

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE FRERES MENTOURI  
CONSTANTINE 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 02/Micb/2021  
N° de série : 98/ D3C/2021

**Thèse**

Présentée pour l'obtention  
Du Diplôme de Doctorat de 3eme cycle LMD  
En Microbiologie générale et appliquée

Par

DJEBAILI Rihab

**Thème**

---

Criblage des souches d'actinobactéries pour leurs pouvoirs PGPR :  
Essais *in vitro* et *in planta* sur *Solanum lycopersicum* L.,  
*Triticum durum* Desf., et *Daucus carota* L.

---

Soutenu Le : 11-11-2021

**Membres du jury :**

Président :	BENHIZIA Yacine.	Professeur U. Frères Mentouri-Constantine1
Directeur de thèse :	KITOUNI Mahmoud	Professeur U. Frères Mentouri-Constantine1
CoDirecteur de thèse :	DEL GALLO Maddalena	Professeur U. Aquila Italie
Examineur :	BOUDEMAGH Allaou-Eddine.	Professeur U. Frères Mentouri-Constantine1
Examineur :	GRAMA Borhane Samir	MCA U. Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

***Année universitaire  
2020- 2021***

## Table des matières

### Résumé

### Abstract

### المخلص

Introduction	1
1. Diversité microbienne du sol	6
2. La rhizosphère	6
3. La communauté microbienne de la rhizosphère	7
4. Effets bénéfiques des rhizobactéries	8
5. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR)	9
6. Les mécanismes d'action des PGPR	10
6.1 Les mécanismes directs	10
6.1.1. La fixation de l'azote	10
6.1.2. Solubilisation du phosphate	11
6.1.3 La production de sidérophores	12
6.1.4. La production de phytohormones	13
6.1.5. L'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	14
6.2. Les mécanismes indirects	15
6.2.1. Les agents de biocontrol	15
6.2.2. L'induction de la résistance chez les plantes	17
7. L'utilisation des PGPR dans l'agriculture	20
7.1. La biofertilisation	20
7.2. La bioremédiation	20
7.3. La bioprotection	21
8. Les actinomycètes	22
8.1. Définition et caractéristiques principales	22
8.2. Ecologie des actinomycètes	23
8.3. Biologie du développement	24
8.4. Mycélium de substrat et le mycélium aérien	25
8.5. Structures particulières	27
8.6. La formation des spores	27
8.7. La germination des spores	28
9. Taxonomie des actinomycètes	28
10. Le stress chez les plantes	35
11. La salinité des sols	35
12. Effet de la salinité sur la croissance et le développement végétal	37
12.1. La perte de la turgescence	37
12.2. Une mitose altérée	37
12.3. La diminution de la croissance des plantes	38
12.4. La limitation de la division cellulaire	38
12.5. L'altération de la photosynthèse	38
12.6. Des dommages oxydatifs	39
13. La réponse des plantes au stress salin	39
13.1. L'osmorégulation	39
13.2. Les protéines du choc thermique	40
13.3. L'activité antioxydante	40

14. L'halophilie et halotolérance	41
14.1. L'adaptation osmotique des microorganismes halophiles	42
14.2. La biotechnologie des microorganismes halophiles	43
15. Les mécanismes des PGPR à améliorer la croissance végétale sous stress salin	44
15.1. L'induction des gènes résistants au stress	44
15.2. La synthèse de l'ACC-désaminase	45
15.3. La production d'IAA et de la proline	46
15.4. L'amélioration des relations avec l'eau	46
15.5. La séquestration/réduction de l'absorption des ions métalliques	47
15.6. L'équilibre ionique Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	47
15.7. La diminution de la production d'éthylène/acide abscisique	48
15.8. Des stratégies diverses	48
16. Le Blé dur	49
17. La culture de la tomate et la carotte	49

## Matériel et méthodes

### **Evaluation des caractères favorisant la croissance des plantes (PGPR) des souches d'actinomycètes et leur capacité à coloniser *in vitro* *Solanum lycopersicum***

1. Origine des souches et les conditions de culture	54
2. Mesure des activités favorisant la croissance des plantes (PGPB)	54
2.1. La solubilisation du phosphate	54
2.2. La production de l'acide indole acétique (AIA)	55
2.3. La production de l'acide cyanhydrique (HCN)	55
2.4. La production de l'ammoniac (NH <sub>3</sub> )	56
2.5. Les activités enzymatiques	56
3. L'étude <i>in vitro</i> de l'association bactérie-plante avec le microscope électronique à balayage (MEB)	57
4. L'expérience en serre sur <i>Solanum Lycopersicum</i>	58
5. Analyses statistiques des données	59

### **Evaluation des caractères favorisant la croissance des plantes des souches d'actinomycètes et les effets de l'inoculation sur *Triticum durum* sous stress salin**

1. Les souches d'actinomycètes et les conditions de culture	61
2. Estimation des caractères favorisant la croissance sous stress salin	61
2.1. La solubilisation du phosphate	61
2.2. La production de l'acide indole acétique (AIA)	61
2.3. La production de l'acide cyanhydrique et de l'ammoniac	62
2.4. L'estimation de l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	62
3. L'expérience en serre sur <i>Triticum durum</i>	63
3.1. Détermination de la chlorophylle	64
3.2. La détermination de la proline	64
4. Analyse statistique	64

**Activité de biocontrôle des souches d'actinomycètes contre des agents pathogènes du sol de *Solanum lycopersicum* L. et *Daucus carota* L. :  
Evaluation *in vitro* et *in planta***

1. Les souches d'actinomycètes	67
2. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i>	67
2.1. L'activité de biocontrôle par les composés diffusibles et volatiles	67
2.2. L'observation de l'interaction PGPR-pathogène par le microscope électronique à balayage (MEB)	67
2.3. L'activité antibactérienne	68
2.4. L'essai d'antagonisme avec le surnageant acellulaire (CFS)	68
3. L'Etude <i>in planta</i> de l'activité antagoniste	69
4. L'analyse statistique	69

**Résultats et discussions**

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des plantes (PGPR) des souches d'actinomycètes et leur capacité à coloniser *in vitro* *Solanum lycopersicum***

1. Les caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB)	73
1.1. La solubilisation du phosphate	74
1.2. La production de l'acide indole acétique (AIA)	77
1.3. La production de l'acide cyanhydrique, l'ammoniac, et les activités enzymatiques	78
2. L'étude <i>in vitro</i> de l'association bactérie- plante avec le microscope électronique à balayage (MEB)	81
3. L'expérience en serre sur <i>Solanum Lycopersicum</i>	83

**Résultats et discussions**

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des plantes des souches d'actinomycètes et les effets de l'inoculation sur *Triticum durum* sous stress salin**

1. Les caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB)	90
1.1. La solubilisation du phosphate sous stress salin	90
1.2. La production de l'acide indole acétique (AIA) sous stress salin	93
1.3. La production de l'acide cyanhydrique et de l'ammoniac sous stress salin	95
1.4. L'estimation de l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	96
2. L'expérience sous serre sur <i>T. durum</i>	98

**Résultats et discussions**

**Activité de biocontrôle des souches d'actinomycètes contre des agents pathogènes du sol de *Solanum lycopersicum* L. et *Daucus carota* L. :  
Evaluation *in vitro* et *in planta***

1. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i>	109
1.1. L'activité antagoniste avec les composés solubles et volatiles	109
1.2. L'évaluation de l'interaction pathogène-PGPR avec le microscope électronique à balayage (MEB)	110

1.3. L'activité antibactérienne	112
1.4. L'activité antagoniste du CFS	113
2. L'étude <i>in planta</i> de l'activité antagoniste	114
Conclusion et perspectives	120
Références bibliographiques	123
Annexes	

## Remerciements

Avant tout, je remercie **Dieu le tout puissant** qui m'a donné la force et la foi et de m'avoir permis d'arriver à ce stade-là.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université des Frères Mentouri Constantine1;

Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Université de Coppito 1, L'Aquila, Italie.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse **Pr. Mahmoud Kitouni** pour sa direction, sa disponibilité, son aide efficace, les précieux conseils, et les réflexions avisées qu'il m'a apporté.

Ma sincère gratitude à **Pr. Maddalena Del Gallo**, ma co-directrice de thèse, pour l'accueil chaleureux au sein de leur laboratoire, pour toute l'aide qu'elle m'a apporté, ses précieux conseils, sa patience, sa compréhension, et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche.

Je tiens également à remercier **Dr. Marika Pellegrini** qui a examiné de près l'évolution des travaux réalisés au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, sa disponibilité remarquable, ses efficaces suggestions, son aide, sa gentillesse, sa patience, qu'elle m'a fait toujours bénéficier de ses conseils.

Je remercie **Pr. Yacine Benhizia** de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont à **Pr. Allaou-Eddine Boudemagh** et **Pr. Borhane Samir Grama** d'avoir accepté de juger mon travail.

Mes sincères remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

## Dédicaces

Je dédie ce travail :

**A mes très chers parents**, vous avez été toujours à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

**A mes chers frères et sœurs**, ma source de joie et de bonheur.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de mon travail.

**A mes collègues** : Loucif Karima, Sahraoui Aboubakre Seddik, Silini Soumia, Smati Maria, Saci Amina, Lefaida Cherifa, Djaballah Chamss eddine, Hamames Mokhtar, oussadi mouna imene, Meriane Ilhem, et Gasmi meriem.

**Un grand merci à mes amis et collègues en Italie** : Marika Pellegrini, Matteo Bernardi, Ilaria Vaccarelli, Beatrice Farda, Francesco Festa, Alessandro Mattedi, et Amedeo Mignini, qui m'ont accueillis à bras ouverts, et pour les merveilleux moments passé ensemble, un bagage remplie de souvenir,

A ma chère **Marika Pellegrini**, une merveilleuse personne avec qui j'ai appris beaucoup de choses, l'exploitation de chaque instant, la réflexion scientifique, la modestie, j'aurais besoin de te connaître pour corriger beaucoup de failles en ma personne.

Mes remerciements vont également à **Pr. Claudia Ercole** et **Pr. Paola Cacchio** pour l'aide qu'elles m'ont apporté.

**A mes chers amis**, Djelid Hadjer, Kouachi Anis, Loucif Karima, et Chouh Amina, merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble.

**Résumé :** Le stress abiotique dû au changement climatique et les attaques par les micro-organismes pathogènes entraînent plusieurs dommages dans les cultures agricoles. L'utilisation excessive de produits chimiques dans l'agriculture provoque une pollution de l'environnement et la perte des terres agricoles avec des sols fertiles. Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) sont une stratégie alternative valable pour une agriculture durable. Parmi les PGPB, les actinomycètes ont récemment attiré une attention croissante pour leur capacité à atténuer les stress et à améliorer la productivité agricole. Le but de cette étude était de sélectionner les souches d'actinomycètes en fonction de leurs traits favorisant la croissance des plantes et d'étudier leurs capacités d'association racinaire et leurs effets biostimulants sans et avec stress salin ainsi que leur pouvoir de biocontrôle contre plusieurs pathogènes bactériens et fongiques des plantes. Les souches ont été étudiées pour leur capacité de solubilisation du phosphate, la production d'acide indole-3-acétique, d'acide cyanhydrique et d'ammoniac, et plusieurs activités enzymatiques. Les associations bactéries-racine ont été étudiées par microscope électronique à balayage (MEB), et une expérience en serre a été réalisée pour évaluer les effets de l'inoculation sur *Solanum lycopersium* L. De même ces souches ont été testées pour leur capacité d'halotolérance *in vitro* par plusieurs tests PGPB avec différentes concentrations de sel (c.-à-d. 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 et 1,5 M NaCl) et par une expérience en serre sur *Triticum durum*. La présence d'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase a également été étudiée. De plus, les souches ont été criblées pour leur activité de lutte biologique *in vitro* par la production de composés solubles et volatils contre les souches fongiques *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) et *Rhizoctonia solani* (RHS). Les événements de la post-interaction champignon-PGPB ont été analysés par microscope électronique à balayage. L'activité antibactérienne a été évaluée contre *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Les souches présentant des bonnes activités de lutte biologique *in vitro* ont été étudiées pour leur activité antifongique et antibactérienne en utilisant le filtrat de culture cellulaire (CFS). Le consortium des souches puissantes a été appliqué sur *Solanum lycopersicum* L. et *Daucus carota* L. pour une activité de biocontrôle *in planta*. Parmi soixante actinomycètes, quatorze souches présentaient des caractéristiques favorisant la croissance des plantes. Les quatorze souches ont solubilisé le phosphate, produit de l'ammoniac et montré plusieurs activités enzymatiques à des taux différents. Le microscope électronique à balayage a révélé que les souches ont des bonnes capacités d'association racinaire et de colonisation des plantes *in vitro*. L'inoculation *in planta* par des souches d'actinomycètes a influencé positivement les paramètres de croissance des plantes de tomate. Les essais *in vitro* ont montré des traits PGP importants de ces souches sous différentes concentrations de sel. La plupart des souches (86 %) avaient une activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase avec des quantités importantes d'acide cétobutyrique. Dans l'expérience en serre, l'inoculation avec des souches d'actinomycètes a amélioré les paramètres morpho-biochimiques des plants de blé dur qui ont enregistré une teneur significativement plus élevée en chlorophylle et en proline que ceux des témoins non inoculés à la fois dans des conditions normales et stressées. Les souches H12 (*Streptomyces albidoflavus*) et H14 (*Nocardopsis aegyptica*) ont montré une bonne activité antifongique *in vitro* avec les composés diffusibles et volatils (inhibition jusqu'à 85 %) et dans l'activité antibactérienne (diamètre d'inhibition > 10 mm). Les micrographes du MEB ont montré une détérioration morphologique des filaments fongiques et des changements dans leurs structures. Le CFS des souches puissantes était également actif pour inhiber la croissance des pathogènes bactériens et fongiques (concentration minimale inhibitrice jusqu'à 0,2 %). Le consortium a également pu atténuer les symptômes d'infection et permettre une croissance normale des plantes infectées par rapport au témoin. Les résultats obtenus mettent en évidence l'efficacité des souches d'actinomycètes halotolérantes en tant qu'agent biofertilisant et de biocontrôle pour la gestion des maladies des plantes et pour l'atténuation des effets négatifs du stress salin chez les plantes.

**Mots clés :** PGPB ; actinomycètes; solubilisation du phosphate; acide indole-3-acétique; acide cyanhydrique; biofertilisant; ACC désaminase; blé dur; stress salin; halotolérance ; la lutte biologique; pathogènes; SEM ; filtrats de culture; tomate; carotte.



**Abstract:** Abiotic stress due to climate change and phytopathogens attacks lead to several damages in agricultural crops. Excessive use of chemicals in agriculture causes environmental pollution and loss of agricultural lands with fertile soils. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are an alternative strategy for sustainable agriculture. Among PGPBs, actinomycetes have recently gained increasing attention for their ability to alleviate plant stress and improve agricultural productivity. This study aimed to select actinomycetes strains with plant growth promoting traits, their plant-roots association capacities, and their biostimulating effects without and with salt stress as well as the biocontrol power against several fungal and bacterial plant pathogens. The strains were studied for their phosphate solubilization capacity, indole-3-acetic acid (IAA), hydrocyanic acid (HCN), and ammonia (NH<sub>3</sub>) production, and several enzymatic activities. Bacteria-root associations were studied by scanning electron microscopy (SEM), and a greenhouse experiment was performed to assess the inoculation effects on *Solanum lycopersium* L.. Likewise, these strains were tested for *in vitro* halotolerant ability by several PGP tests with different salt concentrations (i.e., 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5 M NaCl) and by a greenhouse experiment on *Triticum durum*. The presence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity was also studied. Moreover, the strains were screened for their *in vitro* biocontrol activity by soluble and volatile compounds production against the fungal strains *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and *Rhizoctonia solani* (RHS). The post-interaction events fungus-PGPB were analyzed by scanning electron microscopy. The antibacterial activity was evaluated against *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Strains showing good *in vitro* biological control activities were studied for their antifungal and antibacterial activity using the cell culture filtrate (CFS). The consortium of potent strain was applied on *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. for *in planta* biocontrol activity. Among sixty actinomycetes, fourteen strains exhibited plant growth promoting characteristics. These strains were able to solubilize the phosphate, produce ammonia, and showed several enzymatic activities at different rates. The scanning electron microscopy revealed a good *in vitro* plant root association and colonization abilities. The actinomycetes inoculation influenced positively the tomato growth parameters. These strains exhibited important *in vitro* PGP traits under different salt concentrations. Most strains (86%) had 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity with significant amounts of ketobutyric acid. In the greenhouse experiment, inoculation with actinomycetes strains improved the durum wheat morpho-biochemical parameters, which recorded a significantly higher content of chlorophyll and proline than those of uninoculated controls both under normal and stressed conditions. Strains H12 (*Streptomyces albidoflavus*) and H14 (*Nocardia opacissima*) showed good *in vitro* antifungal activity with diffusible and volatile compounds (inhibition up to 85%) and antibacterial activity (diameter of inhibition > 10 mm). SEM micrographs showed morphological deterioration of the fungal filaments and changes in their structures. The CFS of potent strains was also active in fungal and bacterial pathogens inhibition (minimum inhibitory concentration up to 0.2%). The consortium was also able to alleviate the infection symptoms and allow a normal growth of the infected plants compared to the control. The obtained results demonstrate the efficacy of halotolerant actinomycetes strains as a biofertilizer and biocontrol agent for plant diseases management and for the alleviation of negative effects of salt stress in plants.

**Keywords:** PGPB; actinomycetes; phosphatesolubilization; indole-3-acetic acid; hydrocyanic acid; biofertilizer; ACC deaminase; durum wheat; salt stress; halotolerance; biological control; pathogens; SEM; culture filtrates; tomato; carrot.

**الملخص:** الضغط اللا حيوي الناجم عن تغير المناخ وهجمات الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض يؤدي إلى العديد من الأضرار في المحاصيل الزراعية. يؤدي الاستخدام المفرط للمواد الكيميائية في الزراعة إلى تلوث البيئة وفقدان الأراضي الزراعية ذات التربة الخصبة. تعد البكتيريا المعززة لنمو النبات استراتيجية بديلة صالحة للزراعة المستدامة. من بين هذه البكتيريا، اكتسبت الفطريات الشعاعية مؤخرًا اهتمامًا متزايدًا لقدرتها على تخفيف الضغط وتحسين الإنتاجية الزراعية. كان الهدف من هذه الدراسة هو اختيار سلالات الفطريات الشعاعية وفقًا لصفاتها التي تعزز نمو النبات ودراسة قدراتها على الارتباط الجذري وتأثيراتها على التحفيز الحيوي بدون وبإضافة التوتّر الملحي، وكذلك قوتها في مكافحة الحبيوة ضد العديد من مسببات الأمراض البكتيرية والفطرية للنباتات. درست السلالات لقدرتها على إذابة الفوسفات، وإنتاج حمض الإندول-3-اسيتيك، وحمض الهيدروسيانيك والأمونيا، والعديد من الأنشطة الأنزيمية. وقد تمت دراسة ارتباطات الجراثيم بجذور النباتات عن طريق مسح المجهر الإلكتروني، وأجريت تجربة الدفيئة لتقييم آثار التلقيح على *Solanum lycopersium* L. وبالمثل تم اختبار هذه السلالات لقدرتها على مقاومة الضغط الملحي مع مختلف التركيزات (0، 0.25، 0.5، 0.75، 1.25، و1.5 مول / اللتر) في المختبر من خلال العديد من الاختبارات، ومن خلال تجربة تحت دفيئة زراعية على *Triticum durum*. وجود نشاط-1 aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase تمت دراسته أيضًا. بالإضافة، تم فحص هذه السلالات لنشاط مكافحة البيولوجية في المختبر ضد *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici* (FORL) و *Rhizoctonia solani* (RHS)، عن طريق إنتاج مركبات قابلة للذوبان ومتطايرة. تم تقييم أحداث التفاعل اللاحق للفطريات الخبيثة مع الفطريات الشعاعية عن طريق مسح المجهر الإلكتروني. الفعالية المضادة للبكتيريا تم تقييمها ضد *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* التي كان لها نشاط جيد في مكافحة البيولوجية في المختبر تم اختبار نشاطها المضاد للفطريات، والبكتيريا الخبيثة باستخدام مرشح تكاثر الخلايا. تم تطبيق اتحاد السلالات القوية على *Solanum lycopersicum* L. *Daucus carota* L. من أجل نشاط مكافحة البيولوجية على النبات. من بين ستين فطر شعاعي أربعة عشر سلالة كان لديها خصائص تدعم نمو النبات. الأربعة عشر سلالة كانت لهم القدرة على إذابة الفوسفات، إنتاج الامونياك، والعديد من النشاطات الإنزيمية بمعدلات مختلفة. أظهر المسح بالمجهر الإلكتروني أن السلالات لديها قدرات جيدة للالتصاق والاستعمار في جذور النباتات. تلقيح النباتات بهذه السلالات حسن من معلمات نمو نبات الطماطم. الفحوصات المخبرية أظهرت خصائص جيدة لتحسين نمو النبات تحت الضغط الملحي. معظم السلالات (86%) كان لديها نشاط-1 aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase مع كميات معتبرة من حمض الكيتوتيريك. في تجربة الدفيئة الزراعية. التلقيح بهذه السلالات حسن معدلات نمو نبات القمح الصلب الذي سجل معدلات معتبرة من الكروموفيل والبرولين مقارنة مع الشاهد غير الملقح. السلالات أظهرت نشاطات مضادة للفطريات في المختبر مع المركبات القابلة للذوبان والمتطايرة وفي النشاط المضاد للجراثيم أيضًا. صور مسح المجهر الإلكتروني أظهرت التدهور المورفولوجي للخيوط الفطرية والتغيرات في بنيتها. ترشيح تكاثر الخلايا للسلالات القوية كان جيدًا في تثبيط نمو مسببات الأمراض البكتيرية والفطرية (التركيز المثبط الأدنى يصل إلى (0.2%) كان اتحاد السلالات القوية قادرًا على تخفيف أعراض العدوى والسماح بالنمو الطبيعي للنباتات المصابة مقارنة بالشاهد. توضح النتائج التي تم الحصول عليها فعالية سلالات الفطريات الشعاعية المقاومة للملح كسماد حيوي وعامل تحكم بيولوجي لإدارة أمراض النبات وللتخفيف من الآثار السلبية بالضغط الملحي.

