5 mM); 5 µl de tampon (10×); 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1 µl de l'amorce (50 pmol/µl) ; 0,25 µl de la Taq polymérase (5U/µl); 1 µl de l'ADN matriciel (50 ng/µl) ; l'eau milli-Q stérile est utilisée pour compléter le volume. Le programme PCR réalisé à l'aide de thermocycleur (MJ Research Inc. PTC-100TM) est le suivant : Une dénaturation initiale de l'ADN 7 min à 95 °C, suivie de 35 cycles de dénaturation (1 min à 94 °C)/ hybridation (1 min à 53 °C)/ élongation (8 min à 65 °C) ; et enfin une élongation terminale de 16 min à 65 °C.

### 1.3. Séparation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % contenant 5 µl de bromure d'éthidium, 3 µl de marqueur GeneRuler™, 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) est déposé dans le premier et le dernier puits pour faciliter le traitement des résultats. L'électrophorèse est réalisée en tampon TBE (X 0,5) pendant trois heures à voltage constant de 80 V. Les différents fragments sont révélés par fluorescence sous lampe UV.

### 1.4. Analyse des résultats

Les photos des profils électrophorétiques de la BOX-PCR sont analysées avec le logiciel Image-Pro (version 10.0.4, Media cybernetics). Les bandes sont détectées automatiquement puis améliorées manuellement, les résultats des gels sont regroupés et normalisés grâce à la présence du marqueur de taille dans le premier et le dernier puits de chaque gel. Les matrices binaires obtenues ((1) pour présence de bande ; (0) pour l'absence de bande) sont utilisées pour tracer des arbres phylogénétiques avec le logiciel Past 3 (PAleontological STatistics, version 3.25, University of Oslo) selon la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group with Mathematical Averages*) et l'indice de distance de Jaccard.

L'indice de diversité (*Shannon-Wiener index*), l'abondance (*richness index*), l'équitabilité (*Pielou's evenness index*) et la dominance (*Simpson's dominance index*) sont calculés à partir des matrices binaires par l'utilisation du logiciel Past 3.

## 2. Identification des isolats endophytes

### 2.1. Amplification de l'ADN ribosomique 16S

L'ADNr 16S est amplifié par PCR en utilisant deux amorces : 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). L'amplification est réalisée par l'enzyme GoTaq® Flexi DNA polymérase (Promega) dans un volume réactionnel total de 50 µl contenant : 50 ng d'ADN génomique ; 10 µl de tampon (X5) ; 5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) ; 2 µl de dNTP (5 mM) ; 1 µl de chacune des amorces (10 µM) ; 3U de Taq polymérase ; l'eau milli-Q stérile. Le programme PCR réalisé à l'aide du thermocycleur (MJ Research Inc. PTC-100TM) est le suivant : une dénaturation initiale de l'ADN 2 min à 95 °C ; 30 cycles de : dénaturation (30 s à 95 °C)/hybridation (30 s à 54 °C)/élongation (1 min et 30 s à 72 °C) ; une élongation terminale de 5 min à 72 °C.

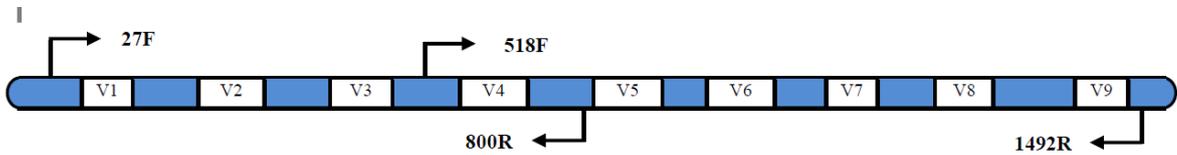
### 2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier les amplicons, les produits de la PCR sont examinés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % en tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA ; Euromedex) contenant 5 µl de bromure d'éthidium et en présence d'un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega). Après migration d'une heure. Le gel est visualisé sous lumière UV à 302 nm.

### 2.3. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Les produits de la PCR sont purifiés par le Kit minElute et envoyés à la compagnie STABvida (Portugal) pour le séquençage. Le séquençage des gènes est réalisé sur les deux brins d'ADN selon la méthode de Sanger. Afin d'améliorer le résultat du séquençage, les amplicons

sont séquencés en utilisant les quatre amorces représentées sur la figure 32 (Claverias *et al.*, 2015). La séquence consensus est obtenue à partir de l'assemblage couvrant la totalité de la région amplifiée.



**Figure 32.** Représentation schématique des régions d'ADN séquencées par les quatre amorces. (Régions bleues : régions conservées. Régions blanches : régions hypervariables).

## 2.4. Etude phylogénétique

Les séquences sont traitées par le logiciel MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis program, version 7.0.26) pour extraire la séquence de l'ADNr 16S. Les séquences consensus obtenues sont comparées aux autres séquences homologues grâce à au programme BLASTn, du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Cette comparaison est faite par le biais de serveur EzTaxon (Yoon *et al.*, 2017), qui regroupe les séquences microbiennes des souches-types validées. L'ensemble des séquences d'ADNr 16S sont alignées à l'aide du programme CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques sont construits à l'aide du logiciel MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), selon la méthode de *Neighbor Joining* (NJ) et une matrice de distance calculée par le modèle à deux paramètres de Kimura (Saitou et Nei, 1987 ; Kimura, 1980). Une analyse par bootstrap est réalisée pour évaluer la topologie des arbres avec un ordre de 1000 répliques (Felsenstein, 1985).

## 3. Etude de caractères biochimiques et physiologiques

### 3.1. Utilisation des composés glucidiques

La mise en évidence de la capacité des isolats à utiliser les substrats glucidiques est déterminée par la méthode de Shirling et Gottlieb (1966), avec le milieu de base *ISP<sub>9</sub>* (annexe 1) pour l'isolat FEO15 et le milieu minimum *M<sub>63</sub>* (annexe 1) pour les autres isolats. Les substrats glucidiques testés sont les suivants : arabinose, fructose, galactose, inositol, mannitol, glucose, lactose, rhamnose, maltose, sucrose, sorbitol, xylitol, mannose et xylose. L'utilisation de différents substrats est révélée par la présence ou l'absence de croissance sur le milieu de culture. La confirmation de l'assimilation des sources de carbone est réalisée par comparaison à un control négatif qui représente le milieu de culture sans la source de carbone.

### 3.2. Utilisation des sources d'azote

La mise en évidence de la capacité des souches à utiliser différents substrats azotés est déterminée selon la méthode décrite par Williams *et al.* (1983a). Les milieux *ISP*<sub>9</sub> et *M*<sub>63</sub> sont additionnés de 0,1 % (P/V) des sources d'azotées. Les substances azotées testées sont les suivants : histidine, arginine, tyrosine, alanine, glycine, méthionine, valine, leucine, tryptophane, asparagine et proline. L'utilisation de différents substrats est révélée par la présence ou l'absence de croissance sur le milieu de culture. La confirmation de l'assimilation des sources d'azote est réalisée par comparaison à un control négatif qui représente le milieu de culture sans la source d'azote.

### 3.3. Les activités d'hydrolyse

L'hydrolyse de la gélatine (0,4 %), la caséine (1 %), l'amidon (1 %) la tyrosine (0,5 %) et l'adénine (0,1 %) est déterminée sur le milieu de base de l'*ISP*<sub>9</sub> pour l'isolat FEO15 et sur le milieu *M*<sub>63</sub> pour les autres isolats. L'hydrolyse du tween 80 (0,1 %) et de la cellulose est testée sur les milieux Sierra et la Carboxyméthyl cellulose (CMC) gélosé, respectivement (annexe 1). La dégradation des composés insolubles est détectée par l'apparition de zones claires autour des colonies. La révélation de la dégradation de la gélatine, de l'amidon et de cellulose est réalisée par inondation par, une solution de chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>), du lugol et d'une solution d'iode (annexe 2), respectivement. (Hankin *et al.*, 1971 ; Williams *et al.*, 1983a ; Nicemol, 2006 ; Maki *et al.*, 2011).

### 3.4. La résistance aux antibiotiques

La mise en évidence de la sensibilité de l'isolat FEO15 aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (*YMEA*), recommandée par Williams *et al.* (1983b). Les différents antibiotiques utilisés sont l'érythromycine, l'imipenème, la gentamycine, la pénicilline, l'amoxicilline, le céfotaxime, la vancomycine, le chloramphénicol et le cotrimoxazole. Après ensemencement de l'isolat, les disques d'antibiotiques sont déposés. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après cinq jours incubation à 30°C.

La sensibilité des isolats KEK1, KEK36, FEK22 et BEK8 contre l'imipenème et la gentamycine est testée, suivant la méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton, selon les recommandations de *CLSI* « *Clinical and Laboratory Standards Institute* ». Les résultats sont interprétés conformément au guide de *CLSI* (*CLSI*, 2018).

### 3.5. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques

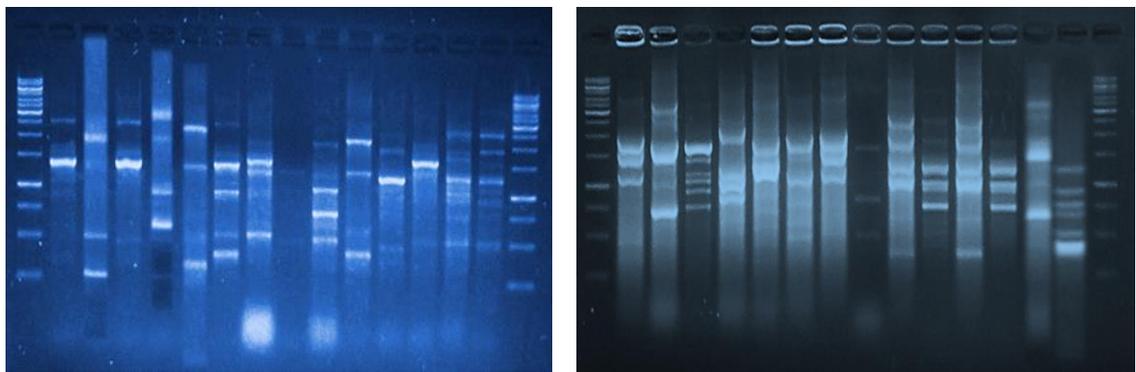
L'effet des inhibiteurs chimiques (pH, chlorure de sodium, le phénol et le crystal violet) sur la croissance des isolats est déterminé. Les isolats sont ensemencés par spot sur gélose nutritive ou sur gélose *ISP*<sub>2</sub> (Annexe 1) additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes : chlorure de sodium 0, 2, 4, 6, 7, 8 et 13 % (P/V), phénol 0,1 % (P/V), crystal violet 0,0001 % (P/V). D'autre part, la croissance des isolats est déterminée à différentes valeurs de pH (4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 9).

La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée, après 7 jours d'incubation pour l'isolat FEO15 et 72 h pour les autres isolats, par comparaison avec le témoin (Gordon *et al.*, 1977 ; Williams *et al.*, 1983a).

## Résultats

### 1. La diversité génétique par BOX-PCR

En examinant les gels, l'amplification des séquences répétées est obtenue pour la totalité des isolats, les amplicons sont visualisés sous formes de différentes bandes (figure 33). Le nombre total des bandes pour chaque isolat varie entre 3 et 12. Selon l'espèce les bandes diffèrent, également, par leur taille.



**Figure 33.** Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % présentant la migration des amplicons de quelques isolats produits par BOX-PCR. Le premier et le dernier puits sur chaque photo représente le profil électrophorétique du marqueur de taille d'ADN 1 Kb.

L'ensemble des profils électrophorétiques, obtenus par l'analyse de la totalité des gels, a permis la construction des dendrogrammes. La figure 34 illustre deux dendrogrammes exprimant les résultats selon la nature de la paroi bactérienne. Selon ces résultats, le pourcentage de similitude le plus faible est de 15 et 30 % pour les bactéries à Gram négatif et à Gram positif respectivement. A 35 % de similitude, il est possible de classer les isolats à Gram négatif en cinq clades différents et à 2 clades seulement pour les isolats à Gram positif. Sur les deux

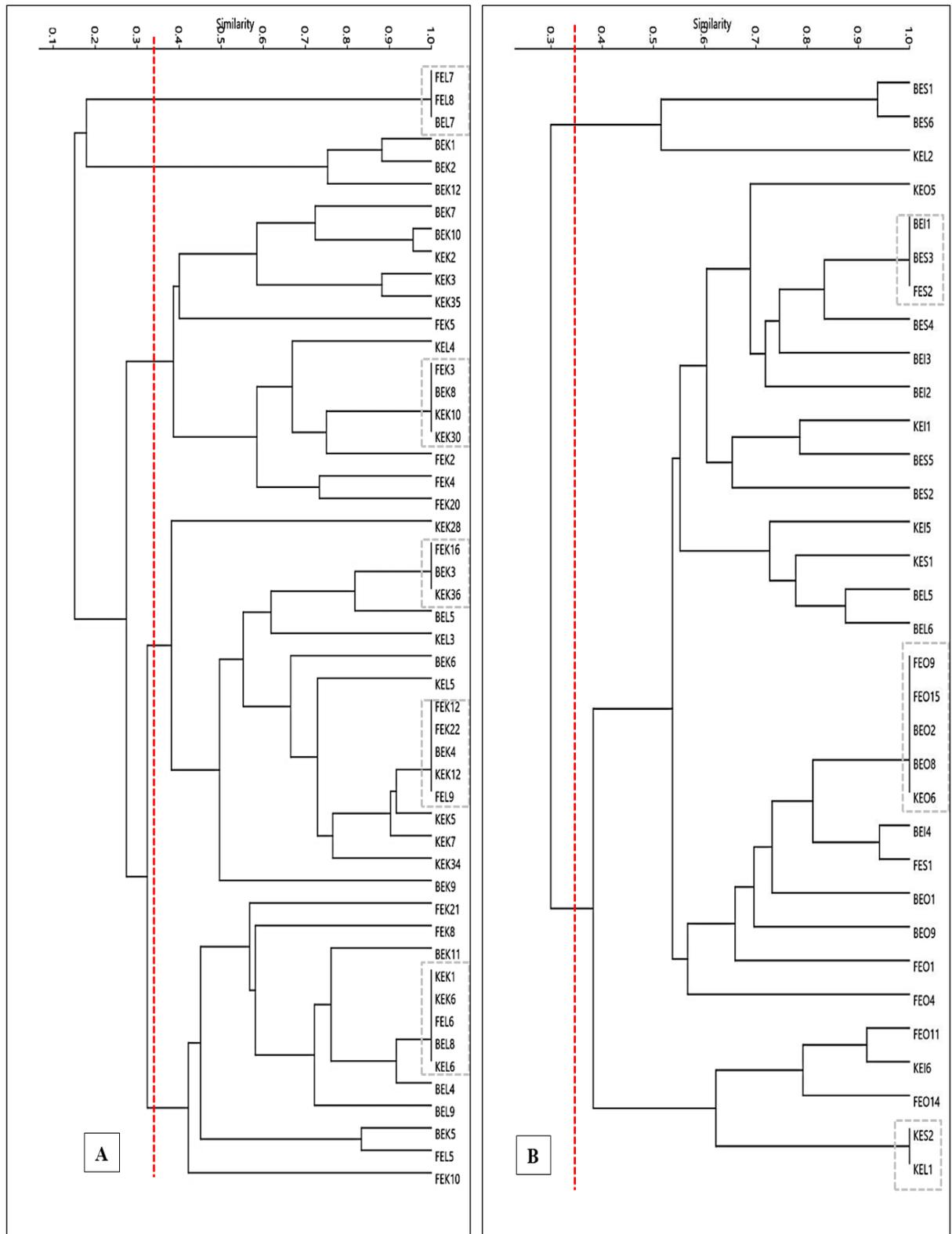
dendrogrammes, 8 groupes présentent des profils électrophorétiques identiques et une similarité de 100 %, dont le nombre d'isolats varie de deux à cinq dans chaque clade, il s'agit des groupes : (FEL7 ; FEL8 ; BEL7), (FEK3 ; BEK8 ; KEK10 ; KEK30), (FEK16 ; BEK3 ; KEK36), (FEK12 ; FEK22 ; BEK4 ; KEK12 ; FEL9), (KEK1 ; KEK6 ; FEL6 ; BEL8 ; KEL6) pour les bactéries à Gram négatif et des groupes : (BEI1 ; BES3 ; FES2), (FEO9 ; FEO15 ; BEO2 ; BEO8 ; KEO6), (KES2 ; KEL1) pour les bactéries à Gram positif.

La diversité génétique des bactéries endophytes de chaque génotype de *C. annum* est étudiée à travers la construction des dendrogrammes (figure 35). Les dendrogrammes sont élaborés par l'analyse des profils électrophorétiques de tous les isolats du même génotype. Selon cette figure, le pourcentage de similitude le plus faible est d'environ 12 % pour les trois cultivars. A 30 % de similitude, les isolats sont classés en quatre, cinq et six clades pour les génotypes Karam, Al-Fares et Biskra, respectivement. A 100 % de similitude, plusieurs isolats ont présentés des groupes clonaux, il s'agit des groupes : (FEL7 ; FEL8), (FEK12 ; FEK22 ; FEL9) (FEO9 ; FEO15) pour le génotype Al-Fares ; des groupes : (KEK10 ; KEK30), (KEK1 ; KEK6 ; KEL6), (KES2 ; KEL1) pour le génotype Karam et des groupes (BEI1 ; BES3), (BEO2 ; BEO8) pour le génotype Biskra.

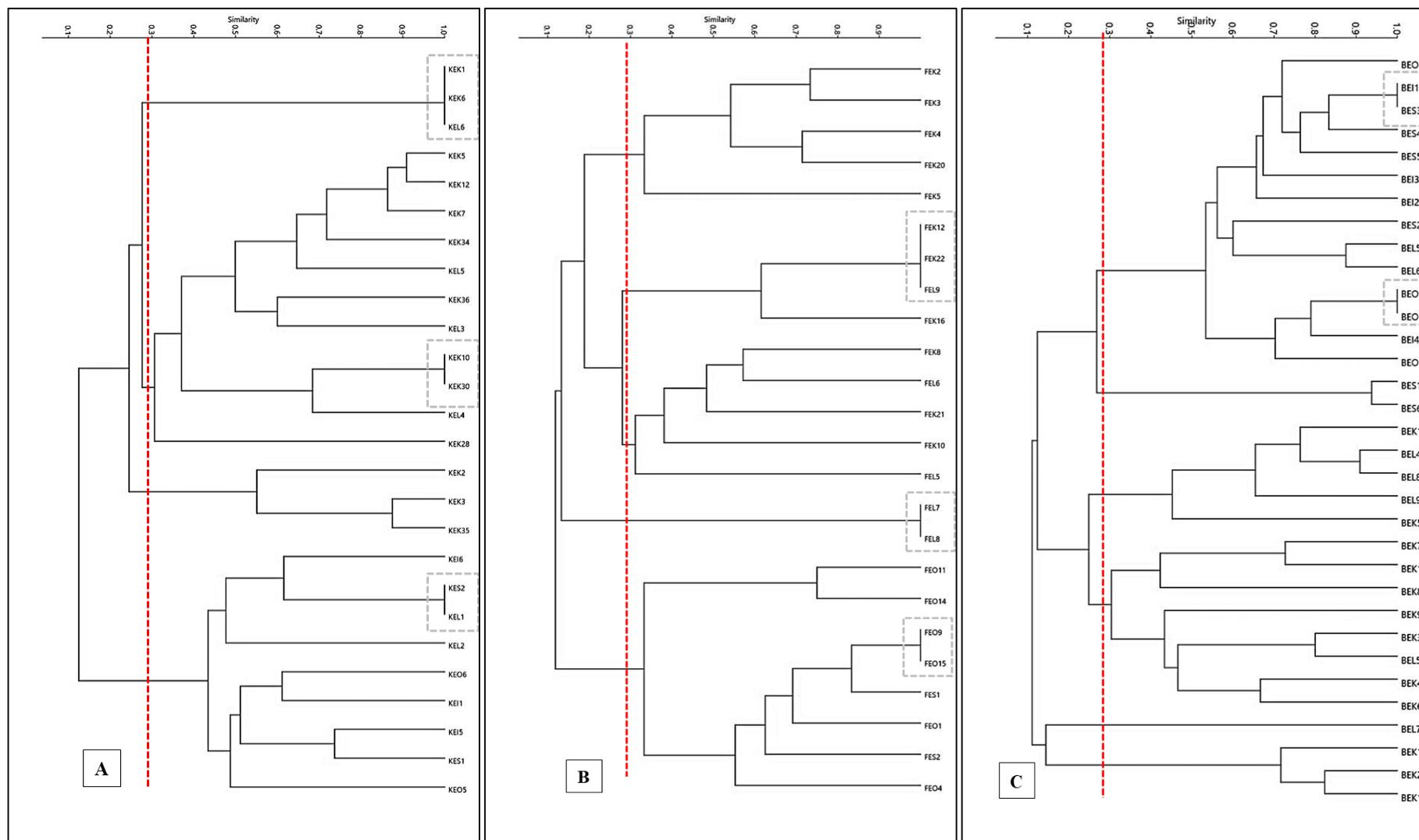
L'indice de diversité, l'abondance, l'équitabilité et la dominance des isolats endophytes sont présentés dans le tableau 14. Ainsi, les trois génotypes ont présenté des résultats très proches, qui se résument à des indices de diversité et d'équitabilité élevés et des indices de dominance faible. Sur la totalité des isolats et selon la nature de la paroi, les isolats Gram négatif ont présenté plus de diversité par rapport aux isolats Gram positif.

**Tableau 14.** L'indice de diversité, l'abondance, l'équitabilité et la dominance des isolats des trois génotypes.

	L'indice de diversité (H')	L'abondance	L'équitabilité	La dominance
<b>Bactéries Gram+</b>	3,23	473	0,88	0,046
<b>Bactéries Gram-</b>	3,54	615	0,91	0,036
<b>Génotype</b> Biskra	3,72	454	0,93	0,028
Karam	3,60	336	0,93	0,032
Al-Fares	3,69	298	0,94	0,029



**Figure 34.** Dendrogrammes basés sur l’analyse des profils électrophorétiques de la BOX-PCR des 83 isolats bactériens. (A) Isolats Gram négatif ; (B) Isolats Gram positif. Les isolats présentant des profils électrophorétiques similaires sont encadrés.



**Figure 35.** Dendrogrammes basés sur l’analyse des profils électrophorétiques de la BOX-PCR des isolats bactériens selon le génotype de *C. annuum*. (A) Génotype Karam ; (B) génotype Al-Fares ; (C) génotype Biskra.

## 2. Identification des isolats endophytes

Après amplification et séquençage de l'ADNr 16S des cinq isolats sélectionnés, les séquences obtenues sont comparées avec d'autres séquences par le biais du serveur EzTaxon et elles sont déposées à la base de données GenBank avec les numéros d'accès mentionnés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 15.** Numéros d'accès des isolats déposés dans la base de données GenBank.

Les isolats bactériens	Numéro d'accès
FEK22	MK100477
KEK1	MK100478
BEK8	MK100476
KEK36	MK100475
FEO15	MK100474

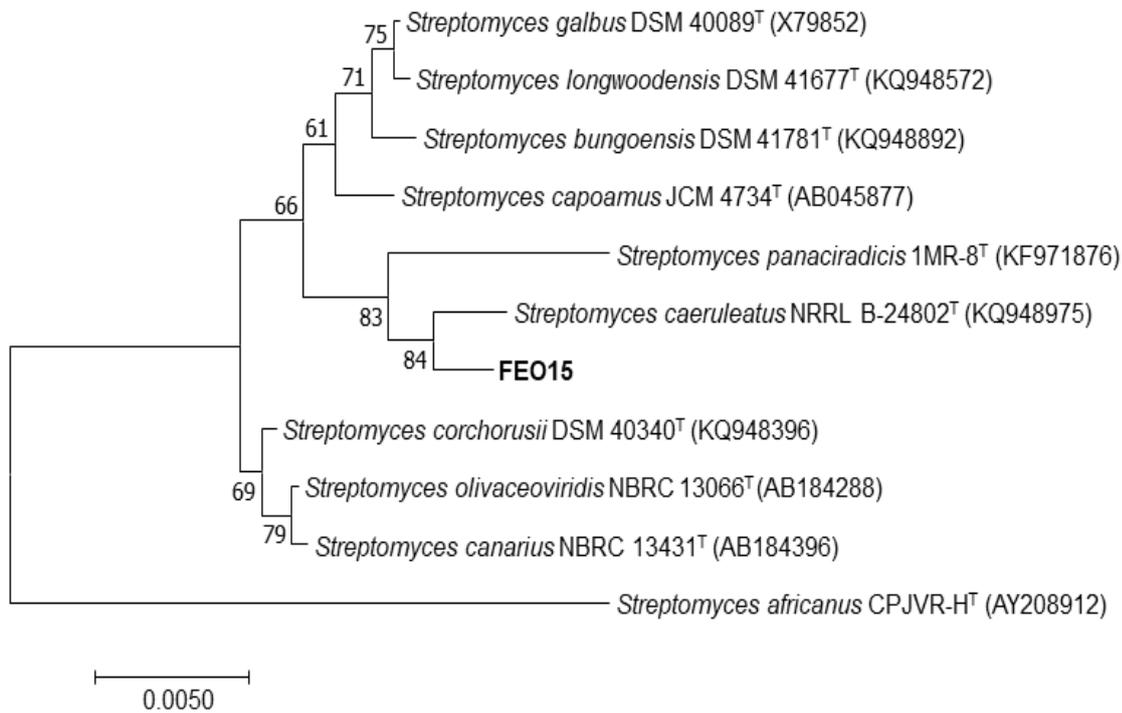
### 2.1. Isolat FEO15

L'analyse effectuée pour l'isolat FEO15 montre que la souche *Streptomyces caeruleatus* NRRL B-24802<sup>T</sup> est la plus proche avec une similitude de 99,57 % (tableau 16).

**Tableau 16.** Souches-types les plus proches à l'isolat FEO15.

Souches-types	Mismatch/nt Total	Similarité (%)
<i>S. caeruleatus</i> NRRL B-24802 <sup>T</sup> (KQ948975)	6/1409	99,57
<i>S. capoamus</i> JCM 4734 <sup>T</sup> (AB045877)	11/1409	99,22
<i>S. galbus</i> DSM 40089 <sup>T</sup> (X79852)	13/1408	99,08
<i>S. corchorusii</i> DSM 40340 <sup>T</sup> (KQ948396)	14/1409	99,01
<i>S. panaciradicis</i> 1MR-8 <sup>T</sup> (KF971876)	14/1409	99,01
<i>S. longwoodensis</i> DSM 41677 <sup>T</sup> (KQ948572)	14/1409	99,01
<i>S. bungoensis</i> DSM 41781 <sup>T</sup> (KQ948892)	14/1409	99,01

L'analyse phylogénétique par la méthode du "Neighbor-Joining" montre la position de l'isolat et sa relation avec quelques souches-types proches appartenant au genre *Streptomyces*. L'isolat FEO15 est situé dans le même clade avec *Streptomyces caeruleatus* NRRL B-24802<sup>T</sup> et *Streptomyces panaciradicis* 1MR-8<sup>T</sup> (figure 36).



**Figure 36.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, montrant la relation entre l'isolat FEO15 et de souches-types appartenant au genre *Streptomyces*. Les valeurs du bootstrap (> 50 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des noeuds de l'arbre. La barre représente deux substitutions pour 1000 nucléotides. L'espèce *Streptomyces africanus* CPJVR-HT<sup>T</sup> est utilisée comme outgroup.

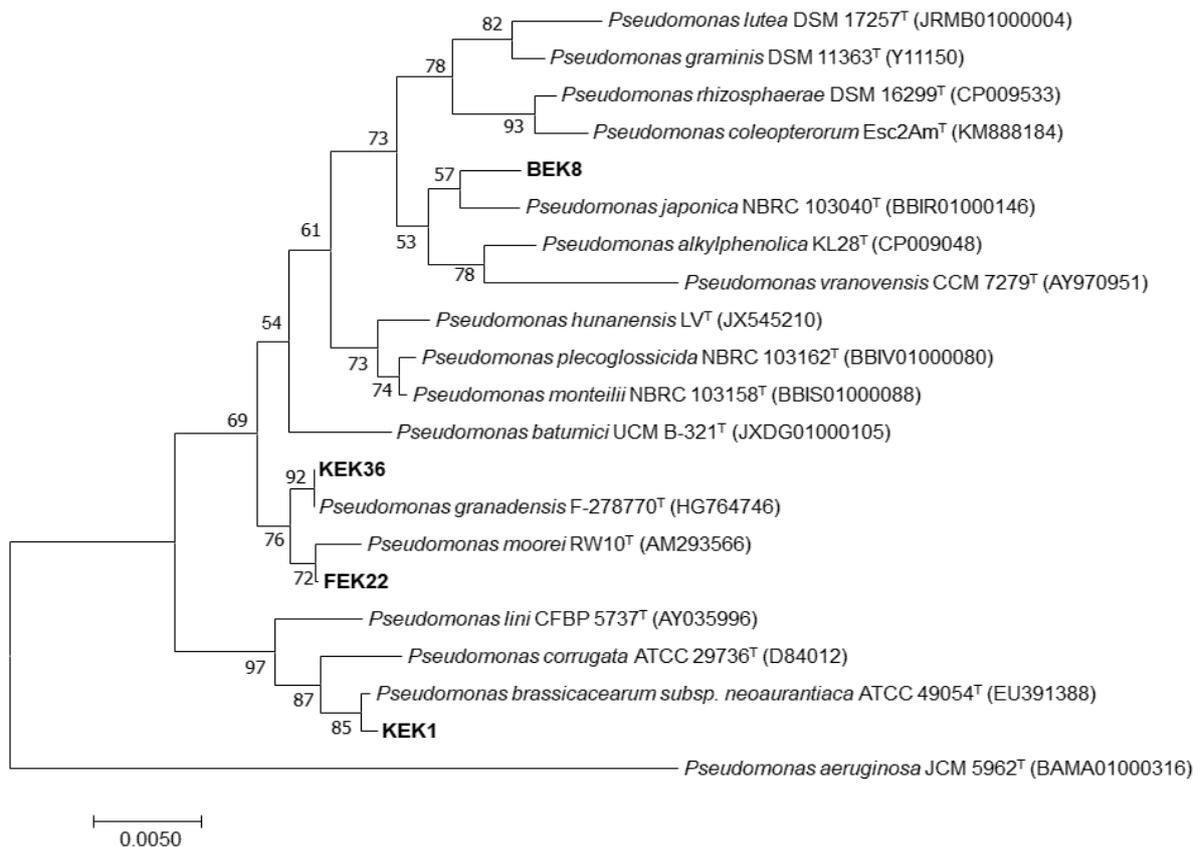
## 2.2. Les isolats FEK22, KEK1, BEK8 et KEK36

Selon les pourcentages de similarité (tableau 17), les quatre isolats sont classés comme membres du genre *Pseudomonas*. Les pourcentages de similitudes varient de 98,99 à 100 % en comparaison avec les souches-types.