## Liste des principales abreviations

<b>PGPR</b>	Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria
<b>AIA</b>	Acide indole acétique
<b>HCN</b>	Acide cyanhydrique
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniac
<b>L.</b>	Linné
<b>Desf.</b>	Desfontaines
<b>ACC</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
<b>GA</b>	Acide gibbérellique
<b>CK</b>	Cytokinine
<b>ABA</b>	Acide abscissique
<b>ET</b>	Ethylène
<b>JA</b>	Acide jasmonique
<b>ISR</b>	induced systemic resistance
<b>ASR</b>	acquired systemic resistance
<b>CFS</b>	cell free supernatant
<b>HSP</b>	heat shock protein
<b>ROS</b>	Les espèces réactives de l'oxygène
<b>NBRIP</b>	National Botanical Research Institutes' phosphate growth medium
<b>PVK</b>	Pikovskaya
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>ISP2</b>	International Streptomyces Project No. 2
<b>TSA</b>	Trypticase Soy Agar
<b>MEB</b>	Microscope électronique à balayage
<b>AFDW</b>	Ash-free dry weight

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Production d'acide cyanhydrique et d'ammoniac et les différentes activités enzymatiques détectées pour les souches d'actinomycètes.....	78
<b>Tableau 2</b> : Les concentrations du phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ $\mu\text{g/ml}$ ) solubilisé par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de NaCl. ....	91
<b>Tableau 3</b> : Les concentrations d'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ ) produites par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de sel. ....	93
<b>Tableau 4</b> : Taux de survie (%) enregistré lors de l'expérience en serre sur <i>T. durum</i> pour les plantes inoculées (PGPB) et non inoculées (CNT).....	98
<b>Tableau 5</b> : Rapport a / b de la chlorophylle des plantes inoculées et non inoculées sans (NaCl 0 M) et avec induction de stress salin (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M NaCl) (n = 3). .....	103
<b>Tableau 6</b> : Le test d'antagonisme in vitro des souches d'actinomycètes contre les bactéries-test .....	112
<b>Tableau 7</b> : Résultats de l'expérience de pré-émergence des plantes de tomate avec le consortium (PGPB) dans le contrôle des pathogènes fongiques et bactériens. ....	116
<b>Tableau 8</b> : Résultats de la pré-émergence des plantes de carotte avec le consortium (PGPB) dans le contrôle des pathogènes fongiques et bactériens. ....	117

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : L'induction de la résistance chez les plantes.....	19
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulantes....	26
<b>Figure 3</b> : Pourcentage des souches (%) présentant des caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB).....	73
<b>Figure 4</b> : Les diamètres d'halos de solubilisation du phosphate par les souches d'actinomycètes sur les milieux de croissance solides NBRIP et PVK.....	75
<b>Figure 5</b> : Les concentrations du phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) solubilisé par les souches d'actinomycètes cultivées sur le milieu PVK liquide.....	76
<b>Figure 6</b> : Les concentrations d'acide indole-3-acétique (AIA) produites par les souches d'actinomycètes sélectionnées..	77
<b>Figure 7</b> : Criblage sur plaques d'agar (plaques de 90 mm de diamètre) effectué pour les activités enzymatiques. ....	81
<b>Figure 8</b> : Les micrographes obtenus par le microscope électronique à balayage (MEB) des racines fraîches obtenues à partir de plantules de huit jours de <i>Solanum lycopersicum</i> . L non inoculées et inoculées avec les souches G10 et H14..	83
<b>Figure 9</b> : Les plantules de tomates après 40 JAS inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes.....	84
<b>Figure 10</b> . Les plantules de tomates après 40 JAS inoculées et non inoculées avec les souches d'actinomycètes.....	84
<b>Figure 11</b> : La longueur des pousses et des racines (A), poids sec sans cendres (AFDW) (B) des pousses et des racines des plantes de tomates ( <i>Solanum lycopersicum</i> . L)..	85
<b>Figure 12</b> : Le contenu en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), et en chlorophylle totale (Chltot) de <i>Solanum lycopersicum</i> .L non inoculée (CNT) et inoculée avec les souches d'actinomycètes sélectionnées..	87
<b>Figure 13</b> : Biplot obtenu à partir de l'ACP sur l'ensemble de données des résultats in vitro et in planta (chargements) enregistrés pour les souches d'actinomycètes (scores).....	88
<b>Figure 14</b> : La production de l'acide cyanhydrique ((HCN) et de l'ammoniac ((NH <sub>3</sub> ) par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de NaCl.....	96
<b>Figure 15</b> : L'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase ( $\mu\text{mol } \alpha\text{-KB mg protéines}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) détectée dans les souches d'actinomycètes..	97
<b>Figure 16</b> : La longueur des pousses (A) et des racines (B) des plantes inoculées et non inoculées cultivées sans (0 M NaCl) et avec NaCl dans les sols.....	99
<b>Figure 17</b> : Le pourcentage (%) de poids sec sans cendres (AFDW) des pousses(A) et des racines (B) des plantes inoculées et non inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes sans (0 M NaCl) et avec NaCl dans les sols. ....	101
<b>Figure 18</b> : La teneur en chlorophylles totales (Chl tot) estimée dans les feuilles des plantes inoculées et non inoculées, sans NaCl et avec induction de stress salin.....	102
<b>Figure 19</b> : La teneur en proline estimée dans les pousses des plantes inoculées et non inoculées sans NaCl et avec induction de stress salin.....	104
<b>Figure 20</b> : Biplot obtenu à partir de l'analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble de données des résultats in vitro et in planta enregistrés pour les souches d'actinomycètes sans stress salin..	105
<b>Figure 21</b> : Biplot obtenu à partir de l'analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble de données des résultats in vitro et in planta enregistrés pour les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de stress salin. ....	106
<b>Figure 22</b> : Le pourcentage d'inhibition (%) des pathogènes fongiques FORL (a) et RHS (b) par les souches d'actinomycètes avec la production des composés solubles et volatiles..	109

<b>Figure 23 :</b> Les micrographies obtenues par MEB des hyphes FORL et RHS en absence et en présence de PGPB. ....	111
<b>Figure 24.</b> La comparaison entre les unités expérimentales obtenues en pré-émergence (A) Plantules de tomate (B) Plantules de carotte.....	115

# **Introduction**

### I-Introduction

Avec l'augmentation de la population mondiale, l'amélioration de la productivité des cultures est devenue l'une des préoccupations majeures pour satisfaire les besoins alimentaires dans le monde (Nath et al., 2019). L'application d'engrais chimiques est le moyen le plus simple d'augmenter qualitativement et quantitativement les rendements des cultures. De ce fait, la demande d'engrais et de pesticides a considérablement augmenté et devrait continuer à croître de plus en plus au cours des prochaines années ( Savci, 2012; Atieno et al., 2020). Cependant, l'utilisation irrationnelle des produits chimiques dans l'agriculture entraîne de nombreux problèmes environnementaux et provoque une toxicité chez les organismes non cibles (Campos et al., 2019). La salinité est l'une des problèmes majeurs affectant la productivité agricole, en particulier dans les sols arides et semi-arides (Bharti et al., 2013; Silini et al., 2016; Fatima and Arora, 2019; Etesami and Glick, 2020; Mahmoud et al., 2020). La salinité dégrade la fertilité du sol et interfère avec le développement normal des plantes, affectant gravement la productivité des cultures (Etesami and Glick, 2020; "FAO. 2015 Global Soil Partnership—World Soil Charter. Available online: <http://www.fao.org/3/mn442e/mn442e.pdf> (accessed on 13 August 2020). - Recherche Google, n.d" Sultana et al., 2020). Une concentration élevée en sel altère également la croissance des plantes en perturbant le fonctionnement physiologique et biochimique (Egamberdieva et al., 2011). La salinité entraîne une perte de turgescence et un dysfonctionnement membranaire, par conséquent une toxicité ionique et une déshydratation cellulaire (Silini et al., 2016; Etesami and Glick, 2020). De plus, la diminution de l'état hydrique due à la salinité perturbe la photosynthèse par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ashraf and Harris, 2004; Baniaghil et al., 2013).

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) et les carottes (*Daucus carota* L.) sont parmi les légumes les plus importants de la famille des solanacées et des apiacées cultivées dans le monde (Que et al., 2019; Pellegrini et al., 2020a). Ces plantes sont attaquées par plusieurs agents pathogènes du sol, parmi lesquels *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani* provoquent de graves maladies affectant la productivité des plantes (de Oliveira et al., 2010; Patkowska, 2020). *F. oxysporum* fait partie des pathogènes ubiquitaires les plus importants (Singh et al., 1999; Goudjal et al., 2016), il provoque la pourriture du collet et des racines limitant la croissance et



## Introduction

---

le développement des plantes (Suárez-Estrella et al., 2007; Goudjal et al., 2016; Rashad et al., 2017). La maladie des taches de la tomate causée par *Pseudomonas syringae* induit des lésions nécrotiques sur les différentes parties de la plante affectant leur productivité (Goode and Sasser, 1980; Hassan et al., n.d.). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* affecte de nombreuses cultures telles que les carottes et provoque la pourriture molle entraînant des pertes économiques importantes (Nesha and Siddiqui, 2013; Adams et al., 2014; Patkowska, 2020; Zhang et al., 2020). L'utilisation des fongicides chimiques pour réduire les pertes agricoles dues aux ravageurs a des effets néfastes sur la communauté microbienne et les sols car ils sont convertis en dérivés toxiques par les agents pathogènes eux-mêmes et les tissus végétaux (Geissbuhler et al., 1982; Goudjal et al., 2014). L'utilisation de bactéricides combat les maladies des plantes causées par des bactéries pathogènes, mais une dépendance excessive rend les pathogènes résistants et provoque une pollution de l'environnement (Hassan et al., n.d.; Hastuti et al., 2012).

La biofertilisation peut remplacer l'utilisation de produits agrochimiques, et est considérée comme un élément clé vers le développement d'une agriculture durable. Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) ont un effet positif sur la productivité des cultures en préservant la fertilité des sols, la santé humaine, et la diversité des organismes vivants (Wu et al., 2005; Mia et al., 2010; Gamez et al., 2019). Ces micro-organismes favorisent la croissance et le développement des plantes directement et indirectement par : la décomposition de la matière organique et le recyclage des éléments nutritifs, la fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation des minéraux (par exemple, le phosphore), et la production de phytohormones (par exemple, les auxines, les cytokinines, les gibbérellines) (Shilev, 2013; Gupta et al., 2015). Ces micro-organismes aident la plante à répondre à plusieurs stress biotiques et abiotiques par différents mécanismes, tels que l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, la libération d'enzymes, la production de sidérophores, et la résistance systémique induite (ISR) (Bai et al., 2003; Jha et al., 2011; Bhattacharyya and Jha, 2012; Kyaw et al., 2019; Etesami and Glick, 2020). L'application de souches halotolérantes favorisant la croissance des plantes (PGP) peut être un outil valable pour réduire les effets néfastes du stress salin et améliorer la productivité des cultures (Bai et al., 2003).

## Introduction

---

Le groupe PGPB comprend un large éventail d'espèces (Bhattacharyya and Jha, 2012; Gupta et al., 2015; Kyaw et al., 2019; Pace et al., 2020). Au sein de ce groupe, un rôle important est joué par les actinomycètes. Ces bactéries Gram-positives ubiquistes – aérobies, avec quelques souches anaérobies – sont largement distribuées dans le sol, où elles occupent 10 à 50 % de la communauté microbienne (Toumatia et al., 2015; Olanrewaju and Babalola, 2019). Elles présentent un polymorphisme remarquable, affichant la plus grande différenciation parmi les bactéries (Olanrewaju et al., 2017). Les actinomycètes peuvent contrôler un large éventail de phytopathogènes et constituent une source importante de métabolites bioactifs et antimicrobiens (Marimuthu et al., 2020). Elles ont la capacité de dégrader les produits récalcitrants et xénobiotiques (Lin et al., 2011; Polti et al., 2014; Arya et al., 2016; Chaurasia et al., 2018), et agissent comme bio pesticides, bio herbicides, un PGPR et agent de lutte biologique (Chaurasia et al., 2018; Vurukonda et al., 2018). Elles sont largement exploitées pour leur capacité à produire des composés biologiquement actifs tels que des antibiotiques et des enzymes hydrolytiques (Costa et al., 2013). Il a été rapporté que les antibiotiques produits par les bactéries filamenteuses inhibent un large éventail de micro-organismes pathogènes (Berg et al., 2001; Costa et al., 2013). Les actinomycètes, en particulier le genre *Streptomyces*, sont considérées comme des bons candidats pour lutter contre les maladies des plantes (Doubou et al., 2001; Panneerselvam et al., 2020). Elles représentent une source importante de plusieurs composés agroactifs (Tanaka and Omura, 1993; Doubou et al., 2001). L'activité de biocontrôle s'explique par leur capacité à coloniser les racines des plantes, l'antibiose, la production de protéines extracellulaires, et l'élimination des phytotoxines (Doubou et al., 2001). Elles sont utilisées comme agent de lutte biologique pour protéger les cultures contre les maladies causées par les phytopathogènes (Goudjal et al., 2014). Le but de ce travail était de sélectionner les souches d'actinomycètes présentant des caractères favorisant la croissance des plantes, évaluer leurs capacités et leurs modèles d'association et de colonisation racinaire, et de déterminer leurs effets sur la croissance de *Solanum lycopersicum*.L. Ces souches ont une tolérance au sel jusqu'à 10 % (1,7 M) NaCl (Smati and Kitouni, 2019). Donc, nous avons avancé l'hypothèse que ces souches pourraient être des agents valables pour la tolérance au stress salin. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué les traits d'halotolérance *in vitro* avec différentes activités PGP, ensuite, une expérimentation en serre a été réalisée sur le blé dur (*Triticum durum* Desf.) pour évaluer les effets de l'inoculation sur la croissance des plantes et dans l'atténuation

## Introduction

---

du stress salin. De plus, les mêmes souches ont été évaluées pour l'activité de lutte biologique contre différents agents pathogènes fongiques et bactériens de *Solanum lycopersicum* et *Daucus carota*. Le consortium des souches efficaces a été utilisé pour l'essai d'antagonisme *in planta* sur *S. lycopersicum* et *D. carota*.

## Revue bibliographique

### 1. La diversité microbienne du sol

Les plantes exercent une forte influence sur la composition de la communauté microbienne dans le sol par la rhizodéposition et la décomposition de la litière et des racines (Nannipieri et al., 2017). Les microorganismes présents dans les sols sont essentiels au maintien de la fonction du sol en raison de leur implication dans les différents processus de décomposition de la matière organique; l'élimination des toxines; et les cycle biogéochimiques (Garbeva et al., 2004). Ces micro-organismes jouent un rôle également dans la suppression des maladies des plantes transmises par le sol, et la promotion de la croissance des plantes (Doran, 1996; Garbeva et al., 2004). Les communautés microbiennes du sol sont souvent difficiles à caractériser en raison de leur immense diversité phénotypique et génotypique (Øvre\aaas et al., 1998; Kirk et al., 2004). Il a été suggéré qu'au moins de 99% des bactéries observées au microscope ne sont pas cultivées par les techniques de laboratoire courantes (Borneman et al., 1996; Pace, 1997; Kirk et al., 2004). Les populations bactériennes des couches supérieures du sol vont jusqu'à plus de  $10^9$  cellules par g de sol, et la plupart de ces cellules ne sont généralement pas cultivables (Torsvik and Øvre\aaas, 2002; Garbeva et al., 2004). Il a été estimé que dans un gramme de sol, il y avait 4000 unités génomiques bactériennes différentes basées sur l'hybridation ADN-ADN (Vigdis Torsvik et al., 1990; V. Torsvik et al., 1990). De même, environ 5000 espèces bactériennes ont été décrites (Pace, 1997; Kirk et al., 2004). Et seulement près de 1 à 2% de la population bactérienne du sol peut être cultivée par les pratiques du laboratoire standard (Kirk et al., 2004).

### 2. La rhizosphère

Lorenz Hiltner définissait le terme rhizosphère comme la zone du sol entourant les racines des plantes influencée par les exsudats racinaires (Hartmann et al., 2008). La rhizosphère est la partie de l'écosystème du sol où les racines des plantes, le sol et le biote interagissent ensemble (Lynch et al., 2001). Ces interactions sont souvent bénéfiques pour les plantes, améliorent la fertilité du sol, et offrent le carbone organique pour la communauté qui y vivent (Lynch et al., 2001). La rhizosphère est influencée par les racines, où les exsudats des racines stimulent ou inhibent les populations microbiennes et leurs activités (Lynch et al., 2001).

La rhizosphère est d'une importance majeure non seulement dans la nutrition et la santé des plantes, mais dans la séquestration du carbone par les microorganismes, et le cycle de nutriment dans l'écosystème terrestre (Berg and Smalla, 2009). La sécrétion des composés par les racines des plantes servent comme attractifs chimiques pour la communauté microbienne rhizosphérique (Walker et al., 2003). Les produits chimiques sécrétés dans le sol par les racines sont généralement appelés exsudats racinaires (Walker et al., 2003). Les racines peuvent favoriser les relations bénéfiques avec les microorganismes symbiotiques, changer les propriétés physiques et chimiques du sol, et prévenir la multiplication des espèces végétales concurrentes (Nardi et al., 2000; Walker et al., 2003). La capacité de sécréter une vaste gamme des composés dans la rhizosphère est l'un des plus caractéristiques métaboliques remarquables des racines des plantes, avec près de 5% à 21% de tout le carbone fixé par photosynthèse étant transféré à la rhizosphère par les exsudats racinaires (Walker et al., 2003).

### **3. La communauté microbienne de la rhizosphère**

La communauté microbienne de la rhizosphère fait partie d'un réseau trophique complexe qui utilise les nutriments libérés par les racines des plantes, qui sont les principaux régulateurs de la diversité microbienne et les différentes activités (Mendes et al., 2014).

La microflore rhizosphérique comprend des bactéries, des champignons, protozoaires, et algues (Nihorimbere et al., 2011). La plupart des microorganismes du sol (98%) sont non cultivables, les analyses moléculaires ont montré une énorme diversité de la microflore rhizosphérique (Suzuki et al., 2006; Nihorimbere et al., 2011). De nombreux travaux ont démontré que les Protéobactéries et les Actinobactéries sont les plus dominants (Singh et al., 2007; Nihorimbere et al., 2011). Ces groupes sont les plus étudiés des rhizobactéries en tant qu'inoculants bénéfiques, et comme des agents pathogènes (Nihorimbere et al., 2011).

Les exsudats racinaires influencent sélectivement la croissance des bactéries et les champignons qui colonisent la rhizosphère en modifiant la chimie du sol à proximité des racines des plantes et en servant de substrats de croissance sélectifs pour les micro-organismes du sol (Yang and Crowley, 2000). La composition des exsudats racinaires varie selon l'espèce végétale, le stade de développement, les conditions environnementales, la nutrition et type du sol (Zhalnina et al.,

2018). Ces composés attirent les microorganismes bénéfiques et influencent l'assemblage des microbiomes de la rhizosphère qui améliorent la capacité des plantes à s'adapter à leur environnement (Zhalnina et al., 2018). Sur la base des différences de rhizodéposition, de nombreux paramètres peuvent influencer la structure de la population, la diversité et l'activité de la communauté microbienne rhizosphérique dont les facteurs importants sont les espèces végétales et le type du sol (Grayston et al., 1998; Garbeva et al., 2008; Nihorimbere et al., 2011). Smalla et al. (2001) a rapporté que différentes espèces végétales sélectionnent différentes communautés bactériennes et que ces enrichissements spécifiques aux plantes peuvent être augmentés par la culture répétée de la même espèce végétale dans le même champ (Smalla et al., 2001).

#### **4. Les effets bénéfiques des rhizobactéries**

Les interactions plante-microbe peuvent être bénéfiques, neutres ou nocifs dépend du microorganisme impliqué, l'espèce végétale, et les conditions environnementales (Bais et al., 2006). Les interactions microbiennes bénéfiques pour les plantes peuvent être divisées en trois catégories ; les microorganismes en association avec les plantes et qui sont responsables de sa nutrition en augmentant l'apport des éléments minéraux à la plante, des micro-organismes qui stimulent indirectement la croissance des plantes en empêchant la prolifération des agents pathogènes, et un groupe de microorganismes qui améliorent directement la croissance des plantes (Welbaum et al., 2004; Nihorimbere et al., 2011).

Différents processus microbiens se déroulent dans la rhizosphère ; la pathogénèse, protection et promotion de la croissance des plantes, production d'antibiotiques, et les cycles géochimiques (Kent and Triplett, 2002).

Les microorganismes rhizosphériques peuvent avoir des effets bénéfiques sur les plantes, entraînent des changements importants dans la physiologie de la plante qui sont souvent liés à la croissance et au développement. Ils aident la plante à faire face aux contraintes environnementales par l'induction d'une résistance liée au stress (Smith et al., 2010; Pineda et al., 2013). L'ISR a été principalement étudiée contre les agents pathogènes microbiens, et elle est caractérisée par l'amorçage de la plante pour une activation plus efficace des réponses de défense régulées par les voies de signalisation JA/ET (Pozo et al., 2008; Pineda et al., 2013). Et la suppression des pathogènes par la compétition ou par la production d'antibiotiques et des

sidérophores (Pineda et al., 2013). Ces microbes bénéfiques peuvent également induire une tolérance de l'hôte aux différents stress dans le sol, tels que la présence de métaux lourds, une concentration de CO<sub>2</sub> élevée, la chaleur ou le stress lumineux, le manque de nutriments, la sécheresse et la salinité (Compant et al., 2010b; Ruiz-Lozano et al., 2012; Pineda et al., 2013).

### **5. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR)**

Les bactéries présentant dans la rhizosphère peuvent affecter la croissance des plantes positivement ou négativement (Donate-Correa et al., 2005). Le terme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) impliquent les bactéries qui exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes (Kloepper, 1978; Donate-Correa et al., 2005). Les bactéries favorisant la croissance des plantes ; PGPB (Bashan and Holguin, 1998), PGPR (Kloepper et al., 1980) sont des souches bactériennes isolées de divers environnements capables d'influencer positivement les paramètres de croissances et le rendement des plantes par une inoculation simple ou combinée (de-Bashan et al., 2012). Plusieurs PGPR ont la capacité d'améliorer la croissance des plantes et l'absorption des nutriments via divers méthodes (Bashan and Holguin, 1998; Saharan and Nehra, 2011a; Egambardieva and Lugtenberg, 2014; Agarwal et al., 2019). Les PGPR améliorent la croissance des plantes en conditions de stress biotiques et abiotiques (Agarwal et al., 2019). Cette stimulation inclue la lutte contre les pathogènes par la production de molécules actives tels que les sidérophores et les antibiotiques, l'allègement du stress, la production de régulateurs de croissance comme les auxines, les cytokinines, et les gibberellines, la solubilisation des minéraux, et la fixation de l'azote (Glick and Bashan, 1997; Bashan and Holguin, 1998; Lugtenberg and Kamilova, 2009; Compant et al., 2010a; Botta et al., 2013; Pagnani et al., 2018; Pace et al., 2020). Ces microorganismes d'associent avec presque toutes les espèces végétales (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Pagnani et al., 2018). Les mécanismes moléculaires liés aux changements induits par les PGPR sont mal connus, hors que (Agarwal et al., 2019) a montré que le traitement du riz par les PGPR a révélé une régulation différentielle d'un grand nombre de gènes liés au métabolisme énergétique, la défense, la résistance systémique induite, et la réponse aux stress environnementales. Les objectifs de l'agriculture actuelle est de réduire l'utilisation des engrais et de pesticides chimiques, et les remplacer par des alternatives respectueuses de l'environnement (Donate-Correa et al., 2005). Les effets bénéfiques de ces microorganismes leurs permettre d'être une alternative aux produits chimiques (Botta et al., 2013; Agarwal et al.,



2019). L'application des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) est une approche de fertilisation respectueuse de l'environnement (Bashan et al., 2014; Pagnani et al., 2020).

### 6. Les mécanismes d'action des PGPR

Les PGPR stimulent la croissance des plantes via des mécanismes directs et indirects (Glick, 1995; Olanrewaju et al., 2017). Les mécanismes directs incluent la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, la séquestration du fer par la production de sidérophores, la production de phytohormones telles que l'auxine (acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines, et la diminution de la concentration d'éthylène par l'activité de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (Idris et al., 2007; J. P. Verma et al., 2013; A. Kumar et al., 2014). Les mécanismes indirects font référence à la lutte contre les phytopathogènes, ACC désaminase, la production d'antibiotiques et des enzymes, et l'induction de la résistance chez les plantes (Olanrewaju et al., 2017).

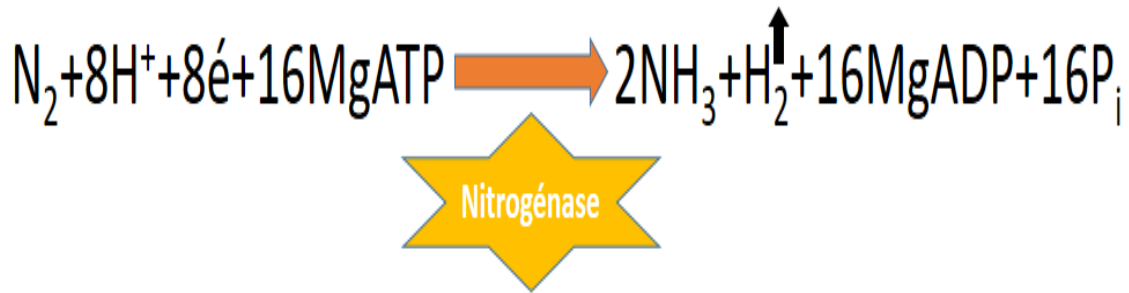
#### 6.1. Les mécanismes directs

##### 6.1.1. La fixation de l'azote

L'azote est un élément de base (fondamental) pour la croissance des organismes vivants y compris les plantes. La plupart est sous forme d'azote gazeux ( $N_2$ , 78% de l'atmosphère terrestre) pas assimilable par les plantes, et 27% se trouve dans les roches (<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2173-4.pdf> Nature, 580, pages 367–371 (2020)). La carence d'azote dans les sols conduit à l'utilisation de grandes quantités d'engrais azotés pour atteindre le rendement maximale des plantes (S. Zhang et al., 2015; Olanrewaju et al., 2017).

Les plantes reçoivent leur azote sous forme d'ammonium ( $NH_4^+$ ) et nitrate ( $NO_3^-$ ) (Lugtenberg et al., 2013). La conversion de l'azote atmosphérique en formes assimilables est connue sous le nom de fixation biologique de l'azote ou diazotrophie (Lugtenberg et al., 2013). Cette réaction est catalysée par le complexe enzymatique nitrogénase qui contient du molybdène-fer (Mo-Fe) comme cofacteur. Plusieurs bactéries diazotrophiques ont la capacité d'établir une relation symbiotique avec les plantes (Lugtenberg et al., 2013). La symbiose rhizobium-légumineuse

est considérée comme la principale source d'azote fixé (Vance, 2001; Van Loon, 2007; Lugtenberg et al., 2013).



Les Rhizobia et autres bactéries fixatrices d' $\text{N}_2$  ont des spécifiques gènes *nod* et *nif* codant les fonctions de nodulation et de fixation d'azote (Zehr and Turner, 2001; Lugtenberg et al., 2013). La symbiose fixatrice d'azote est initiée par la sécrétion des composants flavonoïdes ou isoflavonoïdes par les exsudats racinaires activant par la suite les gènes *nod* chez les bactéries (Van Loon, 2007). La réponse à ce dialogue moléculaire est la sécrétion par les bactéries des facteurs NOD qui sont des déterminants majeurs de la spécificité de l'hôte de la symbiose (Schlaman et al., 1998; Van Loon, 2007). La Perception spécifique des facteurs NOD par les plantes entraîne l'activation d'un ensemble de gènes végétaux conduisant à la formation de nodules racinaires dans lesquels la bactérie *Rhizobium* peut fixer l'azote atmosphérique (Geurts and Bisseling, 2002; Van Loon, 2007). La bactérie se développe aux dépends des glucides de l'hôte et fournit l'azote fixé pour la biosynthèse des acides aminés en retour (Brennic and Winans, 2005; Gray and Smith, 2005; Van Loon, 2007). Cette symbiose est un excellent exemple de relation intime entre une bactérie du sol et sa plante hôte, et illustre le concept de l'expression " rhizobactéries stimulant la croissance des plantes " (PGPR).

### 6.1.2. La solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est l'un des principaux macronutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes (Rodríguez and Fraga, 1999). La concentration de P soluble dans le sol est très faible (Goldstein, 1994). Plusieurs formes de P sont assimilées par les cellules, mais la grande partie est assimilée sous formes d' $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Beever and Burns, 1981). Les plus grandes réserves du phosphore sont les roches (Rodríguez and Fraga, 1999). Dans les

sols agricoles, une grande partie du phosphore s'est accumulée suite à l'application d'engrais phosphatés (Richardson, 1994; Rodríguez and Fraga, 1999). L'application fréquente d'engrais phosphatés est coûteuse et endommage les écosystèmes par la perte de fertilité des sols et l'eutrophisation (Yongbin Li et al., 2020). Cette source de P est rapidement immobilisée et devient indisponible pour les plantes (Rodríguez and Fraga, 1999). L'efficacité d'utilisation des engrais chimiques est inférieure à 30% en raison de la fixation du P par les ions métalliques libres dans le sol, et par le lessivage et le ruissellement qui entraînent également une perte d'engrais P (Sharma et al., 2013; Yongbin Li et al., 2020). Le sol contient une large gamme de substrats organiques, qui constituent une source de P pour la croissance des plantes. La minéralisation de la plupart des composés organiques du phosphore est réalisée avec les phosphatases (Rodríguez and Fraga, 1999). La principale source de l'activité phosphatase dans le sol est considérée comme d'origine microbienne (Xu and Johnson, 1995).

Les bactéries qui solubilisent le phosphate sont appelées bactéries solubilisant le phosphate (BSP) (Alori et al., 2017; Olanrewaju et al., 2017). Ils convertissent avec les mycorhizes le phosphate organique et inorganique sous une forme acceptable pour les plantes (Lugtenberg et al., 2013; Olanrewaju et al., 2017). Les principaux mécanismes pour la solubilisation du phosphate inorganique sont la libération des composés dissolvant les minéraux comme les ions hydroxydes, les acides organiques, les protons, les sidérophores, et le dioxyde de carbone (Rodríguez and Fraga, 1999; Rodríguez et al., 2006). Les acides organiques produits avec leurs carboxyles et les ions hydroxydes chélatent les cations ou abaissent le pH entraînant la libération du phosphore (Khan et al., 2009). L'utilisation des microorganismes solubilisants le phosphate comme inoculants augmente l'absorption du phosphore par les plantes et offrent une alternative qui minimise l'application d'engrais chimique en agriculture, et par conséquent améliore le rendement des cultures de façon biologique (Rodríguez and Fraga, 1999; Yongbin Li et al., 2020).

### **6.1.3. La production de sidérophores**

Le fer est un élément essentiel à la croissance, le métabolisme, et la survie des organismes, et est abondant dans les sols, hors que la concentration de ( $\text{Fe}^{3+}$ ) la forme disponible pour les plantes est faible (Lugtenberg et al., 2013).

Les sidérophores sont des petites molécules peptidiques qui ont un côté chaîne et groupes fonctionnels auxquels les ions ferriques peuvent se lier (Goswami et al., 2016; Olanrewaju et al., 2017). Ils ont une grande affinité aux ions  $Fe^{3+}$ , et servent de chélateurs et porteur de fer (Olanrewaju et al., 2017). Il existe suffisamment de preuves concernant l'absorption du fer par les plantes par les sidérophores microbiens, qui transforment la forme insoluble du fer en forme soluble (Sayyed et al., 2013). Les microorganismes producteurs de sidérophores réduisent la quantité du fer disponible pour les pathogènes, empêchant par conséquent la prolifération de ces derniers (Shen et al., 2013). Les PGPB synthétisent les sidérophores qui se lient avec la plupart des  $Fe^{3+}$  présentant dans la rhizosphère, l'efficacité de cette méthode de biocontrôle repose sur le fait que les sidérophores produites par les PGPB ont une grande affinité au fer comparé à ceux produits par les champignons pathogènes (Kloepper et al., 1980). Les activités de sidérophores comme chélateurs de fer ont été montrées dans différentes études (Sharma and Johri, 2003; Radzki et al., 2013). L'exploitation biotechnologique des sidérophores est de fournir à la plante la nutrition en fer, servent d'une première défense contre les parasites envahissant les racines et aident à éliminer les métaux toxiques des sols pollués (Sayyed et al., 2013).

### 6.1.4. La production de phytohormones

Les phytohormones sont des petites molécules contrôlant la croissance et le développement des plantes comme ; l'auxine, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique, , et l'éthylène (Maheshwari et al., 2015). La croissance et le développement des plantes sont régulées par les nutriments, les hormones, et autres métabolites. En fait, presque toute la communication dans les cellules végétales est apportée par les hormones produites par les cellules végétales ou par les rhizobactéries (Maheshwari et al., 2015).

Parmi les effets bénéfiques des PGPB sur la croissance des plantes est la production de phytohormones notamment les auxines (Olanrewaju et al., 2017). Environ 80% de microorganismes rhizosphériques ont la capacité de produire et libérer l'auxine comme métabolite secondaire, dont l'indole-3-acétique acide (IAA) est le plus pertinent (Patten and Glick, 1996; Spaepen et al., 2007). Les auxines ont un rôle dans la différenciation des tissus vasculaires, la division cellulaire, l'allongement des tiges et racines, et l'augmentation d'exsudats racinaires (Ali et al., 2010; Grobelak et al., 2015; Djebaili et al., 2020). L'IAA

produit par les bactéries peut soit stimuler le développement racinaire dans le cas où la concentration d'IAA dans les plantes est sous-optimale, ou inhiber le développement des racines dans le cas où le niveau d'auxine est déjà optimale (Spaepen et al., 2007). Ces phytohormones d'origine bactérienne améliorent la physiologie des plantes, notamment dans le processus de colonisation des racines par les bactéries lors de l'interaction plante-microbe (Maheshwari et al., 2015). Une grande similarité a été observée entre la voie de biosynthèse de l'IAA dans les plantes et des bactéries, le tryptophane a été identifié comme l'un des principaux précurseurs de la voie de biosynthèse d'IAA chez les bactéries (Maheshwari et al., 2015).

Les hormones de régulation de la croissance des plantes sont généralement appelées les gibbérellines (GA), elles sont impliquées dans différents processus physiologiques chez les plantes (Sponsel, 2003). Les gibbérellines ont un rôle dans l'élongation des tiges, la germination des graines, et la floraison, et dans l'amélioration du taux de la photosynthèse (Khan et al., 2015; Zaidi et al., 2015). L'absence de GB se traduit par une diminution de la longueur et le nombre des racines (Dodd et al., 2010). Le rôle de gibbérellines bactériennes est la stimulation de la croissance des plantes seule, ou en combinaison avec d'autres hormones (Maheshwari et al., 2015; Olanrewaju et al., 2017). Les cytokinines (CK) interviennent dans les réponses des plantes aux facteurs extrinsèques, tels que la lumière, la disponibilité des nutriments, et dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Maheshwari et al., 2015). Les cytokinines contrôlent la différenciation cellulaires chez les plantes (De Rybel et al., 2016). Elles régulent également la dominance apicale, l'allongement des racines, la germination des graines, la signalisation nutritionnelle ,et le développement des fleurs et fruits (Sakakibara, 2006). L'acide abscisique (ABA) est produit à une très faible concentration, il contrôle la respiration, le métabolisme cellulaire, et l'abondance des racines. L'ABA est impliqué dans la protection contre le stress, tel que la sécheresse, la salinité, et les métaux toxiques. L'acide abscisique induit la fermeture stomatique des feuille pour diminuer la perte d'eau (Maheshwari et al., 2015). Il augmente la croissance des plantes en régulant les concentration de cytokinine et l'abondance des racinaire (Maheshwari et al., 2011, 2015).

### **6.1.5. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

L'éthylène est une hormone gazeuse produite par la majorité des plantes (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020), elle est généralement considérée comme un inhibiteur de la

croissance des plantes, mais à des faibles concentrations, elle peut favoriser la croissance de plusieurs espèces végétales (Abeles et al., 1992; Pierik et al., 2006; Glick, 2014). L'éthylène contrôle diverses activités métaboliques chez les plantes. Leur biosynthèse est contrôlée par les changements environnementaux (Goswami and Suresh, 2020). L'augmentation de leur niveau dans les plantes est une réponse au stress (Barnawal et al., 2012). La surproduction de l'éthylène affecte le développement des racines et des pousses des plantes (Abeles et al., 1992; Brígido et al., 2015; Olanrewaju et al., 2017).

les PGPB absorbent une partie de tryptophane exsudée par les plantes et le convertir en IAA (Glick, 2014). L'acide indole acétique produit par les rhizobactéries est absorbé par les racines des plantes et est combiné avec l'IAA endogène. Ceci induit la transcription de l'ACC synthase, d'où la synthèse de l'éthylène. La présence de l'ACC désaminase chez les PGPB abaisse les niveaux d'éthylène lors d'une production élevée dans des conditions de stress (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020). Les PGPB exprimant l'ACC désaminase diminuent les niveaux de l'ACC chez la plante en le convertissant en  $\alpha$ -cétobutyrate et ammoniac, par conséquent, la production d'éthylène est abaissée, ce qui soulage l'inhibition de la croissance. Ainsi, les rhizobactéries contenant l'ACC désaminase peuvent augmenter la croissance des plantes en régulant les niveaux de l'ACC endogènes (Glick, 2005; 2014, Olanrewaju et al., 2017). L'activité de l'ACC désaminase est une caractéristique des rhizobactéries pour réguler les niveaux d'éthylène dans des conditions limitées (Glick et al., 1998; Anwar et al., 2016), elles peuvent améliorer la croissance des plantes en contrôlant les niveaux d'ACC chez la plante (Anwar et al., 2016). Cette caractéristique offre une régulation de la biosynthèse de l'éthylène, afin d'améliorer la croissance des plantes en conditions de stress, ce qui offre une alternative pour le développement durable des cultures (Misra and Chauhan, 2020).

## **6.2. Les mécanismes indirects**

### **6.2.1. Agents de biocontrol**

L'application de micro-organismes pour lutter contre les maladies des plantes est une approche respectueuse de l'environnement (Glick, 2012; Ahemad and Kibret, 2014). Plusieurs PGPR ont des activités antagonistic contre un large spectre d'agents pathogènes des plantes, notamment des bactéries, des champignons, des nématodes, des virus, et des insectes (Saharan and Nehra, 2011b; Antoun, 2013). La suppression des agents pathogènes par les PGPB inclut

## Revue bibliographique

---

une variété de mécanismes. ; la capacité à concurrencer avec succès les agents pathogènes pour les nutriments ou les niches spécifiques sur les racines, la production de sidérophores, la synthèse de métabolites antifongiques et antimicrobiens tels que les antibiotiques, les enzymes hydrolytiques, ou la production de substances volatiles comme le cyanure d'hydrogène (HCN), et la capacité d'induire une résistance systémique (ISR) chez les plantes (Quan et al., 2010. Bhattacharyya and Jha, 2012).

La rivalité entre les PGPB et les agents pathogènes peut limiter l'incidence et la gravité des maladies des plantes (Glick, 2012). La compétition pour les nutriments et les sites spécifiques sur les racines peut limiter la liaison des phytopathogènes aux plantes ce qui rend leur prolifération difficile (Barahona et al., 2011; Olanrewaju et al., 2017). Elad and Chet (1987) ont reporté le rôle de la compétition dans la lutte contre *Pythium aphanidermatum*. De même, l'occurrence de *Bacillus megaterium* dans l'amélioration de la croissance des plantes de tomates a été montré dans le travail de (Porcel et al., 2014).

Plusieurs PGPB ont la capacité de produire le cyanure d'hydrogène (HCN). La toxicité du HCN se traduit par sa capacité d'inhiber le cytochrome c oxydase ainsi que d'autres enzymes importantes (Nandi et al., 2017). Parfois les faibles niveaux d'HCN ne sont pas efficaces pour empêcher la prolifération des champignons phytopathogènes (Olanrewaju et al., 2017). Cependant la plupart des PGPB qui produisent de l'HCN peuvent également synthétiser certains antibiotiques ou enzymes hydrolytiques (Ramette et al., 2006). La production d'antibiotique est un mécanisme efficace pour lutter contre les effets délétères des phytopathogènes (Couillerot et al., 2009; Glick, 2012; Olanrewaju et al., 2017). Hors que l'utilisation accrue des souches productrices d'antibiotiques provoque une résistance aux antibiotiques spécifiques chez certains phytopathogènes (Glick, 2012; Olanrewaju et al., 2017). L'utilisation des souches productrices de cyanure d'hydrogène (HCN) ainsi qu'un ou plusieurs antibiotiques est une approche efficace pour faire face à ce problème. Bien que le cyanure d'hydrogène n'a pas beaucoup d'activité de contrôle biologique en soi, mais il semble agir en synergie avec les antibiotiques pour lutter contre le développement des pathogènes (Glick, 2012; Olanrewaju et al., 2017).

Plusieurs composés antifongiques, et antimicrobiens non volatiles sont produits par les PGPR comme les lipopeptides qui appartiennent au groupe de l'iturine, de la surfactine et de la

fengycine (Quan et al., 2010; Kim et al., 2015; Y. Wu et al., 2019). Les composés volatiles (COV) sont des composés de faible poids moléculaire qui s'évaporent facilement à température et pression normales (Y. Wu et al., 2019). Les COV ont la capacité d'inhiber la croissance et la germination des spores de plusieurs pathogènes fongiques des plantes (Tahir et al., 2017; Y. Wu et al., 2019). Elles peuvent également améliorer la croissance des plantes et induire une résistance contre les phytopathogènes (Y. Wu et al., 2019). Les PGPB peuvent être utilisées également pour la formulation d'un surnageant acellulaire (CFS). Les CFS sont des mélanges dérivés de cultures en bouillon par plusieurs procédés mécaniques et physiques qui permettent l'élimination des cellules. Les CFS et les métabolites des PGPB peuvent être utilisés pour inhiber les agents pathogènes microbiens du sol (Pellegrini et al., 2020b). Certaines bactéries de lutte biologique produisent des enzymes, notamment des chitinases, cellulases, protéases, et lipases qui peuvent lyser la paroi cellulaire de nombreux champignons pathogènes. La synthèse des enzymes hydrolytiques par les PGPB lutte contre la prolifération de plusieurs champignons pathogènes (Frankowski et al., 2001; Kim et al., 2008; Glick, 2012). Les enzymes comprennent la chitinase qui dégrade la chitine, la protéase, qui peut dégrader les protéines de la paroi cellulaire, et la lipase qui agit sur certains lipides associés à la paroi cellulaire, qui peuvent tous dans une certaine mesure lyser les cellules fongiques (Husson et al., 2017; Olanrewaju et al., 2017).

### 6.2.2. L'induction de la résistance chez les plantes

Les PGPR ont des effets bénéfiques sur la promotion de la croissance des plantes et le contrôle biologique des maladies. Leur utilisation est une stratégie efficace pour faire face aux effets délétères de stress biotique et abiotique (Bacilio et al., 2004; Grover et al., 2011; de-Bashan et al., 2012; Kim et al., 2012; Qin et al., 2016; Etesami and Beattie, 2017; Etesami and Maheshwari, 2018; Dastagir, 2019). Les plantes peuvent répondre à certains stress en activant des mécanismes de résistance limités à l'organe endommagé ou peuvent être disséminés de manière systémique dans toute la plante. Les effets bénéfiques des PGPB se traduisent par la production de molécules biologiquement actifs comme les antibiotiques et/ou par l'activation d'une résistance systémique induite (ISR) chez les plantes (Van Loon et al., 1998; Glick, 2004; Compant et al., 2005; Glick, 2010; Etesami and Maheshwari, 2018; Pagnani et al., 2018. Dastagir, 2019, Pagnani et al., 2020). Leur utilisation comme inducteur de la résistance



## Revue bibliographique

---

systemique chez les plantes a été largement démontrée (Wei et al., 1991, 1996; Viswanathan, 1999; Ramamoorthy et al., 2001; Halfeld-Vieira et al., 2006).

Les microorganismes pathogènes et non pathogènes induisent différents types de réponse de défense chez les plantes (Abdullah et al., 2017; Meena et al., 2020). La résistance induite est le renforcement des défenses des plantes en répondant à des stimulateurs biotiques ou abiotiques (Meena et al., 2020). Il y a deux formes de la résistance induite ; la résistance systémique acquise (ASR) et la résistance systémique induite (ISR) (Meena et al., 2020). Dans les deux formes, la réponse de défense des plantes est liée à une infection ou un traitement préalable, ce qui aide à développer une résistance contre une exposition ultérieure au même pathogène (Choudhary et al., 2007).

La résistance systémique induite (ISR) est une amélioration de la capacité défensive des plantes contre les agents pathogènes après une stimulation appropriée (Ramamoorthy et al., 2001). L'ASR est exprimée lorsque l'organisme inducteur provoque une nécrose (Cameron et al., 1994), hors que l'ISR induite par les PGPR ne provoque généralement aucun symptôme nécrotique sur les plantes hôtes (Van Loon et al., 1998). La ASR peut être induit par des agents biotiques comme les agents pathogènes virulents, et les non-pathogènes, et par des agents abiotiques comme l'acide salicylique (SA), l'éthylène, l'acide dichloro-isonicotinique, et le benzothiadiazole (Schisler et al., 1997; Ramamoorthy et al., 2001). Plusieurs PGPB ont la capacité de produire l'acide salicylique (SA) qui agit comme une molécule signal pour l'activation de la résistance systémique acquise ASR (Chen et al., 1999; Olanrewaju et al., 2017). Cependant, l'ASR est généralement induite par le phytopathogène en soi, et l'acide salicylique n'a pas généralement un rôle dans l'activation de la résistance des plantes (Olanrewaju et al., 2017).