**Tableau 17.** Souches-types les plus proches aux isolats FEK22, KEK1, BEK8 et KEK36.

Isolats	Souches-types	Mismatch/nt Total	Similarité (%)
<b>KEK1</b>	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i> ATCC 49054 <sup>T</sup> (EU391388)	2/1307	99,85
	<i>P. corrugata</i> ATCC 29736 <sup>T</sup> (D84012)	5/1291	99,61
<b>BEK8</b>	<i>P. japonica</i> NBRC 103040 <sup>T</sup> (BBIR01000146)	14/1381	98,99
	<i>P. alkylphenolica</i> KL28 <sup>T</sup> (CP009048)	16/1381	98,84
<b>FEK22</b>	<i>P. moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)	2/1326	99,85
	<i>P. granadensis</i> LMG 27940 <sup>T</sup> (LT629778)	16/1344	98,8
<b>KEK36</b>	<i>P. granadensis</i> LMG 27940 <sup>T</sup> (LT629778)	0/938	100
	<i>P. moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)	8/929	99,13

L'analyse phylogénétique montre la position de ces isolats et leurs relations avec les souches-types appartenant au genre *Pseudomonas* (Figure 37). La position des isolats sur l'arbre phylogénétique montre qu'ils sont répartis principalement en trois clades, le premier regroupe l'isolat BEK8, le deuxième rassemble les deux isolats KEK36 et FEK22 et le troisième regroupe l'isolat KEK1.



**Figure 37.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, montrant la relation entre les isolats FEK22, KEK1, BEK8, KEK36 et de souches-types appartenant au genre *Pseudomonas*. Les valeurs du bootstrap (> 50 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des noeuds de l'arbre. La barre représente deux substitutions pour 1000 nucléotides. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962<sup>T</sup> est utilisée comme outgroup.

### 3. Caractères biochimiques et physiologiques des isolats endophytes

Les cinq isolats diffèrent par leurs capacités à utiliser les différentes sources de carbone (tableau 18). Tous les isolats sont capables d'utiliser le fructose, le glucose, le sorbitol et le mannose comme seule source de carbone. La source de carbone la moins utilisée est le xylose. L'isolat KEK36 assimile 13 sources de carbone sur les 14 sources testées, alors que l'isolat FEK22 n'utilise que six sources.

**Tableau 18.** Utilisation des sucres par les isolats étudiés.

	<b>FEK22</b>	<b>BEK8</b>	<b>KEK1</b>	<b>KEK36</b>	<b>FEO15</b>
<b>Arabinose</b>	-	-	+	+	+
<b>Fructose</b>	+	+	+	+	+
<b>Galactose</b>	-	+	-	+	-
<b>Inositol</b>	-	+	-	+	+
<b>Mannitol</b>	+	+	+	+	-
<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+
<b>Lactose</b>	+	+	-	+	-
<b>Rhamnose</b>	-	+	+	+	+
<b>Maltose</b>	-	+	+	+	+
<b>Sucrose</b>	-	+	+	-	+
<b>Sorbitol</b>	+	+	+	+	+
<b>Xylitol</b>	-	+	+	+	+
<b>Mannose</b>	+	+	+	+	+
<b>Xylose</b>	-	-	-	+	+

(-) pas de croissance ; (+) croissance.

Tous les isolats assimilent l'alanine, la glycine et la leucine. L'acide aminé le moins assimilé est le tryptophane (tableau 19). Les isolats FEO15 et KEK1 assimilent tous les acides aminés à l'exception du tryptophane, tandis que l'isolat FEK22 utilise seulement cinq substrats azotés parmi 11 substrats testés.

**Tableau 19.** Utilisation des composés azotés organiques.

	<b>FEK22</b>	<b>BEK8</b>	<b>KEK1</b>	<b>KEK36</b>	<b>FEO15</b>
<b>Histidine</b>	-	+	+	-	+
<b>Arginine</b>	-	+	+	+	+
<b>Tyrosine</b>	-	-	+	+	+
<b>Alanine</b>	+	+	+	+	+
<b>Glycine</b>	+	+	+	+	+
<b>Methionine</b>	-	+	+	-	+
<b>Valine</b>	-	+	+	+	+
<b>Leucine</b>	+	+	+	+	+
<b>Tryptophane</b>	+	-	-	-	-
<b>Asparagine</b>	-	-	+	+	+
<b>Proline</b>	+	+	+	-	+

(-) pas de croissance ; (+) croissance.

Le tween 80 et l'amidon sont hydrolysés seulement avec l'isolat FEO15 (tableau 20). Parmi les 7 substrats testés, l'isolat FEK22 est capable de dégrader seulement deux substrats, tandis que l'isolat FEO15 est capable d'hydrolyser cinq substrats.

**Tableau 20.** Activité hydrolytique des isolats.

	<b>FEK22</b>	<b>BEK8</b>	<b>KEK1</b>	<b>KEK36</b>	<b>FEO15</b>
<b>Gélatine</b>	+	+	-	+	+
<b>Caséine</b>	-	-	+	-	+
<b>Amidon</b>	-	-	-	-	+
<b>Cellulose</b>	-	+	+	+	-
<b>Adénine</b>	+	+	+	+	-
<b>Tween 80</b>	-	-	-	-	+

(-) pas de croissance ; (+) croissance.

Les isolats FEK22, BEK8, KEK1 et KEK36 sont sensibles aux deux antibiotiques testés, qui sont l'imipénème et la gentamycine (tableau 21). L'isolat FEO15 a présenté une sensibilité envers trois antibiotiques (la gentamycine, la vancomycine et le chloramphénicol) par rapport à neuf antibiotiques testés.

**Tableau 21.** Sensibilité des isolats aux antibiotiques.

<b>Antibiotique (mg/ml)</b>	<b>FEK22</b>	<b>BEK8</b>	<b>KEK1</b>	<b>KEK36</b>	<b>FEO15*</b>
<b>Érythromycine (15)</b>	-	-	-	-	0
<b>Imipénème (10)</b>	S	S	S	S	0
<b>Gentamycine (10)</b>	S	S	S	S	20
<b>Pénicilline (10)</b>	-	-	-	-	0
<b>Amoxicilline (30)</b>	-	-	-	-	0
<b>Céfotaxime (30)</b>	-	-	-	-	0
<b>Vancomycine (30)</b>	-	-	-	-	35
<b>Chloramphénicol (30)</b>	-	-	-	-	20
<b>Cotrimoxazole (25)</b>	-	-	-	-	0

(S) sensible ; \*Résultats exprimés en zones d'inhibition (mm).

Les isolats montrent une bonne résistance à la salinité, avec une inhibition totale de la croissance à 13 % d'NaCl pour l'isolat FEO15 et 8 % pour les autres souches. Seulement les deux isolats KEK1 et KEK36 résistent à pH très acide, alors que tous les isolats montrent une résistance à l'alcalinité. Tous les isolats montrent une tolérance au cristal violet, tandis que seulement l'isolat BEK8 montre une résistance contre le phénol (tableau 22).

**Tableau 22.** Croissance des isolats étudiés en présence de différents inhibiteurs.

		<b>FEK22</b>	<b>BEK8</b>	<b>KEK1</b>	<b>KEK36</b>	<b>FEO15</b>
<b>Résistance à la salinité</b>	NaCl 0 %	+	+	+	+	+
	NaCl 2 %	+	+	+	+	+
	NaCl 4 %	+	+	+	+	+
	NaCl 6 %	+	+	+	+	+

	NaCl 7 %	+	+	+	+	+
	NaCl 8 %	-	-	-	-	+
	NaCl 13 %	-	-	-	-	-
<b>Résistance à la variation de pH</b>	pH=4	-	-	+	+	-
	pH=5	-	-	+	+	+
	pH=6	+	+	+	+	+
	pH=7	+	+	+	+	+
	pH=7,5	+	+	+	+	+
	pH=8	+	+	+	+	+
	pH=9	+	+	+	+	+
<b>Crystal violet</b>		+	+	+	+	+
<b>Phénol</b>		-	+	-	-	-

(-) pas de croissance ; (+) croissance.

## Discussion

Les endophytes isolés à partir des racines des trois génotypes sont utilisés pour étudier la diversité génétique de cette population par BOX-PCR.

La BOX-PCR a été reconnue comme une technique simple qui présente les caractéristiques suivantes : un pouvoir discriminant élevé ; faible coût ; adapté à un nombre élevé de souches et considérée comme un outil fiable pour classer et regrouper une large gamme de bactéries Gram négatif et Gram-positif. Cette technique garantie une bonne reproductibilité permet de gagner beaucoup de temps et d'avoir un coût moindre pour le séquençage de l'ADNr 16S (Gevers *et al.*, 2001; Rademaker *et al.*, 2004).

Nos résultats montrent une diversité génétique élevée chez les isolats endophytes qui colonisent les racines des trois génotypes, ce qui suggère l'importance de l'interaction plante-endophytes pour cette plante. D'autres études ont montré une diversité génétique élevée des bactéries endophytes isolées à partir de différents types de plantes (Torres *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008 ; Becerra-Castro *et al.*, 2011 ; Amaresan *et al.*, 2012 ; Ikeda *et al.*, 2013).

Plusieurs études montrent la grande capacité des bactéries à Gram négatif et à Gram positif à coloniser les racines (Afzal *et al.*, 2019), cette aptitude est liée principalement à plusieurs caractéristiques, parmi lesquelles la grande activité hydrolytique des bactéries à Gram positif et la mobilité d'un grand pourcentage des bactéries à Gram négatif qui colonisent le sol. Sur la totalité des isolats, nos résultats montrent plus de diversité génétique chez les isolats Gram négatif par rapport aux isolats Gram positif. Dans le même contexte, d'autres études ont identifié plus d'endophytes Gram négatif que d'endophyte Gram positif chez plusieurs plantes (Mbai *et al.*, 2013 ; Bind et Nema, 2019).

Le regroupement des isolats de chaque génotype révèle aussi une diversité élevée mais avec des valeurs qui se rapprochent entre les trois cultivars. En fait, la diversité du microbiote endophyte est liée à plusieurs facteurs tels que la nature des exsudats racinaires, la compétition des bactéries rhizosphériques pour atteindre les racines et aussi la nature du microbiote du sol (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000 ; Zinniel *et al.*, 2002 ; Afzal *et al.*, 2019).

Les dendrogrammes construits montrent la présence de clades avec une similitude de 100 %, ce qui signifie l'appartenance de ces isolats à la même espèce. D'autre part, les clades avec une similitude de 100 % portent des isolats appartenant aux trois génotypes en même temps, ce qui suggère la grande capacité de ces espèces à coloniser les racines de cette plante ainsi que leurs importances dans l'interaction plante-endophyte pour les trois cultivars.

Le séquençage de l'ADNr 16S a permis de rapprocher phylogénétiquement l'isolat FEO15 des espèces *S. caeruleatus* et *S. capoamus* avec une similarité de l'ordre de 99,57 et 99,22 %, respectivement. Sur la base de cette classification, ces espèces ont été déjà décrites en tant que bactéries endophytes. *S. caeruleatus* a été identifiée comme une bactérie endophyte colonisant le tissu interne de *Zizyphus lotus* et de *Tamarindus indica* (Mingma *et al.*, 2014 ; Zamoum *et al.*, 2015), tandis que *S. capoamus* a été identifiée comme une bactérie endophyte chez *Erigeron annuus* (Kim *et al.*, 2012) et *Musa paradisiaca* (Su *et al.*, 2017).

La comparaison des caractéristiques morphologiques et métaboliques de l'isolat FEO15 avec celles des souches *S. caeruleatus* GIMN4.002<sup>T</sup> et *S. capoamus* JCM 4734<sup>T</sup> (Lin *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2014 ; Nguyen et Kim, 2015) est présenté dans le tableau 23. Cette comparaison fait ressortir que l'isolat FEO15 produit un mycélium macroscopiquement plus proche à *S. caeruleatus* GIMN4.002<sup>T</sup> avec la différence de la couleur du pigment diffusible sur milieu ISP<sub>2</sub> et, que métaboliquement, l'isolat FEO15 est incapable d'assimiler le galactose, le mannitol et le lactose, tandis qu'il assimile l'histidine, l'arginine et la tyrosine contrairement à la souche *S. caeruleatus* GIMN4.002<sup>T</sup>. De plus l'isolat FEO15 semble être plus résistant à la salinité.

Quant aux isolats FEK22, BEK8, KEK1 et KEK36, les données phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ADNr 16S ont permis de les classer comme membres du genre *Pseudomonas*. Ainsi, *P. japonica* a été décrite comme endophyte chez la plante *Wasabia japonica* (Li *et al.*, 2014) ; *P. brassicacearum* chez *Salvia miltiorrhiza* (Li *et al.*, 2013), et *P. moorei* chez *Lavandula dentata* (Pereira *et al.*, 2016). Physiologiquement et biochimiquement, les quatre isolats se sont révélés métaboliquement actifs et ils sont capables d'assimiler différentes sources de carbone et d'azote.

**Tableau 23.** Quelques caractéristiques physiologiques de l'isolat FEO15 et des souches apparentées.

	<b>FEO15</b>	<i>S. caeruleatus</i> <b>GIMN4.002<sup>T</sup></b>	<i>S. capoamus</i> <b>JCM 4734<sup>T</sup></b>
Mycélium aérien	Blanc grisâtre	Blanc grisâtre	Rouge
Mycélium de substrat	Brun rougeâtre	Brun rougeâtre	Blanc crémeux
Pigment diffusible	Marron foncé	Bleu foncé	Non
Aspect de la surface mycélienne	Rugueux	Rugueux	Lisse
<b>Utilisation de</b>			
Arabinose	+	+	+
Fructose	+	+	±
Galactose	-	+	ND
Mannitol	-	+	+
Glucose	+	+	+
Lactose	-	+	ND
Rhamnose	+	ND	±
Sucrose	+	+	±
Xylose	+	+	+
Asparagine	+	+	+
Histidine	+	-	-
Arginine	+	-	-
Tyrosine	+	-	+
Alanine	+	+	ND
Méthionine	+	+	ND
Valine	+	+	+
Cellulose	-	-	+
Amidon	+	+	+
<b>Résistance à</b>			
NaCl (%)	< 13 %	<4 %	<2 %
pH	5 à 9	5 à 12	5-10

(-) pas de croissance ; (+) croissance ; (ND) : non déterminé.

Les quatre isolats bactériens (FEK22, BEK8, KEK1 et KEK36) ont présenté une sensibilité vis-à-vis les deux antibiotiques testés (la gentamycine et l'imipénème). En fait, les sols agricoles sont de plus en plus considérés comme une source potentielle de résistance aux antibiotiques. De plus, l'introduction d'inoculum contenant involontairement des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent augmenter le risque de leur dissémination (Ramakrishna *et al.*, 2019). À cet égard, la caractérisation des PGPB pour les applications agricoles nécessite également une évaluation de la résistance aux antibiotiques.

L'isolat FEO15, qui appartient au genre *Streptomyces* et qui a présenté le taux d'inhibition de *F. oxysporum* le plus élevé, a montré une résistance contre six antibiotiques, parmi neuf testés. Cette résistance peut être justifiée par le fait que le genre *Streptomyces*, qui colonise principalement le sol, est caractérisé par la production de plusieurs types d'antibiotiques (Procópio *et al.*, 2012 ; Nagarajan, 1972 ; Hopwood, 2007).

En fait, les bactéries productrices de métabolites secondaires telles que le genre *Streptomyces* ont souvent besoin de gènes de résistance pour tolérer la nature potentiellement toxique de ces molécules. Ces éléments de résistance peuvent également être associés à un cluster de gènes de biosynthèse et peuvent être utilisés pour prédire une synthèse potentielle de molécules antimicrobiennes. La résistance aux antibiotiques testés a été visuellement apparue après cinq jours d'incubation, notamment à l'imipénème qui est une version stabilisée de  $\beta$ -lactame de la thiénamycine, produite par *Streptomyces cattleya* (Terra *et al.*, 2018).

Les PGPB s'inscrit aussi comme une solution très prometteuse pour réduire le stress due à la salinité des sols, dont le piment qui est classé globalement comme modérément sensible à la salinité avec un seuil de 1,5 dS/m ; au-dessus de cette valeur, le rendement commence à baisser (Maas et Hoffman, 1977). Malgré la faible salinité du terrain d'échantillonnage, nos isolats ont présenté une bonne tolérance à la salinité avec un seuil de 7 % pour les isolats appartenant au genre *Pseudomonas*, et 8 % pour la souche appartenant au genre *Streptomyces*. Selon la littérature, les deux genres sont connus par leurs grandes capacités de tolérance à la salinité (Abbamondi *et al.*, 2016 ; Tolba *et al.*, 2019 ; Elabed *et al.*, 2019 ; Chu *et al.*, 2019 ; Adhikari *et al.*, 2020).

En conclusion, ce chapitre permet de visualiser la grande diversité de la population bactérienne qui colonise les racines des trois génotypes de piment industriel, et que cette diversité est plus élevée chez les isolats Gram négatif que les isolats Gram positif. D'autre part, l'étude taxonomique a permis de classer l'isolat FEO15 comme membre du genre *Streptomyces* avec une grande similitude à l'espèce *S. caeruleatus*. Les isolats FEK22, BEK8, KEK36 et KEK1, qui appartiennent au genre *Pseudomonas*, sont phylogénétiquement proches des espèces : *P. moorei*, *P. japonica*, *P. granadensis* et *P. brassicacearum*, respectivement.

## Chapitre 5 : Effet de cinq isolats endophytes sur la croissance, *in vivo*, de *Capsicum annuum*

Les cinq isolats endophytes, à savoir KEK1, KEK36, FEK22, BEK8 et FEO15 ont été rapportés comme les souches les plus prometteuses dans la croissance de plantes, *in vitro*. Dans ce chapitre, ces isolats, qui sont classé comme membres des genres *Pseudomonas* et *Streptomyces*, sont testés pour leurs efficacités comme promoteurs de croissance de piment, *in vivo*.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- L'évaluation de l'impact des cinq isolats sur la croissance des trois génotypes de piment, en conditions de culture stériles et non-stériles ;
- L'évaluation de l'effet des isolats endophytes représentatifs sur la croissance des trois génotypes au stade de fructification par inoculation séparée et combinée des isolats

### Matériel et méthodes

#### 1. Préparation et désinfection des graines

Les graines des trois génotypes de piment sont désinfectées par l'éthanol à 70 % pendant 2 min, ensuite elles sont stérilisées par une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 6 min. Les graines sont rincées 15 fois avec l'eau distillée stérile, et elles sont transférées à des boîtes de Pétri contenant un milieu à base d'Agar-Agar à 1,2 % (P/V). Pour favoriser la germination, les boîtes sont incubées à l'obscurité à 28 °C pendant six jours. La stérilisation des graines est vérifiée par l'ensemencement de l'eau du dernier rinçage sur gélose nutritive, l'absence de croissance des microorganismes autour des graines après incubation confirme l'efficacité de la stérilisation.

#### 2. Préparation des inoculums

La culture des isolats bactériens est réalisée sur gélose nutritive pour les isolats FEK22, KEK36, KEK1 et BEK8. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les inoculums sont préparés dans l'eau physiologique stérile (9 ‰) avec une charge équivalente à  $10^8$  UFC/ml. L'isolat FEO15 est ensemencé sur le milieu *YMEA*, une suspension sporale est préparée dans l'eau physiologique stérile avec une charge équivalente à  $10^8$  spores/ml. Les inoculums sont préparés le jour même de l'inoculation des graines.

### 3. Expérience en jarres de Leonard

L'impact des isolats sur la croissance du piment en conditions stériles est évalué par l'utilisation des jarres de Leonard (Vincent, 1970). Les jarres utilisées sont composées de deux parties, un flacon en verre ombré et un récipient en verre d'un volume total de 1,5 litre, les deux parties sont reliées avec un cordon qui permet d'alimenter en continu, par capillarité, la culture. La partie supérieure du dispositif est remplie par un mélange de vermiculite et de perlite (3:1). Le mélange est lavé abondamment avec l'eau distillée, puis humidifié à la fin par 10 ml de la solution Hoagland (annexe 2) (Hoagland et Arnon, 1950). La partie inférieure est remplie par 1,5 litre de la solution Hoagland. Les jarres sont couvertes par du papier aluminium et elles sont stérilisées par autoclavage. Après refroidissement sous une hotte microbiologique, la partie supérieure de chaque dispositif est inoculée par trois graines germées. 1 ml de suspension bactérienne est utilisé pour inoculer chaque dispositif. Pour le lot du témoin négatif, les graines germées sont inoculées par 1 ml de l'eau physiologique stérile. Cinq répétitions sont utilisées pour chaque traitement. Les jarres sont transférés à une serre conditionnée avec une photopériode de 16 h ; une température de 25 et 20 °C pour le jour et la nuit, respectivement ; une humidité relative de 50 %. Après 30 jours, les plantes sont collectées délicatement, les racines sont lavées avec l'eau distillée pour éliminer toutes les traces de la vermiculite et de la perlite. La longueur et le poids sec de la partie aérienne et des racines sont déterminés.

### 4. Culture de piment en pots pendant un mois

La culture des plantes est effectuée dans un substrat commercial (universal potting soil, Gramoflor GmbH & Co. KG, Vechta, Germany), avec les caractéristiques suivantes : pH (6,8) ; EC (0,82 dS/m) ; matière organique (75 %) ; azote (270 mg/l) ; phosphate (330 mg/l) ; potassium (420 mg/l). L'expérience est réalisée dans des pots en plastique contenant 1 Kg de substrat. Cinq pots, contenant chacun trois graines, sont utilisés pour chaque isolat.

Pour chaque pot, les graines germées sont inoculées par 1 ml de suspension bactérienne. Les pots sont transférés à la même serre utilisée précédemment avec les mêmes conditions. Le substrat est humidifié par l'eau courante avant le dépôt des germes pour assurer la fixation des bactéries sur les graines germées, par la suite, l'arrosage est réalisé tout les deux jours. Après 30 jours, les plantes sont collectées délicatement, les racines sont lavées avec l'eau distillée pour éliminer toutes les traces du substrat. La longueur et le poids sec de la partie aérienne sont déterminés, alors que les racines sont utilisées seulement pour la détermination du poids sec.

## 5. Culture de piment en pots pendant cinq mois

Les deux meilleurs isolats favorisant la croissance du piment, d'après les résultats des cultures précédentes, sont utilisés pour étudier l'effet sur la croissance au stade de fructification. L'impact des souches bactériennes est testé à la fois séparément et en combinaison, l'absence d'antagonisme entre les deux souches est vérifiée par la méthode des stries croisés et par la méthode des cylindres d'agar comme indiqué par Barakate *et al.* (2002). La culture des plantes est effectuée dans le même substrat commercial (universal potting soil, Gramoflor GmbH & Co. KG, Vechta, Germany). La culture des graines germées est réalisée d'abord dans des alvéoles remplies de substrat de culture, les germes sont inoculés par 1 ml des suspensions bactériennes. Pour l'analyse de l'impact de la combinaison des isolats, les graines sont inoculées par 0,5 ml de chaque souche. Après deux semaines, chaque plantule ainsi que tout le contenu de son alvéole sont transférés à un pot contenant 10 Kg de substrat. 15 pots sont utilisés pour chaque traitement. Les pots sont transférés à la même serre utilisée précédemment avec les mêmes conditions. Après cinq mois, la longueur et le poids sec des tiges ainsi que le nombre et le poids sec des fruits sont déterminés pour chaque traitement, les résultats sont comparés à ceux du témoin négatif dont les graines sont inoculées par l'eau physiologique stérile.

## 6. Analyses statistiques

Les résultats sont comparés à l'aide de test de Tukey après une analyse de la variance (ANOVA) à  $P \leq 0,05$ . L'ACP est réalisée par XLStat 2014 (addinsoft, Paris).

## Résultats

### 1. Impact des isolats sur la croissance du piment en conditions stériles

L'étude de l'impact des isolats sélectionnés sur la croissance du piment, en conditions stériles, a été réalisée dans les jarres de Leonard. La figure 38 qui montre la croissance de l'un des génotypes étudiés (génotype Karam), révèle le grand rôle des bactéries endophytes dans l'amélioration de la croissance de piment. Les cinq isolats bactériens ont augmenté, de manière significative, tous les paramètres de croissance des trois génotypes de piment (tableau 24).



**Figure 38.** Effet des isolats bactériens sur la croissance de piment (génotype Karam).

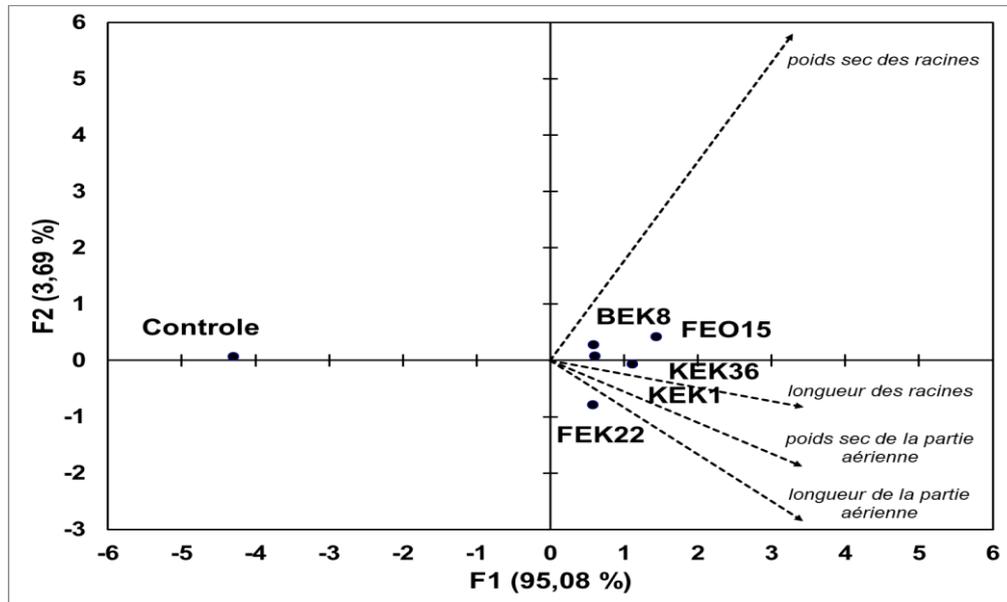
**Tableau 24.** Effet des isolats bactériens sélectionnés sur les différents paramètres de croissance de piment en conditions stériles.

		Témoin négatif	FEK22	BEK8	FEO15	KEK36	KEK1
<b>Karam</b>	<b>LPA (cm)</b>	2,00d	17,20ab	12,30c	15,60b	12,60c	18,40a
	<b>LPR (cm)</b>	3,02e	55,60b	62,20a	51,20c	38,18d	62,60a
	<b>PPA (g)</b>	0,04e	1,45a	0,73c	1,13b	0,45d	1,52a
	<b>PPR (g)</b>	0,01e	1,59c	0,98d	4,32a	0,96d	2,74b
<b>Al-Fares</b>	<b>LPA (cm)</b>	4,50c	15,50b	15,42b	17,23a	14,65b	15,47b
	<b>LPR (cm)</b>	14,65f	49,15c	51,40b	55,25a	43,45d	39,12e
	<b>PPA (g)</b>	0,19e	1,15c	0,97d	1,86a	1,12c	1,67b
	<b>PPR (g)</b>	1,01e	2,17d	2,98b	3,50a	2,04d	2,64c
<b>Biskra</b>	<b>LPA (cm)</b>	11,23d	15,56a	14,90b	13,47c	14,35b	13,90c
	<b>LPR (cm)</b>	34,50e	58,20b	59,12b	63,48a	51,63d	53,10c
	<b>PPA (g)</b>	0,27d	1,05a	0,61c	0,74c	0,86b	0,93ab
	<b>PPR (g)</b>	1,89d	2,05c	2,21bc	2,42b	2,96a	2,57b

Pour chaque ligne, les lettres à côté des moyennes indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$ . Les paramètres incluent : longueur de la partie aérienne (LPA) ; longueur de la partie racinaire (LPR) ; poids de la partie aérienne (PPA) ; poids de la partie racinaire (PPR).

Pour une appréciation objective des différentes observations, une ACP est réalisée en regroupant les résultats des trois génotypes (figure 39). Les axes F1 et F2 représentent respectivement 95,08 et 3,69 % de la variabilité totale, ce qui indique une explication globale de 98,77 % de la variabilité. Selon cette analyse, la première composante sépare tous les traitements par rapport au témoin négatif, de ce fait, comme suggéré par les résultats de

l'analyse de la variance effectuée, l'ACP montre que tous les traitements sont très loin du témoin, assurant ainsi une bonne amélioration de la croissance en conditions stériles.

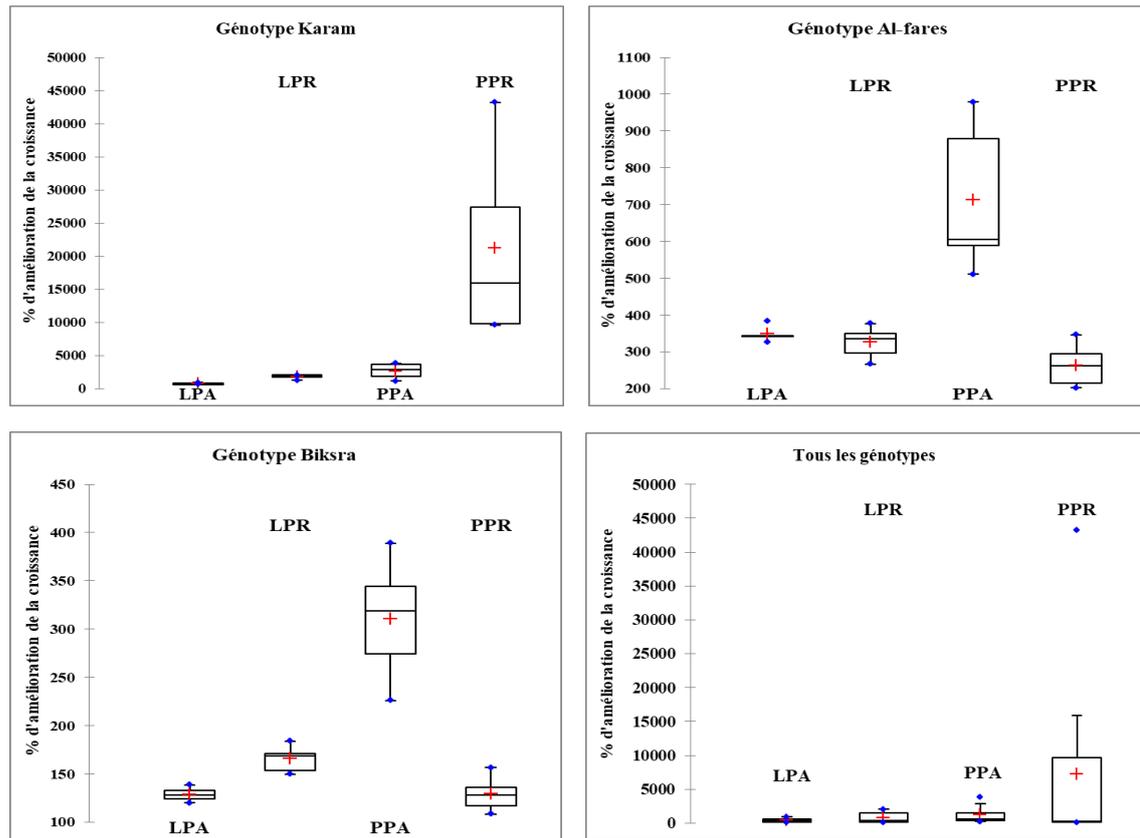


**Figure 39.** Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenue à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en conditions stériles.