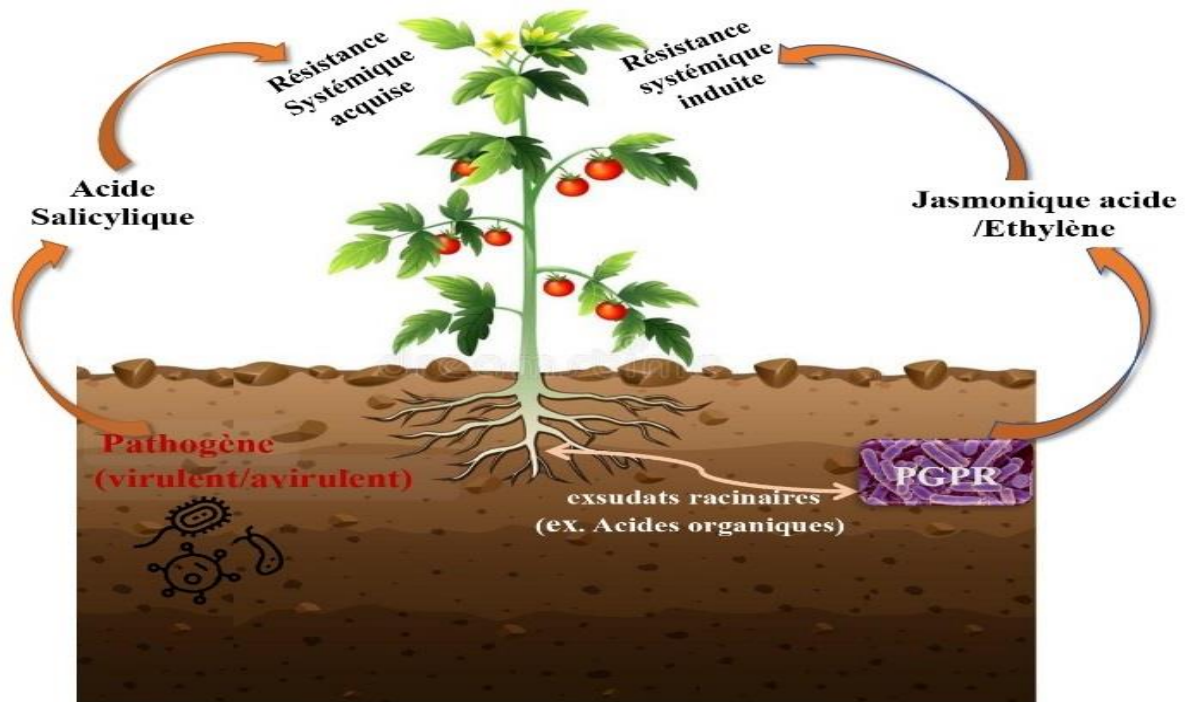


Figure1. L'induction de la résistance chez les plantes

L'ISR et l'ASR sont phénotypiquement semblables par la réduction de la gravité de la maladie causée par l'agent pathogène (Meena et al., 2020). Ils se différencient que par les composés de signalisation, l'acide salicylique (SA) est nécessaire pour l'activation de l'ASR qui est marquée par la surexpression des protéines liées à la pathogénèse (PR), et est généralement induite par des pathogènes biotrophes. Alors qu'une réponse à l'éthylène ou à l'acide jasmonique (JA) est essentielle pour l'expression de l'ISR qui n'implique pas de changements importants dans l'expression des gènes liés à la défense, mais plutôt un amorçage de la défense de la plante (Pieterse et al., 1998; Verhagen et al., 2004; Meena et al., 2020). L'ASR est induite par des agents pathogènes et des ravageurs tandis que l'ISR est médiée par des microbes bénéfiques vivant dans la rhizosphère (Meena et al., 2017). Il a été démontré que l'ISR induite par les PGPR est efficace pour réduire les attaques des pathogènes (Van Loon et al., 1998). Certains éliciteurs produits par les PGPR ont également un rôle dans l'activation de l'ISR (Van Loon et al., 1998; Van Loon and Bakker, 2005). Ces éliciteurs d'ISR peuvent être des composants de parois cellulaires (par exemple, lipopolysaccharides et flagelles) ou des métabolites (sidérophores et antibiotiques) (Van Loon and Bakker, 2005).

### 7. L'Utilisation des PGPR dans l'agriculture

#### 7.1. La biofertilisation

Les microorganismes capables de fixer le N<sub>2</sub>, solubiliser le phosphate, et / ou produire des sidérophores sont classés comme des biofertilisants, car ils augmentent la disponibilité des nutriments pour les plantes (Lugtenberg et al., 2013). Les bactéries fixatrices d'azote peuvent former des nodules sur les racines des plantes, en transformant le N<sub>2</sub> en ammoniac pour être utilisé par la plante comme une source d'azote (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Plusieurs PGPB ont la capacité de solubiliser le phosphate lié organique et inorganique en formes solubles pour les plantes (Lipton et al., 1987). L'utilisation des microorganismes comme inoculants en agriculture améliore la croissance et le rendement des plantes en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs (Singh et al., 2019). Les interactions bénéfiques des plantes avec les microorganismes du sol représentent une alternative durable des engrais chimiques pour améliorer le rendement des cultures (Timmusk et al., 2017; Singh et al., 2019). L'utilisation des PGPB comme biofertilisant est une méthode efficace pour augmenter la productivité agricole (Vejan et al., 2016). Plusieurs bactéries ont été utilisées comme biofertilisant ; *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, etc. comme a été rapporté par plusieurs auteurs (Saubidet et al., 2002; Kloepper et al., 2004; Rajkumar and Freitas, 2008; Rojas-Tapias et al., 2012; Ajay Kumar et al., 2014; Djebaili et al., 2020; Pagnani et al., 2020).

#### 7.2. La bioremédiation

Les rhizobactéries qui ont la capacité de dégrader des polluants en utilisant les exsudats racinaires comme source de nutriment peuvent être utilisés pour protéger les plantes dans les sols contaminés. La souche, *P. putida* PCL1444, utilise efficacement l'exsudat racinaire, dégrade le naphthalène autour de la racine, et empêche les graines d'être tuées par le naphthalène et permet à la plante de croître normalement comme décrit dans le travail de (Kuiper et al., 2001).

La transformation microbienne des composés organiques est probablement facilitée par l'abondance d'énergie fournie dans les exsudats racinaires (Bashan et al., 2008). Ces microorganismes améliorent la disponibilité des nutriments pour les plantes, et réduisent la contamination des sols (Bashan et al., 2008; Santra et al., 2015). Ils sont également connus pour

produire des biosurfactants qui peuvent faciliter l'élimination des polluants organiques (Bashan et al., 2008). Les PGPR améliorent la croissance et la productivité des cultures et protègent les plantes de la toxicité des métaux lourds (Guo and Chi, 2014; Islam et al., 2016). L'inoculation bactérienne sous contamination métallique réduit souvent l'absorption du métal et sa translocation par les racines aux pousses, ce qui entraine moins d'accumulation de métal dans les parties aériennes par rapport aux plantes non inoculées (Islam et al., 2016).

### 7.3.La bioprotection

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes jouent un rôle crucial dans la croissance et le rendement des cultures, ainsi leur protection contre les différents stress biotiques et abiotiques (Khabbaz et al., 2019). Plusieurs rapports ont rapporté que l'inoculation par les PGPR améliorent la croissance des plantes, en faisant disponible les nutriments, améliorent l'absorption d'eau, et le statut hydrique des feuilles dans des conditions de stress hydrique (Naveed et al., 2014; Rai et al., 2020), la salinité (Gond et al., 2015; Singh and Jha, 2016; Barnawal et al., 2017), l'élévation de la température et la sécheresse (Da Jeong Shin et al., 2019).

Les PGPR peuvent être utilisés comme agents de lutte biologique pour contrôler les ravageurs des plantes et les phytopathogènes (Rai et al., 2020). Le traitement par les PGPB s'est avéré efficace dans la gestion des maladies fongiques, bactériennes et virales de plusieurs cultures (Khabbaz et al., 2019). Elles agissent contre de nombreux agents pathogènes du sol ; *Aphanomyces* sp., *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* sp., *Sclerotium rolfsii*, et *Thielaviopsis basicola* (Weller, 1988; L. Zhang et al., 2015; Khabbaz et al., 2015, 2019) . Le contrôle biologique est une alternative aux pesticides pour contrôler les phytopathogènes (Compant et al., 2005). L'application des PGPB dans le domaine agricole est durable et non toxique. Elles peuvent limiter les dommages causés par les pathogènes par différents mécanismes (Singh et al., 2019). Les PGPB font partie des alternatives appropriées qui ont été exécutées comme agents de promotion de la croissance et de lutte biologique (Kumar et al., 2017; Singh et al., 2019).

### 8. Les actinomycètes

#### 8.1. Définition et caractéristiques principales

Les actinomycètes sont des bactéries sporogènes à Gram positif, ayant une teneur en G+C élevée dans leur génome, elles appartiennent à l'ordre des actinomycétales caractérisées par une croissance de mycélium de substrat et aérien (Lechevalier and Lechevalier, 1967; Bhatti et al., 2017). ce sont des organismes chimio-hétérotrophes généralement aérobies présentant des filaments, ou hyphes, qui ressemblent à des mycéliums fongiques, mais de plus petit diamètre (environ 0,5 à 2  $\mu\text{m}$ ) (Pepper, 2019). Ils produisent des spores asexuées appelées conidies. Les actinomycètes en particulier le genre *Streptomyces* sont des organismes saprophytes, formant des spores semi-dormantes dans les conditions limitées en éléments nutritifs (Mayfield et al., 1972; Barka et al., 2016). Elles sont omniprésentes dans les sols, l'eau douce et salée, et dans l'air, mais elles sont plus abondantes dans les sols que les autres milieux, en particulier dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique, où elles constituent une partie importante de la population microbienne (Barka et al., 2016). Leur densité dans les sols est généralement dans l'ordre de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme de sol, dont le genre *Streptomyces* est le plus dominant (plus de 95% des souches Actinomycetales isolées du sol) (Williams and Vickers, 1988; Pepper, 2019). Les actinobactéries sont majoritairement mésophiles, avec une croissance optimale à des températures comprises entre 25 et 30 ° C. Cependant, Les actinobactéries thermophiles peuvent se développer à des températures allant de 50 à 60 ° C (Barka et al., 2016). Ce sont les organismes les plus abondants qui forment des filaments dispersés dans le sol (Lechevalier and Lechevalier, 1967; Barka et al., 2016; Bhatti et al., 2017).

Les actinomycètes ont été l'une des sources les plus prolifiques de nouveaux antibiotiques, (Genilloud, 2017). Elles jouent un rôle majeur dans le cycle de la matière organique, l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes, et la décomposition des polymères complexes entraînant la production de nombreuses enzymes extracellulaires qui sont conductrices de la production végétale (Bhatti et al., 2017).

Une caractéristique distinctive de ce groupe de bactéries est qu'elles sont capables d'utiliser une grande variété de substrats trouvés dans le sol, en particulier certains insectes moins dégradables et des polymères des plantes tels que la chitine, la cellulose et l'hémicellulose, et ils ont un rôle fondamental dans le sol car ils contribuent à la stabilisation de la substance organique et à sa

transformation en humus. Comme toutes les bactéries, les actinomycètes sont des organismes procaryotes (Gasmi, 2017; Pepper, 2019). Les actinomycètes peuvent métaboliser une grande variété de substrats organiques, y compris les composés organiques qui ne sont pas facilement métabolisés comme les phénols et les stéroïdes, Elles sont responsables de l'odeur terreuse d'un sol sain fraîchement transformé due à la géosmine, un composé produit par actinomycètes (Procópio et al., 2012).

### 8.2. Ecologie des actinomycètes

Le sol est très riche en diverses populations microbiennes, et parmi elles, les actinomycètes forment une partie importante de la communauté microbienne du sol. Les actinomycètes ont été considérées comme l'un des groupes influents parmi la population microbienne du sol (Das et al., 2008; Javed et al., 2020). Les actinomycètes les plus dominants dans le sol sont les *Streptomyces*. Cependant, autres membres comme *Nocardia*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes*, et *Streptosporangium* ont également été isolés du sol (Javed et al., 2020).

Les actinomycètes sont un groupe écologiquement diversifié, se trouvent dans des écosystèmes terrigènes, marins, et aquatiques et dans les environnements aériens et extrêmes (Stevens et al., 2007; Kurtböke, 2017). Elles sont capables d'occuper une large gamme d'environnements et de niches (Prudence et al., 2020). Allant des sédiments marins, zones humides, des sols hyperarides du désert, les forêts, et sous terres dans les systèmes des grottes (Küster and Williams, 1964; Benhadj et al., 2019; Kalyani et al., 2019; Long et al., 2019; Millán-Aguñaga et al., 2019; Srivastava et al., 2019). Elles sont associées également à un organisme hôte, formant des relations symbiotiques avec plusieurs organismes vivants (Prudence et al., 2020) tels que les éponges marines, les tuniciers (Hentschel et al., 2003; Lee et al., 2001), les fourmis (Poulsen et al., 2005) et les termites (Kurtböke et al., 2014). Elles sont également associées par des relations endophytes et actinorhiziennes avec les plantes et les mycorhizes (Kurtböke, 2017).

Les actinomycètes ont été créés il y a environ 270 millions d'années. Ils sont longtemps considérées comme des organismes du sol, mais il est désormais établi qu'ils sont présents dans toutes sortes d'environnements et d'habitats sur toute la terre (Williams, 1990; Javed et al., 2020). Divers facteurs influencent les activités des actinobactéries dans les sols, tels que la

température, le pH, le type du sol, la zone géologique, l'humidité, la végétation du sol ,et le climat (Flowers and Williams, 1977; Pathom-Aree et al., 2006; Kurtböke, 2017; Javed et al., 2020). Il a également été démontré que les pesticides et les herbicides exercent une influence sur les populations d'actinobactéries. Elles peuvent être affecter négativement ou positivement en utilisant ces produits chimiques comme substrats de croissance (Bachofer et al., 1973). Les spores peuvent être dispersées au-dessus du sol lorsque les agrégats du sol sont perturbés par la pluie ou le vent (Lloyd, 1969; Kurtböke, 2017). Hors que leurs dispersion dans les sols est affectée par les mouvements de l'eau et les arthropodes (Kurtböke, 2017). Les actinomycètes constituent la composante importante de la microflore du sol, bien que leur nombre dans les sols gorgés d'eau, anaérobies, et acides a été signalé comme étant inférieur (Goodfellow and Williams, 1983). Dans les sols relativement secs, humiques et calcaires, les actinobactéries forment les fractions dominantes (Goodfellow and Williams, 1983). Les analyses moléculaires ont montré la présence des membres non cultivables d'actinobactéries dans différents environnements et lieux géographiques y compris les environnements marins et terrestres (Stach et al., 2003).

Les actinomycètes sont des organismes saprophytes, responsables de l'odeur spécifique de terre en raison de la production de géosmine, telles que *Streptomyces*, *Micromonospora*, et *Thermoactinomyces* (Javed et al., 2020). Elles ont la capacité de décomposer plusieurs polymères complexes dans les sols, la litière, et les composts comme l'amidon, la chitine, la pectine, cellulose, hémicelluloses, et lignocelluloses (Goodfellow and Williams, 1983; Mahmoud, 2015; Gasmi et al., 2019). Avec ces activités, elles deviennent une partie intégrante du recyclage des matériaux et l'élimination des déchets dans les environnements (Crawford, 1988).

### 8.3. Biologie du développement

Les actinomycètes sont un groupe de bactéries filamenteuses unicellulaires ramifiées, Leur morphologie est semblable à celle des champignons car elles forment des filaments ramifiés (hyphes) et des spores asexuées, cette ressemblance résulte en partie de l'adaptation au même habitat (Sharma et al., 2014). Cependant, contrairement aux vrais champignons, les actinomycètes ont des hyphes minces (0,5 à 1,5µm de diamètre) avec du matériel génétique enroulé à l'intérieur sous forme d'ADN libre. La paroi cellulaire des hyphes est constituée d'un

polymère réticulé contenant de courtes chaînes d'acides aminés et de longues chaînes de sucres aminés. En général, les actinomycètes n'ont pas d'organites cellulaires liés à la membrane. Les actinomycètes sont caractérisées par une structure filamenteuse en bâtonnets, coccus, et la présence de protubérances latérales (Bhatti et al., 2017).

Les actinomycètes se reproduisent soit par fission, soit au moyen de spores ou de conidies spéciales. Les hyphes sont généralement non septiques. Le mycélium sporulant peut être ramifié ou non, droit ou en forme spirale. Les spores sont sphériques, cylindriques ou ovales. Elles produisent des microcolonies initiales composées de filaments ramifiés qui après 24 à 48 h se fragmentent en formes dipthéroïdes à chaîne courte et coccobacillaires (Manulis et al., 1994). La paroi cellulaire des actinomycètes est d'une structure rigide qui maintient la forme de la cellule et empêche l'éclatement de celle-ci en cas d'une pression osmotique élevée (Goodfellow et al., 1998). Les *Streptomyces* forment des endospores qui se comportent de manière similaire à celles de *Bacillus* (Kalakoutskii and Agre, 1973; Sharma et al., 2014). Les spores d'actinomycètes sont formées soit par subdivision d'hyphes existants par fragmentation ou gonflement, soit par formation de pores endogènes. Les hyphes qui se subdivisent en spores peuvent être sans gaine ou avoir une gaine, qui restent en partie dans les spores après la fragmentation (Sykes and Skinner, 1973; Reponen et al., 1998). Cela conduit à trois types principaux de spores : les arthrospores (subdivision de l'hyphe gainé), les aleuriospores (subdivision de l'hyphe sans gaine), et les endospores. L'importance des différences dans la structure des spores n'est pas encore connue, mais on s'attend à ce que ces différences entraînent des multitudes dans le comportement et la survie de ces spores (Reponen et al., 1998).

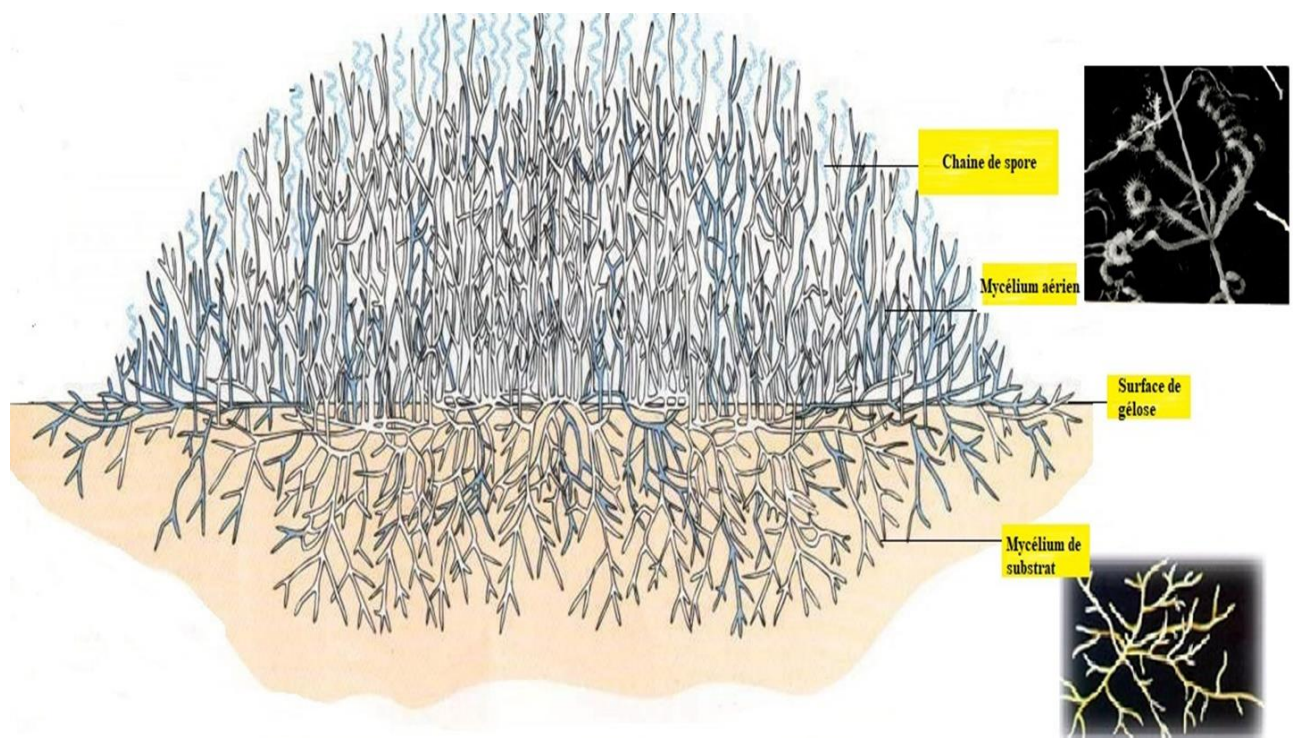
#### **8.4. Le mycélium du substrat et le mycélium aérien**

Le mycélium de substrat (mycélium végétatif ou mycélium primaire) se développe dans le substrat ou bien à la surface du milieu de culture. La fonction principale du mycélium primaire est l'absorption de nutriments pour la croissance des actinobactéries. Sous microscope, les mycéliums de substrat apparaissent minces, transparents, foncés et plus ramifiés que les hyphes aériens. Les hyphes simples ont une épaisseur d'environ 0,4 à 1,2 $\mu$ m, capables de développer des branches, ou des groupes minoritaires (comme *Nocardia*) (Li et al., 2016). Les hyphes de substrat se fragmentent souvent *in situ* en éléments coccoïdes, en éléments non mobiles, et en forme de bâtonnets lorsqu'ils atteignent un certain stade (Li et al., 2016). Les



## Revue bibliographique

mycélium primaires sont blancs, jaunes, oranges, rouges, verts, bleus, violets, marrons, noirs et d'autres couleurs; certaines hyphes peuvent produire des pigments hydrosolubles ou liposolubles. Le pigment soluble dans l'eau peut s'infiltrer dans le substrat et colorer le milieu de culture. Le pigment non hydrosoluble (ou liposoluble) fait de la colonie avec la couleur correspondante (Kalakoutskii and Agre, 1976; Li et al., 2016). La couleur du mycélium de substrat et s'il y a des pigments solubles fournissent des références importantes dans la détermination de nouvelles espèces (Kalakoutskii and Agre, 1976).



**Figure 2.** Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulants.

(Barka et al., 2016)

Lorsque les hyphes du mycélium de substrat arrivent à un certain stade et poussent dans l'air, elle donne ce qu'on l'appelle le mycélium aérien. Parfois, les hyphes aériens et les mycéliums du substrat sont difficiles à se distinguer. Les hyphes du mycélium aérien sont caractérisés par une gaine fibreuse, à l'exception des genres *Pseudonocardia* et *Amycolata* (Wildermuth et al., 1971; Kalakoutskii and Agre, 1976; Warwick et al., 1994 ). La formation de toutes sortes d'hyphes aériens chez les actinobactéries est liée à l'espèce, les conditions nutritionnelles, et les

facteurs environnementaux (Wildermuth et al., 1971). Dans certains cas, le mycélium aérien peut se développer dans la chaîne de spores de forme supérieure ce qui donne des hyphes reproducteur de spores (Li et al., 2016).

### 8.5 Des structures particulières

Certains actinomycètes forment des structures qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores, dont la fonction est encore méconnue, comme les sclérotés, les sporanges, et les synnemata (Kitouni, 2007; DJABALLAH, 2010). Les sclérotés caractéristiques du genre *Chainia* sont constituées d'une masse d'hyphes cloisonnée dont les vacuoles sont chargées de glycérides et d'acides gras ramifiés (Kitouni, 2007; DJABALLAH, 2010).

Les sporanges sont une structure en forme de sac, dans laquelle les spores sont développées et maintenues ensemble jusqu'à ce qu'elles soient libérées, laissant généralement une enveloppe sporangiale vide. Les sporanges varient considérablement à la fois en terme de taille et de forme. Elles proviennent des hyphes de substrat ou des hyphes aériens. Les sporanges avec peu de spores sont appelées oligosporeux. Les sporanges contenant de nombreuses spores sont appelés polysporeux. De plus les genres sporangiés produisent des spores mobiles, à l'exception du *Streptosporangium* et de *Kutzneria* (Li et al., 2016). Les Actinosynnema se différencient en mycélium de substrat à longue ramification d'hyphes qui pénètrent dans la gélose formant des synnémates (Li et al., 2016). Les synnemata ou corémies correspondent aux amas d'hyphes qui fusionnent parfois et portent des conidies latérales ou apicales (Kitouni, 2007; DJABALLAH, 2010; Li et al., 2016).

### 8.6. La formation des spores

Les spores formées par les actinomycètes appartiennent à deux groupes ; endogènes et exogènes, selon le mode de leur formation. Elles suivent essentiellement le même processus que celui pour la formation des spores dans d'autres bactéries à Gram-positives (Kalakoutskii and Agre, 1976).

Les spores de la plupart des actinomycètes se forment de manière exogène (Kalakoutskii and Agre, 1976). Les étapes initiales de la formation des spores chez les actinomycètes incluent la division de la paroi hypale parentale en deux couches. Les régions proto-plasmiques enveloppées par la couche interne de la paroi hypale deviennent alors con-densifiées, laissant

un espace transparent aux électrons entre les parois sporangiales et sporales. Les spores, en forme de sporanges sont libérées dès que la paroi sporangiale (portant une surface gaine caractéristique du mycélium aérien des actinomycètes) est cassée. La jeune colonie est constituée d'un réseau de mycéliums d'apparence uniforme, qui comprend le mycélium de substrat. Les hyphes aériens se développent directement à partir du mycélium de substrat supérieur et la sporulation commence peu de temps après l'apparition des premiers hyphes aériens. Plus tard, de nouveaux hyphes aériens se développent sur cette première zone de sporulation et sporulent. Ces vagues de sporulation se poursuivent plusieurs fois. Finalement, la colonie mature contient des hyphes végétatifs dont la plupart étaient lysés, des hyphes aériens qui n'avaient pas sporulé, et des chaînes de spores. Une observation surprenante était la germination occasionnelle apparente d'une spore dans une chaîne nouvellement développée de spores (Ensign, 1978).

Les endospores sont produites par les actinomycètes thermophiles, et sont semblables morphologiquement et chimiquement à celles des Bacillaceae, elles contiennent une paroi externe épaisse multicouche et résistante qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique le cytoplasme, le ribosome et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique (Kitouni, 2007). Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*.

### 8.7. La germination des spores

Elle correspond aux changements morphologiques de la spore en structure végétative. Plusieurs étapes ont été décrites : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et la croissance (DJABALLAH, 2010). La plupart des études sur la germination des spores de *Streptomyces* ont défini la germination comme la période conduisant à l'émergence visible des tubes germinatifs. Cette terminologie coïncide avec la définition de la germination des spores fongiques mais diffère de la terminologie courante utilisée pour les spores de *Bacillus*. Chez les bacilles, la germination fait généralement référence à la période de perte de la réfractilité lorsque les spores sortent de la dormance (Ensign, 1978).

## 9. La taxonomie des actinomycètes

Avant l'avènement des méthodes moléculaires, les actinobactéries étaient principalement classées à l'aide de propriétés chimiotaxonomiques, morphologiques et

physiologiques. Le développement des méthodes de séquençage d'ADN a énormément contribué à améliorer la classification de ces bactéries en groupes phylogénétiques fortement apparentés (Trujillo, 2008). Sur la base des séquences génétiques de l'ARNr 16S, les actinomycètes et les bactéries Gram-positives unicellulaires à forte teneur en G+C sont désormais classées dans le domaine Bactéries sous le phylum Actinobacteria (Trujillo, 2008; Barka et al., 2016).

Les actinobactéries représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques. Le phylum Actinobacteria contient une classe Actinobacteria qui est très grande et complexe et est divisée en 4 sous-classes, 5 ordres, 14 sous-ordres et 51 familles avec plus de 230 genres et de nouvelles espèces constamment décrites (Barka et al., 2016). Les genres de ce phylum présentent une énorme diversité en termes de morphologie, physiologie et capacités métaboliques. La taxonomie des actinobactéries a considérablement évolué au fil du temps avec l'accumulation des connaissances (Barka et al., 2016). L'ordre Actinomycetales, créé par (Buchanan, 1917) appartient à ce groupe des organismes procaryotes. Le phylum Actinobacteria est délimité sur la base de son position de ramification dans les arbres génétiques de l'ARNr 16S. Cependant, les séquences d'ARNr ne distinguent pas bien les espèces étroitement apparentées ou même des genres, ce qui peut créer une ambiguïté. Une taxonomie mise à jour du phylum Actinobacteria qui est basée sur des arbres ARNr 16S a été récemment signalée (Ludwig et al., 2012). Cette mise à jour élimine les rangs taxonomiques des sous-classes et des sous-ordres (Gao and Gupta, 2012). Le phylum est ainsi divisé en six classes : Actinobacteria, Acidimicrobia, Coriobacteria, Nitriliruptoria, Rubrobacteria et Thermoleophilia. La classe Actinobacteria contient 16 ordres. L'ordre Actinomycetales est désormais limité au membres de la famille Actinomycetaceae, et les autres sous-ordres qui faisaient auparavant partie de cet ordre sont maintenant désignés distincts (Zhi et al., 2009; Gao and Gupta, 2012).

### **9.1.La classification morphologique**

La morphologie microscopique et la chimiotaxonomie sont les principales caractéristiques utilisées pour délimiter la taxonomie des actinobactéries au niveau du genre et de l'espèce. La composition de la paroi cellulaire, la distribution des sucres dans l'ensemble de la cellule, la composition des phospholipides, le type de ménaquinone, et la reproduction végétative puissent également être envisagés. Cependant, les actinobactéries ont un mode de vie principalement

mycélien se reproduisent généralement en formant des spores asexuées. Les actinobactéries présentent une grande variété de morphologies, qui diffèrent principalement par la présence ou l'absence d'un mycélium de substrat, le mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production des pigments mélanoides diffusibles, et la structure et l'aspect de leurs spores (Labeda, 1987; Mohammadipannah and Dehghani, 2017; Salam et al., 2020).

### 9.2. La classification chimiotaxonomique

La chimiotaxonomie est l'utilisation de la distribution des composants chimiques et leur caractéristiques pour la classification et l'identification des bactéries, y compris les actinobactéries en fonction des similitudes de leurs chimies cellulaires (Goodfellow and Minnikin, 1985; Wang and Jiang, 2016). Les composants chimiques les plus couramment utilisés dans cette systématique sont les acides aminés de la paroi cellulaire, les lipides, les protéines, les ménaquinones, les types d'acide muramique, les sucres et la composition de base de l'ADN (Goodfellow, 1989).

L'analyse de la composition de la paroi cellulaire des actinobactéries est taxonomiquement intéressante dans la distinction entre les sous-ordres (Berd, 1973; Barka et al., 2016; Wang and Jiang, 2016). La composition de peptidoglycane dans la paroi cellulaire et l'analyse de la composition des sucres est importante pour la classification des actinomycètes et la discrimination entre les groupes d'actinobactéries. Les profils d'acides gras cellulaires sont également des indicateurs chimiotaxonomiques très utiles pour l'identification d'actinobactéries (Kroppenstedt, 1985). Les acides gras bactériens varient en longueur de chaîne de deux (C2) à plus de 90 (C90) atomes de carbone, mais seulement ceux dans la gamme de C10 à C24 ont une valeur taxonomique particulière (Kroppenstedt, 1985; Goodfellow and O'Donnell, 1993). Trois majeurs types de profils d'acides gras ont été identifiés chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985; Barka et al., 2016; Wang and Jiang, 2016). L'analyse des Ménaquinones fournit des informations précieuses pour la classification des *Actinomadura*, *Microtetraspora*, et les *Streptomyces* (Collins et al., 1988; Kroppenstedt et al., 1990). Différents types de phospholipides sont distribués de manière discontinue dans les membranes cytoplasmiques des actinomycètes, fournissant des informations pour la classification et l'identification des genres d'actinomycètes (Kroppenstedt, 1985; Tindall et al., 2006).

### 9.3. La classification moléculaire

La classification morphologique et chimique des actinomycètes a été contestée par la taxonomie moléculaire, dont une grande partie a été obtenue grâce aux progrès rapides de séquençage de génome (Zhi et al., 2009). Le séquençage de génome a résolu un débat sur la relation de ce groupe avec le genre *Streptomyces* et a démontré de manière concluante qu'il s'agit en fait d'un genre distinct (Ichikawa et al., 2010; Girard et al., 2014). Des critères de composition moléculaire et chimique ont été utilisés pour grouper l'ordre Actinomycetales en 14 sous-ordres : Actinomycineae, Actinopolysporineae, Catenulisporineae, Corynebacterineae, Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Kineosporineae, Micrococcineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae et Streptosporangineae (Euzéby, 1997). De plus, le séquençage des gènes de l'ARNr 16S a conduit à la reconnaissance de 39 familles et 130 genres (Mohammadipanah and Dehghani, 2017).

#### 9.3.1 Le séquençage du gène de l'ARNr 16S

L'analyse des gènes dans l'ARNr 16S est une approche préférable pour la classification des isolats bactériens, et a été considérée comme un marqueur moléculaire important dans la taxonomie des procaryotes en raison de son caractère universel, relativement stable et hautement conservé (Mohammadipanah and Dehghani, 2017; Nouioui et al., 2018). La valeur de similarité du gène de l'ARNr 16S a été suggérée de 97% pour la délimitation des nouvelles espèces (Stackebrandt and GOEBEL, 1994), mais récemment une valeur seuil de 98,7 à 99% a été proposée pour différents ordres (Stackebrandt, 2006). Cependant, le gène de l'ARNr 16S présente également des limites en tant que marqueur moléculaire par des variations nucléotidiques entre plusieurs opérons d'ARNr et la possibilité d'un transfert horizontal entre les gènes (Ramasamy et al., 2014; Nouioui et al., 2018).

#### 9.3.2 L'analyse phylogénétique

Des investigations phylogénétiques détaillées sur les actinobactéries ont ainsi été réalisées en utilisant des séquences d'ARNr 16S (Ludwig and Klenk, 2005; Zhi et al., 2009; Adékambi et al., 2011). La phylogénie des actinobactéries implique des marqueurs moléculaires alternatifs et des séquences protéiques (par exemple, RecA, RpoB, GyrB, DnaK, GrpE, GroEL, et CTP synthase, etc.) pour examiner la phylogénie des actinobactéries. Mais ces études étaient

souvent limitées à des taxons particuliers (par exemple, Mycobactéries ou *Bifidobacterium*, et les membres de *Streptomyces*) (Shivannavar et al., 1996; Blackwood et al., 2000; Devulder et al., 2005; Ventura et al., 2007; Guo et al., 2008). L'analyse phylogénétique par la combinaison de différents gènes entraîne une augmentation remarquable de la robustesse de l'arbre phylogénétique du genre *Mycobacterium* (Devulder et al., 2005).

### 9.3.3. L'hybridation ADN-ADN

Les méthodes d'hybridation ADN/ADN ont été introduites depuis les années 1960, afin d'évaluer la parenté taxonomique des bactéries (Mohammadipanah and Dehghani, 2017). Une valeur d'hybridation de 70% a été présentée comme norme de coupure pour la délimitation des espèces (Wayne et al., 1987). Cette méthode exige la comparaison entre l'ADN génomique (ADNg) de la bactérie test et l'ADNg de la bactérie de type souche, la dissociation des deux brins d'ADN et des fragments d'ADN, et le ré-annelage des fragments par température en déclin (Auch et al., 2010). Les valeurs d'hybridation  $\leq 70\%$  sont considérées comme une indication que l'organisme testé appartient à une espèce différente aux souches types utilisées comme références (Wayne et al., 1987; Auch et al., 2010).

### 9.3.4. Le séquençage du génome entier

Actuellement, le séquençage complet du génome est considéré comme un outil puissant dans la systématique des procaryotes. Parmi les espèces Actinobactériennes, *M. tuberculosis* a été séquencée pour la première fois en 1998 (Cole et al., 1998). Les actinobactéries ont un génome à la fois circulaire et linéaire. La plupart des génomes actinobactériens présentaient des formes circulaires de génome, tandis que dans certains genres comme *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Amycolatopsis*, *Actinoplanes*, *Streptoverticillium* et *Micromonospora*, les génomes étaient linéaires (Redenbach et al., 2000).

### 9.3.5. L'analyse phylogénétique du génome entier

Actuellement, l'analyse phylogénétique du phylum Actinobacteria est basée sur le gène de l'ARNr 16S et des gènes individuels dans le cas des groupes particuliers. Cependant, la phylogénie monogénique semble instable et ne peut pas refléter la véritable histoire évolutive des groupes complexes (Alam et al., 2010). En revanche, l'analyse phylogénique basée sur le génome entier montre une résolution plus élevée des branches internes au niveau de l'espèce et

élimine les restrictions abordées dans l'analyse taxinomique à un seul gène. Parmi les méthodes utilisées, la phylogénie sans alignement s'est avérée robuste et fiable pour les études phylogénétiques de phylum Actinobacteria (Alam et al., 2010; M. Verma et al., 2013).

### 9.3.6. Le typage moléculaire

- **Électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE)**

Cette technique repose sur la séparation des gros fragments d'ADN obtenus par des enzymes de restriction. La PFGE a été couramment utilisée pour le génotypage et la prise d'empreintes génétiques, en particulier dans les études épidémiologiques de bactéries pathogènes (Besser, 2015). La PFGE a également été montrée comme une technique fiable et reproductible dans le typage des bactéries non pathogènes. Cette méthode a été utilisée pour retracer l'histoire évolutive et l'évaluation de la diversité chromosomique ou de la similitude au sein d'Actinomycetales (Ventura et al., 2007). Cette technique a été appliquée pour la différenciation des espèces de *Nocardia* cliniquement importantes afin de contrôler la propagation des maladies nocardiques (Blümel et al., 1998). Des isolats cliniques de souches de *Mycobacterium* impliquées dans des épidémies courantes (*M. abscessus*, *M. chelonae* et *M. fortuitum*) ont été étudiés pour leurs profils dans les PFGE en utilisant des endonucléases de restriction (Zhang et al., 2004; Besser, 2015).

- **Typage de séquence multilocus (MLST)**

Le typage de séquence multilocus (MLST) est une technique moléculaire pour la caractérisation d'espèces bactériennes à l'aide des variations dans des fragments de gènes internes. Cette approche peut aider à l'identification et à la classification de certains genres dans la sous-classe Actinobacteridae, y compris *Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium*, *Microbispora* et *Streptomyces*. La MLST offre la possibilité d'étudier l'évolution et la structure de la population des bactéries (Maiden, 2006). Enfin l'analyse taxinomique basée sur le MLST a montré un soutien probabiliste significatif (Savi et al., 2016).

- **Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)**

Cette méthode est utilisée comme un outil puissant pour la cartographie génétique, l'analyse phylogénétique et l'identification bactérienne (Micheli et al., 1994). Elle détecte le



polymorphisme disponible entre les souches en montrant les différences entre les fragments d'ADN amplifiés. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès pour la différenciation des isolats de *Mycobacterium tuberculosis* dans des études épidémiologiques (Abed et al., 1995), et pour développer des sondes spécifiques pour le genre *Streptomyces* (Roberts and Crawford, 2000). Les actinobactéries produisant des enzymes hydrolytiques ont été identifiées par l'empreinte RAPD en utilisant 20 amorces différentes comme le genre *Streptomyces* (Roberts and Crawford, 2000; Boroujeni et al., 2012).

- **Le Ribotypage**

Le ribotypage est appliqué dans l'analyse taxonomique, les études épidémiologiques et les études de population. L'analyse génomique a révélé que les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) des gènes ménagers existaient dans les séquences de gènes d'ARNr chromosomiques (Bouchet et al., 2008). Le ribotypage de *Nocardia asteroides* et des souches apparentées a été développé en 1996, et quatre ribotypes ont été identifiés (Eshraghi, 2012). Le ribotypage fournit une approche rapide pour la détection des souches pathogènes de *Nocardia*. Le ribotypage automatisé a été utilisé pour l'identification des actinobactéries thermophiles isolées à partir de pâtes et de fibres recyclées. En conséquence, cette méthode a montré une reproductibilité dans la discrimination des espèces *Nocardiopsis* et *Streptomyces* (Suihko et al., 2006).

- **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La spectrométrie de masse à temps de vol par ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) est considérée comme une méthode précise et fiable pour la différenciation des espèces actinobactériennes. Le MALDI-TOF MS a été appliqué pour l'identification rapide des espèces de *Streptomyces* isolées à partir d'échantillons environnementaux. Cette étude a révélé que l'extraction des protéines de cellules entières de *Streptomyces* avec de l'acide trifluoroacétique a fourni des spectres reproductibles pour MALDI-TOF MS et a résolu le défi de la nature filamenteuse des espèces de *Streptomyces* (Loucif L, Bendjama E, Gacemi-Kirane D, Rolain J-M (2014) Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS. *Microbiol Res* 169(12):940–947 - Recherche Google, n.d.). Cette technique a été utilisée pour l'identification des actinobactéries cliniquement importantes telles que les genres *Corynebacterium*, *Actinomyces*,

*Bifidobacterium* et *Propionibacterium*. De plus, la spécificité de MALDITOF MS a été prouvée pour l'identification des espèces *Mycobacterium* et *Nocardia* (Buckwalter et al., 2016).

### 10. Le stress chez les plantes

Divers facteurs biotiques et abiotiques contrôlent le rendement agricole. Un changement dans ces conditions entraîne le stress (Rejeb et al., 2014; Gull et al., 2019). Les attaques d'agents pathogènes réduisent les rendements agricoles annuels d'environ 30% (Gull et al., 2019). D'autres stress tels que la sécheresse, les changements de températures, la salinité, les conditions acides, la lumière, et les carences en nutriments causent des dommages aux cultures (Pandey et al., 2017; Gull et al., 2019; Hussain and Usman, 2019).

Avec le changement climatique mondial et les activités anthropiques, les incidences de stress environnementaux ne cessent qu'augmenter affectant la productivité agricole dans le monde (Grover et al., 2016). Un rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) 2007 a déclaré que 3,5% seulement de la superficie mondiale des terres n'est pas affectée par une contrainte environnementale ("<http://www.fao.org/docrep/010/a1075e/a1075e00.htm> - Recherche Google," n.d.). Il est évident que le stress abiotique continue d'avoir un impact significatif sur les plantes en fonction du pourcentage de la superficie des terres touchées (Cramer et al., 2011). Les conditions de stress telles que la sécheresse, la salinité ou la chaleur ont fait l'objet d'intenses recherches. Ces facteurs sont susceptibles d'entraîner de graves impacts sur les rendements des cultures et imposent une forte pression sur le sol et les ressources en eau. Selon une estimation de FAO, les facteurs de stress abiotiques peuvent entraîner une perte de terres de 30% dans les 25 prochaines années et jusqu'à 50% de perte dans les années 2050, si des mesures correctives ne sont pas prises (Munns, 2002; Mahajan and Tuteja, 2005).

### 11. La salinité des sols

L'un des principaux facteurs de stress environnementaux qui entravent la croissance et le rendement des cultures dans le monde est la salinité (Parihar et al., 2015). La salinisation du sol induit plusieurs changements biochimiques et physiologiques au sein des plantes (Nabati et al., 2011). L'excès de sodium induit ; un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, une carence

en nutriments, un stress oxydatif avec production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et l'inhibition de la croissance et la mort cellulaire (Carillo et al., 2011; Parihar et al., 2015).

Au-delà des conséquences négatives sur les cultures, la salinité affecte négativement la composition du sol, la teneur en matière organique, et la biomasse microbienne du sol (ZHANG et al., 2019). La salinité des sols met en danger le rendement des cultures et la capacité de production (Arora et al., 2018). La salinisation peut être restaurée par l'assainissement chimique (par exemple, lessivage, rinçage, gypse et traitement à la chaux). Cependant, ces traitements demandent du temps et entraînent une diminution de la biodiversité végétale et microbienne (Egamberdieva et al., 2019). Récemment, l'utilisation des PGPB halotolérants et leurs métabolites secondaires a été proposée comme un outil valide et respectueux pour l'environnement afin de restaurer les terres salines dégradées et induire l'halotolérance des plantes (Sunita et al., 2020). Plusieurs genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des régions hypersalines; *Aeromicrobium*, *Actinomadura*, *Actinopolyspora*, *Gordonia*, *Marinactinospora*, *Marinophilus*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Prauserella*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*, *Salinactinospora*, *Salinibacterium*, *Salinispora*, *Streptosporangium*, *Streptomonospora*, *Streptomyces*, et *Verrucosipora* (Arasu et al., 2016). Les actinomycètes halophiles ont la capacité de croître à des concentrations modérées et extrêmes de NaCl (15 et 30%, respectivement), grâce à la présence de mécanismes qui bloquent l'entrée du NaCl et maintiennent la structure cellulaire (Vargas et al., 2008; Quillaguamán et al., 2010). Ces souches halophiles induisent une tolérance au stress salin chez les plantes par l'accumulation des osmolytes, la séquestration des ions Na<sup>+</sup> toxiques, et le maintien d'une conductance hydraulique et les activités photosynthétiques (Dodd and Pérez-Alfocea, 2012).

Il a été démontré que l'inoculation par les actinomycètes halophiles améliore la tolérance au stress salin et favorise la croissance et la santé des plantes par plusieurs mécanismes (l'induction de la résistance systémique (ISR), la production des phytohormones, l'activité de l'ACC désaminase...). Qin et coll (2014) ont rapporté que les souches productrices d'ACC désaminase appartenant aux genres *Arthrobacter*, *Streptomyces*, et *Isophtericola* isolées de *Limonium sinense* et réinoculées sur la même espèce, amélioreraient la germination des graines, la croissance des plantes et la production des flavonoïdes sous stress salin. De même, Damodharan et al (2018) ont signalé qu'une souche de *Streptomyces* isolée et réinoculée sur *Solanum*

*lycopersycum* a améliorait la croissance et la biomasse végétale sous stress salin. Sadeghi et coll (2012) ont démontré qu'un isolat de *Streptomyces* producteur d'IAA favorisait la croissance et le développement du blé dans des conditions de stress salin élevé. Des résultats positifs ont également été soulignés pour *Serratia* par Nadeem et al (2013), qui ont rapporté que *S. ficaria* améliorait la germination et le rendement du blé dans un champ salin.