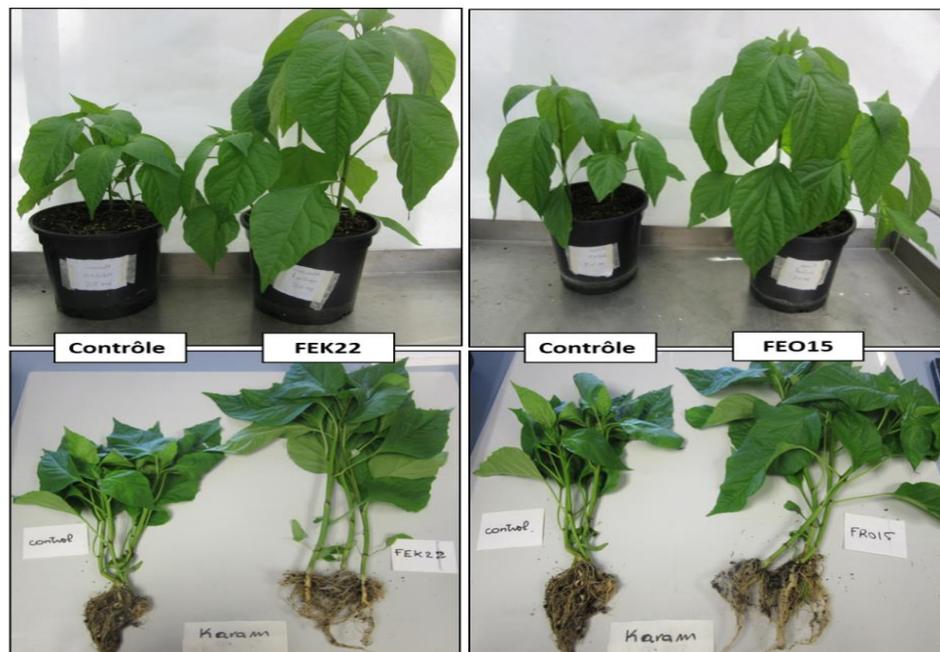
Par ailleurs, un *Box-plot* est utilisé pour analyser la réponse des trois génotypes à l'inoculation bactérienne. La promotion de la croissance s'est manifestée différemment pour les trois génotypes. Pour les génotypes Karam et Al-Fares, ce sont, respectivement, la stimulation de la croissance de la partie racinaire et de la partie aérienne. Pour le troisième génotype, les endophytes bactériens ont amélioré plus efficacement la longueur des racines et le poids sec des tiges. L'impact des endophytes sur la totalité des cultivars, montre que le poids sec des racines est le paramètre le mieux stimulé par rapport aux autres (figure 40).

## 2. Impact des isolats sur la croissance du piment en pots après un mois de culture

Les cinq endophytes bactériens ont amélioré la croissance des trois génotypes après un mois de culture en pot (tableau 25) (figure 41). L'analyse de la variance réalisée sur la totalité des résultats montre que les souches testées ont une action très positive sur l'accroissement des différents paramètres mesurés de croissance. De même, une différence nettement perceptible est observée entre les traitements et les témoins non inoculés.



**Figure 40.** Box-plot révèle la biostimulation de la croissance de piment par les isolats bactériens. Les paramètres incluent : longueur de la partie aérienne (LPA) ; longueur de la partie racinaire (LPR) ; poids de la partie aérienne (PPA) ; poids de la partie racinaire (PPR).

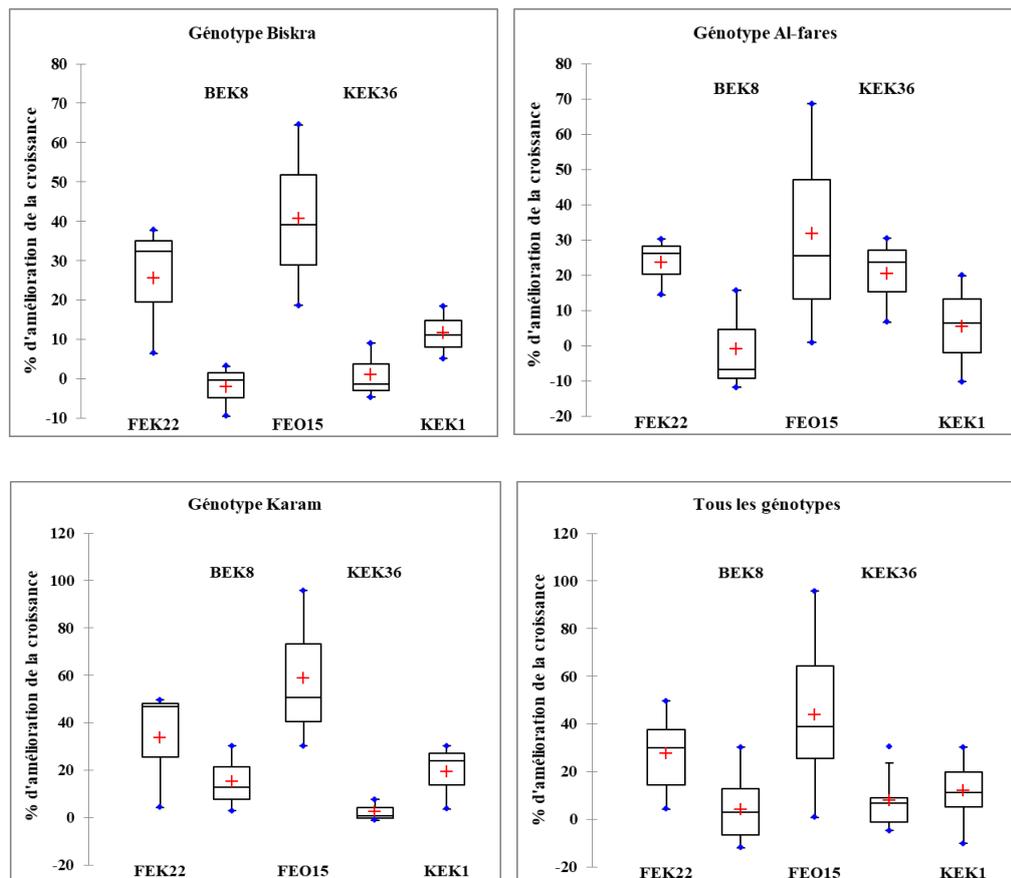


**Figure 41.** Effet des isolats FEK22 et FEO15 sur la croissance de piment après un mois de culture en pot (génotype Karam).

**Tableau 25.** Effet des isolats bactériens sélectionnés sur les différents paramètres de croissance de piment en pots après un mois.

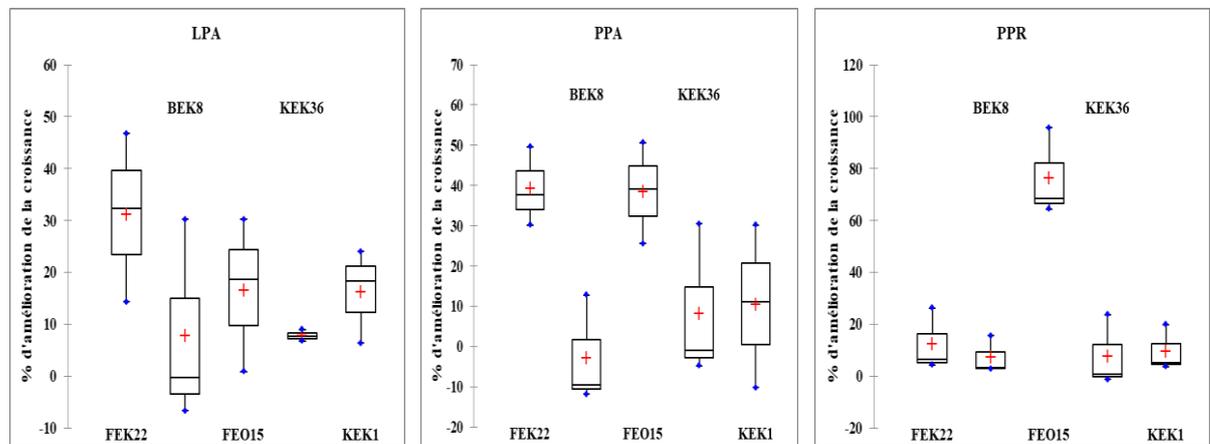
		Témoin négatif	FEK22	BEK8	FEO15	KEK36	KEK1
<b>Karam</b>	<b>LPA (cm)</b>	35,65d	52,33a	46,44b	46,44b	38,39d	44,22c
	<b>PPA (g)</b>	4,07d	6,09a	4,59c	6,13a	4,03d	5,30b
	<b>PPR (g)</b>	3,50b	3,65b	3,60b	6,85a	3,53b	3,63b
<b>Al-Fares</b>	<b>LPA (cm)</b>	42,23c	48,30a	39,41c	42,60c	45,08b	44,92b
	<b>PPA (g)</b>	3,05b	3,97a	2,69b	3,83a	3,98a	2,74b
	<b>PPR (g)</b>	2,36b	2,98b	2,73b	3,98a	2,92b	2,83b
<b>Biskra</b>	<b>LPA (cm)</b>	26,80d	35,48a	26,74d	31,79b	29,21c	31,73b
	<b>PPA (g)</b>	2,97c	4,09a	2,69c	4,13a	2,83c	3,30b
	<b>PPR (g)</b>	1,55b	1,65b	1,60b	2,55a	1,53b	1,63b

Pour chaque ligne, les lettres à côté des moyennes indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$ . Les paramètres incluent : longueur de la partie aérienne (LPA) ; poids de la partie aérienne (PPA) ; poids de la partie racinaire (PPR).



**Figure 42.** Box-plot montrant la biostimulation des trois génotypes de piment par chaque isolat.

La figure 43 regroupe les pourcentages d'amélioration de la croissance par les isolats bactériens selon le paramètre mesuré. Selon cette analyse, les meilleures améliorations de la longueur de la tige et de la croissance racinaire sont obtenues par l'isolat FEK22 et l'isolat FEO15, respectivement.



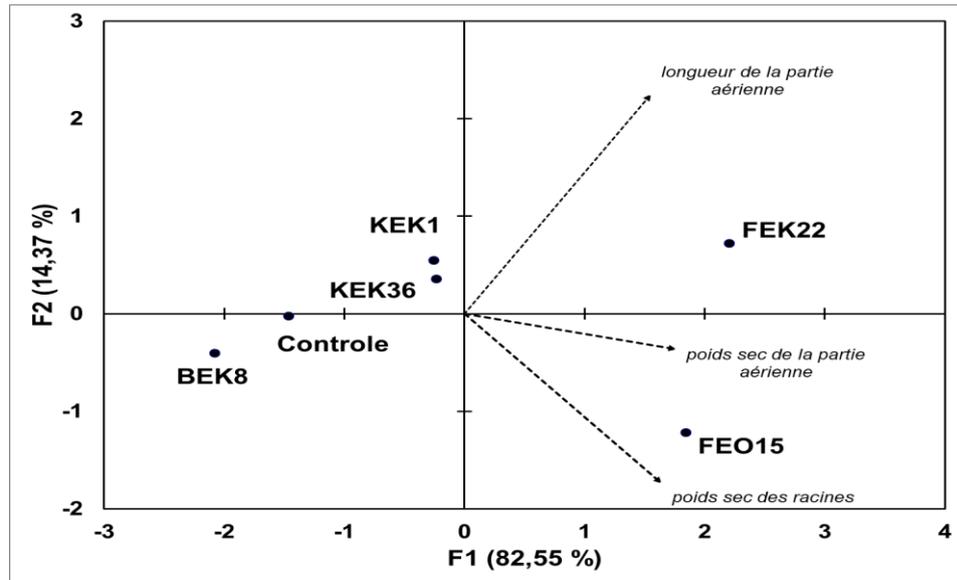
**Figure 43.** *Box-plot* montrant l'impact des isolats endophytes sur chaque paramètre de croissance. Les paramètres sont : longueur de la partie aérienne (LPA) ; poids de la partie aérienne (PPA) ; poids de la partie racinaire (PPR).

Une ACP a été réalisée sur l'ensemble des données générées (figure 44). Les deux premiers plans, F1 et F2, expliquent 96,92% des différences entre traitements (82,55 % pour F1 et 14,37 % pour F2). Dans cette analyse, la première composante sépare les deux isolats FEK22 et FEO15 par rapport aux autres traitements, signifie l'effet hautement significatif de ces deux souches sur la croissance du piment. Les isolats KEK1 et KEK36 se situent avant le témoin négatif et ils possèdent une amélioration faible avec des taux qui se rapprochent. L'isolat BEK8 se situe derrière le témoin négatif apparaît donc comme le moins performant par rapport aux autres isolats.

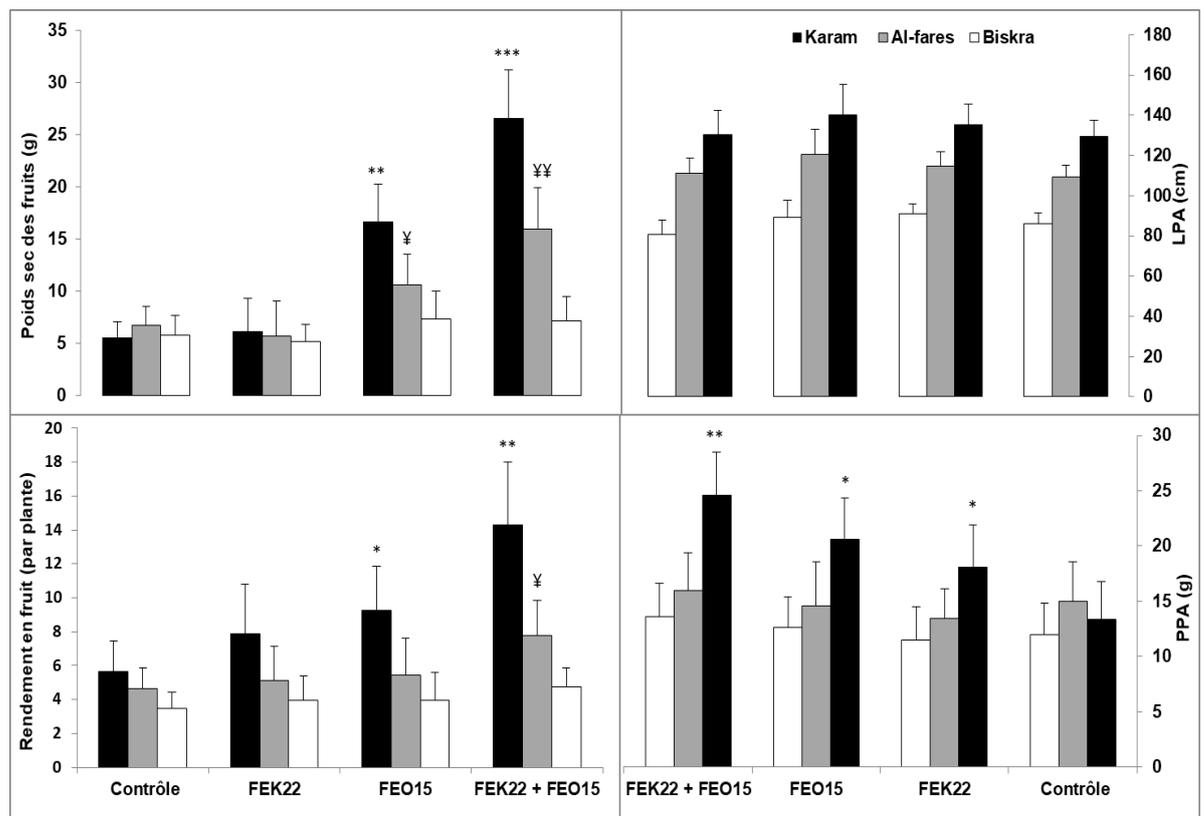
### 3. Impact des isolats sur la croissance du piment en pots après cinq mois de culture

Du fait que les isolats FEO15 et FEK22 ont présenté des effets hautement significatifs sur la croissance du piment après un mois de culture, ils ont été choisis pour étudier l'impact sur le rendement après cinq mois, avec des inoculations séparées et conjuguées.

Les résultats obtenus sont illustrés avec des histogrammes (figure 45). Il ressort que les bactéries endophytes affectent différemment les trois génotypes. Des effets significatifs sont observés, seulement, pour les deux génotypes Karam et Al-Fares. Les différents traitements utilisés n'ont pas un effet significatif sur la longueur de la tige.



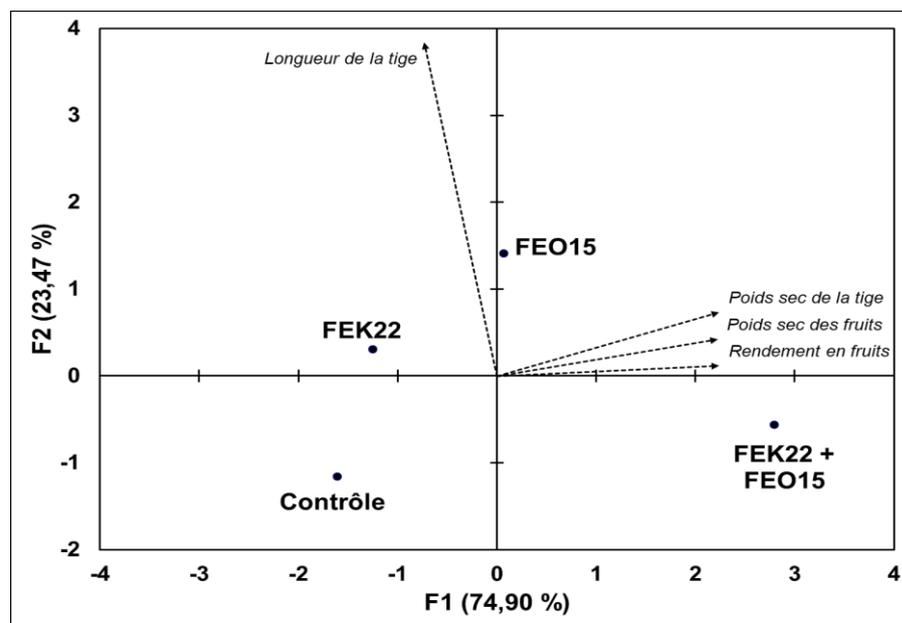
**Figure 44.** Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenus à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en pots après un mois de culture.



**Figure 45.** Effet de inoculation du piment par les isolats FEK22, FEO15 et leur consortium après cinq mois de croissance. Les symboles (\*, ¥) indiquent des différences significatives à  $P \leq 0,05$  en utilisant les tests HSD de Tukey d'après ANOVA. Les paramètres sont : longueur de la partie aérienne (LPA) ; poids de la partie aérienne (PPA).

Les deux isolats ainsi que leur mélange ont augmenté significativement le poids sec de la tige d'un seul cultivar. L'inoculation par le consortium a amélioré le rendement en fruit des deux génotypes Karam et Al-Fares, tandis que le traitement par l'isolat FEO15 a augmenté significativement ce paramètre pour un seul cultivar. D'autre part, la souche d'actinobactérie ainsi que le mélange ont augmenté significativement le poids sec des fruits chez deux génotypes. L'analyse de la variance réalisée montre aussi une différence nette entre les inoculations séparées et le mélange des deux isolats. En effet, le génotype Karam montre une amélioration de 199 % et 377 % du poids sec des fruits pour le traitement avec l'isolat FEO15 et le consortium, respectivement. De même, des augmentations de 58 % et 138 % sont obtenues lors de l'inoculation du génotype Al-Fares avec l'isolat FEO15 et le mélange respectivement.

L'efficacité du consortium comparativement aux inoculations séparées est étudiée aussi à travers une ACP, la figure 46 montre une ACP élaborée avec les résultats des différents traitements des trois génotypes. Les axes F1 et F2 représentent, respectivement, 74,90 et 23,47 % de la variabilité totale, ce qui indique une explication globale de 98,37 % de la variabilité. Selon cette figure, la première composante, qui est corrélée positivement avec le rendement en fruits et le poids sec de la tige et des fruits, sépare le traitement avec le mélange par rapport aux autres traitements, confirmant ainsi l'efficacité du consortium comparativement aux inoculations séparées. De même, il ressort de cette analyse que l'isolat FEK22 apparaît comme moins performante comparativement à l'isolat FEO15.



**Figure 46.** Analyse en composantes principales basée sur les deux premiers plans obtenue à partir des données générées par l'essai de biostimulation du piment en pots après cinq mois de culture.

## Discussion

Les souches bactériennes sélectionnées ont été testées pour leurs capacités de promotion de la croissance de trois cultivars de piment. En condition stérile, les cinq isolats bactériens ont augmenté, de manière très significative, tous les paramètres de croissance des trois génotypes de piment. Bien que la solution Hoagland fournisse tous les nutriments nécessaires à la croissance des plantes, la croissance des trois cultivars a été minimale en absence de l'inoculation bactérienne, ce qui suggère la grande importance du microbiote du sol pour la croissance du piment. Par regroupement des résultats des trois génotypes en condition de culture stérile, la biomasse racinaire a été le paramètre le mieux stimulé. En fait, pour divers PGPB, il a été démontré qu'une prolifération accrue des racines est liée à la biosynthèse bactérienne de l'IAA (Dobbelaere *et al.*, 1999). Cette augmentation de l'enracinement améliore l'absorption des minéraux et l'exsudation, ce qui stimule à son tour la colonisation bactérienne et amplifie ainsi l'effet d'inoculation (Dobbelaere *et al.*, 1999 ; Lambrecht *et al.*, 2000 ; Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). D'autre côté, bien que l'IAA est une phytohormone majeure impliquée dans de nombreux processus physiologiques des plantes (Gravel *et al.*, 2007 ; Spaepen *et al.*, 2007), il a été démontré que la biosynthèse de l'IAA à elle seule ne peut pas expliquer l'effet global de stimulation de la croissance des plantes observées. Par conséquent, il a été suggéré que la stimulation de la croissance est le résultat de plusieurs mécanismes travaillant ensemble. D'après nos résultats, les cinq souches ont réagi différemment sur les trois génotypes, ce qui peut s'expliquer par la différence de leurs exsudats racinaires. Des résultats similaires ont été observés dans des études antérieures, Neiverth *et al.* (2014) ont révélé que divers cultivars de blé ont des réponses différentes à l'inoculation avec *Herbaspirillum seropedicae*. De plus, Vargas *et al.*, (2012) ont signalé une colonisation bactérienne différente entre les cultivars de riz.

En fait, la colonisation endophyte est un processus complexe qui implique la capacité des bactéries à entrer en compétition d'abord dans le sol de la rhizosphère et à trouver un endroit pour interagir et communiquer avec les racines des plantes (Santoyo *et al.*, 2016). En utilisant les exsudats racinaires, les racines des plantes influencent fortement la colonisation des endophytes (Dheeman *et al.*, 2017). Les bactéries endophytes pénètrent dans les tissus végétaux par les fissures des racines et sous la zone des poils racinaires (Santoyo *et al.*, 2016 ; Goudjal *et al.*, 2018) ; une fois à l'intérieur de la plante hôte, les endophytes utilisent de multiples mécanismes qui peuvent être activés simultanément pour stimuler la croissance des plantes (Santoyo *et al.*, 2016 ; Jain et Pundir, 2017). La perte de stimulation de la croissance par les

isolats KEK36 et BEK8 peut être attribuée à la compétition entre les isolats inoculés et le microbiote du substrat utilisé. Dans cette ligne, Sasse *et al.* (2018) ont rapporté que les interactions microorganismes-plantes dépendent également des interactions microbes-microbes. D'autre part, les isolats FEO15 et FEK22 ont l'effet le plus élevé sur le poids sec des racines et la longueur des tiges, respectivement, reflétant la grande capacité de compétition et de colonisation de ces isolats. Des études antérieures ont signalé une augmentation de la longueur des racines et du poids de la plante de *C. annuum* après 30 jours d'inoculation avec *Streptomyces* sp. d'origine rhizosphérique (Ortiz-Castro *et al.*, 2008), de même, une augmentation de la taille et du poids frais a été rapportée par Kang *et al.* (2007) après inoculation par une souche appartenant au genre *Pseudomonas*.

Nos résultats soutiennent l'hypothèse que la co-inoculation avec des bactéries endophytes peut améliorer l'efficacité d'utilisation des nutriments plus que l'inoculation séparée. En fait, l'inoculation avec une seule souche est moins susceptible d'être active dans toutes sortes de sols et d'écosystèmes agricoles (Raupach et Kloepper, 1998). De même, elle peut entraîner une colonisation inadéquate, une tolérance limitée au changement des conditions environnementales, et la fluctuation de la production de métabolites (Weller et Thomashao 1994 ; Pandey *et al.*, 2012), de ce fait, une application d'un consortium peut améliorer et élargir l'activité des PGPB.

L'efficacité de consortium est liée aussi au caractère non compétitif des microorganismes qui le compose. Sasse *et al.* (2018) ont rapporté que certains microorganismes évitent la compétition à travers le catabolisme de substrats spécifiques ou en utilisant certains métabolites du partenaire. Le manque de compétition entre les deux isolats testés peut être attribué à la différence de leur métabolisme. Le tableau 26, qui est construit à partir des résultats du chapitre 4, montre que les deux isolats FEK22 et FEO15 métabolisent différemment 19 substrats sur 30 substrats analysés.

Datta *et al.* (2011) ont rapporté un rendement plus élevé en fruits de *C. annuum* avec la combinaison de deux souches appartenant au genre *Streptomyces* et *Bacillus*. Passari *et al.* (2015a) ont montré qu'un mélange de deux actinobactéries a permis l'augmentation de la longueur des tiges et des racines du piment. De même, Reyes-Tena *et al.* (2017) ont constaté que la co-inoculation de champignons mycorhiziens arbusculaires et d'actinobactérie améliore la longueur des tiges et des racines du piment.

**Tableau 26.** Comparaison entre les activités métaboliques des isolats FEK22 et FEO15.

<b>Substrat</b>	<b>FEK22</b>	<b>FEO15</b>
<b>Arabinose</b>	-	+
<b>Fructose</b>	+	+
<b>Galactose</b>	-	-
<b>Inositol</b>	-	+
<b>Mannitol</b>	+	-
<b>Glucose</b>	+	+
<b>Lactose</b>	+	-
<b>Rhamnose</b>	-	+
<b>Maltose</b>	-	+
<b>Sucrose</b>	-	+
<b>Sorbitol</b>	+	+
<b>Xylitol</b>	-	+
<b>Mannose</b>	+	+
<b>Xylose</b>	-	+
<b>Histidine</b>	-	+
<b>Arginine</b>	-	+
<b>Tyrosine</b>	-	+
<b>Alanine</b>	+	+
<b>Glycine</b>	+	+
<b>Méthionine</b>	-	+
<b>Valine</b>	-	+
<b>Leucine</b>	+	+
<b>Tryptophane</b>	+	-
<b>Asparagine</b>	-	+
<b>Proline</b>	+	+
<b>Gélatine</b>	+	+
<b>Caséine</b>	-	+
<b>Amidon</b>	-	+
<b>Cellulose</b>	-	-
<b>Tyrosine</b>	-	+

(-) Substrat non-assimilable ; (+) Substrat assimilable.

En conclusion, les cinq isolats ont présenté des résultats très prometteurs de la culture de piment en conditions stériles, tandis que cette efficacité est diminuée en culture non-stériles pour les isolats BEK8, KEK1 et KEK36. De même, Les différents traitements mettant en œuvre l'effet des isolats montrent que l'effet des endophytes dépend largement du génotype du piment. D'autre part, cette partie a contribué à élucider l'importance de l'inoculation mixte dans l'amélioration de la croissance et du rendement en fruits. De plus, à notre connaissance, c'est la première étude qui illustre la promotion de la croissance et du rendement en fruits de piment industriel en Algérie avec un consortium de bactéries endophytes.

**CONCLUSION GENERALE**  
**ET PERSPECTIVES**

---

## **Conclusion générale et perspectives**

L'utilisation des produits agrochimiques représente une source de risque sanitaire et environnemental, de ce fait, l'application d'alternatives sans danger, pour garantir des pratiques agricoles durables, est devenue une nécessité. L'un des moyens les plus prometteurs proposés ces dernières années est l'exploitation du microbiote de la rhizosphère et des endophytes.

La présente thèse s'inscrit dans ce contexte général et a pour objectif l'étude de la biodiversité bactérienne de la rhizosphère et la caractérisation des activités des PGPB associées aux racines de *C. annuum*.

Notre étude s'est basée sur deux approches :

- Une stratégie indépendante de la culture qui s'appuie sur l'étude de la diversité de l'ADNr 16S dans la rhizosphère, de trois génotypes de piment fort, en comparaison avec le sol non-rhizosphérique ;
- Une méthode classique qui consiste en l'isolement de souches pures sur milieux sélectifs à partir de la rhizosphère et des racines de piment, permettant d'une part, l'étude de l'effet de piment sur les caractéristiques PGPB et d'autre part, la sélection des endophytes les plus prometteurs pour l'amélioration de la croissance.

Il ressort de notre étude que le génotype est un déterminant important de la relation sol/plante/microbiote. Par rapport au sol non-rhizosphérique, la rhizosphère des trois génotypes possède une texture de sol différente, un pH et une teneur en carbonates plus faibles. La croissance bactérienne est plus abondante autour des racines des trois génotypes avec des rapports rhizosphère/sol qui diffère d'un cultivar à l'autre. L'analyse de la diversité génétique à travers la T-RFLP a montré que la diversité bactérienne augmente de manière significative chez seulement le génotype Biskra.

L'isolement des bactéries à partir des échantillons de sol rhizosphériques et non-rhizosphériques a permis l'obtention d'un total de 515 isolats bactériens, morphologiquement, différents, soit 301 et 214 isolats provenant, respectivement, de l'ensemble des trois rhizosphères et des sols non-rhizosphériques. L'analyse des activités spécifiques aux PGPB révèle que la production de composés indoliques est stimulée dans la rhizosphère des trois cultivars, l'activité anti-phytopathogène est stimulée seulement chez un seul génotype.