## 12. Effet de la salinité sur la croissance et le développement végétal

### 12.1. La perte de la turgescence

La turgescence est considérée comme le mécanisme physiologique vulnérable à la sécheresse qui conduit à une croissance étonnante et à une réduction de l'expansion cellulaire (Marshall and Dumbroff, 1999). L'intrusion de xylème empêche la croissance cellulaire de nombreuses plantes (Silva et al., 2010). Une pression de turgescence élevée limite la production des cellules, ce qui diminue la croissance et le rendement des plantes. L'élimination des films d'eau des cellules affecte la structure normale de la bicouche lipidique, la dissolution des protéines en couches et entraîne une perte d'intégrité de la membrane et les activités enzymatiques affectant par conséquent la croissance cellulaire (Feng et al., 2016). L'élargissement et la croissance des cellules sont affectés par le stress dû à la sécheresse avant la photosynthèse ou la respiration (Tezara et al., 1999; Lowlor and Cornic, 2002; Ambavaram et al., 2014).

### 12.2. Une mitose altérée

Le stress affecte la mitose et l'élongation cellulaire, diminuant la croissance et le rendement des plantes (Avramova et al., 2015; Schuppler, n.d.). Les perturbations de l'eau minimisent la production végétale en réduisant l'état hydrique du sol (Castell et al., 1994). L'augmentation de la surface foliaire sèche induit la suppression de l'expansion des feuilles (Weraduwege et al., 2015). Le stress hydrique réduit la production de biomasse fraîche et sèche chez les plantes et induit la sénescence des feuilles (Castell et al., 1994; Granier and Tardieu, 1999; Li et al., 2018). La sécheresse modifie considérablement les caractéristiques morpho biochimiques et la croissance des plantes (Barnabás et al., 2008).

### 12.3. La diminution de la croissance des plantes

Le principal effet du stress sur les plantes est la faible germination et semis. L'incidence du stress dû à la sécheresse sur la germination et la croissance a été signalée dans diverses études ; le pois (*Pisum sativum* L), la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le riz (*Oryza sativa* L.). La sécheresse a mis en évidence le potentiel de germination, le développement précoce des semis, des pousses, et des racines, le poids sec, la longueur de l'hypocotyle et la croissance des plantes (OLOGUNDUDU et al., 2014; Petrović et al., 2016; L.-M. Wu et al., 2019). Elle induit également une diminution de la taille et du nombre des feuilles. L'expansion des feuilles dépend de la pression de turgescence (Shivakrishna et al., 2018), sa diminution provoque une photosynthèse lente par conséquent une limite d'expansion des feuilles.

### 12.4. La limitation de la division cellulaire

La division et le développement cellulaire sont des processus vitaux chez les plantes. La croissance des plantes est active dans des régions cellulaires spécifiques appelées méristèmes (Grandjean et al., 2004). Dans ces régions méristématiques, la quasi-totalité de la mitose et de la cytokinèse se produite, ce qui entraîne un allongement des cellules communément appelées une croissance primaire (Perrot-Rechenmann, 2010). Le stress dû à la sécheresse modifie le plus souvent la croissance et le métabolisme des cellules dans cette région, en raison d'une diminution de la pression de turgescence et l'altération du développement cellulaire qui sont les principaux effets de la sécheresse sur les plantes (Fahad et al., 2017). La croissance résulte de la production des cellules filles par division cellulaire méristématique et le doublement de la masse cellulaire. Un déficit en eau dure affecte l'allongement de la plante en interrompant le flux d'eau du xylème vers les cellules environnantes (Zhang and Yu, 2014).

### 12.6. L'altération de la photosynthèse

Le stress des plantes a un effet négatif sur de nombreux processus métaboliques ainsi que sur la photosynthèse. Par exemple, une carence en eau modifie la structure principale de la plante, inhibant l'assimilation du carbone et endommageant la photosynthèse (Heidari and Golpayegani, 2012). De nombreuses études ont montré la réduction de la photosynthèse des feuilles en cas de stress de sécheresse (Lowlor and Cornic, 2002; Wang et al., 2018). Un faible taux de photosynthèse induit à une perte d'énergie lumineuse. Cette perte d'énergie conduit à

une production élevée d'ROS comme l' $O_2^-$  et l' $H_2O_2$ , ce qui altère le fonctionnement cellulaire (Pospíšil, 2016). De plus, plusieurs études antérieures suggéraient que la fixation du  $CO_2$  était sensible au stress environnemental dans le cycle de Calvin, y compris le stress salin (Garg and Singla, 2004).

### **12.7.Des dommages oxydatifs**

Les dommages oxydatifs représentent généralement un stade ultérieur de la plupart des stress abiotiques des plantes. Initialement, l'exposition des plantes à la sécheresse induit des dommages oxydatifs par la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Pospíšil, 2016). L'activité destructrice des lipides et des protéines dans ce ROS présente un risque important pour le développement cellulaire. Cependant, la réaction de l'oxygène aux composants de la chaîne de transport conduit également à la génération des ROS dans les mitochondries (A. Abdel-Rahman et al., 2016). Des voies enzymatiques et non enzymatiques peuvent être impliquées dans la synthèse des ROS, leur développement en conditions de stress a été également documenté (Das and Roychoudhury, 2014; Wang et al., 2018).

## **13. La réponse des plantes au stress salin.**

### **13.1.L'osmorégulation**

Les plantes accumulent divers solutés organiques et inorganiques dans le cytosol pour la préservation de la turgescence cellulaire à un potentiel osmotique réduit (Abbas et al., 2014). En conditions sèches, les plantes préservent la turgescence des feuilles par ajustement osmotique ainsi que par l'accumulation de solutés tels que; la proline, le saccharose, les glucides solubles et la glycine bêtaïne dans le cytoplasme (Abbas et al., 2014). Le processus d'accumulation de ces solutés en cas de déficit hydrique est appelé adaptation osmotique, qui dépend fortement du taux de stress hydrique chez les plantes (Chen and Jiang, 2010). La proline est l'osmolyte le plus étudié pour son rôle important dans la résistance au stress et elle est considérée comme une réaction initiale des plantes en déficit hydrique pour réduire les dommages cellulaires (Silveira et al., 2003). Dans les plants de maïs, l'accumulation de proline est corrélée à un stress de sécheresse croissant (Dien et al., 2019). La proline peut agir comme une molécule de signalisation pour moduler les fonctions mitochondriales et activer une expression des gènes spécifique sous stress pour la protection des plantes (Liang et al., 2013).

L'accumulation de proline a été associée à la tolérance au stress chez plusieurs espèces végétales (Saibi et al., 2015). Elle améliore la conservation de la structure protéique complexe, la protection des membranes et la réduction de l'oxydation lipidique (Ozdeniz, 2019). Elle aide également à stabiliser les structures subcellulaires, à éliminer les radicaux libres, et à augmenter le potentiel redox cellulaire dans des conditions de stress (Chen and Jiang, 2010).

### **13.2. Les protéines du choc thermique**

Une autre protection bien connue est l'expression des protéines du choc thermique (HSP) (AAkerfelt et al., 2007). Les HSP sont un complexe de protéines chaperons induit par la chaleur et d'autres stress. Les protéines du choc thermique varient en taille, de petites HSP de moins de 20 kDa à 100 kDa et plus, interagissent régulièrement avec d'autres protéines pour remplir leurs fonctions de chaperon (Miller and Fort, 2018). La capacité des HSP à réparer les protéines permet à la plante de maintenir un métabolisme sensible pendant le stress thermique (Bita and Gerats, 2013). Les domaines protéiques hydrophiles se lient aux petits HSP pour empêcher l'agrégation des protéines et les ciblent pour la réparation. Des HSP plus grandes comme HSP70 sont impliquées dans le renforcement des protéines dénaturées. On pense que HSP100 décompose les protéines de recyclage endommagées (Nievola et al., 2017). Le mécanisme induit une résistance aux oxydes et aux chaperons, pour une meilleure tolérance des plantes aux chocs thermiques (Balogh et al., 2013). En outre, ils réduisent les dommages causés par les ROS et les protéines dénaturées en préservant l'homéostasie conférant une tolérance au stress (Balogh et al., 2013; Vickers, 2017). Le stress thermique n'est pas la seule façon d'utiliser ces mécanismes de protection; l'exposition au choc thermique peut conduire une tolérance croisée avec d'autres stress abiotiques (Driedonks et al., 2015).

### **13.3. L'activité antioxydante**

Les plantes dépendent généralement d'une protection antioxydante, enzymatique ou non enzymatique, pour faire face au stress oxydatif (Birben et al., 2012). Les SOD, GR, POD et CAT sont des enzymes essentielles impliquées dans le système de défense des plantes (Fahad et al., 2017). En plus de ces enzymes, les caroténoïdes et le glutathion peuvent également être utilisés comme éléments non enzymatiques du système antioxydant. Des enzymes telles que la SOD, le CAT, et le POD récupèrent les ROS en protégeant directement ou indirectement les plantes contre les dommages oxydatifs (Das and Roychoudhury, 2014). Une augmentation du

malon-dialdéhyde, un simple indicateur des dommages oxydatifs dus à la sécheresse, a été signalée en réponse aux ROS (Das and Roychoudhury, 2014). Le maintien des concentrations plus élevées d'antioxydants peut être une stratégie efficace pour les plantes pour atténuer les effets nocifs des ROS (Birben et al., 2012). Les phytohormones maintiennent souvent des antioxydants plus élevés qui protègent les plantes aux stress environnementaux (Fahad et al., 2015).

### 14. L'halophilie et halotolérance

Les environnements hypersalins sont des habitats extrêmes dans lesquels plusieurs autres facteurs en plus d'une teneur élevée en sel, peuvent limiter la croissance des organismes (Ventosa et al., 2008). Ces facteurs comprennent la température, le pH, la pression, l'oxygène, la disponibilité des nutriments et l'énergie solaire (Rodriguez-Valera, 1988). Les environnements hypersalins comprennent les eaux et les sols hypersalins. Les eaux hypersalines sont définies comme les environnements qui ont des concentrations en sels plus élevées que l'eau de mer (Rodriguez-Valera, 1988). Les sols hypersalins ne sont pas bien définis et en fait, il n'y a pas de définition claire d'un sol salin ou hypersalin. Ils sont largement représentés sur notre planète parce que la plupart des sols contiennent de petites quantités de sels, un sol serait considéré comme hypersalin lorsque sa concentration en sel est au-dessus d'un certain seuil (Rodriguez-Valera, 1988). Selon (Kaurichev et al., 1980), les sols contenant plus de 0,2% (p/v) de sel soluble devraient être considérés comme des sols salins. Les micro-organismes montrent des réponses assez différentes au sel. Selon la concentration de sel particulière nécessaire à leur croissance optimale, plusieurs les groupes de micro-organismes sont considérés: (i) les non halophiles nécessitent moins de 1% de NaCl; (ii) halotolérants sont des micro-organismes non halophiles qui peuvent tolérer une forte teneur en sel, dans certains cas jusqu'à 25% de NaCl; (iii) les halophiles légers poussent mieux dans un milieu contenant 1 à 3% de NaCl; (iv) les halophiles modérés se développent de manière optimale dans des milieux avec 3 à 15% de NaCl; et enfin, (v) les halophiles extrêmes poussent mieux dans les milieux contenant 15 à 25% de NaCl et sont capables de croître même à des concentrations saturées en sel (Kushner, 1988). Les organismes les plus couramment trouvés dans les environnements avec des concentrations élevées en sel sont les bactéries modérément halophiles, les bactéries halophiles, et archées; cependant, les micro-organismes halotolérants peuvent être également présents, bien que on considère qu'elles jouent un rôle mineur dans ces environnements (Rodriguez-Valera, 1988).



Les micro-organismes halophiles sont classés comme : des halophiles extrêmes (poussant mieux dans des milieux contenant 2,5–5,2 M de sel), halophiles extrêmes à la limite dans les milieux contenant 1,5–4,0 M de sel), halophiles modérés (poussent dans des milieux avec 0,5 à 2,5 M de sel), et halotolérants qui ne présentent pas d'exigence absolue en sel pour la croissance mais poussent bien à des hautes concentrations, et tolèrent jusqu'à 100 g/l de sel (Kushner, 1978; Oren, 2002; Hamedi et al., 2013). Les actinomycètes se caractérisent par la teneur élevée en G-C% dans leur ADN, la plupart présentent un développement différencié de la spore à la forme mycélienne. Les halophiles sont trouvés dans les trois domaines phylogénétiques de la vie y compris l'ordre des actinomycétales. L'occurrence des actinomycètes en milieu salin et leur tolérance aux fortes concentrations de sel a été décrite pour la première fois il y a plus de 40ans. Cependant, il n'y a pas de connaissances raisonnables sur la biologie et les applications des actinomycètes halophiles (Gottlieb, 1973).

### **14.1.L'adaptation osmotique des microorganismes halophiles**

Il existe deux stratégies pour faire face aux problèmes des environnements salins. Les archées halophiles maintiennent un équilibre osmotique dans leur cytoplasme avec l'environnement hypersalin en accumulant de fortes concentrations en sel. Ce mécanisme d'osmorégulation nécessite des adaptations spéciales des enzymes intracellulaires qui doivent fonctionner en présence de sel. En revanche, les eubactéries halophiles ou halotolérantes sont caractérisées par une plus grande diversité métabolique. Leur concentration en sel intracellulaire est faible, et ils maintiennent un équilibre osmotique dans leur cytoplasme en accumulant de fortes concentrations de divers solutés osmotiques (Margesin and Schinner, 2001).

La vie microbienne à des concentrations élevées en sel est phylogénétiquement très diverse. Les environnements hypersalins sont habités par des représentants halophiles et hautement halotolérants des trois domaines de la vie : les archées, les bactéries, et les eucarya. Tous les microorganismes possèdent une turgescence positive. Le maintien de cette pression est essentiel en tant qu'une force motrice de l'expansion des cellules (Kempf and Bremer, 1998). Pour maintenir une pression osmotique élevée à l'intérieur des cellules, différentes stratégies peuvent être utilisées : (a) La stratégie «salt-in» où l'équilibre osmotique est obtenu en accumulant des concentrations importantes de sel inorganique dans le milieu comme les ions  $\text{Na}^+$  qui sont

exclus autant que possible à partir de cellules, cette stratégie est basée sur KCl plutôt que sur NaCl comme sel intracellulaire principal. (b) La stratégie de «faible teneur en sel», «soluté compatible» (Brown and Simpson, 1972). Il a été démontré que de nombreux composés organiques appartenant à différentes classes servent de solutés dans différents groupes de microorganismes, y compris les polyols, les sucres, les acides aminés, les bêtaïnes, les ectoïnes, les diaminoacides nacétylés, et les carboxamides N-dérivés de glutamine (Galinski, 1993, 1995; Da Costa et al., 1998; Kempf and Bremer, 1998; Roberts, 2005). Chez de nombreux extrémophiles, ces composés de bas poids moléculaire s'accumulent non seulement en réponse à des concentrations accrues en sel, mais également en réponse à d'autres changements tels que le stress thermique (Lentzen and Schwarz, 2006; Cowan, 2009; Klähn and Hagemann, 2011). Autre stratégie (c) est la biosynthèse des solutés osmotiques organiques et donc les microorganismes qui utilisent la stratégie «à faible teneur en sel», «soluté compatible» accumulent également des solutés appropriées si elles sont disponibles dans leur milieu (Kempf and Bremer, 1998; Oren, 1999). Les microorganismes qui utilisent les solutés organiques sont généralement plus flexibles et peuvent s'adapter au stress salin que les organismes qui utilisent la stratégie «salt-in». Lors d'une descente de sel, l'excès de solutés compatibles peut être excrété via des canaux mécanosensibles ou converti à l'intérieur de la cellule sous formes osmotiquement inactives. Les ions inorganiques peuvent s'accumuler de manière transitoire après augmentation soudaine de la salinité, pour être remplacée plus tard par des solutés organiques nouvellement synthétisés (Wood et al., 2001). Autres informations sur l'adaptation des microorganismes halophiles peuvent être trouvées dans les précédents travaux (Kushner, 1978; Roeßler and Müller, 2001; Oren, 2002, 2008;; Plemenitaš et al., 2014).

### **14.2.La biotechnologie des microorganismes halophiles**

Le potentiel biotechnologique des halophiles en tant qu'une source naturelle de biomolécules uniques allant des antioxydants, des solutés compatibles, et les enzymes hydrolytiques a été décrit. Ces biomolécules sont précieuses et présentant un potentiel commercial pour l'alimentation, la pharmacie, le biomédical, l'industrie, et l'environnement. La disponibilité de ces biomolécules en production peut être optimisée pour produire des rendements durables à échelle industrielle. La disponibilité récente de diverses séquences génomiques complètes d'halophiles ensemble les progrès des technologies omiques, offrant davantage de nouvelles opportunités d'exploration, découverte, et identification de propriétés

uniques et/ou de nouvelles biomolécules dérivées d'halophiles à l'avenir (Waditee-Sirisattha et al., 2016).

Au cours des dernières décennies, les halophiles ont été envisagés pour des applications biotechnologiques. Divers mécanismes de réponse des halophiles dans des conditions de salinité élevée induit la production de diverses biomolécules importantes. Il a été reconnu que les halophiles sont également des sources majeures d'enzymes qui fonctionnent à très haute salinité, une condition extrême qui entraîne une dénaturation et agrégation de la plupart des protéines conventionnelles. Par exemple, l' $\alpha$ -amylase isolée de *Haloarcula* sp. fonctionne de manière optimale à 4,3 M de sel à 50 ° C, et est stable dans les solvants benzène, toluène, et chloroforme (Fukushima et al., 2005; Hutcheon et al., 2005). En outre, les halophiles sont également considérés comme des sources potentielles de composés bioactifs, de solutés compatibles, et d'enzymes uniques. Actuellement, seuls deux procédés industriels utilisant des produits à partir des microorganismes halophiles ont été adoptés ; la production des caroténoïdes par l'algue halophile *Dunaliella* et la production d'ectoïne par la bactérie halophile *Halomonas* (Oren, 2014). Diverses études montrent que certains halophiles sont capables de synthétiser des quantités massives de solutés compatibles tels que la glycine bêtaïne et les ectoïnes (Ventosa et al., 1998). Ces petites molécules organiques sont utiles comme stabilisants de biomolécules ou agents de protection contre le stress. Ainsi, les halophiles ont de larges applications biotechnologiques allant de l'agriculture au biomédical. L'utilisation des halophiles en biotechnologie inclut l'halotolérance de leurs enzymes lors des procédés de transformations. Plusieurs enzymes halophiles ont été testées pour le potentiel d'applications biotechnologiques, y compris les amylases, les nucléases et protéases (Kamekura, 1986). Des enzymes cytoplasmiques résistantes au sel, voire dépendantes du sel, peuvent être trouvées à l'intérieur de ces groupes de micro-organismes.

## **15. Les mécanismes des PGPR à améliorer la croissance végétale sous stress salin**

### **15.1.L'induction des gènes résistants au stress**

Les micro-organismes associés aux racines, y compris les rhizobactéries et les mycorhizes, sont les bio-stimulants émergents pour la promotion de la croissance des plantes. En outre, ces microorganismes symbiotiques peuvent aider à lutter contre divers stress biotiques et abiotiques (Lata et al., 2018). Un nombre considérable de recherches antérieures ont rapporté

que les rhizobactéries et autres microbes symbiotiques associés à la rhizosphère ont la potentialité innée de tolérer ou d'atténuer le stress des plantes (Jogawat et al., 2019; Yang et al., 2009). Le principal mécanisme de tolérance au stress des plantes était l'induction de gènes résistants au stress dans les plantes médiée par les micro-organismes symbiotiques potentiels (Jogawat et al., 2019). Les micro-organismes favorisant la croissance des plantes, en particulier les endophytes, y compris les PGPR, les PGPB, l'AMF, les champignons de type AM, et leur association avec la plante peuvent induire des gènes potentiellement tolérants au stress pour lutter contre les conditions de stress. Le déclenchement de la régulation de ces gènes est le principal indicateur fonctionnel pour tolérer plusieurs conditions de stress des plantes (Lata et al., 2018). La sécheresse chez *Oryza sativa* a été atténuée efficacement par la surexpression médiée par *Trichoderma* du gène *DHN/AQU* (Pandey et al., 2016). De même, *DREB/CBF*, gènes *CBL1* induits par *Piriformospora* et *Gluconacetobacter* pour la défense de la sécheresse chez *Brassica* et *Saccharum* (Sun et al., 2010; Vargas and Santa Brígida, 2014).

Le stress de salinité a été défendu avec succès en stimulant les gènes *zmPIP* chez *Zea mays* médiée par l'endophyte *Pantoea agglomerans* (Gond et al., 2015). L'endophyte potentiel *P. psuedoalcaligenes* de la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* peut réguler à la hausse l'activité des gènes *HKT1*, *KAT1* *KAT2* choline déshydrogénase (coda) pour lutter contre le stress de salinité chez cette espèce végétale (Abdelaziz et al., 2017). La stimulation du gène *arsC* pour l'activation enzymatique afin de contrôler le stress dû à l'arsenic chez *Brassica juncea* médiée par *Staphylococcus arlettae* a été rapportée dans une étude précédente (Srivastava et al., 2013). Le codage de *CaACCO* et *CaLTPI* par *P. indica* pour réguler le stress osmotique chez *Capsicumannum* a été documenté dans le travail de Sziderics et ses collaborateurs (Sziderics et al., 2007). (Otieno et al., 2015) ont rapporté la régulation à la hausse du gène *gcd* défendant le stress nutritionnel pour l'amélioration de la solubilisation des phosphates chez *Pisum sativum*. Egalement les gènes tolérants au stress froid (*RBcL*, *COR78*, *CBF*, etc.) arbitrés par *Burkholderia* et *Pseudomonas* ont été documentés pour la tomate et *Arabidopsis* (Su et al., 2015; Subramanian et al., 2015).

### 15.2. La synthèse de l'ACC-désaminase

Divers micro-organismes de la rhizosphère possèdent un gène spécifique pour la synthèse de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase. Ils peuvent agir comme

promoteurs de la croissance des plantes, défenseurs de nombreux stress végétaux et redresseurs de la physiologie végétale (Cheng et al., 2012; Jha et al., 2020). La synthèse de l'ACC-désaminase par *Pseudomonas*, *Luteibacter*, et *Acinetobacter* a été revendiquée comme un outil de défense pour atténuer le stress dû à la sécheresse dans le maïs et le sorgho (Colli Mull et al., 2017). La sécrétion d'ACC-désaminase par *Variovorax paradoxus* a été signalée comme un mécanisme important de tolérance au déficit hydrique chez les pois (Dodd et al., 2004). L'ACC-désaminase sécrétée par *P. fluorescens* peut protéger les arachides de la salinité (Saravanakumar and Samiyappan, 2007). Le potentiel de *Hartmannibacter diazotrophicus* pour lutter contre le stress salin par la synthèse de l'ACC-désaminase dans l'orge est également décrit. De même, l'isolat bactérien de *Burkholderia phytofirmans* et *P. putida* a été signalé comme un anti-stress dû au froid dans les vignes et le canola (Barka et al., 2006; Chang et al., 2007).

### 15.3. La production d'AIA et de la proline

L'hormone de croissance végétale l'acide indole acétique (AIA) peut induire une région protéique pour la production de proline afin de gérer le stress de salinité chez diverses espèces végétales. La fonction réelle de la région riche en proline (PRR) pour la gestion de divers stress est très compliquée et peu claire. Cependant, la production ou l'accumulation de proline induite par l'AIA est prouvée pour sa tolérance au stress chez les plantes (Barka et al., 2006; Barnawal et al., 2014). La tolérance à la sécheresse a été signalée par la production d'IAA et de la proline médiée par *A. brasilense* dans la tomate (Molina-Favero et al., 2008). La bactérie isolée *Bacillus megaterium* et le champignon arbusculaire *Glomus sp.* ont été utilisés simultanément pour alléger la sécheresse chez *Trifolium sp.* par la sécrétion d'AIA et de la proline (Marulanda et al., 2007). Le stress de salinité chez le blé peut être géré par la proline induite par l'AIA sécrétée par *Azospirillum sp.* avec *P. indica* (Zarea et al., 2012). En outre, le stress dû aux métaux lourds (Cd) chez *Arabidopsis* a été défendu par *P. putida* par la sécrétion d'AIA et de la proline (Glick, 2014).

### 15.4. L'amélioration des relations avec l'eau

La sécheresse est le principal stress hydrique environnemental des plantes. Habituellement, l'agriculture tropicale peut être fortement affectée par ce stress abiotique. La sécheresse est la conséquence d'une mauvaise gestion de l'eau pendant la production agricole ou par les temps secs. L'utilisation d'*Azospirillum sp.* pour améliorer la dynamique de l'eau dans

le blé pour lutter contre le stress dû à la sécheresse a été rapporté dans le travail de (Creus et al., 2004). Cho et al., (2006) ont étudié l'association rhizosphère-AM-champignons dans le sorgho peut faire proliférer la surface et la masse racinaire afin d'améliorer les relations hydriques dans la culture en croissance sous dessiccation. La sécheresse d'*Arabidopsis* a été atténuée grâce à *A. brasilense* sp. en améliorant la surface racinaire et la dynamique de l'eau (Cohen et al., 2015). De plus, le potentiel *B. megaterium* a été utilisé comme atténuant du stress chez le maïs (*Zea Mays*.L) (Marulanda et al., 2010).

### 15.5. La séquestration/réduction de l'absorption des ions métalliques

Le stress des métaux lourds a un impact néfaste sur la croissance et le développement normal des plantes. Il entraîne une perte sévère de rendement et même la mort des plantes dans une certaine mesure. La séquestration ou la réduction de l'absorption des ions métalliques est le principal mécanisme de tolérance au stress des métaux lourds chez les plantes (Madhaiyan et al., 2007; Jha et al., 2020). *Mesorhizobium* sp. peut limiter l'absorption des ions Cd dans *Astragalus sinicus* pour gérer la toxicité des métaux lourds (Sriprang et al., 2003). Le potentiel de séquestration des métaux de *Methylobacterium oryzae* et *Burkholderia* sp. A été signalé pour atténuer le stress lié au nickel et au cadmium chez la tomate (Madhaiyan et al., 2007). Les premières recherches ont montré la capacité de *G. etunicatum* à réduire l'absorption du nickel pour *Alphitonia neocaledonica* et *Cloezia artensis* (Amir et al., 2013). Le stress des métaux lourds (Cu) a été géré en réduisant l'absorption de Cu par *Pisolithnus* sp, et *Laccaria laccata* chez *Pinus densiflora* et *Quercus variabilis* (Zong et al., 2015).

### 15.6. L'équilibre ionique $\text{Na}^+/\text{K}^+$

Le déséquilibre ionique des sels de sodium et de potassium dans la solution du sol peut créer un stress de salinité dans les cultures en croissance. Cette contrainte de salinité peut être modulée en limitant l'apport d'ions  $\text{Na}^+$  ou en équilibrant les ions  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Ashraf et al., 2006; Abdelaziz et al., 2017). Le stress dû à la sécheresse de la moutarde indienne a été réduit par *T. harzianum*. La régulation des ions  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  est le mécanisme de contrôle de la sécheresse tel que rapporté par Fahad et al (2015). La réduction du niveau des  $\text{Na}^+$  et la disponibilité des  $\text{K}^+$  par la souche AK-1 de *P. koreensis* a été signalée comme une technique prédominante pour gérer le stress de salinité chez le soja (Kasotia et al., 2015). La salinité des arachides était causée par un rapport sodium, potassium, calcium, et phosphate irrégulier. *Brachybacterium*, *Brevibacterium*

et *Haererohalobacter* ont atténué ce problème en augmentant le rapport  $K^+/Na^+$  et d'autres contenus ioniques (Shukla et al., 2012). De même, le stress salin du blé a été géré positivement par la restriction de l'afflux ionique médiée par des consortiums microbiens potentiels (*B. amylolequifaciens*, *B. insolitus*, *P. syringae*, *Microbacterium sp.*) (Ashraf et al., 2006).

### 15.7. La diminution de la production d'éthylène/acide abscisique

L'éthylène, l'acide abscisique, et l'acide salicylique sont les facteurs prédominants d'induction du stress chez les plantes (Kang et al., 2014). Aroca et al. (2008) ont rapporté la réduction de la concentration d'acide abscisique par le champignon mycorhizien *G.intraradices* BEC121 sous stress de salinité chez la laitue. *P. putida* a été signalé comme atténuant de stress salin chez *Gossypium hirsutum* par un dépôt d'acide abscisique dans les semis de plantes (Yao et al., 2010). *Pseudomonas sp.* a été utilisée pour alléger le stress de sécheresse chez les pois en diminuant la production d'éthylène dans les tissus végétaux (Arshad et al., 2008). Il a été signalé qu'une souche de *P. putida* abaissait les concentrations d'acide abscisique et salicylique, augmentant finalement le jasmonate dans le soja pour gérer le stress hydrique (Kang et al., 2014).

### 15.8. Des stratégies diverses

Le stress thermique peut causer aux cultures en croissance des dommages associés à la reproduction du à une évaporation inattendue et à la mort prématurée des semis. Des recherches ont proposé plusieurs techniques en utilisant des microbes potentiels pour gérer ces conditions de stress thermique des plantes (McLellan et al., 2007; Jha et al., 2020). L'induction des protéines du choc thermique (HSP) par les micro-organismes potentiels est l'approche génomique fonctionnelle pour tolérer le stress thermique pendant la production agricole. *Pseudomonas sp.* AMK-P6 a été documentée pour l'induction des protéines de choc thermique dans le sorgho (Ali et al., 2009). Il a été rapporté que la stimulation des HSP 90 par *Paraphaeosphaeria quadrisepata* allège le stress thermique chez *Arabidopsis* (McLellan et al., 2007). Le stress de salinité chez le riz a été géré par la production d'acide gibbérellique et de produits extracellulaires médiés par *Scytonema* (Rodríguez et al., 2006). La réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par *P. putida* a été signalée comme un mécanisme prédominant pour atténuer le stress dû à la sécheresse chez le pois chiche (Tiwari et al., 2016).

La production de composés organiques volatils par *B.thuringiensis* a été revendiquée comme stratégie de lutte contre la sécheresse pour le blé dans le travail de Timmusk et al (2014).

### 16. Le Blé dur

Le blé est l'une des céréales les plus consommées dans le monde et sa production est très sensible aux contraintes environnementales (Lobell et al., 2011; Ebel et al., 2018). Le blé dur (*Triticum turgidum* subsp. *durum* Desf.) est une culture céréalière mineure représente 5% de la récolte totale de blé cultivé dans le monde (environ 17 millions d'hectares), en 2019, la production était d'environ 38 millions de tonnes (Xynias et al., 2020). Le blé est aujourd'hui la principale céréale produite, consommée et commercialisée dans le monde. Les céréales (blé, maïs, riz, orge, sorgho, etc.) fournissent 68% des approvisionnements alimentaires mondiaux. Les céréales sont généralement désignées comme étant des denrées alimentaires (blé et riz) ou des céréales fourragères/secondaires (maïs, orge, sorgho, etc.), en fonction de leur utilisation finale (Oleson, 1994). Les principales contraintes environnementales limitant la culture du blé dur dans le bassin méditerranéen sont la sécheresse et les températures extrêmes (Nachit and Elouafi, 2004; Sabella et al., 2020). L'apparition de ces stress environnementaux pendant la floraison, la pollinisation et le remplissage des grains est nocive pour le blé (Aprile et al., 2013; Sabella et al., 2020).

En Algérie, le blé dur est la première céréale cultivée ; il occupe 45% de la superficie consacrée aux céréales, soit 1,6 Mha ("ITGC algérie - Recherche Google," n.d.). Cependant, sa production est encore insignifiante, elle ne couvre que 20 à 25% des besoins d'une population de plus en plus croissante, et le reste étant importé (Chehili et al., 2017). Cette faible production s'explique souvent par le fait que la majorité des superficies ensemencées en blé dur se situe dans les hautes plaines où les précipitations et les températures sont soumises aux fortes variations, souvent associées aux fréquentes gelées printanières et l'apparition du sirocco au stade du remplissage des grains qui affectent gravement les rendements (BOUDERSA et al., 2021). En effet, cette situation ne peut être débloquée que par une augmentation réelle et efficace des rendements grâce à l'application d'une meilleure gestion des techniques adaptées (préparation du sol, date et dose de semis, irrigation, fertilisation, désherbage, et lutte contre les maladies).



### 17. La culture de la tomate et la carotte

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) et les carottes (*Daucus carota* L.) font partie des légumes les plus importants de la famille des Solanacées et des Apiacées cultivés dans le monde (Que et al., 2019; Pellegrini et al., 2020a). À l'échelle mondiale, la tomate continue de gagner une importance pour la consommation en tant qu'une culture fraîche, un constituant majeur dans de nombreux aliments préparés, ainsi que pour la recherche sur les principes fondamentaux de la croissance et du développement des plantes. Les membres du genre *Lycopersicon* tolèrent un large éventail de conditions environnementales (Hobson and Grierson, 1993). En Algérie, elle est considérée comme une culture d'importance socioéconomique. La carotte fait partie des dix cultures légumières les plus importantes au monde sur le plan économique, en terme de superficie de production, et de valeur marchande (Simon et al., 2008). La carotte est le membre le plus cultivé des Apiacées ou Ombellifères (Rubatzky et al., 1999). Comme les autres plantes de cette famille, les graines de carottes sont aromatiques et sont par conséquent utilisées depuis longtemps comme épice ou comme phytothérapie. Le genre *Daucus* comprend environ 20 espèces dispersées dans le monde, mais la majorité des espèces se trouvent autour de la Méditerranée (Simon et al., 2008).

Ces plantes sont attaquées par plusieurs agents pathogènes du sol, parmi lesquels : *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani* provoquent de graves maladies affectant la productivité des cultures (de Oliveira et al., 2010; Patkowska, 2020). *F. oxysporum* fait partie des agents pathogènes omniprésents les plus importants (Singh et al., 1999; Goudjal et al., 2016), il provoque la pourriture de la couronne et des racines limitant la croissance et le développement des plantes (Suárez-Estrella et al., 2007; Goudjal et al., 2016; Rashad et al., 2017). La maladie de la tache de la tomate causée par *Pseudomonas syringae* induit des lésions nécrotiques sur les différentes parties de la plante affectant leur productivité (Goode and Sasser, 1980; Hassan et al., n.d.). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* affecte de nombreuses cultures telles que les carottes et provoque une pourriture molle entraînant des pertes économiques importantes (Nesha and Siddiqui, 2013; Adams et al., 2014; Patkowska, 2020; Zhang et al., 2020). L'utilisation de bactéricides combat les maladies des plantes causées par des bactéries pathogènes, mais une dépendance excessive rend les agents pathogènes résistants et provoque une pollution de l'environnement (Hassan et al., n.d.; Hastuti et al., 2012). L'application des fongicides chimiques pour éradiquer les ravageurs a des effets néfastes sur la communauté

microbienne et les sols, car ils sont convertis en dérivés toxiques par les agents pathogènes eux-mêmes et les tissus végétaux (Geissbuhler et al., 1982; Goudjal et al., 2014).

Les plantes infectées attirent les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) par les exsudats racinaires dans leurs parties radicalaires (Bais et al., 2005; Berendsen et al., 2012; Cao et al., 2016). Ces microbes constituent une source durable de composés antifongiques (Marimuthu et al., 2020). Parmi ces microorganismes, les actinomycètes peuvent contrôler un large éventail de phytopathogènes et constituent une source importante de métabolites bioactifs et antimicrobiens (Marimuthu et al., 2020). Ils ont la capacité de dégrader les produits récalcitrants et xénobiotiques (Lin et al., 2011; Polti et al., 2014; Arya et al., 2016; Chaurasia et al., 2018), et agissent comme des bio pesticides, des bio herbicides, un PGPR et un agent de lutte biologique (Chaurasia et al., 2018; Vurukonda et al., 2018). Ils sont largement exploités pour leur capacité de produire des composés biologiquement actifs tels que des antibiotiques et les enzymes hydrolytiques (Costa et al., 2013). Il a été rapporté que les antibiotiques produits par des bactéries filamenteuses inhibent un large éventail de microorganismes pathogènes (Berg et al., 2001; Costa et al., 2013). Les actinomycètes, en particulier le genre *Streptomyces*, sont considérés comme des bons candidats pour lutter contre les maladies des plantes (Doubou et al., 2001; Panneerselvam et al., 2020). Ils présentent une source importante de plusieurs composés agroactifs (Tanaka and Omura, 1993; Doubou et al., 2001). L'activité de biocontrôle s'explique par leur capacité à coloniser les racines des plantes, l'antibiose, la production de protéines extracellulaires, et l'élimination des phytotoxines (Doubou et al., 2001). Ils sont utilisés comme agent de lutte biologique, pour protéger les cultures contre les maladies causées par les phytopathogènes (Goudjal et al., 2014).

## Materiels et méthodes

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des  
plantes (PGPR) des souches d'actinomycètes et leur  
capacité à coloniser *in vitro* *Solanum lycopersicum***

### 1. Origine des souches et les conditions de culture

Soixante souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* sp et *Nocardioopsis* sp. ont été utilisées dans cette étude. Les souches d'actinomycètes ont été isolées à partir de deux sites salins dans la région nord-est de l'Algérie; Ezzemoul sebkha (35°53'14" Nord; 06°30'20" Est : pH 8,6; CE (conductivité électrique) 1600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; matière organique 6,0%; humidité et matière organique 6,0%; sable 52,8%; fente 22,4%; argile 24,8%) dans la wilaya de Oum el Bouaghi, et Djendli sebkha (35°43'15" Nord; 06°32'23" Est : pH 8,0; EC 1101  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; matière organique 6,2%; humidité et matière organique 5,8%, sable 31,0%; fente 32,7%; argile 36,3%) dans la wilaya de Batna comme indiqué dans le travail de Smati and Kitouni (2019). Les échantillons du sol ont été prélevés selon la méthode du Pochon et Tardieux. En bref, les échantillons ont été prélevés en retirant les cinq premiers centimètres de la couche supérieure du sol. Ensuite, environ 100 g de terre de la couche sous-jacente ont été prélevés et transportés dans des tubes stériles au laboratoire (Pochon and Tardieux, 1962).

La production de spores de chaque souche a été obtenue par la culture sur le milieu gélosé ISP<sub>2</sub> (International *Streptomyces* Project-2) (Annexe1) à 30 ° C pendant 7 jours. Les suspensions de spores ont été préparées en ajoutant de l'eau distillée stérile dans les boîtes de Pétri ; les mélanges ont été filtrés à travers une seringue contenant du coton hydrophile pour éliminer les mycéliums. Les concentrations de spores ont été ajustées par spectrophotomètre à une densité finale de 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>. Les suspensions de spores ont été utilisées différemment, selon le test réalisé (les descriptions sont données dans chaque paragraphe).

### 2. Mesure des activités favorisant la croissance des plantes (PGPB)

#### 2.1. La solubilisation du phosphate

Ce test permet d'évaluer la capacité des souches à dissoudre le phosphate inorganique sur trois milieux de cultures contenant le Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> comme une seule source de phosphate ; NBRIP (National Botanical Research Institute's Growth Medium) (Nautiyal, 1999) (Annexe2), PVK (Pikovskaya) (Pikovskaya, 1948) (Annexe3) , et LB (Luria Bertani) modifiée par l'addition du glucose (Annexe4) . Des cylindres d'agar de 5 mm de chaque souche d'actinomycètes (cultivées au préalable sur le milieu ISP<sub>2</sub> solide jusqu'à sporulation) ont été placés dans chaque milieu de

## **Materiels et méthodes**

---

culture. La capacité de solubilisation a été estimée en mesurant la zone transparente formée autour des colonies après 7 jours d'incubation à 30 C°. Le diamètre du halo de solubilisation pour chaque souche a été déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total (Cherif-Silini et al., 2013).

La quantification du phosphate solubilisé a été réalisée dans le milieu PVK liquide. La suspension de spores de chaque souche (100 µl) a été inoculée dans 10 ml du milieu PVK liquide et incubée à 30 C° pendant 7 jours sous agitation modérée. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 20 min (Cherif-Silini et al., 2013), et le phosphore solubilisé a été quantifié dans le surnageant par la méthode colorimétrique d'Olsen et Sommers (Olsen and Sommers, 1982). Dans une fiole de 50 ml contenant 1 ml du surnageant, sont ajoutés 10 ml de molybdate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) à 12 mM (Fluka) et 1ml de chlorure d'étain (SnCl<sub>2</sub>) à 5 mM (Fluka). Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur bleue est mesurée à 620 nm, et est directement proportionnelle à la concentration de phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard a été effectuée avec une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Olsen and Sommers, 1982) (Annexe5).

### **2.2.La production de l'acide indole acétique (AIA)**

Pour la production d'acide indole-3-acétique, la suspension de spores de chaque souche (100 µl) a été inoculée dans le milieu de croissance phosphaté NBRIP supplémenté de tryptophane (0,2% v/v) et incubé à 30 C° pendant 7 jours sous agitation modérée (Nautiyal, 1999; Ponmurugan and Gopi, 2006; Leaungvutiviroj et al., 2010; Khiangte and Lalfakzuala, 2011; Wahyudi et al., 2019). Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 3000 tr/min pendant 20 min, et 1 ml de surnageant a été mélangé avec 4 ml de réactif de Salkowski (Gordon and Weber, 1951). Le mélange a été incubé à 37 C° pendant 30 minutes dans l'obscurité. Après incubation, la densité optique a été mesurée à 530 nm (spectrophotomètre SPEKOL 1300 UV VIS, Analytik Jena, Jena, Allemagne). Les concentrations d'AIA ont été déterminées en utilisant une courbe d'étalonnage standard, et les résultats ont été exprimés en µg AIA mL<sup>-1</sup>.

### **2.3.La production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

L'activité cyanogène a été détectée sur le milieu Trypticase Soy Agar (TSA) additionné de glycine (4,4 g L<sup>-1</sup>). Un papier Whatman a été trempé d'une solution d'acide picrique (0,5%) et

## Materiels et méthodes

---

de carbonate de sodium (2%), et a été placé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri. Les boîtes sont scellées avec du parafilm et incubées à 30 C° pendant 7 jours. Après incubation, un changement de couleur du papier Whatman en orange ou en brun est considéré comme un résultat positif (Donate-Correa et al., 2005).

### 2.4.La production de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

La production de l'ammoniac a été évaluée dans l'eau peptonée; 10 ml d'eau peptonée ont été inoculés avec 100 µl de chaque suspension de spores. Après 7 jours d'incubation à 30 C°, 0,5 ml de réactif de Nessler a été ajouté dans chaque tube. Le développement de la couleur jaune a été considéré comme un résultat positif pour la production d'ammoniac (Cappuccino and Sherman, 1992).

### 2.5.Les activités enzymatiques

Les activités enzymatiques amylase, caséinase, catalase, cellulase, chitinase, gélatinase, lécithinase, lipase, lipoprotéinase et pectinase ont été évaluées comme suit :

- **L'Amylase** : Les souches ont étéensemencées sur le milieu Glycerol Bouillon Agar (GBA) (Annexe6) contenant de l'amidon soluble. Les cultures ont été incubées à 30 C° pendant 7 jours, et la production d'amylase a été détectée après immersion des boîtes avec une solution de Lugol. Une réaction positive a été marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Pranay et al., 2019).
- **Lacaséinase** : Les souches ont été striées sur une gélose au lait écrémé (Chaiharn et al., 2008). Après 7 jours d'incubation à 30 C°, l'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une dégradation de la caséine (Raval et al., 2012).
- **La catalase** : Une colonie isolée à partir d'une culture sur le milieu ISP<sub>2</sub> solide a été placée sur une lame, et quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont déposées sur la colonie. Une réaction catalase positive résulte de l'apparition des bulles après la libération d'O<sub>2</sub> (Nonomura, 1974).
- **La cellulase** : Les souches ont été striées sur le milieu ISP<sub>2</sub> supplémenté de 1% de cellulose. Après 7 jours d'incubation à 30 C°, les boîtes ont été inondées d'une solution de rouge Congo

## Matériels et méthodes

---

(1% p/v) pendant 20 min, suivi d'un lavage avec une solution de NaCl (1N). Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Prasad et al., 2012).

- **La chitinase** : Les souches ont été striées sur une gélose nutritive supplémentée de 1% de chitine. Après 7 jours d'incubation à 30 C°, l'apparition de zones claires autour des colonies a été considérée comme un signe de production de chitinase.

- **Lagélatinase** : Les souches ont été ensemencées dans des tubes contenant le milieu gélatine nutritif, après incubation à 30 C° pendant 21 jours, les tubes sont ensuite placés au réfrigérateur pendant 1 heure. Si la gélatine devient solide signifie qu'elle n'est pas attaquée, si elle reste liquide, cela signifie qu'une enzyme extracellulaire hydrolyse la gélatine (Camille, 2014).

- **Lalécithinase, la lipase, et la lipoprotéinase** : Les souches ont été striées sur un milieu gélosé contenant du jaune d'œuf préparé selon la méthode décrite par (Camille, 2014). Après incubation à 30 C° pendant 7 jours, la présence des enzymes a été évaluée comme suit : (i) La lécithinase : Apparition d'un halo opaque avec des perles blanc-jaunâtres, avec un bord clair autour de la colonie ou à ses limites ; (ii) La lipase : Apparition d'un halo blanc nacré huileux et brillant ; (iii) La lipoprotéinase : Une apparition d'un halo clair autour de la colonie (Nitsch and Kutzner, 1969).

- **La pectinase** : Les souches ont été striées sur la gélose MP7 (Annexe7) (Prasad et al., 2012), après 7 jours d'incubation à 30 C°, les boîtes ont été inondées avec une solution d'acétate de cuivre à 10% pendant 15 minutes. L'apparition d'un halo clair indique la présence d'une activité pectinolytique (Hankin et al., 1971).