L'isolement de bactéries à partir des racines des trois cultivars permet l'obtention d'un total de 83 isolats morphologiquement distincts, montrant ainsi la capacité de ces espèces bactériennes à gagner les racines de plantes. De plus, la grande diversité morphologique suggère l'importance de l'interaction plante-endophytes pour ces géotypes. La grande diversité des isolats endophytes est confirmée par les dendrogrammes de la BOX-PCR, et par les indices de diversités élevées obtenus pour les trois cultivars.

L'analyse des activités des PGPB montre que les endophytes présentent une grande capacité de promotion de la croissance des plantes *in vitro*. Tous les isolats bactériens utilisent des voies de synthèse dépendantes du tryptophane. L'analyse par GC-MS montre que l'IAA est le produit terminal le plus important des voies métaboliques utilisées, alors que 73 % des isolats utilise la voie IPyA. Le microbiote cultivable colonisant les racines de *C. annuum* possèdent une grande aptitude à produire des sidérophores mais avec une capacité de chélation et/ou des concentrations moins importantes que celles du microbiote rhizosphérique. L'utilisation de UHPLC-MS/MS Q Exactive pour la détection des sidérophores a permis la détection de 23 composants différents chez 21 isolats bactériens. Notre étude montre la détection de la production des AHL de longues chaînes par 7 isolats endophytes, ce qui suggère l'importance de ces molécules dans l'interaction plante-endophyte pour les deux partenaires. L'activité de désactivation de l'auto-induction par les AHL est observée chez 22 isolats, dont 10 et 15 isolats ont inhibé l'auto-induction chez *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement. L'étude de l'activité antifongique révèle que 25 isolats parmi 83 peuvent inhiber la croissance de *F. oxysporum*. De même, 79 % des isolats ont la capacité de solubiliser le phosphate.

Du point de vue technique, à travers cette étude il est possible de conclure que les différentes techniques de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse semblent être très prometteuses pour la quantification des auxines et l'identification des voies métaboliques utilisées directement à partir du surnageant, de même ces techniques semblent être utiles dans l'identification de plusieurs type de sidérophores et des AHL produits par les endophytes.

L'ACP élaborée à partir des résultats des activités étudiées a permis la mise en évidence des isolats KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 et BEK8. L'étude taxonomique basée sur l'amplification de l'ADNr 16S a classé l'isolat FEO15 comme membre du genre *Streptomyces* avec une grande similitude à l'espèce *S. caeruleatus*. Les isolats FEK22, BEK8, KEK36 et KEK1, classifiés comme souches appartenant au genre *Pseudomonas*, sont très proches aux espèces : *P. moorei*, *P. japonica*, *P. granadensis* et *P. brassicacearum*, respectivement.

L'analyse de la capacité de promotion de croissance de piment, en conditions stériles, montre que les cinq isolats bactériens ont augmenté, de manière très significative, tous les paramètres de croissance des trois géotypes de piment. Les cinq souches ont réagi différemment sur les trois géotypes. D'autre part, Nos résultats soutiennent l'hypothèse que la co-inoculation avec des bactéries endophytes peut améliorer efficacement la croissance en comparaison avec les inoculations séparées. Le géotype Karam montre une amélioration de 199 % et 377 % du poids sec des fruits pour le traitement avec l'isolat FEO15 et le consortium, respectivement. De même, une augmentation de 58 % et 138 % sont obtenus lors de l'inoculation du géotype Al-Fares avec l'isolat FEO15 et le mélange, respectivement.

Cette étude a montré l'effet du géotype de *C. annuum* sur la modulation des caractéristiques microbiologiques de la rhizosphère. Ces résultats pourraient être utiles concernant la compréhension de la relation sol/racines de l'agro-écosystème de *C. annuum*. D'autre part, nous démontrons que l'application de bioinoculants ayant un consortium d'endophytes donne une meilleure croissance et une amélioration du rendement de cette plante que l'inoculation d'une seule souche.

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses et multiples :

- La confirmation de l'effet des géotypes de piment sur la diversité du microbiote du sol et ses activités nécessite d'élargir l'étude sur d'autres géotypes et d'autres types de sol ;
- En raison des limites des techniques classiques qui consistent à isoler les bactéries sur milieu de culture, l'analyse du microbiote par métagénomique semble être très utile pour déterminer les principales familles microbiennes stimulées par les trois géotypes ;
- Tous les isolats présentant des activités de promotion de la croissance, *in vitro*, nécessitent une attention pour la valorisation de leurs activités *in vivo* ;
- Il serait intéressant l'élaborer d'autres consortiums pour assurer différentes activités de bio-stimulation ;
- Pour les isolats FEO15 et FEK22, du fait de leur fort potentiel biostimulant, il serait intéressant de valoriser leurs effets en plein champs ;
- Les isolats issus des échantillons de sol ou des racines avec une activité antifongique importante peuvent être valorisés pour la protection des cultures principalement contre la fusariose et/ou autres maladies causées par *F. oxysporum* ;

- Il est important d'étudier le rôle des AHL de longues chaînes et les sidérophores détectés dans l'interaction piment/endophyte.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## Références bibliographiques

- Abbamondi GR, Tommonaro G, Weyens N, Thijs S, Sillen W, Gkorezis P, Iodice C, *et al.* 2016. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chem Biol Technol Agric.* 3:1.
- Acharyabhata A, Kandula SK, Terli R. 2013. Taxonomy and polyphasic characterization of alkaline amylase producing marine actinomycete *Streptomyces rochei* BTSS 1001. *Int J Microbiol.* 2013: 276921.
- Adeleke BS, Babalola OO. 2020. The endosphere microbial communities, a great promise in agriculture. *Int Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00140-2>.
- Adhikari A, Khan MA, Lee KE, Kang SM, Dhungana SK, Bhusal N, Lee IJ. 2020. The Halotolerant *Rhizobacterium-Pseudomonas koreensis* MU2 Enhances Inorganic Silicon and Phosphorus Use Efficiency and Augments Salt Stress Tolerance in Soybean (*Glycine max* L.). *Microorganisms.* 8:1256.
- Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology.* 148: 2371–2381.
- Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol Res.* 221: 36–49.
- Ahemad M, Mulugeta K. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univ Sci.* 26:1–20.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res.* 163: 173–181.
- Ahmed E, Holmström SJM. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol.* 7: 196–208.
- Ait Bahadou S, Ouïjja A, Karfach A, Tahiri A, Lahlali R. 2018. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microb Pathog.* 117: 7–15.
- Alain K, Querellou J. 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles.* 13: 583–594.
- Allain P, Chaleil D, Mauras Y, Beaudeau G, Varin MC, Poinet JL, Ciancioni C, Ang KS, Cam G, Simon P. 1987. Pharmacokinetics of desferrioxamine and of its iron and aluminum chelates in patients on haemodialysis. *Clinica Chimica Acta.* 170: 331–338.
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 8:971.
- Alstrom S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonas*. *J Gen Appl Microbiol.* 37: 495–501.
- Alvin A, Miller KI, Neilan BA. 2014. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol Res.* 169: 483–495.
- Amareesan N, Jayakumar V, Kumar K, Thajuddin N. 2012. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. *Arch Phytopathology Plant Protect.* 45: 344–355.
- Amareesan N, Kumar K, Naik JH, Bapatla KG, Mishra RK. 2018. *Streptomyces* in plant growth promotion: mechanisms and role. In: Gupta VG, Pandey A (Eds). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications.* Elsevier BV. pp. 125–135.

- Anderegg G, Raber M. 1990. Metal complex formation of a new siderophore desferrithiocin and of three related ligands. *J Chem Soc Chem Commun.* 17: 1194–1196.
- Antony-Babu S, Stach JE, Goodfellow M. 2008. Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie Leeuwenhoek.* 94(1): 63–74.
- Anwar S, Ali B, Sajid I. 2016. Screening of rhizospheric actinomycetes for various *in-vitro* and *in-vivo* plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front Microbiol.* 7: 1334.
- Aravind R, Kumar A, Eapen S, Ramana K. 2009. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Lett Appl Microbiol.* 48: 58–64.
- Arnou LE. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine–tyrosine mixtures. *J Biol Chem.* 118: 531–537.
- Arshad M, Frankenberger WT. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil.* 133: 1–8.
- Atalan E, Manfio GP, Ward AC, Kroppenstedt RM, Goodfellow M. 2000. Biosystematic studies on novel streptomycetes from soil. *Antonie Leeuwenhoek.* 77: 337–353.
- Atkin CL, Neilands JB, Phaff HJ. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *J Bacteriol.* 103: 722–733.
- Atlas RM. 2004. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton: CRC Press.
- Aydi-Benabdallah R, Jabnoun-Khireddine H, Nefzi A, Mokni-Tlili S, Daami-Remadi M. 2016. Endophytic bacteria from *Datura metel* for plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Biocontrol Sci Technol.* 26: 1139–1165.
- Aznar A. 2014. Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la modulation des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat en Biologie végétale. Université Paris Sud-Paris X. p.293. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01249389/document>. (Consulté le 20.09.2019).
- Babalola OO, Glick BR. 2012. The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *J Food Agric Environ.* 10: 540–549.
- Baca BE, Soto-Urzuá L, Xochinua-Corona YG, Cuervo-García A. 1994. Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. *Soil Biol Biochem.* 26: 57–63.
- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J Mycol Med.* 15: 211–219.
- Bai X, Todd CD, Desikan R, Yang Y, Hu X. 2012. N-3-oxo-decanoyl-L-homoserine lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in Mung Bean. *Plant Physiol.* 158: 725–736.
- Bakker PAHM, Ran LX, Cm P, van Loon CC. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant pests. *Can J Plant Pathol.* 25: 5–9.
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, Van Der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol.* 22: 583.
- Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez RM, Martín M, Rivilla R. 2011. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 77: 5412–5419.

- Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou KH, Beaulieu C. 2002. Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microbiol Biotechnol.* 18: 49–54.
- Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, Zeroual Y, Dhiba D. 2018. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front Microbiol.* 9:1606.
- Barriuso J, Solano BR, Fray RG, Camara M, Hartmann A, Manero FJG. 2008. Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Biotechnol J.* 6: 442–452.
- Bartling D, Seedorf M, Mithofer A, Weiler EW. 1992. Cloning and expression of an Arabidopsis nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem.* 205: 417–424.
- Barton LL, Hemming BC. 1993. Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. Academic Press, San Diego, CA.
- Bashan Y, de Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil.* 378: 1–33.
- Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernández Á, Weyens N, Acea MJ, Vangronsveld J. 2011. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: Isolation and characterisation. *Plant Soil.* 340: 413–433.
- Beghalem H, Aliliche K, Chriki A, Landoulsi A. 2017. Molecular and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from sulla nodules. *Microb Pathog.* 111: 225–231.
- Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. 2014. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganisms in mangrove—a review. *Biocat Agricul Biotech.* 3: 97–110.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol.* 35: 1044–1051.
- Beneduzi A, Moreira F, Da Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldani JI, Passaglia LMP. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol.* 63: 94–104.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol.* 39: 311–320.
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci Technol.* 11: 557–574.
- Bennett PN, Brown MJ. 2008. Clinical pharmacology (10th ed). Edinburgh: Churchill Livingstone. Elsevier.
- Berta G, Copetta A, Gamalero E, Bona E, Cesaro P, Scarafoni A, D'Agostino G. 2014. Maize development and grain quality are differentially affected by mycorrhizal fungi and a growth-promoting pseudomonad in the field. *Mycorrhiza.* 24: 161–170.
- Berti AD, Thomas MG. 2009. Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Bacteriol.* 191: 4594–4604.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(4): 1327–50.
- Bianco C, Defez R. 2010. Improvement of Phosphate Solubilization and *Medicago* Plant Yield by an Indole-3-Acetic Acid-Overproducing Strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.* 76 (14): 4626–4632.

- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R. 2006. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli* defences to stress. *Arch Microbiol.* 185: 373–382.
- Bind M, Nema S. 2019. Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria from Pigeon Pea Along With Antimicrobial Evaluation against *Fusarium udum*. *Appl Microbiol Open Access.* 5: 163. <https://doi.org/10.35248/2471-9315.1000163>.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Op Plant Biol.* 4: 343–350.
- Bogas AC, Ferreira AJ, Araújo WL, Astolfi-Filho S, Kitajima EW, Lacava PT, Azevedo JL. 2015. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. *SpringerPlus.* 4: 258.
- Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact.* 20: 526–533.
- Bona E, Cantamessa S, Massa N, Manassero P, Marsano F, Copetta A, Lingua G, D'Agostino G, Gamalero E, Berta G. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza.* 27: 1–11.
- Bou-Abdallah F. 2010. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 1800 (8): 719–731.
- Bouffaud ML, Kyselková M, Gouesnard B, Grundmann G, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. 2012. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? *Mol Ecol.* 21: 195–206.
- Bourgeois E. 2016. Contribution au développement de bioindicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact de pratiques agricoles sur les sols. Thèse de doctorat en Microbiologie et Parasitologie. Université de Bourgogne. p.202. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01291850>. (Consulté le 20.09.2019).
- Breidenbach B, Pump J, Dumont MG. 2016. Microbial community structure in the rhizosphere of rice plants. *Front Microbiol.* 6: 1537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01537>.
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobreaux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, Wiren N, Wuytswinkel O. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell.* 84: 69–81.
- Brown DJ, Dawborn JK, Ham KN, Xipell JM. 1982. Treatment of dialysis osteomalacia with desferrioxamine. *Lancet.* 2(8294): 343–345.
- Brown SP, Johnstone RA. 2001. Cooperation in the dark: Signalling and collective action in quorum-sensing bacteria. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 268: 961–965.
- Buckee GK. 1994. Determination of total nitrogen in barley, malt and beer by Kjeldahl procedures and the Dumas Combustion Method. *J Inst Brewing.* 100: 57–64.
- Budi SW, Van Tuinen D, Arnould C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil borne pathogenic bacteria. *Appl Soil Ecol.* 15:191–199.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC, Schulze-Lefert P. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe.* 17: 392–403.
- Bultreys A. 2007. Siderotyping, a tool to characterize, classify and identify fluorescent *Pseudomonas*. In: Varma A, Chincholkar S (Eds). *Microbial siderophores*. Berlin. Springer. pp. 67–89.
- Butler JL, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD. 2003. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Appl Environ Microbiol.* 69: 6793–6800.

- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, De los Santos EP, Martinez-Aguilar L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5308–5319.
- Calatrava-Morales N, McIntosh M, Soto MJ. 2018. Regulation mediated by N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Genes.* 9: 263.
- Campos EVR, Proença PLF, Oliveira JL, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF. 2019. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. *Ecol Indic.* 105: 483–495.
- Canfora L, Lo Papa G, Vittori Antisari L, Bazan G, Dazzi C, Benedetti A. 2015. Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Appl Soil Ecol.* 93: 120–129.
- Canfora L, Salvati L, Benedetti A, Francaviglia R. 2017. Is soil microbial diversity affected by soil and groundwater salinity? Evidences from a coastal system in central Italy. *Environ Monit Assess.* 7: 189–319.
- Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biol Biochem.* 32: 11–21.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaaw PD, Farrand SK. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Inter.* 11: 1119–1129.
- Chachaty E, Saulnier P. 2000. Isolating chromosomal DNA from bacteria. In: Rapley R (Eds) *The nucleic acid protocols handbook*, vol 1. Humana, Totowa. pp. 29–32.
- Chaiham M, Lumyong S. 2011. Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. *Curr Microbiol.* 62: 173–81.
- Chan KG, Atkinson S, Mathee K, Sam CK, Chhabra SR, Cámara M, *et al.*, 2011. Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol.* 11:51.
- Chen C, Zhang J, Lu M, Qin C, Chen Y, Yang L, Huang Q, Wang J, Shen Z, Shen Q. 2016. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers. *Biol Fertil Soils.* 52: 455–467.
- Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int J Mol Sci.* 14: 17477–17500.
- Chen L, He Ly, Wang Q, Sheng Xf. 2016. Synergistic effects of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and immobilizers on the growth and heavy metal accumulation of edible tissues of hot pepper. *J Hazard Mater.* 312: 123–131.
- Chen ZY, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan LB, Sheen J, Kunkel BN. 2007. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 20131–20136.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Mulders IHM, Dekkers LC, Lugtenberg BJJ. 2000. Root colonization by Phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 1340–1345.
- Chu TN, Tran BTH, Van Bui L, Hoang MTH. 2019. Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Res Notes* 12: 11. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4046-1>.
- Clark E, Manulis S, Ophir Y, Barash I, Gafni Y. 1993. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar gypsophila. *Phytopathology.* 83: 234–240.

- Claverías FP, Undabarrena A, González M, Seeger M, Cámara B. 2015. Culturable diversity and antimicrobial activity of actinobacteria from marine sediments in Valparaiso bay, Chile. *Front Microbiol.* 6: 1–11.
- CLSI. In: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. CLSI supplement M100. (Consulté le 13.03.2021).
- Coa L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol.* 39: 425–430.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem.* 42: 669–678.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Biocontrol of plant diseases using plant growth-promoting bacteria (PGPB): principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4951–4959.
- Coombs JT, Michelsen PP, Franco CM. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol Control.* 29: 359–366.
- Cornish AS, Page WJ. 1995. Production of the tricacetate siderophore protochelin by *Azotobacter vinelandii*. *BioMetals.* 8: 332.
- Costacurta A, Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 21: 1–18.
- Cregut M. 2009. Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation du soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national polytechnique de Lorraine. p.293. Disponible sur <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01748716>. (Consulté le 20.09.2019).
- Crowley DE, Wang YC, Reid CPP, Szaniszló PJ. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil.* 130: 179–198.
- Crowley DE. 2006. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton LL, Abadia J (Eds). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Dordrecht. Springer. pp. 169–198.
- D’Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, Witt K, Gavrish E, Epstein S, Clardy J, Lewis K. 2010. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem Biol.* 17: 254–264.
- Da Costa PB, Granada CE, Ambrosini A, Moreira F, de Souza R, dos Passos JF, Arruda L, Passaglia LM. 2014. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One.* 9(12): e116020.
- Dabin B. 1967. Application des dosages automatiques à l’analyse des sols. 3ème partie. Cahiers ORSTOM. Série Pédologie. 5: 257–286. France.
- Das K, Prasanna R, Saxena AK. 2017. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiol.* 62(5): 425–435.
- Datta M, Palit R, Sengupta C, Pandit MK, Banerjee S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annum* L.) under field conditions. *Aust J Crop Sci.* 5: 531–6.
- Dave BP, Anshuman K, Hajela P. 2006. Siderophores of halophilic archaea and their chemical characterization. *Indian J Exp Biol.* 44: 340–344.
- Dave BP, Dube HC. 2000. Chemical characterization of fungal siderophores. *Indian J Exp Biol.* 38: 56–62.

- David P, Raj RS, Linda R, Rhema SB. 2014. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. *Int J Innov Sci Eng Technol.* 1: 317–324.
- Dazzo FB, Ganter S. 2009. Rhizosphere. In: Schaechter M (Eds). *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford. Elsevier. pp. 335–349.
- De Jesus Sousa JA, Olivares FL. 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem Biol Technol Agric.* 3: 24.
- De Serrano LO. 2017. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. *Biomol Concepts*, 8(3–4): 169–178. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0016>.
- De Souza JT, Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, Gianinazzi-Pearson V, Raaijmakers JM. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology.* 93: 966–975.
- De Weger LA, Dekkers LC, van der Bij AJ, Lugtenberg BLL. 1994. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. *Mol Plant Microbe Interact.* 7: 32–38.
- Deepti D, Johri BN. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr Sci.* 85: 1693–1703.
- Deori M, Jayamohan NS, Kumudini BS. 2018. Production, characterization and iron binding affinity of hydroxamate siderophores from rhizosphere associated fluorescent *Pseudomonas*. *J Plant Prot Res.* 58: 36–44.
- Depret G, Laguerre G. 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations nodulating pea. *New Phytol.* 179: 224–235.
- Dertz EA, Xu J, Stintzi A, Raymond KN. 2006. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc.* 128: 22–23.
- Desai A, Archana G. 2011. Role of siderophores in crop improvement. In: Maheshwari DK (Eds). *Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management*. Berlin. Springer. pp. 109–139.
- Deveau A, Gross H, Palin B, Mehnaz S, Schnepf M, Leblond P, Dorrestein PC, et al. 2016. Role of secondary metabolites in the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and soil microorganisms under iron-limited conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 92(8): fiw107.
- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A. 2008. An antifungal compound: 4' phenyl-1-naphthyl-phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. *Med Biol.* 15: 7–12.
- Dheeman S, Maheshwari DK, Baliyan N. 2017. Bacterial Endophytes for Ecological Intensification of Agriculture. In: Maheshwari D (Eds). *Endophytes: Biology and biotechnology. Sustainable development and biodiversity*. Cham. Springer. pp. 193–231.
- Dias AC, Costa FE, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpção LC, Araújo WL, Azevedo JL, Melo IS. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 189–195.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G, Kothe E. 2009. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol.* 107: 1687–96.
- Ding T, Palmer MW, Melcher U. 2013. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. *BMC Microbiol.* 13: 1.
- Djavaheri M, Mercado-Blanco J, Versluis C, Meyer J-M, Loon LC, Bakker PAHM. 2012. Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required

- for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Microbiologyopen*. 1: 311–325.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 212: 153–162.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*. 68(4): 1754–1759.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 411: 813.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Leeuwenhoek*. 106: 85–125.
- Duca DR, Rose DR, Glick BR. 2018. Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie Leeuwenhoek*. 111: 1645–1660.
- Duhme AK, Hider RC, Naldrett MJ, Pau RN. 1998. The stability of the molybdenum-azotochelin complex and its effect on siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Inorg Chem*. 3(5): 520–526.
- Duncan KR, Haltli B, Gill KA, Correa H, Berru e F, Kerr RG. 2015. Exploring the diversity and metabolic potential of actinomycetes from temperate marine sediments from New found land, Canada. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 42: 57–72.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, bacteria: firmicutes, cyanobacteria. 3rd ed. New York: Springer Science + Business Media.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci*. 112: 911–920.
- Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, Jaspers S, White J, Vangronsveld J, Weyens N. 2015. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microb Biotechnol*. 8: 707–715.
- Elabed H, González-Tortuero E, Ibacache-Quiroga C, Bakhrouf A, Johnston P, Gaddour K, Bl zquez J, et al. 2019. Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiol*. 19: 142. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1499-2>.
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, Stewart G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil borne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 67: 1198–1209.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Suzuki H, Sato T, Sato YI, Morisaki H, Mitsui H, Minamisawa K. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci Plant Nutr*. 46: 617–629.
- El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GESJ, Sivasithamparam K. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J Appl Microbiol*. 106: 13–26.
- El-Tarabily KA. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing Streptomyces actinomycetes. *Plant Soil*. 308: 161–174.
- Errakhi R, Bouteau F, Lebrihi A, Barakate M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*. 23: 1503–1509.

- Essen SA, Johnsson A, Bylund D, Pedersen K, Lundstrom US. 2007. Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 73(18): 5857–5864.
- Etesami H, Maheshwari DK. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf.* 156: 225–246.
- Faleiro A, Pereira T, Espindula E, Brod F, Arisi A. 2013. Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis.* 61(3): 125–133.
- Farrand SK, Qin Y, Oger P. 2002. Quorum sensing systems of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymol.* 358: 452–484.
- Fekete A, Kuttler C, Rothballer M, Hense BA, Fischer D, Buddrus-Schiemann K, Lucio M, *et al.* 2010. Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF. *FEMS Microbiol Ecol.* 72(1): 22–34.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution.* 39: 783–791.
- Fernández Bidondo L, Silvani V, Colombo R, Pérgola M, Bompadre J, Godeas A. 2011. Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. *In vitro* and *in vivo* assays with soybean (AG043RG) as plant host. *Soil Biol Biochem.* 43: 1866–1872.
- Fernandez-Calvino D, Baath E. 2010. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiol Ecol.* 73: 149–156
- Ferreira CMH, Soares HMVM, Soares EV. 2019. Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Sci Total Environ.* 682 : 779–799.
- Fetzner S. 2015. Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol.* 201: 2–14.
- Fiedler HP, Krastel P, Müller J, Gebhardt K, Zeeck A. 2001. Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol Lett.* 196: 147–151.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci.* 103: 626–631.
- Finkel OM, Castrillo G, Paredes SH, González IS, Dangl JL. 2017. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.* 38: 155–163.
- Forar LR, Amany K, Ali E, Bengraa CH. 2006. Taxonomy identification and biological activities of a novel isolate of *Streptomyces tendae*. *Arab J Biotechnol.* 9: 427–436.
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76: 1145–1152.
- Foster KR, Parkinson K, Thompson CRL. 2007. What can microbial genetics teach sociobiology? *Trends Genet.* 23: 74–80.
- Fravel DR. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 337–359.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse ML, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, *et al.* 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.* 165(1): 317–28.
- Friedrich N, Hagedorn M, Soldati-Favre D, Soldati T. 2012. Prison break: pathogens' strategies to egress from host cells. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76: 707–720.

- Fukushima T, Allred BE, Sia AK, Nichiporuk R, Andersen UN, Raymond KN. 2013. Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 13821–13826.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density -responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 176: 269–275.
- Gaby JC, Buckley DH. 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environ Microbiol*. 13: 1790–1799.
- Gamalero E, Glick BR. 2011. Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Maheshwari D (Eds). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Berlin. Springer. pp. 17–46.
- Gamit DA, Tank SK. 2014. Effect of siderophore producing microorganism on plant growth of *Cajanus cajan* (Pigeon pea). *Int J Res Pure Appl Microbiol*. 4: 20–27.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol*. 128: 197–210.
- García-Salamanca A, Molina-Henares MA, van Dillewijn P, Solano J, Pizarro-Tobías P, Roca A, Duque E, Ramos JL. 2013. Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial biotechnology*. 6(1) : 36–44.
- García de Salamone IE, Funes JM, Di Salvo LP, Escobar-Ortega JS, D'Auria F, Ferrando L, Fernandez-Scavino A. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl Soil Ecol*. 61: 196–204.
- Garcia de Salmone IE, Hynes RK, Nelson L. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol*. 47: 404–411.
- Gevers D, Huys G, Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*. 205: 31–36.
- Ghosh S, Basu PS. 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiol Res*. 161: 362–366.
- Gledhill M. 2001. Electrospray ionisation-mass spectrometry of hydroxamate siderophores. *Analyst*. 126(8): 1359–1362.
- Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can J Microbiol*. 40: 911–915.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose GM. 1999. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, London.
- Glick BR. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. *Scientifica*. 2012: 963401.
- Glick BR. 2015. Resource acquisition. In: *Beneficial plant-bacterial interactions*. New York. Springer. pp. 29–63. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-02>.
- Goldstein AH. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biol Agri Hort*. 12:185–193.
- Gomes NCM, Heuer H, Schonfeld J, Mendonca-Hagler L, Smalla K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil*. 232: 167–180.
- Gómez-Galera S, Sudhakar D, Pelacho AM, Capell T, Christou P. 2012. Constitutive expression of a barley Fe phytosiderophore transporter increases alkaline soil tolerance and results in iron partitioning between vegetative and storage tissues under stress. *Plant Physiol Biochem*. 53: 46–53.

- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Laxmipathi Gowda CL, Krishnamurthy L. 2015a. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*. 5: 355–377.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Alekhya G, Prakash B, Kudapa H, Rathore A, *et al.*, 2015b. The extent of grain yield and plant growth enhancement by plant growth-promoting broad-spectrum *Streptomyces* sp. in chickpea. *Springerplus*. 4: 31.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Alekhya G, Prakash B, Kudapa H, Varshney RK. 2015c. Evaluation of *Streptomyces* sp. obtained from herbal vermicompost for broad spectrum of plant growth-promoting activities in chickpea. *Org Agric*. 5: 123–133.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Samineni S. 2017. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocatal Agric Biotechnol*. 11: 116–123.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vidya MS, Rathore A. 2013. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. *SpringerPlus*. 3: 254.
- Gordon RE, Barnett DA. 1977. Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int J Syst Bacteriol*. 27: 176–178.
- Gortari MC, Hours RA. 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs: a review. *Mycol Prog*. 7: 221–238.
- Goswami D, Pithwa S, Dhandhukia P, Thakker JN. 2014. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: A novel IAA-producing bacterium isolated from saline desert. *J Plant Interact*. 9: 566–576.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. 2015. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *J Microbiol Method*. 110: 7–14.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res*. 206: 131–140.
- Goudjal Y, Toumatia O, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. 2013. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J Microbiol Biotechnol*. 29: 1821–1829.
- Goudjal Y, Zamoum M, Sabaou N, Mathieu F, Zitouni A. 2016. Potential of endophytic *Streptomyces* spp. for biocontrol of Fusarium root rot disease and growth promotion of tomato seedlings. *Biocontrol Sci Technol*. 26: 1691–1705.
- Goudjal Y, Zamoum M, Sabaou N, Zitouni A. 2018. Chapter 7 - Endophytic actinobacteria from native plants of Algerian sahara: Potential agents for biocontrol and promotion of plant growth. In: Singh BP, Gupta VK, Passari AK (Eds). *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier. pp. 109–124.
- Götz-Rösch C, Sieper T, Fekete A, Schmitt-Kopplin P, Hartmann A, Schröder P. 2015. Influence of bacterial N-acyl-homoserine lactone on growth parameters, pigments, antioxidative capacities and the xenobiotic phase II detoxification enzymes in barley and yam bean. *Front Plant Sci*. 6: 205.
- Grandclement C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. 2015. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Lett*. 40: 86–116.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*. 39: 1968–1977.
- Grover M, Ali SKZ, Sandhya V, Rasul A and Venkateswarlu B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol*. 27: 1231–1240.

- Guan LL, Kamino K. 2001. Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community. *BMC Microbiol.* 1(1): 27.
- Gyaneshwar P, Kumar NJ, Pareka LJ, Podle PS. 2002. Role of Soil Microorganisms in Improving P Nutrition of Plants. *Plant Soil.* 245(1): 83–93.
- Haas D, Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 3: 307–319.
- Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl Soil Ecol.* 38: 12–19.
- Hamdali H, Virolle MJ, von Jan M, Sproer C, Klenk HP, Ouhdouch Y. 2011. *Streptomyces youssoufiensis* sp. nov., isolated from a Moroccan phosphate mine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61: 1104–1108.
- Hamedi J, Mohammadipanah F. 2015. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 42(2): 157–71.
- Han S, Li D, Trost E, Mayer KF, Vlot AC, Heller W, Schmid M, et al. 2016. Systemic responses of barley to the 3-hydroxy-decanoyl-homoserine lactone producing plant beneficial endophyte *Acidovorax radices* N35. *Front Plant Sci.* 7: 1868.
- Han Y, Chen F, Li N, Zhu B, Li X. 2010. *Bacillus marcorestinum* sp. nov., a novel soil acylhomoserine lactone quorum-sensing signal quenching bacterium. *Int J Mol Sci.* 11(2): 507–520
- Han Y, Yang B, Zhang F, Miao X, Li Z. 2009. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar Biotechnol.* 11: 132–140.
- Haney CH, Samuel BS, Bush J, Ausubel FM. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat Plants.* 1: 15051.
- Hankin L, Zucker M, Sands DC. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl Microbiol.* 22: 205–209.
- Hansen M, Kragelund L, Nybroe O, Sørensen J. 1997. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol.* 23: 353–360.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463–471.
- Hartmann A, Singh M, Klingmuller W. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum mutants* excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can J Microbiol.* 29: 916–923.
- Hassan MK, McInroy JA, Kloepper JW. 2019. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. *Agriculture.* 9: 142.
- Hassan R, Shaaban MI, Bar FMA, El-Mahdy AM, Shokralla S. 2016. Quorum sensing inhibiting activity of *Streptomyces coelicoflavus* isolated from soil. *Front Microbiol.* 7: 1–12.
- Hastuti RD, Lestari Y, Suwanto A, Saraswati R. 2012. Endophytic *Streptomyces* spp. as biocontrol agents of rice bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *HAYATI J Biosci.* 19: 155–162.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.* 60: 579–598.
- Hazelton P, Murphy B. 2007. Interpreting soil test results: what do all the numbers mean? CSIRO publishing. Collinwood, Melbourne.
- Heimpel GE, Mills NJ. 2017. Biological control: ecology and applications. Cambridge University Press, Cambridge.

- Helman Y, Chernin L. 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Mol Plant Pathol.* 16: 316–329.
- Henke JM, Bassler BL. 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 14(11): 648–656.
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Høiby N, Kjelleberg S, Givskov M. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology.* 148(1): 87–102.
- Hernández-Reyes C, Schenk ST, Neumann C, Kogel KH, Schikora A. 2014. N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microb Biotechnol.* 7: 580–588.
- Hider RC, Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep.* 27(5): 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of Root-Mediated pH Changes in the Rhizosphere and Their Responses to Environmental Constraints: A Review. *Plant Soil.* 248: 43–59.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. California agriculture experiment station. Circular 347.
- Höfte M, Bakker PAHM. 2007. Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth-promoting rhizobacteria. In: Varma A, Chincholkar SB (Eds). *Microbial siderophores, soil biology.* Berlin. Springer. pp. 121–133.
- Hogan DA. 2006. Quorum sensing: Alcohols in a social situation. *Curr Biol.* 16: 457–458.
- Hopwood DA. 2007. *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press, New York.
- Hu J, Lin X, Wang J, Chu H, Yin R, Zhang J. 2009. Population size and specific potential of P-mineralizing and solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. *Pedobiologia.* 53: 49–58.
- Huma N, Shankar P, Kushwah J, Bhushan A, Joshi J, Mukherjee J, Raju J, Purohit HJ, Kalia VC. 2011. Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (*aiiA*) of *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol.* 21(10): 1001–1011.
- Igiehon NO, Babalola OO. 2017. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101: 4871–4881.
- Ikeda AC, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M, Galli-Terasawa LV. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microb Ecol.* 65(1): 154–160.
- Illmer P, Schinner F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem.* 27: 257–63.
- Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. 2011. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3202–3210.
- Istina IN, Widiastuti H, Joy B, Antralina M. 2015. Phosphate solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Proc Food Sci.* 3: 426–435.
- Jacob N, Niladevi KN, Anisha GS, Prema P. 2008. Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiol Res.* 163(5): 538–44.
- Jain P, Pundir RK. 2017. Potential role of endophytes in sustainable agriculture-recent developments and future prospects. In: Maheshwari D (Eds). *Endophytes: Biology and biotechnology. Sustainable development and biodiversity.* Cham. Springer. pp. 145–169.
- Jameson PE. 2000. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Reg.* 32: 369–380.

- Jang MS, Goo E, An JH, Kim J, Hwang I. 2014. Quorum sensing controls flagella morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS One*. 9:e84831.
- Jansson JK, Hofmockel KS. 2018. The soil microbiome-from metagenomics to metaproteomics. *Curr Opin Microbiol*. 43: 162–168.
- Jeffrey LSH. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afr J Biotechnol*. 7: 3697–3702.
- Ji SH, Gururani MA, Chun SC. 2014. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Diazotrophic Bacteria from Korean Rice Cultivars. *Microbiol Res*. 169: 83–98.
- Jin K, White PJ, Whalley WR, Shen J, Shi L. 2017. Shaping an Optimal Soil by Root–Soil Interaction. *Trends Plant Sci*. 22: 823–29.
- Jog R, Nareshkumar G, Rajkumar S. 2012. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *J Appl Microbiol*. 113: 1154–1164.
- Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 160: 778–788.
- Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*. 163: 459–480.
- Jones JDG, Dang JL. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323–329.
- Joo GJ. 2005. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol Lett*. 27: 201–205.
- Jurinak JJ, Dudley LM, Allen M, Knight WG. 1986. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: thermodynamic study. *Soil sci*. 142: 225–261.
- Kalia VC. 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv*. 31(2): 224–245.
- Kang J, Amoozegar A, Hesterberg D, Osmond DL. 2011. Phosphorus leaching in a sandy soil as affected by organic and incomposted cattle manure. *Geoderma*. 161: 194–201.
- Kang JE, Han JW, Jeon BJ, Kim BS. 2016. Efficacies of quorum sensing inhibitors, piericidin A and glucopiericidin A, produced by *Streptomyces xanthocidicus* KPP01532 for the control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Microbiol Res*. 184: 32–41.
- Kang SH, Cho H, Cheong H, Ryu C, Kim JF, Park S. 2007. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Microbiol Biotechnol*. 17: 96–103.
- Karakurt H, Aslantas R, Ozkan G, Guleryuz M. 2009. Effects of indol-3-butyric acid (IBA), plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and carbohydrates on rooting of hardwood cutting of MM106 Apple rootstock. *Afr J Agric Res*. 4: 60–64.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol*. 32: 210–220.
- Kaviani S, Izadyar M, Housaindokht MR. 2017. A DFT study on the complex formation between desferrithiocin and metal ions (Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>). *Comput Biol Chem*. 67: 114–121.
- Kendall MM, Sperandio V. 2007. Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol*. 23: 10–15.
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol*. 96: 473–80.

- Khamna S, Yokota A, Lumyong S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 649–655.
- Khan KS, Joergensen RG. 2009. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. *Bioresour Technol.* 100: 303–309.
- Kidarsa TA, Goebel NC, Zabriskie TM, Loper JE. 2011. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Mol Microbiol.* 81: 395–414.
- Kim KY, Jordan D, McDonald GA. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fert Soils.* 24: 347–352.
- Kim TU, Cho SH, Han JH, Shin YM, Lee HB, Kim SB. 2012. Diversity and physiological properties of root endophytic Actinobacteria in native herbaceous plants of Korea. *J Microbiol.* 50: 50–57.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16: 111–120.
- Kinoshita H, Ipposhi H, Okamoto S, Nakano H, Nihira H, Yamada Y. 1997. Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol.* 179(22): 6986–6993.
- Kline T, Fromhold M, McKennon TE, Cai S, Treiberg J, Ihle N, Sherman D, et al. 2000. Antimicrobial effects of novel siderophores linked to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Bioorg Med Chem.* 8: 73–93.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schiroth MN. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting Rhizobacteria. *Nature.* 286: 885–886.
- Kobayashi M, Izui H, Nagasawa T, Yamada H. 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile – cloning of the *Alcaligenes* gene and site directed mutagenesis of cysteine residues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 247–251.
- Kobayashi M, Suzuki T, Fujita T, Masuda M, Shimizu S. 1995. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 714–718.
- Koebnik R. 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: The exception or the rule? *Trends Microbiol.* 13(8): 343–347.
- Kour D, Rana KL, Yadav AN, Yadav N, Kumar V, Kumar A, Sayyed RZ, et al. 2019. Drought-tolerant phosphorus-solubilizing microbes: biodiversity and biotechnological applications for alleviation of drought stress in plants. In: Sayyed RZ, Arora NK, Reddy MS (Eds). *Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management*. Singapore. Springer. pp. 255–308.
- Kraemer SM. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci.* 66: 3–18.
- Krysciak D, Schmeisser C, Preuss S, Riethausen J, Quitschau M, Grond S, Streit WR. 2011. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234. *Appl Environ Microbiol.* 77(15): 5089–5099.
- Krzyzanowska J, Czubacka A, Oleszek W. 2010. Dietary phytochemicals and human health. In: Giardi MT, Rea G, Berra B (Eds). *Bio-farms for nutraceuticals: advances in experimental medicine and biology*. Boston. Springer. pp. 74–98.

- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 6: 1244–1251.
- Kumar P, Thakur S, Dhingra GK, Singh A, Pal M, Harshvardhan K, Dubey RC, Maheshwari DK. 2018. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. *Biocatal Agric Biotechnol.* 15: 264–269.
- Kumar S, Baudhdh K, Barman SC, Singh RP. 2014. Amendments of microbial bio fertilizers and organic substances reduces requirement of urea and DAP with enhanced nutrient availability and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecol Eng.* 71: 432–437.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870–1874.
- Kurabachew H, Wydra K. 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biol Control.* 67: 75–83.
- Kuzyakov Y, Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *J Plant Nutr Soil Sci.* 163: 421–431.
- Lakshmanan V, Castaneda R, Rudrappa T, Bais HP. 2013. Root transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* exposed to beneficial *Bacillus subtilis* FB17 rhizobacteria revealed genes for bacterial recruitment and plant defense independent of malate efflux. *Planta.* 238: 657–668.
- Lambers H, Chapin FS III, Pons TL. 2008. Mineral nutrition. In: Lambers H, Chapin FS, Pons TL (Eds). *Plant physiological ecology*. New York. Springer. pp. 255–320.
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8(7): 298–300.
- Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, Cnockaert M, Zhang J, Huang Y, Liu Z, Swings J. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol.* 27: 84–92.
- Lareen A, Burton F, Schafer P. 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol.* 90(6): 575–587.
- LaSarre B, Federle MJ. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol R.* 77(1): 73–111.
- Laschat S, Bilitewski U, Blodgett J, Duhme-Klair A-K, Dallavalle S, Routledge A, Schobert R. 2017. Chemical and biological aspects of nutritional immunity-perspectives for new anti-infectives targeting iron uptake systems. *Angew Chem Int Ed Engl.* 56(46): 14360–14382.
- Last RL, Bissinger PH, Mahoney DJ, Radwanski ER, Fink GR. 1991. Tryptophan mutants in *Arabidopsis* – the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *Plant Cell.* 3: 345–358.
- Latour X, Faure D, Dialo S, Cirou A, Smadja B, Dessaux Y, Orange N. 2008. Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cah Agric.* 17: 355–360.
- Lechevalier MP, Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 20(4): 435–43.
- Lee HJ, Cho GY, Chung SH, Wang KS. 2014. *Streptomyces panaciradicis* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium isolated from rhizoplane of ginseng. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64: 3816–3820.

- Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb Technol.* 38: 990–997.
- Leite HAC, Silva AB, Gomes FP, Gramacho KP, Faria JC, de Souza JT, Loguercio LL. 2013. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(6): 2639–2651.
- Leveau HJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *J Appl Microbiol.* 71: 2365–2371.
- Lewis K, Epstein S, D’Onofrio A, Ling LL. 2010. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J Antibiot.* 63(8): 468–476.
- Li GJ, Dong QE, Ma L, Huang Y, Zhu ML, Ji YP, Wang QH, Mo MH, Zhang KQ. 2014. Management of *Meloidogyne incognita* on tomato with endophytic bacteria and fresh residue of *Wasabia japonica*. *J Appl Microbiol.* 117: 1159–1167.
- Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem.* 40: 238–246.
- Li M, Guo R, Yu F, Chen X, Zhao H, Li H, Wu J. 2018. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *Int J Mol Sci.* 19: 443.
- Li XJ, Tang HY, Duan JL, Gao JM, Xue QH. 2013. Bioactive alkaloids produced by *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *Neaurantiaca*, an endophytic bacterium from *Salvia miltiorrhiza*. *Nat Prod Res.* 27: 496–499.
- Libbert E, Fiscer E, Drawert A, Schrouder R. 1970. Pathways of IAA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria: a comparison II. Establishment of the tryptophan metabolites, effects of a native inhibitor. *Physiol Plant.* 23: 278–286.
- Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, Torkewitz NR, Hofmann D, Kempf HJ. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag Sci.* 56: 688–695.
- Lim HS, Kim YS, Kim SD. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ Microbiol.* 57(2): 510–516.
- Lin GH, Chang CY, Lin HR. 2015. Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 988: 53–58.
- Lin L, Ge HM, Yan T, Qin YH, Tan RX. 2012. Thaxtomin A-deficient endophytic *Streptomyces* sp. enhances plant disease resistance to pathogenic *Streptomyces scabies*. *Planta.* 236: 1849–1861.
- Lin YB, Wang XY, Fang H, Ma YN, Tang J, Tang M, Wei GH. 2012. *Streptomyces shaanxiensis* sp. nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62: 1725–1730.
- Link GKK, Eggers V. 1941. Hyperauxiny in crown gall of tomato. *Bot Gaz.* 103: 87–106.
- Liu F, Bian Z, Jia Z, Zhao Q, Song S. 2012. The GCR1 and GPA1 participate in promotion of *Arabidopsis* primary root elongation induced by N-acyl-homoserine lactones, the bacterial quorum-sensing signals. *Mol Plant Microbe Interact.* 25: 677–683.
- Liu P, Nester EW. 2006. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proc Natl Acad Sci.* 103: 4658–4662.

- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4516–4522.
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M, der Lelie Dv. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci.* 21: 583–606.
- Loh J, Pierson EA, Pierson LS 3rd, Stacey G, Chatterjee A. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* 5:1–5.
- López JL, Alvarez F, Príncipe A, Salas ME, Lozano MJ, Draghi WO, Jofré E, et al. 2018. Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *J Biotechnol.* 267: 55–62.
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, et al. 2012. Road map of the phylum Actinobacteria, in Bergey's manual of systematic bacteriology. Berlin. Springer. pp.1–28.
- Lugtenberg BJ, Chin AWTF, Bloemberg GV. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Leeuwenhoek.* 81: 373–383.
- Luo G, Ling N, Nannipieri P, Chen H, Raza W, Wang M, Guo S, Shen Q. 2017. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biol Fertil Soils.* 53: 375–388.
- Ma Z, Geudens N, Kieu NP, Sinnaeve D, Ongena M, Martins JC, Höfte M. 2016. Biosynthesis, chemical structure and structure activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front Microbiol.* 7:382.
- Ma Y, Prasad M, Rajkumar M, Freitas H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv.* 29: 248–258.
- Mahadevan B, Crawford D. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb Technol.* 20: 489–493.
- Mahmoud ALE, Abd-Alla MH. 2001. Siderophore production by some microorganisms and their effect on *Bradyrhizobium*-Mung Bean symbiosis. *Int J Agric Biol.* 03(2):157–162.
- Mahmoudi E, Hasanzadeh N, Tabatabaei BES, Venturi V. 2011. Virulence attenuation of *Pectobacterium carotovorum* using N-acyl-homoserine lactone degrading bacteria isolated from potato rhizosphere. *Plant Pathol J.* 27(3): 242–248.
- Maindad DV, Kasture VM, Chaudhari H, Dhavale DD, Chopade BA, Sachdev DP. 2014. Characterization and fungal inhibition activity of siderophore from wheat rhizosphere associated *Acinetobacter calcoaceticus* strain HIRFA32. *Indian J Microbiol.* 54: 315–322.
- Maki ML, Broere M, Tin Leung K, Qin W. 2011. Characterization of some efficient cellulose producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol.* 2(2): 146–154.
- Malluche HH, Smith AJ, Abreo K, Faugere MC. 1984. The use of desferrioxamine in the management of aluminum accumulation in bone in patients with renal failure. *N Engl J Med.* 311: 140–144.
- Mamta RP, Pathania V, Gulati A, Singh B, Bhanwra RK, Tewari R. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Appl Soil Ecol.* 46: 222–229.
- Mani A, Hameed S, Ramalingam S, Narayanan N. 2012. Assessment of quorum quenching activity of *Bacillus* species against *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297. *Global J Pharmacol.* 6: 118–125.

- Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE, Barash I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11: 634–642.
- Manulis S, Shafrir H, Epstein E, Lichter A, Barash I. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology.* 140: 1045–1050.
- Manzur JP, Oliva-Alarcón M, Rodríguez-Burruezo A. 2014. *In vitro* germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hortic.* 170: 203–210.
- Marques AP, Pires C, Moreira H, Rangel AO, Castro PM. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol Biochem.* 42: 1229–1235.
- Marquez-Santacruz H, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda M, Velazquez-Sepulveda I, Santoyo G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet Mol Res.* 9: 2372–2380.
- Martinelli D, Grossmann G, Sequin U, Brandl H, Bachofen R. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol.* 4: 25.
- Martínez-Morales LJ, Soto-Urzúa L, Baca BE, Sánchez-Ahédo JA. 2003. Indole-3- butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 228(2): 167–173.
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci O, Mengel K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils.* 30: 433–439.
- Materska M, Perucka I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem.* 53: 1750–1756.
- Mathesius U, Imin N, Chen H, Djordjevic MA, Weinman JJ, Natera SH, Morris AC, et al. 2003. Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 2: 1288–1303.
- Mathesius U. 2008. Auxin: at the root of nodule development? *Funct Plant Biol.* 35: 651–668.
- Mathieu C, Pieltain F. 2003. Analyse chimique des sols méthodes choisies. Paris: Tec et Doc/Lavoisier. France.
- Matsumoto K, Ozawa T, Jitsukawa K, Masuda H. 2004. Synthesis, solution behavior, thermal stability, and biological activity of an Fe (III) complex of an artificial siderophore with intramolecular hydrogen bonding networks. *Inorg Chem.* 43: 8538–8546.
- Matthijs S, Budzikiewicz H, Schafer M, Wathélet B, Cornelis P. 2008. Ornicorrugatin, a new siderophore from *Pseudomonas fluorescens* AF76. *Z Naturforsch C.* 63: 8–12.
- Mbai FN, Magiri EN, Matiru VN, Nganga J, Nyambati VCS. 2013. Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan basmati rice. *Amer Internat J Contemp Res.* 3 (4): 25–40.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, et al. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* 143: 3703–3711.
- McCormack P, Worsfold PJ, Gledhill M. 2003. Separation and detection of siderophores produced by marine bacterioplankton using high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 75(11): 2647–2652.
- Meena KK, Mesapogu S, Kumar M, Yandigeri MS, Singh G, Saxena AK. 2010. Co-inoculation of the endophytic fungus *Piriformospora indica* with the P-solubilizing bacteria

- Pseudomonas striata* affects population dynamics and plant growth in chickpea. *Biol Fertil Soils*. 46: 169–174.
- Mehnaz S, Saleem RSZ, Yameen B, Pianet I, Schnakenburg G, Pietraszkiewicz H. *et al.* 2013. Lahorenoic acids A–C, orthodialkyl-substituted aromatic acids from the biocontrol strain *Pseudomonas aurantiaca* PB-St2. *J Nat Prod*. 76: 135–141.
- Meiwes J, Fiedler HP, Haag H, Zahner H, Konetschny-Rapp S, Jung G. 1990. Isolation and characterization of Staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiol Lett*. 67: 201–206.
- Mercado-Blanco J, Van der Drift KM, Olsson PE, Thomas-Oates JE, van Loon LC, Bakker PA. 2001. Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriol*. 183(6): 1909–1920.
- Meschke H, Schrempf H. 2010. *Streptomyces lividans* inhibits the proliferation of the fungus *Verticillium dahliae* on seeds and roots of *Arabidopsis thaliana*. *Microb Biotechnol*. 3(4): 428–43.
- Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, *et al.* 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. 68: 2745–2753.
- Meyer JM, Hohnadel D, Hallé F. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J Gen Microbiol*. 135(6): 1479–1487.
- Mezaache S. 2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Ferhat ABBAS Sétif. p. 221. Disponible sur : <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/2102>. (Consulté le 20.09.2019).
- Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, Divya KL, Venkatasalam EP, Srinivasan S, *et al.* 2019. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatal Agric Biotechnol*. 17: 119–128.
- Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Labuschagne N, Dubery IA. 2018. The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. *Front Plant Sci*. 9: 112.
- Miao C, Liu F, Zhao Q, Jia Z, Song S. 2012. A proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* seedling responses to 3-oxo-octanoylhomoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signal. *Biochem Biophys Res Commun*. 427: 293–298.
- Miao L, Xu J, Yao Z, Jiang Y, Zhou H, Jiang W, Dong K. 2017. The anti-quorum sensing activity and bioactive substance of a marine derived *Streptomyces*. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 31: 1007–1015.
- Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A. 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot*. 60: 1729–1742.
- Mingma R, Pathom-aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. 2014. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Glycine*. *World J Microbiol Biotechnol*. 30: 271–280.
- Misko AL, Germida JJ. 2002. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol Ecol*. 42: 399–407.
- Mönchgesang S, Strehmel N, Schmidt S, Westphal L, Taruttis F, Müller E, Herklotz S, *et al.* 2016. Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Sci Rep*. 6: 1–11.

- Montero-Calasanz MC, Santamaría C, Albareda M, Daza A, Duan J, Glick BR, Camacho M. 2013. Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish J Agric Res.* 11: 146–154.
- Moreira FDS, Da Costa PB, De Souza R, Beneduzi A, Lisboa BB, Vargas LK, Passaglia LMP. 2016. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genet Mol Biol.* 39: 111–121.
- Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T. 2008. N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett.* 279: 124–130.
- Morris RO. 1995. Genes Specifying Auxin and Cytokinin Biosynthesis in Prokaryotes. In: Davies PJ (Eds). *Plant Hormones*. Dordrecht. Springer. pp. 318–339.
- Mossialos D, Meyer JM, Budzikiewicz H, Wolff U, Koedam N, Baysse C, Anjaiah V, Cornelis P. 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl Environ Microbiol.* 66: 487–492.
- Mullis KB, Pollack JR, Neilands JB. 1971. Structure of schizokinen, an iron-transport compound from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry.* 10(26): 4894–4897.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 148: 257–266.
- Nagarajan R. 1972.  $\beta$ -Lactam antibiotics from *Streptomyces*. In: Flynn EH (Eds). *Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology*. New York. Academic Press. pp. 636–661.
- Nagasawa T, Mauger J, Yamada H. 1990. A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3 – purification and characterization. *Eur J Biochem.* 194: 765–772.
- Nagata T. 2017. Effect of *Pseudomonas fluorescens* inoculation on the improvement of iron deficiency in tomato. *Plant Root.* 11: 1–9.
- Nagoba B, Vedpathak D. 2011. Medical applications of siderophores. *Eur J Gen Med.* 8: 229–235.
- Nair CB, Anith KN, Sreekumar J. 2007. Mitigation of growth retardation of the plant defense activator, acibenzolar-S-methyl, in amaranthus plants by plant growth-promoting rhizobacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 23: 1183–1187.
- Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Raguchander T, Samiyappan R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem.* 33: 603–612.
- Nandi M, Selin C, Brassinga AKC, Belmonte MF, Fernando WGD, Loewen PC *et al.* 2015. Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematocidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 10:e0123184.
- Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. 2003. Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant Growth Regul.* 40: 97–106.
- Nasser W, Dorel C, Wawrzyniak J, Van Gijsegem F, Groleau MC, Déziel E, Reverchon S. 2013. Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. *Environ Microbiol.* 15: 865–880.
- Nautiyal CS, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R, Verma D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett.* 182: 291–296.

- Navarrete AA, Soares T, Rossetto R, Van Veen JA, Tsai SM, Kuramae EE. 2015. Verrucomicrobial Community Structure and Abundance as Indicators for Changes in Chemical Factors Linked to Soil Fertility. *Antonie Leeuwenhoek*. 108: 741–52.
- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V. 2006a. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem*. 96: 66–73.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD. 2006b. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*. 31: 436–439.
- Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*. 43(4): 496–518.
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*. 104(1): 313–322.
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*. 270: 26723–26726.
- Neiverth A, Delai S, Garcia DM, Saatkamp K, Souza EM, Pedrosa FO, Guimarães VF, et al. 2014. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Eur J Soil Biol*. 64: 1–5.
- Nelson MN, Sorenson J. 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 30: 217–227.
- Neumann G, Römheld V. 2007. The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: Pinton R, Varanino Z, Nannipieri P (Eds). *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. New York: CRC Press. pp. 23–72.
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci*. 4: 139.
- Ng LC, Sariah M, Sariam O, Radziah O, Abidin MAZ. 2012. Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic cultivation system. *Austr J Crop Sci*. 6: 170–5.
- Nguyen TM, Kim J. 2015. *Streptomyces gilvifuscus* sp. nov., an actinomycete that produces antibacterial compounds isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65: 3493–3500.
- Nonhebel HM. 2015. Tryptophan-independent IAA synthesis: critical evaluation of the evidence. *Plant Physiol*. 169: 1001–1005.
- O’Callaghan M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100: 5729–5746.
- Oberhansli T, Defago G, Haas D. 1991. Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* – role of tryptophan side-chain oxidase. *J Gen Microbiol*. 137: 2273–2279.
- Ofek-Lalzar M, Sela N, Goldman-Voronov M, Green SJ, Hadar Y, Minz D. 2014. Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome. *Nat Commun*. 5: 4950.
- Olano C, Lombo F, Mendez C, Salas JA. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng*. 10: 281–292.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 33:197.
- Oleńska E, Małek W, Wójcik M, Swiecicka I, Thijs S, Vangronsveld J. 2020. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Sci Total Environ*. 743: 140682.
- Ollinger J, Song KB, Antelmann H, Hecker M, Helmann JD. 2006. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 188 (10): 3664–3673.

- Omidvari M, Sharifi R, Ahmadzadeh M, Dahaji P. 2010. Role of fluorescent pseudomonads siderophore to increase bean growth factors. *J Agric Sci.* 2: 242–247.
- Ortiz-Castro R, Martinez-Trujillo M, Lopez-Bucio J. 2008. N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31: 1497–1509.
- Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, Cámara M, Williams P, Barrett DA. 2007. Comprehensive profiling of n-acyl homoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 387: 497–511.
- Osorio NW. 2011. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganism in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils. In: Maheshwari DK (Eds). *Bacteria in agrobiology: plant nutrient management*. Berlin. Springer. pp. 65–80.
- Özen AI, Ussery DW. 2012. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb Ecol.* 63: 239–248.
- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R, Sa T. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils.* 46: 807–816.
- Palaniyandi SA, Yang SH, Damodharan K, Suh JW. 2013. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. *J Basic Microbiol.* 53: 985–995.
- Palmer AG, Senechal AC, Mukherjee A, Ane JM, Blackwell HE. 2014. Plant responses to bacterial N-acyl-L-homoserine lactones are dependent on enzymatic degradation to L-homoserine. *ACS Chem Biol.* 9: 1834–1845.
- Pandey P, Bisht S, Sood A, Aeron A, Sharma GD, Maheshwari DK. 2012. Consortium of Plant-Growth-Promoting Bacteria: Future Perspective in Agriculture. In: Maheshwari D (Eds) *Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics*. Berlin, Heidelberg. Springer. pp. 185–200.
- Pansu M, Gautheyrou J. 2006. *Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods*. Heidelberg: Springer.
- Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT, Yum DY. 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol.* 71: 2632–2641.
- Parks EJ, Olson GJ, Brickman FE, Baldi F. 1990. Characterization of high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron one by a fungus. *Indian J Microbiol.* 5: 183–190.
- Parsek MR, Greenberg EP. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13(1): 27–33.
- Passari AK, Mishra VK, Saikia V, Gupta VK, Singh BP. 2015a. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. *Front Microbiol.* 6: 273.
- Passari AK, Mishra VK, Gupta VK, Yadav MK, Saikia R, Singh BP. 2015b. *In vitro* and *in vivo* plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS One.* 10: e0139468.
- Passari AK, Mishra VK, Yadav MK, Gupta VK, Saikia R, Singh BP. 2016. Distribution and identification of endophytic *Streptomyces* species from *Schima wallichii* as potential. *Pol J Microbiol.* 65 (3): 319–329.
- Patten C, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol.* 42: 207–220.

- Patten CL, Glick BR. 2002b. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol.* 48: 635–642.
- Patten CL, Glick BR. 2002a. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3795–3801.
- Pereira SIA, Monteiro C, Vega AL, Castro PML. 2016. Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth promoting activities. *Ecol Eng.* 87: 91–97.
- Pereira TP, do Amaral FP, Dall'Asta P, Brod FCA, Arisi ACM. 2014. Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. *Mol Biotechnol.* 56(7): 660–670.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods.* 70: 127–131.
- Pérez-Montaña F. 2012. Caracterización de los sistemas de Quorum Sensing en rizobios. Importancia durante el diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. (Caractérisation des systèmes de détection de quorum dans le rhizobium. Importance lors du dialogue moléculaire dans la symbiose rhizobio-légumineuse), Thèse de doctorat en Microbiologie. Université de Séville. p.296. Disponible sur : <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=140280>. (Consulté le 20.09.2019).
- Perley JW, Stowe BB. 1966. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. *Plant Physiol.* 41: 234–237.
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189–199.
- Petrus MLC, Claessen D. 2014. Pivotal roles for *Streptomyces* cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie Leeuwenhoek.* 106 (1):127–139.
- Pham VTK, Rediers H, Ghequire MGK, Nguyen HH, De Mot R, Vanderleyden J, Spaepen S. 2017. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Arch Microbiol.* 199: 513–517.
- Pierson LS, Pierson EA. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *App Microbiol Biotechnol.* 86: 1659–1670.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28(1): 489–521.
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology.* 17: 362–370.
- Piotrowski M, Schonfelder S, Weiler EW. 2001. The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem.* 276: 2616–2621.
- Piper KR, Farrand SK. 2000. Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J Bacteriol.* 182 (4):1080–1088.
- Pollmann S, Muller A, Piotrowski M, Weiler EW. 2002. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 216: 155–161.
- Pollmann S, Neu D, Weiler EW. 2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry.* 62: 293–300.
- Poole K, McKay GA. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci.* 8: 661–686.

- Postma J, Nijhui E, Someus E. 2010. Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal bone charcoal. *Appl Soil Ecol.* 46: 464–469.
- Pourbabae AA, Shoaibi F, Emami S, Alikhani HA. 2018. The potential contribution of siderophore producing bacteria on growth and Fe ion concentration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water stress. *J Plant Nutr.* 41: 619–626.
- Pridham TG, Hesseltine CW, Benedict RG. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups—placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol.* 6(1): 52–79.
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant–Microbe Interact.* 6: 609–615.
- Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 16: 466–471.
- Prusty R, Grisafi P, Fink GR. 2004. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 101: 4153–4157.
- Puente ME, Li CY, Bashan Y. 2009. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ Exp Bot.* 66: 389–401.
- Pugliese A, Loizzo MR, Tundis R, O’Callaghan Y, Galvin K, Menichini F, O’Brien N. 2013. The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chem.* 141: 2606–2613.
- Puri A, Padda KP, Chanway CP. 2017. Plant growth promotion by endophytic bacteria in nonnative crop hosts. In: Maheshwari D, Annapurna K (Eds). *Endophytes: Crop productivity and protection. Sustainable development and biodiversity.* Springer. Cham. pp. 11–45.
- Qi W, Zhao L. 2013. Study of the siderophore producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J Basic Microbiol.* 53(4): 355–364.
- Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89: 457–473.
- Qing C, Pengfei Q, Renlin X, Tambong JT, Djama ZR, Wei L. 2011. Comparison of three typing methods for evaluating the diversity of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. *J Plant Sci.* 6: 52–65.
- Raaijmakers JM, Mazzola M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50: 403–424.
- Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Leeuwenhoek.* 81: 537.
- Rachid CT, Santos AL, Piccolo MC, Balieiro FC, Coutinho HLC, Peixoto RS, Tiedje JM, *et al.* 2013. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian cerrado soil bacterial community structure. *PLoS One.* 8: e59342.
- Rademaker J, Hoste B, Louws F, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, *et al.* 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 665–677.
- Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic J, De Bruijn FJ. 2004. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk GA, De Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, Van Elsas JD (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual.* Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. pp. 1–33.
- Radzki W, Mañero FG, Algar E, García JL, García-Villaraco A, Solano BR. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Leeuwenhoek.* 104: 321–330.

- Ramakrishna W, Yadav R, Li K. 2019. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. *Appl Soil Ecol.* 138: 10–18.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samayapan R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20: 1–11.
- Ramette A, Moëgne-Loccoz Y, Défago G. 2006. Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiol Ecol.* 55: 369–381.
- Rankl S, Gunsé B, Sieper T, Schmid C, Poschenrieder C, Schröder P. 2016. Microbial homoserine lactones (AHLs) are effectors of root morphological changes in barley. *Plant Sci.* 253: 130–140.
- Rashid S, Charles TC, Glick BR. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Appl Soil Ecol.* 61: 217–224.
- Rasouli-Sadaghiani M, Malakouti MJ, Khavazi K, Miransari M. 2014. Siderophore efficacy of fluorescent pseudomonades affecting labeled iron (<sup>59</sup>Fe) uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in Fe efficiency. In: Miransari M (Eds). *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses: Volume 2: Alleviation of Soil Stress by Pgp and Mycorrhizal Fungi*. New York. Springer. pp. 121–132.
- Raupach GS, Kloepper JW. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology.* 88: 1158–1164.
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2261–2268.
- Reyes-Tena A, Rincon-Enriquez G, Lopez-Perez L, Quinones-Aguilar EE. 2017. Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annuum* L. against *Phytophthora capsici*. *Pak J Agri Sci.* 54: 513–522.
- Řezanka T, Palyzová A, Faltýšková H, Sigler K. 2018. Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. *Stud Nat Prod Chem.* 60: 157–188.
- Řezanka T, Palyzová A, Faltýšková H, Sigler K. 2019. Chapter 5-Siderophores: amazing metabolites of microorganisms. In: Atta-urRahman (Eds). *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. pp. 157–188.
- Rillig MC, Lehmann A, Lehmann J, Camenzind T, Rauh C. 2018. Soil biodiversity effects from field to fork. *Trends Plant Sci.* 23:17–24.
- Rincon-Florez VA, Carvalhais LC, Schenk PM. 2013. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity.* 5: 581–612.
- Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan T. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15 – 21.
- Romero A, Carrion G, Rico-Gray V. 2001. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Fungal Divers.* 7: 81–87.
- Rungin S, Indananda C, Suttiviriya P, Kruasuwan W, Jaemsaeng R, Thamchaipenet A. 2012. Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Leeuwenhoek.* 102(3): 463–472.
- Sabaratham S, Traquair JA. 2015. Mechanism of antagonism by *Streptomyces griseocarneus* (strain Di944) against fungal pathogens of greenhouse-grown tomato transplants. *Can J Plant Pathol.* 37: 197–211.

- Sadeghi A, Karimi E, Dahaji PA, Javid MG, Dalvand Y, Askari H. 2012. Plant growth-promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* 28: 1503–1509.
- Sadfi N, Cherif M, Fliss I, Boudabbous A, Antoun H. 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of Fusarium dry rot of potato tubers. *J Plant Pathol.* 83: 101–118.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P. 2015. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 3984–3999.
- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. 2013. Microbial siderophores: a mini review: Microbial Siderophores. *J Basic Microbiol.* 53: 303–317
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406–425.
- Salam M, Varma A. 2019. Bacterial community structure in soils contaminated with electronic waste pollutants from Delhi NCR. *India Electron J Biotechnol.* 41: 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.07.003>.
- Sams T, Baker Y, Hodgkinson J, Gross J, Spring D, Welch M. 2016. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *Isr J Chem.* 56: 282–294.
- Sandargo B, Chepkirui C, Cheng T, Chaverra-Muñoz L, Thongbai B, Stadler M, Hüttel S. 2019. Biological and chemical diversity go hand in hand: *Basidiomycota* as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnol Adv.* 37:107344. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.011>.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda Mdel C, Glick BR. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res.* 183: 92–99.
- Sapers G, Gorny J, Yousef A. 2006. Microbiology of Fruits and Vegetables. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420038934>
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. 2018. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23: 25–41.
- Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S. 2016. Exploration of Plant Growth-Promoting Actinomycetes for Biofortification of Mineral Nutrients. In: Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V (Eds). Plant Growth Promoting Actinobacteria. Singapore. Springer. pp. 263–274.
- Saure MC. 2005. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Sci Hortic.* 105: 65–89.
- Saxena B, Modi, Modi VV. 1986. Isolation and Characterization of Siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *J Gen Microbiol.* 132: 2219–2224.
- Scagliola M, Pii Y, Mimmo T, Cesco S, Ricciuti P, Crecchio C. 2016. Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and tomato (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. *Plant Physiol Biochem.* 107: 187–196.
- Schenk ST, Hernandez-Reyes C, Samans B, Stein E, Neumann C, Schikora M, Reichelt M, *et al.* 2014. N-acyl-homoserine lactone primes plants for cell wall reinforcement and induces resistance to bacterial pathogens via the salicylic acid/oxylipin pathway. *Plant Cell.* 26: 2708–2723.
- Schenk ST, Stein E, Kogel KH, Schikora A. 2012. *Arabidopsis* growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. *Plant Signal Behav.* 7: 178–181.
- Schikora A, Schenk ST, Hartmann A. 2016. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol.* 90: 605–612.

- Schikora A, Schenk ST, Stein E, Molitor A, Zuccaro A, Kogel KH. 2011. N-acyl homoserine lactone confers resistance towards biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6. *Plant Physiol.* 157: 1407–1418.
- Schmidt JE, Bowles TM, Gaudin AC. 2016. Using ancient traits to convert soil health into crop yield: impact of selection on maize root and rhizosphere function. *Front Plant Sci.* 7:373.
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, *et al.* 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29: 909–918.
- Segaran G, Sathivelu M. 2019. Fungal endophytes: a potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatal Agric Biotechnol.* 21: 101284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>.
- Seidel C, Walz A, Park S, Cohen JD, Ludwig-Muller J. 2006. Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant Biol.* 8: 340–345.
- Sekine M, Watanabe K, Syono K. 1989. Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol.* 171: 1718–1724.
- Sessitsch A, Reiter B, Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can J Microbiol.* 50: 239–249.
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, Wilhelm E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 39: 23–32.
- Shameer S, Prasad TNVKV. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regul.* 84: 603–615.
- Shanmugaiyah V, Mathivanan N, Varghese B. 2010. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *J Appl Microbiol.* 108: 703–711.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer plus.* 2: 587–600.
- Shashkov AS, Kosmachevskaya LN, Streshinskaya GM, Evtushenko LI, Bueva OV, Denisenko VA, Naumova IB, *et al.* 2002. A polymer with a backbone of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a  $\beta$ -glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124. *Eur J Biochem.* 269: 6020–6025.
- Shastry RP, Rai VR. 2017. Quorum-quenching endophytes: A novel approach for sustainable development of agroecosystem. In: Maheshwari D (Eds). *Endophytes: Biology and biotechnology. Sustainable development and biodiversity.* Cham. Springer. pp. 41–57.
- Shekhar N, Bhattacharya D, Kumar D, Gupta RK. 2006. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can J Microbiol.* 52: 805–808.
- Shenker M, Oliver I, Helmann M, Hadar Y, Chen Y. 1992. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *J Plant Nutr.* 15(10): 2173–2182.
- Sheoran N, Nadakkakath AV, Munjal V, Kundu A, Subaharan K, Venugopal V, Rajamma S, *et al.* 2015. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemoprofiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiol Res.* 173: 66–78.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Sys Bacteriol.* 16(3): 313–40.

- Shivlata L, Satyanarayana T. 2015. Thermophilic and alkaliphilic actinobacteria: biology and potential applications. *Front Microbiol.* 6: 1014.
- Silva HSA, de Silva RR, Macagnan D, de Almeda Halfeld-Viera B, Pereira MCB, Munteer A. 2004. Rhizobacterial Induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase in enzyme activities. *Biol Control.* 29: 288–295.
- Singh AK, Chhatpar HS. 2011. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *J Basic Microbiol.* 51: 424–432.
- Smith J, Doran JW. 1996. Measurement and Use of pH and Electrical Conductivity for Soil Quality Analysis. In: Doran JW, Jones AJ (Eds). *Methods for Assessing Soil Quality*. Madison. Soil Science Society of America. pp. 169–185.
- Smith MJ, Shoolery JN, Schwyn B, Holden I, Neilands JB. 1985. Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J Am Chem Soc.* 107: 1739–1743.
- Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K. 2000. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis.* 84: 334–340.
- Song S, Jia Z, Xu J, Zhang Z, Bian Z. 2011. N-butyryl-homoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signaling molecule, induces intracellular calcium elevation in *Arabidopsis* root cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 414: 355–360.
- Song Z, Zhang C, Liu G, Qu D, Xue S. 2015. Fractal Feature of Particle-Size Distribution in the Rhizospheres and Bulk Soils during Natural Recovery on the Loess Plateau, China. *PLoS One.* 10: e0138057.
- Sørensen D, Nielsen TH, Christophersen C, Sørensen J, Gajhede M. 2001. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta Crystallogr C.* 57: 1123–1124.
- Souza Rd, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Gen Mol Biol.* 38: 401–419.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2015. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis. In: de Bruijn FJ (Eds). *Biological nitrogen fixation*. Hoboken. Wiley. pp. 937–940.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. In: Uden F (Eds). *FEMS microbiol rev.* New York. Blackwell Publishing Ltd. pp. 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(4): a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.
- Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Kudapa H, Varshney RK. 2016. Exploring PGP actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Braz J Microbiol.* 47: 85–95.
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, et al. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One.* 10: e0117617.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 487–506.
- Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N. 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol.* 6: 7387–7396.
- Storey EP, Boghozian R, Little JL, Lowman DW, Chakraborty R. 2006. Characterization of ‘Schizokinen’, a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *BioMetals.* 19(6): 637–649.
- Su L, Shen Z, Ruan Y, Tao C, Chao Y, Li R, Shen Q. 2017. Isolation of antagonistic endophytes from Banana roots against *Meloidogyne javanica* and their effects on soil nematode community. *Front Microbiol.* 8: 2070.

- Suárez-Moreno ZR, Devescovi G, Myers M, Hallack L, Mendonça-Previato L, Caballero-Mellado J, *et al.* 2010. Commonalities and differences in regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Appl Environ Microbiol.* 76: 4302–4317.
- Subramanian J, Satyan K. 2014. Isolation and selection of fluorescent pseudomonads based on multiple plant growth promotion traits and siderotyping. *Chil J Agric Res.* 74: 319–325.
- Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar SA, Parameshwar AB, Reddy KM, Dayanand A. 2014. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Appl Biochem Biotechnol.* 174: 297–308.
- Szoboszlay M, Lambers J, Chappell J, Kupper JV, Moe LA, McNear Jr DH. 2015. Comparison of root system architecture and rhizosphere microbial communities of Balsas teosinte and domesticated corn cultivars. *Soil Biol Biochem.* 80: 34–44.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, *et al.* 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol.* 75: 748–757.
- Tajini F, Trabelsi M, Drevon JJ. 2012. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi J Biol Sci.* 19: 157–163.
- Tallapragada P, Gudimi M. 2011. Phosphate solubility and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Turk J Biol.* 35: 593–600.
- Tatar D, Guven K, Sproer C, Klenk H-P, Sahin N. 2014. *Streptomyces iconiensis* sp. nov. and *Streptomyces smyrnaeus* sp. nov., two halotolerant actinomycetes isolated from a salt lake and saltern. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:3126–3133.
- Taylor KG, Konhauser KO. 2011. Iron in earth surface systems. *Elements.* 7: 83–120.
- Terra L, Dyson PJ, Hitchings MD, Thomas L, Abdelhameed A, Banat IM, Gazze SA, *et al.* 2018. A Novel Alkaliphilic Streptomyces Inhibits ESKAPE Pathogens. *Front Microbiol.* 9:2458.
- Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, Prinsen E. 2004. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol Plant-Microbe Interact.* 17: 1153–1161.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Thongsri Y, Aromdee C, Yenjai C, Kanokmedhakul S, Chaiprasert A, Hamal Prariyachatigul C. 2014. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain. *Biomed Pap.* 158: 378–383.
- Throup JP, Camara M, Briggs GS, Winson MK, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, *et al.* 1995. Characterisation of the yenI/yenR locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology.* 17(2): 345–356.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA. *et al.* 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol.* 68: 2162–2171.
- Tolba STM, Ibrahim M, Amer EAM, Ahmed DAM. 2019. First insights into salt tolerance improvement of *Stevia* by plant growth-promoting *Streptomyces* species. *Arch Microbiol.* 201(9): 1295–1306. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01696-y>.

- Torres AR, Araújo WL, Cursino L, Hungria M, Plotegher F, Mostasso FL, Azevedo JL. 2008. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. *J Microbiol.* 46: 373–379.
- Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 5: 240–245.
- Toumatia O. 2015. Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d’Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum* : taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. L’école normale supérieure de Kouba-Alger.
- Towe S, Kleineidam K, Schloter M. 2010. Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples. *J Microbiol Methods.* 82: 338–341.
- Tresner HD, Davies MC, Backus EJ. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J Bacteriol.* 81: 70–80.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.* 162: 69–76.
- Uroz S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Oger P, Dessaux Y. 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology.* 151: 3313–3322.
- Utari PD, Vogel J, Quax WJ. 2017. Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Front Microbiol.* 8: 1123.
- Valls M, Genin S, Boucher C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2: 798–807.
- Van Dam NM, Bouwmeester HJ. 2016. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci.* 21: 256–265.
- Van Der Heijden MG, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 11: 296–310.
- Van der Meij A, Willemsse J, Schneijderberg MA, Geurts R, Raaijmakers JM, van Wezel GP. 2018. Inter- and intracellular colonization of *Arabidopsis* roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. *Antonie Leeuwenhoek.* 111: 679–690.
- Vandeputte O, Oden S, Mol A, Vereecke D, Goethals K, El Jaziri M, Prinsen E. 2005. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1169–1177.
- Vargas L, de Carvalho TLG, Ferreira PCG, Baldani VLD, Baldani JI, Hemerly AS. 2012. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant Soil.* 356: 127–137.
- Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 137–144.
- Vázquez-Rivera D, González O, Guzmán-Rodríguez J, Díaz-Pérez AL, Ochoa-Zarzosa A, López-Bucio J, Meza-Carmen V, et al. 2015. Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *BioMed Res Intern.* 2015: 197608.
- Veliz-Vallejos DF, van Noorden GE, Yuan M, Mathesius U. 2014. A *Sinorhizobium meliloti*-specific N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal increases nodule numbers in *Medicago truncatula* independent of autoregulation. *Front Plant Sci.* 5: 551.

- Venturi V, Keel C. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21: 187–198.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 895–908.
- Vesuna A, Nerurkar AS. 2018. Enzymatic quorum quenching for virulence attenuation of phytopathogenic bacteria. In: Kalia V (Eds). *Biotechnological applications of quorum sensing inhibitors*. Singapore. Springer. pp. 447–473.
- Vincent JM. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. International Biological Program Handbook N°15 Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford. <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>.
- Von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, Durner J. 2008. Response of *Arabidopsis thaliana* to Nhexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta.* 229: 73–85.
- Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int J Mol Sci.* 19: 952.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44–51.
- Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, Someya N, Ikeda T. 2010. *AiiM*, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol.* 76: 2524–2530.
- Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21(1): 319–346.
- Wei HL, Zhang LQ. 2006. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Leeuwenhoek.* 89: 267–280.
- Weidenmaier C, Peschel A. 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 6(4): 276–87.
- Welbaum GE, Sturz AV, Dong Z, Nowak J. 2004. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Crit Rev Plant Sci.* 23: 175–193.
- Weller DM, Thomashao LS. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O’Gara F, Dowling DN, Boesten B (Eds). *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs*. VCH, Weinheim. pp. 1–18.
- Wells G, Palethorpe S, Pesci EC. 2017. PsrA controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the FadE homolog, PA0506. *PLoS One.* 12:e0189331.
- Wessén E, Hallin S, Philippot L. 2010. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol Biochem.* 42: 1759–1765.
- Weyens N, Boulet J, Adriaensen D, Timmermans J-P, Prinsen E, Van Oevelen S, D’Haen J, *et al.* 2012. Contrasting colonization and plant growth promoting capacity between wild type and a gfp-derivative of the endophyte *Pseudomonas putida* W619 in hybrid poplar. *Plant Soil.* 356: 217–230.
- White PR, Braun AC. 1941. Crown gall production by bacteria free tumor tissues. *Science.* 93: 239–241.
- Whiteley GM. 1989. The deformation of soil by penetrometers and root tips of *Pisum sativum*. *Plant Soil.* 117: 201–205.
- Williams P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology.* 153: 3923–3938.

- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. 1983a. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 129: 1743–1813.
- Williams ST, Goodfellow M, Wellington EM, Vickers JC, Alderson G, Sneath PHA, Sackin MJ, *et al.* 1983b. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J Gen Microbiol.* 129: 1815–1830.
- Wilson MK, Abergel RJ, Raymond KN, Arceneaux JEL, Byers RB. 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Bioph Res Co.* 348(1): 320–325.
- Winkelmann G. 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals.* 20: 379–392.
- Wolde-Meskel E, Van Heerwaarden J, Abdulkadir B, Kassa S, Aliyi I, Degefu T, Wakweya K, *et al.* 2018. Additive Int Microbiol yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to Rhizobium inoculation and phosphorus fertilizer across smallholder farms in Ethiopia. *Agric Ecosyst Environ.* 261: 144–152.
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann Bot.* 95: 707–735.
- Wright AF, Bailey JS. 2001. Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer. *Comm Soil Sci Plant Anal.* 32: 3243–3258.
- Wu Z, Lin W, Li B, Wu L, Fang C, Zhang Z. 2015. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of soil bacterial communities under different vegetation types in subtropical area. *PLoS One.* 10: e0129397.
- Xu J, Wang Y, Xie S-J, Xu J, Xiao J, Ruan J-S. 2009. *Streptomyces xiamenensis* sp. nov., isolated from a mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 472–476.
- Yang Y, Li X, Liu J, Zhou Z, Zhang T, Wang X. 2017. Bacterial diversity as affected by application of manure in red soils of subtropical China. *Biol Fertil Soils.* 53: 639–649.
- Yasmin F, Othman R, Saad MS, Sijam K. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Afr J Biotechnol.* 6: 49–52.
- Yin WF, Tung HJ, Sam CK, Koh CL, Chan KG. 2012. Quorum quenching *Bacillus sonorensis* isolated from soya sauce fermentation brine. *Sensors.* 12(4): 4065–4073.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 1613–1617.
- Yu S, Teng C, Liang J, Song T, Dong L, Bai X, Jin Y, Qu J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *J Microbiol.* 55: 877–884.
- Zachow C, Fatehi J, Cardinale M, Tilcher R, Berg G. 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS Microbiol Ecol.* 74: 124–135.
- Zachow C, Müller H, Monk J, Berg G. 2017. Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* strain L13-6-12, a biological control agent from the rhizosphere of potato. *Stand Genomic Sci.* 12: 6.
- Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact.* 25: 139–150.
- Zamoum M, Goudjal Y, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. 2015. Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara. *J Plant Dis Prot.* 122: 215–223.

- Zarei M, Aminzadeh S, Zolgharnein H, Safahieh A, Daliri M, Noghabi KA, Motallebi A. 2011. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Braz J Microbiol.* 42: 1017–1029.
- Zarkani AA, Stein E, Röhrich CR, Schikora M, Evgenieva-Hackenberg E, Degenkolb T, Vilcinskis A, *et al.* 2013. Homoserine lactones influence the reaction of plant to rhizobia. *Int J Mol Sci.* 14: 17122–17146.
- Zhai Y, Hou M, Nie S. 2018. Variance of microbial composition and structure and relation with soil properties in rhizospheric and non-rhizospheric soil of a flooded paddy. *Paddy Water Environ.* 16: 163–172.
- Zhang D, Spadaro D, Valente S, Garibaldi A, Gullino ML. 2012. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *Int J Food Microbiol.* 153: 453–464.
- Zhang XX, Rainey PB. 2013. Exploring the sociobiology of pyoverdine producing *Pseudomonas*. *Evolution.* 67: 3161–3174.
- Zhao Q, Zhang C, Jia Z, Huang Y, Li H, Song S. 2015. Involvement of calmodulin in regulation of primary root elongation by N-3-oxo-hexanoyl homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 5: 807.
- Zhao Q, Li M, Jia Z, Liu F, Ma H, Huang Y, Song S. 2016. AtMYB44 positively regulates the enhanced elongation of primary roots induced by N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact.* 29: 774–785.
- Zhu F, Qu L, Hong X, Sun X. 2011. Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011: 615032.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng ZY, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2198–2208.
- Zuniga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA, González B. 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol Plant Microbe Interact.* 26: 546–553.



**Annexe 1 : Composition des milieux de cultures utilisés**

Milieu <i>Olsen</i>		Milieu <i>ISP2 + CaCO<sub>3</sub> (YMEA)</i>	
Sodium caséine	2 g	Extrait de levure	4 g
L-asparagine	0,1 g	Extrait de malt	10 g
Sodium propionate	4 g	Glucose	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	CaCO <sub>3</sub>	1 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g	Agar	20 g
Agar	10 g	Eau distillée	1000 ml
Eau distillée	1000 ml	pH = 7,3	
pH=7,2			

Milieu <i>ISP2</i>		Milieu <i>Sierra</i>	
Extrait de levure	4 g	Tryptone	3 g
Extrait de malt	10 g	Extrait de levure	5 g
Glucose	4 g	Glucose	5 g
Agar	20 g	Tween	1 %
Eau distillée	1000 ml	CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
PH = 7,3		Agar	20 g
		Eau distillée	1000 ml
		pH = 7	

Milieu <i>Mueller-Hinton</i>		Milieu <i>ISP9</i>	
Extrait de viande	2 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,38 g
Amidon	1,5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,65 g
Agar	10 g	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	1 g
Eau distillée	1000 ml	Solution d'oligoéléments*	1 ml
PH=7,4		Agar	15 g
		Eau distillée	1000 ml
		PH=7,4	

Milieu <i>CMC (Carboxy méthyl Cellulose)</i>		Milieu <i>LB</i>	
Extrait de levure	0,2 g	Tryptone	10 g
Glycérol	2 ml	Extrait de levure	5 g
CMC	10 g	Sodium chlorure	5 g
Agar	20 g	Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml	Eau distillée	1000 ml
pH : 7,3		pH : 7,5	

Milieu PDA ( <i>Potato-Dextrose-Agar</i> )		Milieu SCA ( <i>Starch casein Agar</i> )	
Glucose	20 g	Amidon	10 g
Pomme de terre	200 g	KNO <sub>3</sub>	2 g
Agar	15 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Eau distillée	1000 ml	NaCl	2 g
PH=6,5		Caséine	0,3 g
		MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,05 g
		CaCO <sub>3</sub>	0,02 g
		FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,01 g
		Agar	20 g
		Eau distillée	1000 ml
		pH =7,5	

Milieu B de King		Milieu Pikovskaya	
peptone B	20 g	Glucose	10 g
glycérol	10 g	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	1,5 g	NaCl	0,2 g
Agar	12 g	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée	1000 ml	KCl	0,2 g
pH : 7,2		Extrait de levure	0,5 g
		MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,002 g
		FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,002 g
		Agar	15 g
		pH : 7,0	

Milieu Czapek modifié		Milieu fer/Chrome azurol S	
sucrose	30 g	Chrome azurol S	60,5 mg
NaNO <sub>3</sub>	3 g	(CAS)	
KCl	0,5 g	hexadecyltrimetyl	72,9 mg
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,5 g	ammonium bromide	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	(HDTMA)	
Agar	15 g	Piperazine-1,4-bis(2-	30,24 g
Eau distillée	1000 ml	ethanesulfonic acid)	
pH : 7,3		(PIPES)	
		1 mM FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	10 ml
		dans 10 mM HCl	
		Agarose	9 g
		Eau distillée	1000 ml
		pH : 7,2	

milieu <i>TSB</i>		Milieu <i>FMM</i>	
Tryptone	15 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
Peptone papainique de soja	5 g	Asparagine	5 g
Chlorure de sodium	5 g	Glucose	5 g
Agar	15 g	MgSO <sub>4</sub>	40 mg
Eau distillée	1000 ml	MnSO <sub>4</sub>	100 mg
pH : 7,3		ZnSO <sub>4</sub>	500 µg
		Eau distillée	1000 ml
		pH : 7,2	

Milieu succinate		Milieu <i>YM</i>	
Sodium succinate	10 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg
NaCl	5,8 g	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	200 mg
KCl	3,7 g	NaCl	100 mg
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,15 g	Extrait de levure	400 mg
Tris-HCl	12,1 g	Mannitol	10 g
MgCl <sub>2</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g	pH : 7	
NH <sub>4</sub> Cl,	1,1 g		
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,142 g		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,272 g		
Eau distillée	1000 ml		
pH : 7,3			

Bouillon <i>ISP</i> <sub>2</sub>		Milieu minimum <i>M</i> <sub>63</sub>	
Extrait de levure	4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g
Extrait de malt	10 g	KOH	4,2 g
Glucose	4 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
Eau distillée	1000 ml	FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1,08 mg
PH = 7,3		Thiamine	1 mg
		MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	246 mg
		Glucose	4 g
		pH : 7	

**Annexe 2 : Composition des solutions**

Réactif de Salkowsky		Solution d'oligo-éléments*	
0,5 M FeCl <sub>3</sub>	2 ml	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,11g
acide perchlorique à 35%	98 ml	MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0,79g
		ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,15g
		CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,64g
		Eau distillée	100ml

Solution Hoagland		Solution des micronutriments**	
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O (2 mol/L)	2 ml	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	578 mg
KNO <sub>3</sub> (2 mol/L)	3 ml	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	125 mg
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol/L)	1 ml	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	845 mg
MgSO <sub>4</sub> (1 mol/L)	2 ml	KCl	3728 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 mol/L)	0,5 ml	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4H <sub>2</sub> O	88 mg
Fe EDTA (25 g/L)	1 ml	Eau distillée	1000 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (25mM)	1 ml		
Solution des micronutriments**	1 ml		
Eau distillée	1000 ml		

Solution iodine	
KI	2 g
I <sub>2</sub>	1 g
Eau distillée	300 ml

**Annexe 3 : paramètres des courbes étalons utilisées pour la détection des composés indoliques par GC-MS**

Analyte	Temps de rétention (min)	Equation de Régression	intervalle (µg/ml)	r <sup>2</sup>	LD	LQ
IAA	22,80	y= (-0,0971)x + 5,348	0 - 5	0,9989	0,06	0,14
ILA	26,20	y= (-0,3865)x + 5,013	0 - 15	0,9966	0,24	0,64
TOL	21,70	y= (-0,1028)x + 4,011	0 - 5	0,9978	0,08	0,20

(IAA): indole-3-acetic acid; (ILA): indole-3-lactic acid; (TOL): indole-3-ethanol; (LD): limite de détection (µg/ml); (LQ): limite de quantification en (ng/ml).

## Annexe 4 : Test de khi-carré

### *Production des auxines*

<b>Tableau croisé production des auxines * nature du sol (géotype Biskra)</b>					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
auxines	N1	Effectif	55	50	105
		Effectif théorique	63,1	41,9	105
	N2	Effectif	39	12	51
		Effectif théorique	30,7	20,3	51
	N3	Effectif	10	7	17
		Effectif théorique	10,2	6,8	17
Total		Effectif	104	69	173
		Effectif théorique	104	69	173

<b>Tests du Khi-deux (géotype Biskra)</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	8,321a	2	,016
Rapport de vraisemblance	8,691	2	,013
Association linéaire par linéaire	3,352	1	,067
Nombre d'observations valides	173		
<b>Mesures symétriques</b>			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,219	,016
	V de Cramer	,219	,016
Nombre d'observations valides		173	

<b>Tableau croisé production des auxines * nature du sol (géotype Karam)</b>					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
auxines	N1	Effectif	54	57	111
		Effectif théorique	61,2	49,8	111
	N2	Effectif	37	5	42
		Effectif théorique	23,1	18,9	42
	N3	Effectif	6	17	23
		Effectif théorique	12,7	10,3	23
Total		Effectif	97	79	176
		Effectif théorique	97	79	176

<b>Tests du Khi-deux (géotype Karam)</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	28,177a	2	,000
Rapport de vraisemblance	31,282	2	,000
Association linéaire par linéaire	,011	1	,916
Nombre d'observations valides	176		
<b>Mesures symétriques</b>			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,400	,000
	V de Cramer	,400	,000
Nombre d'observations valides		176	

<b>Tableau croisé production des auxines * nature du sol (géotype Al-Fares)</b>					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
auxines	N1	Effectif	50	48	98
		Effectif théorique	59	39	98
	N2	Effectif	28	9	37
		Effectif théorique	22,3	14,7	37
	N3	Effectif	22	9	31
		Effectif théorique	18,7	12,3	31
Total		Effectif	100	66	166
		Effectif théorique	100	66	166

<b>Tests du Khi-deux (géotype Al-Fares)</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	8,648a	2	,013
Rapport de vraisemblance	8,890	2	,012
Association linéaire par linéaire	6,220	1	,013
Nombre d'observations valides	166		
<b>Mesures symétriques</b>			
	Valeur	Signification approximée	
Nominal par Nominal	Phi	,228	,013
	V de Cramer	,228	,013
Nombre d'observations valides	166		

### *Production des sidérophores*

<b>Tableau croisé production des Sidérophores * nature du sol (géotype Biskra)</b>					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Sidérophores	N1	Effectif	70	46	116
		Effectif théorique	69,7	46,3	116
	N2	Effectif	5	5	10
		Effectif théorique	6,0	4,0	10
	N3	Effectif	29	18	47
		Effectif théorique	28,3	18,7	47
Total		Effectif	104	69	173
		Effectif théorique	104	69	173

<b>Tests du Khi-deux (géotype Biskra)</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	,479a	2	,787
Rapport de vraisemblance	,470	2	,791
Association linéaire par linéaire	,007	1	,933
Nombre d'observations valides	173		
<b>Mesures symétriques</b>			
	Valeur	Signification approximée	
Nominal par Nominal	Phi	,053	,787
	V de Cramer	,053	,787
Nombre d'observations valides	173		

<b>Tableau croisé production des Sidérophores * nature du sol (géotype Karam)</b>					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Sidérophores	N1	Effectif	57	53	110
		Effectif théorique	60,6	49,4	110,0
	N2	Effectif	5	3	8
		Effectif théorique	4,4	3,6	8,0
	N3	Effectif	35	23	58
		Effectif théorique	32,0	26,0	58,0
Total		Effectif	97	79	176
		Effectif théorique	97	79	176

<b>Tests du Khi-deux (géotype Karam)</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,301a	2	,522
Rapport de vraisemblance	1,307	2	,520
Association linéaire par linéaire	1,168	1	,280
Nombre d'observations valides	176		
<b>Mesures symétriques</b>			
	Valeur	Signification approximée	
Nominal par Nominal	Phi	,086	,522
	V de Cramer	,086	,522
Nombre d'observations valides	176		

Tableau croisé production des Sidérophores * nature du sol (géotype Al-Fares)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Sidérophores	N1	Effectif	81	43	124
		Effectif théorique	74,7	49,3	124
	N2	Effectif	4	4	8
		Effectif théorique	4,8	3,2	8
	N3	Effectif	15	19	34
		Effectif théorique	20,5	13,5	34
Total		Effectif	100	66	166
		Effectif théorique	100	66	166

Tests du Khi-deux (géotype Al-Fares)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	5,377a	2	,068
Rapport de vraisemblance	5,293	2	,071
Association linéaire par linéaire	5,276	1	,022
Nombre d'observations valides	166		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,180	,068
	V de Cramer	,180	,068
Nombre d'observations valides		166	

### Solubilisation de phosphate

Tableau croisé Solubilisation de phosphate * nature du sol (géotype Biskra)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Solubilisation de phosphate	N1	Effectif	87	54	141
		Effectif théorique	84,8	56,2	141
	N2	Effectif	17	15	32
		Effectif théorique	19,2	12,8	32
Total		Effectif	104	69	173
		Effectif théorique	104	69	173

Tests du Khi-deux (géotype Biskra)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	,800a	1	,371
Rapport de vraisemblance	,791	1	,374
Association linéaire par linéaire	,796	1	,372
Nombre d'observations valides	173		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,068	,371
	V de Cramer	,068	,371
Nombre d'observations valides		173	

Tableau croisé Solubilisation de phosphate * nature du sol (géotype Karam)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Solubilisation de phosphate	N1	Effectif	79	59	138
		Effectif théorique	76,1	61,9	138,0
	N2	Effectif	18	20	38
		Effectif théorique	20,9	17,1	38,0
Total		Effectif	97	79	176
		Effectif théorique	97	79	176

Tests du Khi-deux (géotype Karam)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,175a	1	,278
Rapport de vraisemblance	1,170	1	,279
Association linéaire par linéaire	1,169	1	,280
Nombre d'observations valides	176		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,082	,278
	V de Cramer	,082	,278
Nombre d'observations valides		176	

Tableau croisé Solubilisation de phosphate * nature du sol (géotype Al-Fares)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Solubilisation de phosphate	N1	Effectif	79	49	128
		Effectif théorique	77,1	50,9	128
	N2	Effectif	21	17	38
		Effectif théorique	22,9	15,1	38
Total		Effectif	100	66	166
		Effectif théorique	100	66	166

Tests du Khi-deux (géotype Al-Fares)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	,510a	1	,475
Rapport de vraisemblance	,506	1	,477
Association linéaire par linéaire	,507	1	,477
Nombre d'observations valides	166		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,055	,475
	V de Cramer	,055	,475
Nombre d'observations valides		166	

### Inhibition de *F. oxysporum*

Tableau croisé Inhibition * nature du sol (géotype Biskra)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Inhibition	N1	Effectif	51	35	86
		Effectif théorique	51,7	34,3	86
	N2	Effectif	32	29	61
		Effectif théorique	36,7	24,3	61
	N3	Effectif	21	5	26
		Effectif théorique	15,6	10,4	26
Total		Effectif	104	69	173
		Effectif théorique	104	69	173

Tests du Khi-deux (géotype Biskra)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	6,141a	2	,046
Rapport de vraisemblance	6,599	2	,037
Association linéaire par linéaire	1,675	1	,196
Nombre d'observations valides	173		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,188	,046
	V de Cramer	,188	,046
Nombre d'observations valides		173	

Tableau croisé Inhibition * nature du sol (géotype Karam)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Inhibition	N1	Effectif	54	47	101
		Effectif théorique	55,7	45,3	101,0
	N2	Effectif	35	22	57
		Effectif théorique	31,4	25,6	57,0
	N3	Effectif	8	10	18
		Effectif théorique	9,9	8,1	18,0
Total		Effectif	97	79	176
		Effectif théorique	97	79	176

Tests du Khi-deux (géotype Karam)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,851a	2	,396
Rapport de vraisemblance	1,855	2	,395
Association linéaire par linéaire	,003	1	,954
Nombre d'observations valides	176		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,103	,396
	V de Cramer	,103	,396
Nombre d'observations valides		176	

Tableau croisé Inhibition * nature du sol (géotype Al-Fares)					
			nature du sol		Total
			(R)	(NR)	
Inhibition	N1	Effectif	59	42	101
		Effectif théorique	60,8	40,2	101
	N2	Effectif	31	15	46
		Effectif théorique	27,7	18,3	46
	N3	Effectif	10	9	19
		Effectif théorique	14,4	7,6	19
Total		Effectif	100	66	166
		Effectif théorique	100	66	166

Tests du Khi-deux (géotype Al-Fares)			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,582a	2	,453
Rapport de vraisemblance	1,598	2	,450
Association linéaire par linéaire	,008	1	,928
Nombre d'observations valides	166		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,098	,453
	V de Cramer	,098	,453
Nombre d'observations valides		166	

### Les interactions

Tableau croisé production des auxines * production des siderophores						
			production des siderophores			Total
			N1	N2	N3	
production des auxines	N1	Effectif	219	16	79	314
		Effectif théorique	213,4	15,9	84,7	314
	N2	Effectif	86	7	37	130
		Effectif théorique	88,3	6,6	35,1	130
	N3	Effectif	45	3	23	71
		Effectif théorique	48,3	3,6	19,2	71
Total		Effectif	350	26	139	515
		Effectif théorique	350,0	26,0	139,0	515

Tests du Khi-deux			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,817a	4	,769
Rapport de vraisemblance	1,787	4	,775
Association linéaire par linéaire	1,606	1	,205
Nombre d'observations valides	515		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,059	,769
	V de Cramer	,042	,769
Nombre d'observations valides		515	

Tableau croisé production des siderophores * inhibition						
		inhibition			Total	
		N1	N2	N3		
production des siderophores	N1	Effectif	198	113	39	350
		Effectif théorique	195,7	111,5	42,8	350
	N2	Effectif	17	9	0	26
		Effectif théorique	14,5	8,3	3,2	26
	N3	Effectif	73	42	24	139
		Effectif théorique	77,7	44,3	17,0	139
Total	Effectif	288	164	63	515	
	Effectif théorique	288,0	164,0	63,0	515	

Tests du Khi-deux			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	7,330a	4	,119
Rapport de vraisemblance	10,176	4	,038
Association linéaire par linéaire	1,604	1	,205
Nombre d'observations valides	515		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,119	,119
	V de Cramer	,084	,119
Nombre d'observations valides		515	

Tableau croisé production des auxines * inhibition						
		Inhibition			Total	
		N1	N2	N3		
production des auxines	N1	Effectif	181	98	35	314
		Effectif théorique	175,6	100	38,4	314
	N2	Effectif	69	45	16	130
		Effectif théorique	72,7	41,4	15,9	130
	N3	Effectif	38	21	12	71
		Effectif théorique	39,7	22,6	8,7	71
Total	Effectif	288	164	63	515	
	Effectif théorique	288	164	63	515	

Tests du Khi-deux			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	2,464a	4	,651
Rapport de vraisemblance	2,335	4	,674
Association linéaire par linéaire	1,440	1	,230
Nombre d'observations valides	515		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,069	,651
	V de Cramer	,049	,651
Nombre d'observations valides		515	

Tableau croisé production des siderophores * solubilisation de phosphate					
		solubilisation de phosphate		Total	
		N1	N2		
production des siderophores	N1	Effectif	293	57	350
		Effectif théorique	276,6	73,4	350
	N2	Effectif	17	9	26
		Effectif théorique	20,5	5,5	26
	N3	Effectif	97	42	139
		Effectif théorique	109,9	29,1	139
Total	Effectif	407	108	515	
	Effectif théorique	407	108	515	

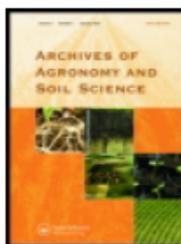
Tests du Khi-deux			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	14,725a	2	,001
Rapport de vraisemblance	14,046	2	,001
Association linéaire par linéaire	12,798	1	,000
Nombre d'observations valides	515		
Mesures symétriques			
		Valeur	Signification approximée
Nominal par Nominal	Phi	,169	,001
	V de Cramer	,169	,001
Nombre d'observations valides		515	

<b>Tableau croisé production des auxines * solubilisation de phosphate</b>					
			solubilisation de phosphate		Total
			N1	N2	
production des auxines	N1	Effectif	270	44	314
		Effectif théorique	248,2	65,8	314
	N2	Effectif	98	32	130
		Effectif théorique	102,7	27,3	130
	N3	Effectif	39	32	71
		Effectif théorique	56,1	14,9	71,0
Total	Effectif	407	108	515	
	Effectif théorique	407	108	515	

<b>Tests du Khi-deux</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	35,096a	2	,000
Rapport de vraisemblance	31,682	2	,000
Association linéaire par linéaire	33,811	1	,000
Nombre d'observations valides	515		
<b>Mesures symétriques</b>			
	Valeur	Signification approximée	
Nominal par Nominal	Phi	,261	,000
	V de Cramer	,261	,000
Nombre d'observations valides		515	

<b>Tableau croisé solubilisation de phosphate * inhibition</b>						
			inhibition			Total
			N1	N2	N3	
solubilisation de phosphate	N1	Effectif	229	132	46	407
		Effectif théorique	227,6	129,6	49,8	407
	N2	Effectif	59	32	17	108
		Effectif théorique	60,4	34,4	13,2	108
Total	Effectif	288	164	63	515	
	Effectif théorique	288	164	63,0	515	

<b>Tests du Khi-deux</b>			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	1,626a	2	,444
Rapport de vraisemblance	1,546	2	,462
Association linéaire par linéaire	,641	1	,424
Nombre d'observations valides	515		
<b>Mesures symétriques</b>			
	Valeur	Signification approximée	
Nominal par Nominal	Phi	,056	,444
	V de Cramer	,056	,444
Nombre d'observations valides		515	



## Effect of *Capsicum annuum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions

Karima Khenaka, Loredana Canfora, Anna Benedetti, Nassima Leulmi & Abderrahmane Boulahrouf

To cite this article: Karima Khenaka, Loredana Canfora, Anna Benedetti, Nassima Leulmi & Abderrahmane Boulahrouf (2019): Effect of *Capsicum annuum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions, Archives of Agronomy and Soil Science, DOI: [10.1080/03650340.2019.1566711](https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1566711)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1566711>



Accepted author version posted online: 07 Jan 2019.  
Published online: 24 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 19



View Crossmark data [↗](#)



## Effect of *Capsicum annuum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions

Karima Khenaka <sup>a,b</sup>, Loredana Canfora<sup>c</sup>, Anna Benedetti<sup>c</sup>, Nassima Leulmi<sup>a</sup> and Abderrahmane Boulahrouf<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Génie microbiologique et applications, FSNV, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria; <sup>b</sup>Département des SNV, Université 8 mai 1945, Guelma, Algeria; <sup>c</sup>Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Agriculture and Environment, Rome, Italy

### ABSTRACT

In literature, it remains little explored the soil–plant relationships within *Capsicum* agroecosystem. We studied how chili peppers plants contribute to influence microbial diversity. Across the bulk and rhizosphere soils of three genotypes of *Capsicum annuum*, the structure, the diversity and the abundance of bacteria was evaluated by means of DNA-based culture-independent approach. Furthermore, 515 bacterial strains isolated from the bulk and rhizosphere soil, were used to investigate the effect of *C. annuum* on four plant growth promoting bacteria (PGPB) abilities. Our results indicated that the three genotypes influence differently the physical-chemical and microbial properties of soil around the roots. Bacterial abundance resulted in increasing with different trend rhizospheres to bulk soil ratio; however, bacterial diversity was significantly higher only in the rhizosphere of one genotype. Only the indolic compounds production was stimulated in the rhizosphere of the three cultivars. Inhibition of *Fusarium oxysporum* was stimulated just with one genotype, where 53 of rhizosphere isolates showed more than 10% of inhibition. 165 of isolates produced siderophores and the major part belonged to the high production level. Interactions between PGPB features revealed that anti-phytopathogenic activity was not associated with the others characteristics; however, phosphate solubilization was associated with both siderophores and indolic compounds productions.

### ARTICLE HISTORY

Received 5 May 2018  
Accepted 11 December 2018

### KEYWORDS

Chili pepper; rhizobacteria; indolic compounds; siderophores; anti-phytopathogenic activity

### Introduction

Soil microbes perform important processes, including improvement in soil structure and nutrient availability, as well as sustaining plant growth (Jansson and Hofmockel 2018). The rhizosphere is the soil surrounding plant roots colonized by a subset of the bulk soil community called rhizobiome (Sasse et al. 2018), where roots exudates were proposed as the major mechanism allowing plants to sustain their microbiota (van Dam and Bouwmeester 2016). Using the plant model *Arabidopsis thaliana*, Micallef et al. (2009) reported a correlation between rhizobiome variation and root exudates of eight accessions. Recently, Mönchgesang et al. (2016) observed distinct exudation patterns of 19 accessions. Thus, enhancing knowledge on plant-microbe associations in the rhizosphere will be a crucial step towards the rational management of soil biodiversity and

**CONTACT** Karima Khenaka  khenaka.karima@univ-guelma.dz  Laboratoire de Génie microbiologique et applications, FSNV, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

a sustainable progress in plant production and yield (Rillig et al. 2018). Molecular fingerprinting techniques have become popular to characterize the diversity, structure, and dynamics of soil microbial communities (Wu et al. 2015). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) becomes one of the most useful culture-independent approaches in microbial ecology for rapidly comparing and profiling the diversity of microbial population in the rhizosphere (Szoboszlay et al. 2015; Zhai et al. 2018). Its enables structure analyses of a wide array of microbes with high reproducibility, moreover, it is a convenient way to store data and compare between different samples (Rincon-Florez et al. 2013).

Through chemical communication, plant roots stimulate beneficial microbes in the rhizosphere (Mhlongo et al. 2018). The role of PGPB (Plant growth promoting bacteria), in contributing to the nutrition and protection of plants through the various processes, such as production and secretion of various regulatory chemicals in the vicinity of the rhizosphere, has been well-investigated (Ahemad and Mulugeta 2014). Studies have pointed out the PGPB-mediated and promoted plant growth by facilitating nutrient uptake like nitrogen (Gaby and Buckley 2011), phosphorus (Sharma et al. 2013) and iron through the siderophores production (Ahmed and Holmström 2014) and modulation of plant hormone levels mainly indole-3-acetic acid (IAA) (Glick 2012). Indirect mechanisms refer to bacterial traits that inhibit the functioning of one or more phytopathogenic organisms which protected crops (Olanrewaju et al. 2017). Despite all works conducted on the soil microflora, there are still limitations to their management and exploration (Shameer and Prasad 2018). As mentioned by Jansson and Hofmockel (2018), the majority of soil microbes have not yet been isolated, another limitation of PGPB application lies in the specificity of microflora stimulated by each plant and the joining of their effect to soil type (Shameer and Prasad 2018). Furthermore, just a few works have reported the interactions between PGPB features (Da Costa et al. 2014; Moreira et al. 2016). Olanrewaju et al. (2017) have suggested that additional fundamental works are needed to better understand PGPB and their biochemistry. Studies at field scale seem to be essential and could be useful for identifying of novel beneficial microorganisms, moving toward a deeper understanding of their interactions with the plant.

In this paper, we have focused our attention on the rhizosphere soil of *Capsicum annum*, one of the three most important Solanaceous vegetable crops in the world (Navarro et al. 2006). Chili pepper is widely used as a flavoring agent, colorant and for providing tang and taste to otherwise insipid foods (Pugliese et al. 2013). Furthermore, these fruits are good sources of phytochemicals such as phenols, flavonoids, and capsaicinoids (Materska and Perucka 2005; Krzyzanowska et al. 2010). Chili pepper is one of the industrial crops throughout the world encompassing a worldwide production of 30 million t and acreage of 4 million ha (Marzur et al. 2014), making important to understand the relationship between plant roots, soil, and microflora specific to this plant. Several studies have already shown the ability of PGPB to improve the growth and protection of *C. annum*, however, to the best of our knowledge this is the first report on the effect of chili pepper on microbial diversity and PGPB abilities in the rhizosphere in comparison to the bulk soil.

The study was carried out in an agricultural land located in the north-eastern Algeria, where the soil of the three most cultivated genotypes were collected, targeting the following specific objectives: (i) investigate how *C. annum* plants diversity influence physical-chemical properties of the surrounding root soil compared to bulk soil; (ii) evaluate differences in microbial abundance and diversity by means of quantitative polymerase-chain-reaction (qPCR) and (T-RFLP) approach (iii) evaluate the competence of plant to stimulate four specific characteristics of PGPB, namely phosphate solubilization, phytopathogen inhibition, indolic compounds and siderophores production, addressing also such issue as the association between PGPB abilities. To these aims, the study was performed under a farming system carried out in Mediterranean condition (Algeria) on three different genotypes of *C. annum*.

## Materials and methods

### Study site

Sampling was done from the locality of Guelma (36° 29'N, 07° 30'E) in Northeastern Algeria. The area is characterized by a warm Mediterranean climate with an average annual rainfall of 600 mm, average air temperature of 10.6 °C in January and 26.7 °C in August. The city of Guelma is one of the largest agricultural sites in Algeria with a total area of 368,684 ha, of which 50% are currently used in agriculture, principally for industrial crops. Hot pepper culture increases every year in this region, where its production was exceeded 180,000 q in 2016. The three most cultivated genotypes of *C. annuum* was: Karam (plant height 1 m, green fruit with 25 cm length at the beginning of the harvest and red with 20 cm length at the end), Al-fares (plant height 1m, green fruit with 25–30 cm length at the beginning of the harvest and red with 20–25 cm length at the end) and Biskra (plant height 80 cm, green fruit with 25 cm length at the beginning of the harvest and red dwarf at the end).

### Soil sampling

Soil samples were collected after five months of growth. Each genotype was grown over an area of 2 ha. For each variety, three independent samples were made through pooling five subsamples. The loose soil attached to the roots was removed by gentle shaking, the soil attached to the roots located 5 mm below the surface was used as the rhizosphere soil sample. Bulk soil was taken in the same depth with the rhizosphere soil. Soil samples were put into sterile polyethylene bags, stored at 4 °C until analysis.

### Physical-chemical soil analysis

Soil texture was determined by Robinson's pipette method after organic matter removal (Pansu and Gautheyrou 2006). pH was measured on 1:2.5 (w/v) soil to water mixtures. EC1:5 was measured on 1:5 (w/v) soil to water mixtures at 25 °C. Total phosphorus was determined according to the protocol of Dabin (1967). Calcium carbonate was determined with calcimeter Bernard methods (Mathieu and Pieltain 2003). Total organic carbon and total nitrogen were analyzed by dry combustion using LECO analyzer (RC-612) and LECO analyzer (FP-528) respectively.

### Soil DNA extraction

The extraction was done from 0.35 g of soil using the PowerSoil DNA Isolation Kit according to the manufacturer's protocol. By each soil sample, DNA was extracted in duplicate, pooled and eluted in 100 µL of elution buffer. The DNA concentration was verified by Qubit® 2.0 Fluorometer following manufacturer's instructions kit. Samples were stored at –20 °C until use.

### q-PCR

Bacterial DNA was quantified using the quantitative polymerase chain reaction method. Bacterial DNA was amplified using the primers that amplify a fragment of 193 bp, as referred by Muyzer primer pairs (Nadkarni et al. 2002). The amplification was carried out in 25 µL reactions containing 10 µL of template DNA (2 ng µL<sup>-1</sup>), 12.5 µL of quantifast SYBR green PCR, 1.2 µM of primer and PCR grade water up to 25 µL. The reactions were performed in a Stratagene Mx3000P qPCR (Agilent Technologies) with a cycle of initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C annealing for 30 s, 78 °C extension for 30 s, followed by fluorescence quantification at the end of a step performed at 84 °C for 15 s. The qPCR reactions were performed in duplicate within each DNA template. The standard curve, were obtained by amplification of DNA soil samples for each genotype

(Canfora et al. 2017). After the qPCR reaction, the amplified products were purified and quantified using Qubit® 2.0 and diluted to minimize PCR bias (Towe et al. 2010). Gene copy numbers for each sample were calculated using the following formula (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>):

$$\text{Gene copy number} = (\text{ng} \times \text{number / mole}) / (\text{pb} \times \text{ng / g} \times \text{g mole of pb})$$

The standards were obtained using a 10-fold dilution series, covering six orders of magnitude from  $10^3$  to  $10^9$  gene copies per qPCR reaction during each run. Bacterial gene copy numbers were expressed as  $\text{g}^{-1}$  soil (dry weight).

### **16S rDNA T-RFLP**

16S rDNA was amplified using 63f primer labeled with VIC and 1087r primer (Liu et al. 1997). The amplification was done in volume of 50  $\mu\text{L}$  with 25 ng of template DNA and 5 U of Taq DNA polymerase (Promega) under the following conditions: 95 °C for 5 min; repeat of 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated on a 1.5% agarose and then were purified with minElute kit. PCR reactions were repeated two times on each soil sample. An aliquot of 300 ng of amplified 16S rDNA was digested with 20 U of TaqI, AluI, and HpaII (Promega) for 5 h. The digested products were analyzed by capillary electrophoresis on an ABI3500 Genetic Analyzer using LIZ600 Applied Biosystems as size standard. Fragment sizes from 55 to 600 bp were considered for profile analysis. The quality of T-RFLP data was first visually inspected in GenMapper Software v4.1 (Applied Biosystems) and then transferred to GeneMarker software (SoftGenetics).

### **Bacteria isolation from rhizosphere and bulk soils**

Ten grams of fresh rhizosphere or bulk soil samples were suspended in 90 mL sterile saline solution (0.9% NaCl) and shaken (at 100 rpm) for 1 h at room temperature. Aliquots (0.1 mL) from serially diluted samples (up to  $10^{-4}$ ) were streaked out on five different solid media, LB agar (Atlas 2004), King's B medium (Kurabachew and Wydra 2013), ISP2 (Badji et al. 2005), SCA (Jeffrey 2008) and Olsen (Atlas 2004). Pure-culture isolates were preserved in 50% glycerol and were stored at  $-20$  °C.

### **Plant growth promoting activity**

#### **Indolic compounds production**

It was done as per the protocols of Patten and Glick (1996). The bacterial strains were grown in LB broth ( $\text{g L}^{-1}$ : tryptone 10; yeast extract 5; NaCl 10 and pH 7.5) supplemented with L-tryptophan ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for four days. At the end of incubation, cultures were centrifuged at 9000 g for 15 min. Two milliliters of Salkowsky reagent (2% 0.5 M  $\text{FeCl}_3$  in 35% perchloric acid) was added to 2 mL of supernatant and incubated at  $28 \pm 2$  °C in darkness for 1 h. Indolic compounds production was quantified as IAA equivalents by measuring the absorbance in a spectrophotometer at 530 nm. A standard curve was plotted using authentic IAA.

#### **Phosphate solubilization**

Pikovskaya's agar medium as described by Pikovskaya (1948) was used to measure calcium phosphate [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] solubilizing activity. Plate assays were inoculated by pinpoint and incubated at 29 °C for 8 days. Three replicates were done for each isolate. Results were expressed by measuring the clear halo diameter.

#### **Siderophores production**

Iron-free Czapek agar medium was used to test the production of siderophores ( $\text{g L}^{-1}$ : sucrose 30;  $\text{NaNO}_3$  3; KCl 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1; agar 15 and pH 7.3). Bacterial strains were inoculated

by pinpoint and plates were incubated at 30 °C for 7 days. Subsequently, the bacterial cultures were overlaid by 15 mL of Chrome azurol S (CAS) agar (Pérez-Miranda et al. 2007). The siderophore production was determined as a color change in the overlay medium (from blue to orange) after 1 h of incubation at room temperature. Three replicates were done for each strain. Results were expressed by measuring the orange halo diameter.

#### **Anti-phytopathogenic activity**

Antagonistic activity of bacterial isolates was evaluated against *Fusarium oxysporum* obtained from National Institute of Plant Protection (Regional Plant Protection Station, El Tarf, Algeria) using the method of Ji et al. (2014). A 5 mm cylinder of soil-borne fungi culture was placed on potato dextrose agar (Atlas 2004), bacterial isolates were streaked in the other side of the Petri dish. After 7 to 14 days of incubation at 28 °C. Results were expressed as a percentage of inhibition as described by Khamna et al. (2009) using the formula  $(C - T)/C \times 100$ , where C was the mycelia development from the edge of the mycelium, perpendicularly to the bacterial line, and T was the mycelia development in control plate. The trial was done with three replicates.

#### **Microbial diversity index and statistical analysis**

The diversity of the bacterial community in soil samples was estimated from the results of T-RFLP analysis as showed by Canfora et al. (2015). OTU (operational taxonomic units) numbers were calculated counting the numbers of TRFs. Microbial diversity parameters (Shannon–Wiener index and OTU numbers) were performed using Past software available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. Soil analysis and derived T-RFLP results were compared using Tukey's HSD tests following ANOVA for significance at  $p < 0.05$ . XLStat 2014 (addinsoft, Paris) was used for the purpose.

The results of plant growth promoting activity were categorized to facilitate statistical analyses, indolic compounds production was classified as level 1 (0–15), level 2 (15–50) and level 3 (more than 50)  $\mu\text{g}$  of IAA  $\text{mL}^{-1}$ . Siderophores production and phosphate solubilization were categorized as level 1 (no-halo), level 2 (0.1–10) and level 3 (more than 10) mm of halo diameter. Anti-phytopathogenic activity was classified as level 1 (0–10), level 2 (10–35) and level 3 (more than 35) % of inhibition.

Association between categorical data of the four PGPB features was analyzed using the chi-square test. Categorical Principal Component Analysis (CatPCA) and principal component analysis (PCA) were performed by IBM SPSS statistics 21.

## **Results**

### **Physical and chemical properties of rhizosphere and bulk soils**

Bulk soils pH ranged from 8 to 8.2 (subalkaline soil) as showed in Table 1 where it was reported a significant pH decreasing in the rhizosphere of Biskra and Al-fares genotypes. Calcium carbonate content was significantly decreased in the rhizosphere ( $p < 0.001$ ) of the three *C. annuum* cultivars. No significant differences were observed for electrical conductivity, total phosphorus, total nitrogen, total organic carbon and C/N ratio.

Around the root of the three genotypes, the soil texture has changed from sandy loam to sandy clay loam. Sand was clearly the dominant soil particle in both rhizosphere (55–69%) and bulk soils (65–71% of the total soil mass), and it was significantly lower in the rhizosphere of the genotype Al-fares. Clay (0.002–0.05 mm) content was significantly higher in the three rhizosphere soils than bulk soils for the three genotypes.

**Table 1.** Main physical and chemical properties of rhizosphere and bulk soils.

Genotype	Soil	pH	ECe ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	CaCO <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	TP (g kg <sup>-1</sup> )	TN (g kg <sup>-1</sup> )	TOC (g kg <sup>-1</sup> )	C/N	Clay (g kg <sup>-1</sup> )	Silt (g kg <sup>-1</sup> )	Sand (g kg <sup>-1</sup> )	Texture class
Biskra	R	7.9b	188a	46.9b	2a	1.3a	18.3a	14a	208a	121a	667a	Sandy Clay Loam
	B	8.1a	199a	73.2a	1.9a	1.3a	16.0b	12a	188b	157a	653a	Sandy Loam
Karam	R	8a	180a	60.9b	2.1a	1.3a	17.6a	14a	210a	92a	695a	Sandy Clay Loam
	B	8a	187a	74.9a	1.8a	1a	15.3b	15a	185b	124a	689a	Sandy Loam
Al-fares	R	7.8b	214a	52.1b	1.9a	1.1a	15.7a	15a	208a	238a	550b	Sandy Clay Loam
	B	8.2a	196a	79.9a	1.9a	1a	15.6a	16a	183b	100b	714a	Sandy Loam

Letters next to the means indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  using Tukey's HSD tests following ANOVA. Tukey's test was performed contrasting rhizosphere soil versus bulk soil within each genotype. Parameters include total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP). Soil samplings include (R) for rhizosphere soil and (B) for bulk soil.

### Abundance and Genetic diversity of the bacterial community of soil samples

Figure 1 shows a significant increase in bacterial abundance around the roots of two genotypes. A rhizosphere to soil ratio (R:S) was introduced to define the effect of root exudates on the surrounding soil. In general, this metric is typically computed as the parameter measured in rhizosphere soil divided by the value of the same measurement in nearby non-rhizosphere control soil (Dazzo and Ganter 2009). According to this ratio, the bacterial abundance was around seven times higher in the rhizosphere of the genotype Biskra and around two times higher in the rhizosphere of Karam genotype. OTU numbers ranged from 18 to 67 for bulk soils and from 20 to 54 for rhizosphere soils, the average amount of bacterial community was significantly ( $p < 0.005$ ) higher in the rhizosphere than in bulk soil just for Biskra genotype (Figure 1). As referred to Shannon–Wiener index ( $H'$ ), bacterial diversity was significantly higher only for Biskra genotype.

PCA performed with data from physical and chemical analysis, T-RFLP and q-PCR, provided the discrimination among soil types. The first two dimensions of PCA (F1 and F2) explained 75% of the total variation, with 40% and 35% accounting for component 1 and component 2, respectively (Figure 2). According to this analysis, just the first axis allowed a good separation between rhizosphere and bulk soils. The construction of this axis was mainly linked with bacterial abundance ( $r = 0.87$ ) and with clay content ( $r = 0.97$ ), this axis was also correlated negatively with pH ( $r = -0.80$ ) and calcium carbonate content ( $r = -0.95$ ).

### Evaluation of plant growth promotion characteristics

All bacterial isolates were evaluated for their capacity to achieve four important activities of PGPB. Only isolates with at least one character were taken into account. A total of 515 morphologically different bacterial isolates were obtained from the entire sampling sites, where 301 and 214 were isolated from rhizosphere and bulk soils, respectively (Table 2). Phosphate solubilization was the rarest ability among the isolates. According to the classification performed, all phosphate solubilizing isolates belonged to level 2 (0.1–10 mm of halo diameter) occurring in 108 out of 515 isolates. Indolic compounds production was the most abundant activity: the number of isolates belonging to the level 2 (15–50  $\mu\text{g}$  of IAA mL<sup>-1</sup>) in the rhizosphere was four times higher than that observed in bulk soils. Chi-square test proved an association between production levels of indolic compounds and soil type. One hundred and sixty-five of the bacterial isolates produced siderophores and the major part belonged to the high production level. High *F. oxysporum* inhibition ability of the bacterial isolates was associated with rhizosphere soil for just one genotype.

In order to determine the statistical correlation between the four PGPB features, a CatPCA was used. This method is very useful in microbiology, it allows a better observation of the results when

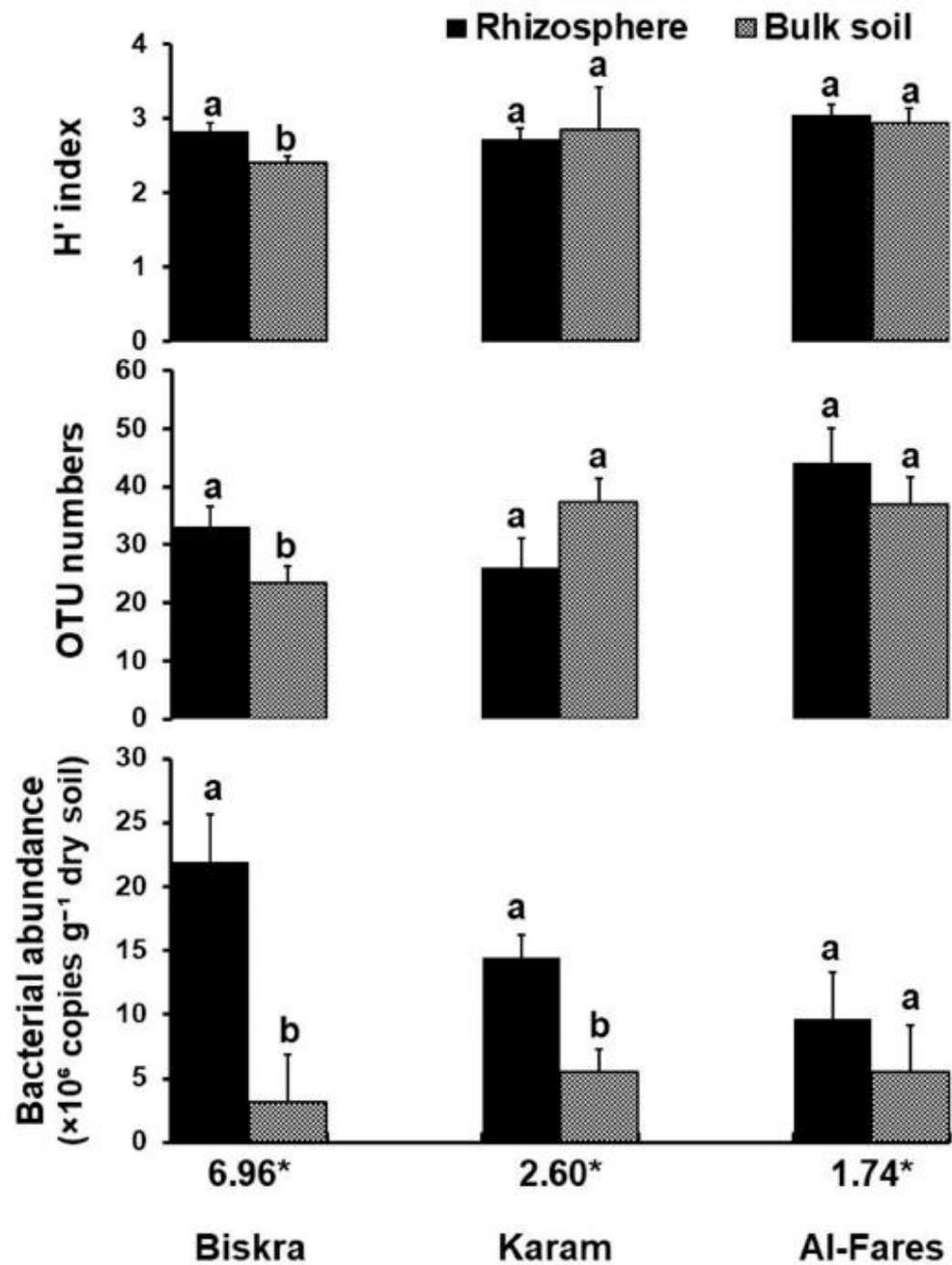


Figure 1. Quantification of bacterial genomic DNA, operational taxonomic units (OTU) and Shannon–Wiener index ( $H'$ ) of bacterial populations in the rhizosphere and bulk soils. Values are means  $\pm$  SE of the replicates. Letters next to the means indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  using Tukey's HSD tests following ANOVA. \*Values of rhizosphere to bulk soil ratio (R:S).

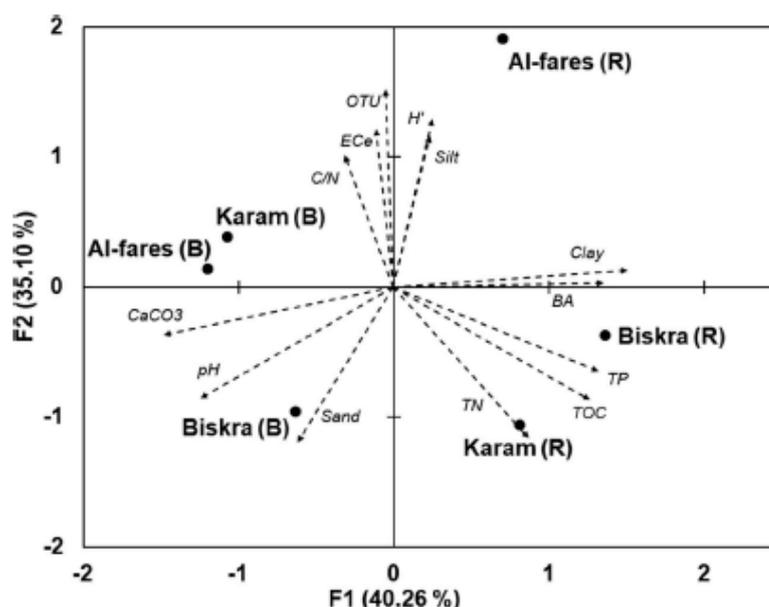


Figure 2. Principal components analysis based on bacterial abundance, T-RFLP profiles and physical-chemical analysis of rhizosphere and bulk soils.

Parameters include: total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), bacterial abundance (BA), Shannon–Wiener index ( $H'$ ), operational taxonomic units (OTU), rhizosphere soil (R), bulk soil (B)

Table 2. Association of sampling site and PGPB features.

Sampling		Indolic compounds production (a)			<i>F. oxysporum</i> inhibition (b)			Siderophores production (c)			Phosphate solubilization (c)	
		L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2
Biskra	(B)	50*	12*	7*	35*	29*	5*	46	5	18	54	15
	(R)	55*	39*	10*	51*	32*	21*	70	5	29	87	17
Karam	(B)	57*	5*	17*	47	22	10	53	3	23	59	20
	(R)	54*	37*	6*	54	35	8	57	5	35	79	18
Al-fares	(B)	48*	9*	9*	42	15	9	43	4	19	49	17
	(R)	50*	28*	22*	59	31	10	81	4	15	79	21
Total	(B)	155	26	33	124	66	24	142	12	60	162	52
	(R)	159	104	38	164	98	39	208	14	79	245	56

(a) Level of indolic compounds production [L1 (0–15), L2 (15–50) and L3 (more than 50)  $\mu\text{g}$  of IAA  $\text{mL}^{-1}$ ]. (b) Level of *F. oxysporum* inhibition [L1 (0–10), L2 (10–35) and L3 (more than 35) % of inhibition]. (c) Level of siderophores production and phosphate solubilization [L1 (no halo), L2 (0.1–10) and L3 (more than 10) mm of halo diameter]. Soil samplings include (R) for rhizosphere soil and (B) for bulk soil. \* (excessive number of isolates than expected in those conditions). \* (less number of isolates than expected in those conditions).

grouping different research questions, moreover the classification in categories reduces the complexity of the results when they are expressed with several different units. According to Figure 3, the four vectors increased towards the positive values of the first dimension (X axis), while just the *F. oxysporum* inhibition increased with the second dimension, demonstrated that the Anti-phytopathogenic activity was not associated to the others vectors. The phosphate solubilization vector plotted close for both indolic compounds and siderophores productions vectors. Different bacterial isolates were separated in two clusters, where the most loaded cluster was associated

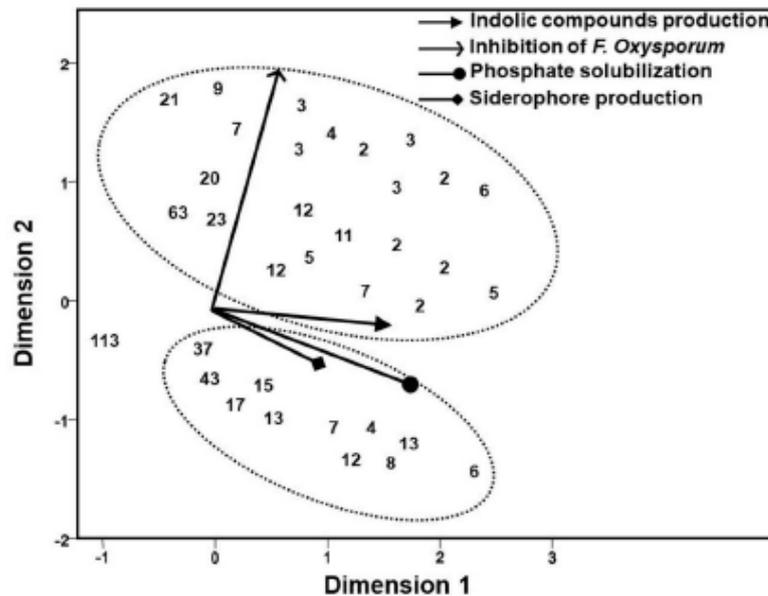


Figure 3. CatPCA analysis of bacterial isolates.

Vectors represent the siderophores production, inorganic phosphate solubilization, indolic compounds production, and *F. oxysporum* inhibition. Arrows in the plot indicating the vector's direction. Numbers in the plot show the position and the frequency of bacterial isolates with the same characteristics

Table 3. Association of phosphate solubilization with siderophores and indolic compounds productions.

Phosphate solubilization (b)	Indolic compounds production (a)			Siderophores production (b)		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
L1	270*	98*	39*	293*	17*	97*
L2	44*	32*	32*	57*	9*	42*

(a) Level of indolic compounds production [L1 (0–15), L2 (15–50) and L3 (more than 50)  $\mu\text{g}$  of IAA  $\text{mL}^{-1}$ ]. (b) Level of siderophores production and phosphate solubilization [L1 (no halo), L2 (0.1–10) and L3 (more than 10) mm of halo diameter]. \* (excessive number of isolates than expected in those conditions). \* (less number of isolates than expected in those conditions).

with anti-phytopathogenic activity and indolic compounds production, and the small cluster with siderophores production and phosphate solubilization capacity.

The chi-square test was used to study the association between the four characteristics, in Table 3 only the statistically associated features have been shown. It was clearly demonstrated the presence of an excessive number that were level 1 of the phosphate solubilization and level 1 of both siderophores and indolic compounds productions or were level 2 of the phosphate solubilization and level 2 and 3 of both siderophores and indolic compounds productions.

## Discussion

All results obtained were based on the comparison of rhizosphere soils vs. bulk soils only. In our study, *C. annuum* affected significantly physical-chemical properties of soil. It was reported that root systems provide anchorage and allow capturing of soil water and nutrients (Jin et al. 2017). To achieve these goals, plants modulate the surrounding soil through root exudates (Sasse et al. 2018). pH was significantly lower in the rhizosphere of the three genotypes. In fact, plants could change soil pH to affect the chemical form, concentration, and availability of substrates

(Beneduzi et al. 2013). It was reported that pH decrease could increase micronutrients availability in soil (Lambers et al. 2008). As mentioned by Hinsinger et al. (2003) proton extrusion by roots may reduce rhizosphere pH by more than 2 units from that in bulk soil. Several studies have related between the pH value and the microbial activities in soil (Fierer and Jackson 2006; Beneduzi et al. 2008), thereby, plants could modulate soil pH to stimulate microbial growth around roots, where the optimum growth pH for most microorganisms was in the neutral range (Smith and Doran 1996). Calcium carbonate content was significantly decreased in the rhizosphere with 36%, 19% and 35% for the genotype Biskra, Karam and Al-fares, respectively, suggesting the importance of calcium for the growth of *C. annuum*. Saure (2005) was also reported the role of calcium in plant growth, fruit development and in many biochemical and physiological processes.

The rhizosphere of the three investigated *C. annuum* genotypes harbored high content of clay compared to the bulk soils. To achieve their growth, plant roots can modify soil structure with various mechanisms including anchorage, water extraction and exudation (Jin et al. 2017), plant roots usually exude different organic compounds such as sugars and polysaccharides, acids, growth factors, hormones, and mucilage (Neumann and Römheld 2007), it was reported that some of these viscous substances, such as polysaccharides, phenolic compounds, and polygalacturonic acid, contribute greatly to the cohesion of small soil particles to the root surface (Song et al. 2015). Whiteley (1989) explained the high clay fraction near to the root of *Pisum sativum* by the secretion of mucilage by root tip, which increase soil water potential and consequently generated high clay content in the rhizosphere.

Results of bacterial quantification (based on the quantity of 16S rDNA gene copies) proved the stimulation of growth around the plants roots, which confirmed the results of several previous studies (Rachid et al. 2013; Navarrete et al. 2015). In the rhizosphere, plants exude up to 10% of the fixed carbon and 15% of the nitrogen (Venturi and Keel 2016), including an array of nutrient molecules that could promote rhizobiome growth, in difference to bulk soil, which is rapidly exhausted in nutrients by heterotrophic microbes. Outlined in the literature, root exudates also have an effect on microbial diversity (Micallef et al. 2009), Sasse et al. (2018) concluded that the amount and composition of root exudates modulated microbial biodiversity in the rhizosphere, Steinauer et al. (2016) reported that the inoculation with diverse exudate mix increased microbial diversity. The three cultivars of *C. annuum* analyzed exerted a different effect on bacterial diversity, suggesting the difference of root exudates for members of the same plant species. Bouffaud et al. (2012) have indicated that five maize genotypes have influenced rhizobiome diversity differently in 21 days old seedlings, the same results were observed by analyzing microbial diversity of arabis accessions (Micallef et al. 2009; Mönchgesang et al. 2016). On other hand, other studies had reported similar rhizobiome to bulk soil by analyzing rice and barley rhizosphere (Bulgarelli et al. 2015; Edwards et al. 2015).

The phosphate solubilization was the lowest activity observed in both rhizosphere and bulk soils, which could be attributed to the regular phosphate fertilization of these agricultural lands. Our results were in agreement with many other studies: Da Costa et al. (2014) reported that the bacterial phosphate solubilization ability increased as the soil richness decreased; Hu et al. (2009) found that phosphate solubilizing bacteria were more metabolically active in phosphate deficient fertilized soils after long-term fertilizer management; Moreira et al. (2016) studied the microbial communities of wheat rhizosphere and observed that the phosphate solubilization was the rarest bacterial ability and occurred just in 55 among 346 isolates, where the soil was under regular regime of phosphate fertilization. By analyzing bacterial microflora isolated from seven distinct rice production zones, only 22 among the 296 isolates were able to solubilize phosphate (Beneduzi et al. 2008).

The three varieties of *C. annuum* stimulated bacterial indolic compounds production in the rhizosphere, that corroborate with results of Beneduzi et al. (2008) who also reported that rhizosphere isolates produced more auxins than bulk soil isolates, as well as, Beneduzi et al. (2013)

reported that the majority of bacterial strains isolated from the rhizosphere showed the ability to synthesize indolic compounds. Association between indolic compounds production and phosphate solubilization levels was observed previously with Chaiham and Lumyong (2011) who found that the best indolic compounds producer had high phosphate solubilization.

The high production of siderophores by several isolates could be related to the sub-alkalinity of our soils, in fact, in alkaline soil, iron is present mostly as  $\text{Fe}^{3+}$ , which is insoluble and therefore inaccessible (Gómez-Galera et al. 2012), consequently, soil microorganisms increase siderophores production to sequester this metal (Pérez-Miranda et al. 2007). Our study confirmed that of Da Costa et al. (2014) who showed the association of siderophores production to the phosphate solubilization.

Although several studies reported the antimicrobial activity of siderophores (Ahmed and Holmström 2014), results of both CatPCA and chi-square test, indicated that *F. oxysporum* inhibition and siderophores production were not associated. According to the literature, these molecules are secreted only in iron deficiency condition (Ahmed and Holmström 2014), suggesting that these molecules were not used as a biological control agent in nutrient-rich medium. Olanrewaju et al. (2017) reported that the major mechanism used by PGPB against phytopathogens is the synthesis of one or more antibiotics. Cell wall degrading enzymes production was another way that allows biological control, the most discussed were chitinase (Zarei et al. 2011) and  $\beta$ -1,3-glucanase (Leelasuphakul et al. 2006).

## Conclusion

This study contributed to the elucidation of the main changes in the rhizosphere of *C. annuum* in comparison with bulk soil. Results indicated that rhizosphere has a different soil texture, low pH and low calcium carbonate content. Bacterial growth was more abundant around the roots, however, the bacterial diversity was significantly increased just with one genotype. Among the four characteristics of PGPB analyzed only the indolic compounds production was stimulated in the rhizosphere of the three cultivars, anti-phytopathogenic activity was stimulated just with one genotype. Interactions between PGPB features revealed that anti-phytopathogenic activity was not associated with the others characteristics; on the other hand, phosphate solubilization was associated with both siderophores and indolic compounds productions. The results could be useful with reference to the understanding of the soil/roots relationship allowing to make inference about the soil-plant interaction in *C. annuum* agroecosystem. The identification of potential new PGPB from Mediterranean area could offer a promising tool for the improvement of soil fertility and sustainability.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## ORCID

Karima Khenaka  <http://orcid.org/0000-0003-1215-6291>

## References

- Ahemad M, Mulugeta K. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univ Sci.* 26:1–20.
- Ahmed E, Holmström SJM. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol.* 7:196–208.
- Atlas RM. 2004. *Handbook of microbiological media.* Boca Raton: CRC Press.

- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J Mycol Med.* 15:211–219.
- Beneduzi A, Moreira F, da Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldani JI, Passaglia LMP. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol.* 63:94–104.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol.* 39:311–320.
- Bouffaud ML, Kyselková M, Gouesnard B, Grundmann G, Muller D, Moëne-Loccoz Y. 2012. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? *Mol Ecol.* 21:195–206.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC, Schulze-Lefert P. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe.* 17:392–403.
- Canfora L, Lo Papa G, Vittori Antisari L, Bazan G, Dazzi C, Benedetti A. 2015. Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in "extreme" hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Appl Soil Ecol.* 93:120–129.
- Canfora L, Salvati L, Benedetti A, Francaviglia R. 2017. Is soil microbial diversity affected by soil and groundwater salinity? Evidences from a coastal system in central Italy. *Environ Monit Assess.* 7:189–319.
- Chaiham M, Lumyong S. 2011. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Curr Microbiol.* 62:173–181.
- Da Costa PB, Granada CE, Ambrosini A, Moreira F, de Souza R, dos Passos JF, Arruda L, Passaglia LM. 2014. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One* 9(12):e116020.
- Dabin B. 1967. Application of automatic assays to soil analysis [Application des dosages automatiques à l'analyse des sols]. 3<sup>ème</sup> partie. *Cahiers ORSTOM. Série Pédologie* 5:257–286. French.
- Dazzo FB, Ganter S. 2009. Rhizosphere. In: Schaechter M, editor. *Encyclopedia of microbiology.* Oxford: Elsevier; p. 335–349.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellin C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundareshan V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:E911–E920.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:626–631.
- Gaby JC, Buckley DH. 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environ Microbiol.* 13:1790–1799.
- Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012:1–15.
- Gómez-Galera S, Sudhakar D, Pelacho AM, Capell T, Christou P. 2012. Constitutive expression of a barley Fe phytosiderophore transporter increases alkaline soil tolerance and results in iron partitioning between vegetative and storage tissues under stress. *Plant Physiol Biochem.* 53:46–53.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248:43–59.
- Hu J, Lin X, Wang J, Chu H, Yin R, Zhang J. 2009. Population size and specific potential of P-mineralizing and solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. *Pedobiologia* 53:49–58.
- Jansson JK, Hofmockel KS. 2018. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. *Curr Opin Microbiol.* 43:162–168.
- Jeffrey LSH. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afr J Biotechnol.* 7:3697–3702.
- Ji SH, Gururani MA, Chun SC. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol Res.* 169:83–98.
- Jin K, White PJ, Whalley WR, Shen J, Shi L. 2017. Shaping an optimal soil by root–soil interaction. *Trends Plant Sci.* 22:823–829.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:649.
- Krzyzanowska J, Czubačka A, Oleszek W. 2010. Dietary phytochemicals and human health. In: Giardi MT, Rea G, Berra B, editors. *Bio-farms for nutraceuticals: advances in experimental medicine and biology.* Boston: Springer; p. 74–98.
- Kurabachew H, Wydra K. 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bio-protectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biol Control.* 67:75–83.
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. 2008. Mineral nutrition. In: Lambers H, Chapin FS, Pons TL, editors. *Plant physiological ecology.* New York: Springer; p. 255.
- Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb Technol.* 38:990–997.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Fomey LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol.* 63:4516–4522.
- Manzur JP, Oliva-Alarcón M, Rodríguez-Burruero A. 2014. In vitro germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annum* L.). *Sci Hortic.* 170:203–210.

- Materska M, Perucka I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem*. 53:1750–1756.
- Mathieu C, Pielain F. 2003. Soil chemical analysis methods chosen [Analyse chimique des sols méthodes choisies]. Paris: Tec et Doc/Lavoisier. French.
- Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Labuschagne N, Dubery IA. 2018. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Front Plant Sci*. 9:112.
- Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A. 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot*. 60:1729–1742.
- Mönchgesang S, Strehmel N, Schmidt S, Westphal L, Taruttis F, Müller E, Herklotz S, Neumann S, Scheel D. 2016. Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana* linking metabolomic and genomic data. *Sci Rep*. 6:1–11.
- Moreira FDS, da Costa PB, de Souza R, Beneduzi A, Lisboa BB, Vargas LK, Passaglia LMP. 2016. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genet Mol Biol*. 39:111–121.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148:257–266.
- Navarrete AA, Soares T, Rossetto R, van Veen JA, Tsai SM, Kuramae EE. 2015. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie Leeuwenhoek*. 108:741–752.
- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martínez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem*. 96:66–73.
- Neumann G, Römheld V. 2007. The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: Pinton R, Varanino Z, Nannipieri P, editors. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York: CRC Press; p. 23–72.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 33:197.
- Parsu M, Gautheryou J. 2006. *Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods*. Heidelberg: Springer.
- Patten C, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol*. 42:207–220.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods*. 70:127–131.
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17:362–370.
- Pugliese A, Loizzo MR, Tundis R, O'Callaghan Y, Galvin K, Menichini F, O'Brien N. 2013. The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chem*. 141:2606–2613.
- Rachid CT, Santos AL, Piccolo MC, Balieiro FC, Coutinho HLC, Peixoto RS, Tiedje JM, Rosado AS. 2013. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian cerrado soil bacterial community structure. *PLoS One* 8:e59342.
- Rillig MC, Lehmann A, Lehmann J, Camenzind T, Rauh C. 2018. Soil biodiversity effects from field to fork. *Trends Plant Sci*. 23:17–24.
- Rincon-Florez VA, Carvalhais LC, Schenk PM. 2013. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity*. 5:581–612.
- Sasse J, Martinoia E, Norten T. 2018. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci*. 23:25–41.
- Saure MC. 2005. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Sci Hortic*. 105:65–89.
- Shameer S, Prasad TNKV. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regul*. 84:603–615.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*. 2:587.
- Smith J, Doran JW. 1996. Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. In: Doran JW, Jones AJ, editors. *Methods for assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America; p. 169–185.
- Song Z, Zhang C, Liu G, Qu D, Xue S. 2015. Fractal feature of particle-size distribution in the rhizospheres and bulk soils during natural recovery on the Loess Plateau, China. *PLoS One* 10:e0138057.
- Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N. 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol*. 6:7387–7396.
- Szoboszlay M, Lambers J, Chappell J, Kupper JV, Moe LA, McNear DH Jr. 2015. Comparison of root system architecture and rhizosphere microbial communities of balsas teosinte and domesticated corn cultivars. *Soil Biol Biochem*. 80:34–44.

- Towe S, Kleineidam K, Schloter M. 2010. Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples. *J Microbiol Methods*. 82:338–341.
- Van Dam NM, Bouwmeester HJ. 2016. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci*. 21:256–265.
- Venturi V, Keel C. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci*. 21:187–198.
- Whiteley GM. 1989. The deformation of soil by penetrometers and root tips of *Pisum sativum*. *Plant Soil*. 117:201–205.
- Wu Z, Lin W, Li B, Wu L, Fang C, Zhang Z. 2015. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of soil bacterial communities under different vegetation types in subtropical area. *PLoS One* 10:e0129397.
- Zarei M, Aminzadeh S, Zolghamein H, Safahieh A, Daliri M, Noghabi KA, Motallebi A. 2011. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Braz J Microbiol*. 42:1017–1029.
- Zhai Y, Hou M, Nie S. 2018. Variance of microbial composition and structure and relation with soil properties in rhizospheric and non-rhizospheric soil of a flooded paddy. *Paddy Water Environ*. 16:163–172.

# Université des Frères Mentouri. Constantine 1

## Laboratoire de génie microbiologique et applications

### Thèse de Doctorat en Sciences

*KHENAKA Karima*

#### **Biodiversité bactérienne du sol rhizosphérique de *Capsicum annuum* : activités des PGPB et exploitation des endophytes pour l'amélioration de la croissance et le rendement.**

Le présent travail s'intéresse à l'étude de la biodiversité bactérienne du sol rhizosphérique et la caractérisation des activités des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) associées aux racines de piment fort (*Capsicum annuum*).

Les échantillons du sol (rhizosphérique et non-rhizosphérique) et les racines de trois génotypes de piment industriel ont été collectés à partir d'un terrain agricole situé dans la Wilaya de Guelma. Par rapport au sol non-rhizosphérique, la rhizosphère des trois génotypes possède une texture de sol différente, un pH et une teneur en carbonates plus faibles. La croissance bactérienne est plus abondante autour des racines des trois génotypes avec des rapports rhizosphère/sol différents. L'analyse de la diversité génétique par T-RFLP montre que la diversité bactérienne a augmenté de manière significative seulement chez le génotype Biskra.

Un total de 515 isolats bactériens, soit 301 et 214 isolats ont été collectés, respectivement, de l'ensemble des trois rhizosphères et des sols non-rhizosphériques. L'analyse des activités spécifiques aux PGPB révèle que la production de composés indoliques est stimulée dans la rhizosphère des trois cultivars. Cependant, l'activité anti-phytopathogène est stimulée seulement par un seul génotype.

L'isolement des bactéries à partir des racines des trois cultivars a permis la sélection de 83 isolats. L'amplification des séquences répétées par BOX-PCR a révélé une grande diversité génétique de ces isolats. Les endophytes ont présenté une grande capacité de promotion de la croissance des plantes *in vitro*. Tous les isolats bactériens produisent des auxines avec des voies de synthèse dépendantes du tryptophane. L'analyse par GC-MS montre que l'acide indole acétique est produit majoritairement par la voie IPyA. Les endophytes ont une grande aptitude à produire des sidérophores mais avec une capacité de chélation moins importante que celle du microbiote rhizosphérique. L'utilisation de l'UHPLC-MS/MS Q Exactive a permis la détection de 23 chélateurs de fer différents chez 21 isolats. La production des acyl-homosérine lactones (AHL) de longues chaînes est détectée chez 7 isolats endophytes. Cependant, la désactivation de l'auto-induction par les AHL est observée chez 22 isolats, dont 10 et 15 isolats ont inhibé l'auto-induction chez *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* NT1, respectivement. L'étude de l'activité antifongique révèle que 25 isolats parmi 83 peuvent inhiber la croissance de *F. oxysporum*. De même, 79 % des endophytes ont la capacité de solubiliser le phosphate inorganique.

Les isolats KEK36, KEK1, FEK22, FEO15 et BEK8 ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie sur leurs effets. L'étude taxonomique basée sur l'amplification de l'ADNr 16S a classé l'isolat FEO15 comme membre du genre *Streptomyces* avec une grande similitude à l'espèce *S. caeruleatus*. Les isolats FEK22, BEK8, KEK36 et KEK1, sont classifiés comme souche appartenant au genre *Pseudomonas* très proches aux espèces : *P. moorei*, *P. japonica*, *P. granadensis* et *P. brassicacearum*, respectivement. *In vivo*, les cinq souches ont augmenté, de manière très significative, tous les paramètres de croissance des trois génotypes. Les isolats FEO15 et FEK22 ont été choisis pour étudier l'impact sur le rendement après cinq mois de culture, avec des inoculations séparées et conjuguées. Nos résultats montrent que le consortium est plus efficace que l'inoculation séparée. Le génotype Karam montre une amélioration de 199 % et 377 % du poids sec des fruits pour le traitement avec l'isolat FEO15 et le consortium, respectivement. De même, une augmentation de 58 % et 138 % est obtenue lors de l'inoculation du génotype Al-Fares avec l'isolat FEO15 et le mélange, respectivement.

A l'issue de cette étude, le consortium des isolats FEO15 et FEK22 s'avère prometteur pour une utilisation comme biofertilisants. Cependant, d'autres études complémentaires sont indispensables pour achever les étapes de formulation et d'application sur champs.

**Mots-clés : piment fort, rhizosphère, rhizobactérie, diversité génétique, endophyte, activités PGPB.**