### 3. L'étude *in vitro* de l'association bactérie- plante avec le microscope électronique à balayage (MEB)

Les suspensions de spores de chaque souche ( $10^6$  spores mL<sup>-1</sup>) ont été utilisées pour inoculer les plantules de tomate *in vitro* afin d'évaluer la capacité des actinomycètes à coloniser les racines des plantes. Des graines de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) de la variété Saint Pierre ont été utilisées dans cette expérience. Pour stimuler la germination, les graines ont été placées dans de l'eau distillée stérile pendant 24 h. Ensuite, elles ont été stérilisées en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium à 20% (p/v) (NaClO) pendant 15 min avec une agitation modérée, suivi de plusieurs lavages dans de l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été



## Matériels et méthodes

---

traitées avec l'éthanol à 70% (v/v) pendant 3 min et, finalement, rincées trois fois avec l'eau distillée stérile pendant 15 min (Pagnani et al., 2018). L'inoculation a été obtenue par l'immersion des graines pendant 1h dans l'inoculum. Les graines témoins ont été traitées avec la même procédure mais en utilisant de l'eau distillée stérile. Les graines inoculées et non inoculées ont été transférées dans des boîtes de culture contenant 50 ml de milieu MS - Murashige et Skoog (Murashige and Skoog, 1962) contenant 1% d'agar et 3% de saccharose à un pH final de 5,8, et incubées dans une chambre de croissance avec un environnement contrôlé (22 C°, photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, rayonnement photo-synthétique actif  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ , 65% d'humidité relative). Après 8 jours, les racines des plantules fraîches ont été collectées et des sections de 5 mm de diamètre ont été préparées. Une solution de 2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon de cacodylate 0,2 M (pH 7,2–7,4) a été utilisée pour fixer les fragments. Après une fixation à 4 C° pendant 24 h, les échantillons ont été déshydratés dans de l'éthanol à 70% et à 100% (20 min pour chaque traitement) et traités avec l'hexaméthylsilazane (HMDS) (Pagnani et al., 2020). Les échantillons séchés ont été recouverts de chrome. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage Gemini MEB 500 (MEB) (Zeiss, Oberkochen, Allemagne); toutes les micrographes ont été réalisés en utilisant une tension d'accélération de 5 kV et un signal SE2 (électrons secondaires de type II) (Pagnani et al., 2020).

### 4. L'expérience en serre sur *Solanum Lycopersicum*

Les quatorze souches d'actinomycètes sélectionnées ont été utilisées pour l'inoculation des graines de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variété Saint Pierre. La surface des graines a été stérilisée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 20% (v/v) et lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile (Silini et al., 2016)

L'inoculation a été réalisée en plongeant les graines dans les différentes suspensions de spores ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) pendant 1 h ; des graines immergées dans de l'eau distillée stérile ont été utilisées comme témoin. Les graines inoculées et non inoculées ont été semées dans des pots ( $\Phi = 10 \text{ cm}$ ) remplis de terre (pH 7,9, conductivité électrique  $332 \mu\text{S cm}^{-1}$ , 5% de matière organique, et 0,7% de taux d'humidité), et ont été irriguées avec de l'eau du robinet deux fois par semaine. Quarante jours après le semis (JAS), les tiges et les racines ont été collectées séparément. Différents paramètres ont été étudiés : la longueur des tiges et des racines, le poids frais, le

## Materiels et méthodes

---

poids sec (séchage au four à 105 C° pendant 48 h), le poids sec des cendres (AFDW) et la teneur en chlorophylle. L'AFDW a été déterminée en soustrayant le poids sec du poids des cendres (obtenu à l'aide d'un four à moufle à 450 C° pendant 16 h) comme suit :

$$AFDW (\%) = \frac{\text{Poids sec} - \text{poids des cendres}}{\text{poids sec}} \times 100(1)$$

Les teneurs en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), et en chlorophylle totale (Chltot) ont été déterminées selon la méthode décrite par Arnon (1949) (Arnon, 1949). Brièvement, 0,5 g de feuilles de chaque échantillon, finement coupés, ont été homogénéisés dans 10 ml d'acétone à 80% et conservés à -10 C° pendant une nuit, après centrifugation à 14 000 tr/min pendant 5 min, l'absorbance du surnageant a été lue à 663 pour la chlorophylle a et à 645 nm pour la chlorophylle b. Les concentrations de chlorophylle dans les échantillons ont été calculées à l'aide des équations suivantes :

$$Ch_a(\text{mg L}^{-1}) = 12.41 (\text{OD } 663) - 2.59 (\text{OD } 645) (2)$$

$$Ch_b(\text{mg L}^{-1}) = 22.9 (\text{OD } 645) - 4.68 (\text{OD } 663) (3)$$

$$Ch_{tot}(\text{mg L}^{-1}) = Ch_a + Ch_b (4)$$

### 5. Analyses statistiques des données

Chaque expérience a été réalisée en triplicata (n=3), et les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. Les données ont été traitées par une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA), en utilisant la différence honnêtement significative (HSD) de Tukey post-hoc pour comparer les valeurs moyennes à un niveau de signification de 5% (p <0,05). L'ANOVA a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica 10.0 (Dell Software, Round Rock, TX, USA). Pour évaluer les corrélations potentielles entre les caractères AIA, la solubilisation des phosphates, et l'HCN réalisés *in vitro*, et les paramètres de croissance des plantes enregistrés dans l'expérience en serre, l'ensemble de données a été traité par l'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel XLSTAT 2014 (Addinsoft, Paris, France).

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des  
plantes des souches d'actinomycètes et les effets de  
l'inoculation sur *Triticum durum* sous stress salin**

### 1. Les souches d'actinomycètes et les conditions de culture

Quatorze souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* sp et *Nocardiopsis* sp préalablement sélectionnées en fonction de différents caractères PGPB ont été choisies pour la réalisation de cette étude. Les souches sont cultivées sur le milieu gélosé ISP-2 pendant 7 jours à 30 ° C. La suspension de spore de chaque souche (préparée comme décrit auparavant) a été utilisée pour inoculer les milieux des tests (descriptions données dans chaque paragraphe).

### 2. Estimation des caractères favorisant la croissance sous stress salin

Les souches d'actinomycètes ont été étudiées pour différents traits PGP ; solubilisation du phosphate, la production de l'acide indole acétique AIA, l'acide cyanhydrique (HCN), et de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Avec l'ajout de diverses concentrations de sel (c'est-à-dire 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, et 1,5 M de NaCl) ; Sur la base du test PGP effectué, différentes procédures et milieux de cultures ont été utilisés.

#### 2.1. La solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate a été évaluée sur 5ml du milieu liquide Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), inoculé avec 100 µL de chaque suspension de spores des différentes souches d'actinomycètes. Les cultures en bouillon sont ensuite incubées à 30 ° pendant 7 jours avec une agitation modérée (150 tr / min). La quantification du phosphore soluble a été déterminée selon la méthode d'Olsen et Sommers (1982) et les résultats ont été exprimés en µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> mL<sup>-1</sup>.

#### 2.2. La production de l'acide indole acétique (AIA)

La production de l'AIA a été réalisée sur le milieu de croissance phosphate NBRIP (National Botanical Research Institutes) additionné du tryptophane (0,2%). Le milieu est inoculé par (100 µL) de suspension de spores de chaque souche et incubé à 30 ° C pendant 7 jours sous agitation modérée (Nautiyal, 1999; Ponmurugan and Gopi, 2006; Leungvutiviroj et al., 2010; Khiangte and Lalfakzuala, 2011; Wahyudi et al., 2019). Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 tr/min pendant 20 min, puis 1 ml du surnageant a été mélangé avec 4 ml du réactif de Salkowski (Gordon and Weber, 1951). Le mélange a été incubé à 37 C° pendant 30 min dans l'obscurité et la densité optique a été lue à 530 nm (spectrophotomètre SPEKOL 1300 UV VIS, Analytik

## Matériels et méthodes

---

Jena, Jena, Allemagne). AIA (Sigma, St. Louis, MO, USA) a été utilisé comme standard et les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{g AIA ml}^{-1}$ .

### 2.3. La production de l'acide cyanhydrique et de l'ammoniac

L'activité cyanogène a été détectée sur le milieu Trypticase Soy Agar (TSA) additionné de glycine ( $4,4 \text{ g L}^{-1}$ ). Un papier Whatman a été imprégné d'une solution d'acide picrique (0,5%) et de carbonate de sodium (2%) et a été placé sur le couvercle de chaque boîte inoculée. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du parafilm et incubées à  $30 \text{ C}^\circ$  pendant 7 jours. Après incubation, un changement de couleur du papier Whatman en orange ou en brun est considéré comme un résultat positif (Donate-Correa et al., 2005). La production de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) a été évaluée dans de l'eau peptonée inoculé avec les différentes suspensions sporales. Après incubation, le développement d'une couleur jaune ou orange après addition du réactif de Nessler a été considéré comme un résultat positif (Cappuccino and Sherman, 1992).

### 2.4. L'estimation de l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

L'estimation de l'activité ACC désaminase a été réalisée selon la procédure décrite par Brígido et ses collaborateurs (Brígido et al., 2015) ; 15 ml du milieu ISP<sub>2</sub> liquide ont été inoculés avec 200  $\mu\text{l}$  de chaque suspension de spores et incubés pendant 3 jours à  $30 \text{ C}^\circ$  sous agitation modérée. Les cultures sont ensuite centrifugées et lavées deux fois avec 10 ml du milieu minimum de sels DF (Dworkin et Foster) (annexe 8) sans source d'azote (Dworkin and Foster, 1958). Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 15 ml du milieu DF avec 3 mM d'ACC et incubés pendant 3 jours à  $30 \text{ C}^\circ$  sous agitation, suivi d'une étape de centrifugation et de lavage avec 5 ml de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6). Les suspensions cellulaires ont été transférées dans des tubes eppendorf de 1,5 ml, le surnageant a été éliminé après centrifugation à 10 000 g pendant 1 min et le culot cellulaire a été utilisé pour le test d'activité enzymatique. Le culot des différentes souches d'actinomycètes a été remis en suspension dans 400  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) avec 20  $\mu\text{l}$  de toluène. De plus, 50  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire de chaque souche ont été distribués dans trois microtubes, où 5  $\mu\text{l}$  d'ACC (0,5 M) ont été ajoutés dans deux tubes, tandis que le troisième tube a servi de témoin négatif. Un autre contrôle négatif a également été préparé contenant 50  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) et 5  $\mu\text{l}$  de 0,5 M d'ACC. Après avoir ajouté l'ACC, les suspensions cellulaires ont été vortexées pendant 5S, après cela, tous les tubes ont été incubés à  $30 \text{ C}^\circ$  pendant 30 min. Après incubation, 500  $\mu\text{l}$  de HCl 0,56 M ont été ajoutés à chaque tube puis vortexés pendant 5S. Les cellules ont été centrifugées pendant

## Matériels et méthodes

---

5 min à 10 000 g à température ambiante. La solution d' $\alpha$ -cétobutyrate (Sigma) dans Du TRIS-HCl 0,1 M (pH 8,0) a été utilisée comme standard. Les absorbances des mélanges réactionnels ont été détectées à 540 nm (spectrophotomètre Cary Bio 50 UV VIS, Varian, Palo Alto, CA, USA). L'activité ACC désaminase des souches a été déterminée avec une courbe d'étalonnage d' $\alpha$ -cétobutyrate (5, 10, 15, 20, et 25  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ). L'activité ACC désaminase des souches a été exprimée en  $\mu\text{mol d' } \alpha \text{-cétobutyrate h}^{-1} \text{ mg de protéine}^{-1}$ . La teneur en protéines a été estimée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme un standard. Une courbe d'étalonnage avec BSA (1,25, 2,5, 5, et 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a été utilisée pour déterminer la concentration totale en protéines des extraits.

### 3. L'expérience en serre sur *Triticum durum*

L'expérience a été réalisée en utilisant les graines du blé dur (*Triticum durum* L.) de la variété Cirta R1, avec des susceptibilités aux stress abiotiques comparables à d'autres génotypes parentaux de *Triticum durum* (Ouerghi et al., 2000; Ayadi et al., 2011; Maleki et al., 2014). Pour obtenir un taux de germination optimal, les graines ont été mises dans de l'eau distillée stérile pendant 24 h. Après, les graines sont ensuite stérilisées en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium à 20% (v/v) puis lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile (Silini et al., 2016) et laissées sécher dans des conditions stériles pendant 3 h. L'inoculation a été réalisée en immergeant les graines dans des suspensions de spores ( $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) des différents souches d'actinomycètes pendant 1 h sous agitation modérée; des graines trempées dans de l'eau distillée stérile ont été utilisées comme contrôle (non inoculées) (Djebaili et al., 2020). L'expérience a été organisée comme suit : CNT (sans PGPB et avec/sans stress salin), PGPB (avec PGPB et avec/sans stress salin). Les graines inoculées et non inoculées ont été semées dans des pots ( $\varnothing = 10$  cm) avec trois graines par pot, sur lesquels la surface intérieure a été désinfectée avec l'éthanol (70%), puis remplis du sol autoclavé (pH 8,27, conductivité électrique 332  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , 5% de matière organique, taux d'humidité 0,7%). Les graines sont cultivées dans des conditions de lumière naturelle et irriguées avec de l'eau du robinet pendant 10 jours (chaque unité expérimentale se composait de cinq répétitions). Les plantes ont ensuite été irriguées deux fois par semaine avec une solution de NaCl à des concentrations croissantes de 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, et 1,5 M pendant 4 semaines. Les plantes non stressées en sel (0 M NaCl  $\text{L}^{-1}$ ) ont été irriguées avec de l'eau du robinet uniquement (Mahmoud et al., 2020). Quarante jours après le semis (JAS), les racines et les pousses ont été collectées séparément. La longueur des pousses et des racines (par règle), le poids frais (FW), le poids sec (séchage au

four à 105 C° pendant 48 h), et le poids sec sans cendres (AFDW) ont été déterminés (Djebaili et al., 2020).

### 3.1. Détermination de la chlorophylle

Les teneurs en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), et en chlorophylle totale (Chltot) ont été détectées après 40 JAS comme décrit par Arnon (Arnon, 1949). En bref, 0,5 g de feuilles des plantes ou des tissus de tige de chaque échantillon ont été finement coupés et homogénéisés dans 10 ml d'acétone à 80% et stockés à -10 C° pendant une nuit dans l'obscurité. Après, une centrifugation à 14 000 tr/min pendant 5 min a été réalisée, et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 663 et 645 nm (spectrophotomètre SPEKOL 1300 UV VIS, Analytik Jena) pour déterminer la chlorophylle a (Chla), b (Chlb), et la chlorophylle totale (Chltot) en suivant les équations (1) - (3).

$$Chl_a = 12.41 (OD 663) - 2.59 (OD 645) \quad (1)$$

$$Chl_b = 22.9 (OD 645) - 4.68 (OD 663) \quad (2)$$

$$Chl_{tot} = Ch_a + Ch_b \quad (3)$$

Les résultats ont été exprimés en mg 100 g FW<sup>-1</sup>. Le rapport Chl a : Chl b a été calculé pour observer les effets du stress sur ce paramètre.

### 3.2. La détermination de la proline

La teneur en proline a été détectée dans les feuilles fraîches après 40 JAS selon la méthode décrite par Naidu et al (1998). Brièvement, 0,5 g de feuilles ont été transférés dans des tubes contenant 5 ml d'un mélange méthanol : chloroforme : eau distillée (60:25:15). Les tubes ont été chauffés à 60 C° pendant 2 minutes et les mélanges ont été centrifugés à 10000 tr/min pendant 10 minutes. Ensuite, 1ml du surnageant est ajouté à 4 ml de solution de ninhydrine, 4 ml d'acide acétique glacial, et 1 ml d'eau distillée. Le mélange a été chauffé à 90 C° pendant 45 minutes, refroidi à température ambiante, et l'absorbance a été déterminée à 520 nm (spectrophotomètre SPEKOL 1300 UV VIS, Analytik Jena). La proline (Sigma) a été utilisée comme étalon de référence et les résultats ont été exprimés en µg de proline g poids frais<sup>-1</sup> (µg Pro g FW<sup>-1</sup>).

### 4. Analyse statistique

Toutes les données obtenues sont la moyenne de trois répétitions. Les données ont été traitées par une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA). La séparation des moyennes a été réalisée avec un test post-hoc de Tukey avec un niveau de probabilité de 5%. Les données des expériences *in vitro* et *in planta* ont été traitées par l'algorithme de l'analyse en composantes principales (ACP). Tous les calculs statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statistica 10.0 (Dell Software, Round Rock, TX, USA) et du logiciel XLSTAT 2014 (Addinsoft, Paris, France).



**Activité de biocontrôle des souches d'actinomycètes  
contre des agents pathogènes du sol de *Solanum  
lycopersicum* L. et *Daucus carota* L.: Evaluation *in vitro*  
et *in planta***

### 1. Les souches d'actinomycètes

Quatorze souches d'actinomycètes sont utilisées dans cette étude. Ces souches présentent différents caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB) dans des conditions normales et avec un stress salin comme décrit auparavant, compte tenu de leur caractère halotolérant (jusqu'à 10 % de NaCl) (Smati and Kitouni, 2019; Djebaili et al., 2020, 2021).

### 2. Le test d'antagonisme *in vitro*

#### 2.1. L'activité de biocontrôle par les composés diffusibles et volatiles

Le test d'antagonisme par les composés diffusibles contre les champignons-test : *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) et *Rhizoctonia solani* (RHS) (fournis par G. Bonanomi, Département d'agriculture, Université de Naples), a été effectué par la technique de double culture. Des disques de 6 mm de diamètre des différentes souches d'actinomycètes préalablement cultivées sur milieu ISP<sub>2</sub> (International Streptomyces Project No. 2) jusqu'à sporulation ont été déposés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA (PDA ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), après 48h, des disques de 6 mm de diamètre des souches fongiques ont été placés au centre des boîtes de Pétri. Pour le témoin, des disques fongiques seuls ont été positionnés sur milieu PDA. Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les résultats ont été enregistrés en comparant la croissance fongique en double culture (R2) avec celle du témoin (R1) (Skidmore and Dickinson, 1976; Chauhan et al., 2016; Pellegrini et al., 2020a). Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$(I\%) = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100$$

L'activité de biocontrôle par les composés volatils (COV) a été évaluée selon Fernando et al, (2005) modifiée comme suit : Des cylindres des souches d'actinomycètes ont été placés sur le milieu ISP<sub>2</sub> des boîtes compartimentées (ISP<sub>2</sub>/PDA), après 48 heures, des cylindres contenant les souches fongiques ont été positionnés sur le côté PDA. Les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées jusqu'à la croissance complète du témoin. Le pourcentage d'inhibition des cultures fongiques a été calculé comme décrit ci-dessus.

### 2.2.L'observation de l'interaction PGPR-pathogène par le microscope électronique à balayage (MEB)

Pour évaluer les changements morphologiques et l'effet d'inhibition sur la structure fongique et le dépôt d'hyphes, des petits morceaux d'agar de la zone d'interaction PGPR-champignon et du témoin (croissance fongique normale) ont été prélevés et montés sur du ruban adhésif. Les échantillons frais collectés ont été observés par microscopie électronique à balayage (MEB) 500 SEM Gemini (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

### 2.3.L'activité antibactérienne

L'effet des souches d'actinomycètes sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes ; *Pseudomonas syringae* I1082, *Pseudomonas corrugata* I1501, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*I1539, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* I1230, I1240, et I1262 a été déterminé par la méthode de double culture. Des cultures fraîches sur bouillon nutritif (BN) de chaque bactérie-test ont été ajustées à 0,5 McFarland pour obtenir une densité finale de  $10^8$  UFC/ml. Des cylindres d'agar de 6 mm des souches d'actinomycètes ont été placés sur la gélose nutritive (GN) préalablement ensemencée avec les bactéries-test. Après incubation à 30°C pendant 24h, le pourcentage d'inhibition a été obtenu en soustrayant le diamètre total du diamètre de la colonie (Kitouni et al., 2005).

### 2.4. L'essai d'antagonisme avec le surnageant acellulaire (CFS)

Les souches H12 (*Streptomyces albidoflavus*) et H14 (*Nocardioopsis aegyptica*) montrant une bonne activité de lutte biologique *in vitro* ont été évaluées pour l'activité antifongique et antibactérienne en utilisant le surnageant acellulaire (CFS) tel que décrit par les lignes directrices du CLSI (Wayne, 2011). Les souches ont été cultivées sur le milieu liquide ISP<sub>2</sub> séparément, après incubation à 30°C pendant 7 jours sous agitation modérée, les cultures ont été ajustées à une densité finale de  $10^6$  spores/ml par spectrophotomètre, et un consortium de souches combinées a été préparé. Les cultures ont été centrifugées à 10000tr/10min puis passées sur un filtre bactériologique de 0,22 µm pour obtenir le CFS. Les plaques de polystyrène avec la méthode de microdilution (96 puits, contenant 8 rangées) ont été utilisées pour déterminer l'efficacité du CFS. Dans un premier temps, 100 µL de milieu PDB (pour les champignons) et BN (pour les bactéries pathogènes) ont été introduits dans les différents puits. Ensuite, le CFS (100 µL) des souches H12, H14, et le consortium ont été insérés dans les premiers puits. Après mélange du contenu des premiers puits, 100 µl de solution ont été prélevés

dans ces derniers et transférés dans les autres puits jusqu'au neuvième, de cette manière, à chaque transfert la concentration initiale était réduite de moitié. Enfin, les champignons et les bactéries-tests ont été inoculés (100 µL). Les dixième, onzième, et douzième puits ont été utilisés comme témoins, contenant dans l'ordre ; le CFS, le milieu de culture, et l'inoculum. Les plaques ont ensuite été scellées avec du parafilm, insérées dans des sacs hermétiques, puis incubées à 30°C pendant 24 heures (pour les bactéries) et 5 jours pour les champignons. Les résultats ont été lus au spectrophotomètre et par addition de résazurine (bleu d'Alamar) (Teh et al., 2017).

Afin d'élucider les propriétés antibactériennes (bactéricides ou bactériostatiques) des inoculas testés, les résultats obtenus (croissance ou absence de croissance) ont été confirmés par le test sur boîtes de Pétri, en semant le contenu du premier et du dernier puits. Les boîtes ont été incubées dans les conditions optimales pour la croissance des microorganismes examinés. Si les micro-organismes ne reprenaient pas la croissance après incubation, l'inoculum était considéré comme bactéricide, sinon, il était bactériostatique.

### 3. L'Etude *in planta* de l'activité antagoniste

L'activité de biocontrôle du consortium a été réalisée sur *S. lycopersicum* et *D. carota* contre les bactéries et les champignons pathogènes cités ci-dessus. La pré-émergence a été réalisée en inoculant les graines avec le consortium pendant 3h à température ambiante sous agitation modérée. Les infections ont été réalisées en utilisant la suspension de spores de FORL et RHS et de bactéries pathogènes ( $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup>) (Roberti et al., 2015; Parveen et al., 2017; Pellegrini et al., 2020a). L'expérience a été organisée comme suit ; (i) CNT (sans PGPB/infection), PGPB (avec PGPB/pas d'infection), PGPB+INF (avec PGPB/infection), INF (avec infection/pas de PGPB). Chaque unité expérimentale a été réalisée dans 25 pots avec deux graines par pot (diamètre 6/7) remplis du sol commun (pH 8,2, conductivité électrique 1ds/m, porosité totale 81% (v/v)). Les expérimentations ont été réalisées dans des conditions normales jusqu'à l'apparition des symptômes de la maladie (défoliation de la tomate et la pourriture molle des plants de carotte). La protection induite a été évaluée par l'estimation de la survie des plantes, les paramètres morfo-biochimiques, les dommages, et les teneurs en chlorophylle (Pellegrini et al., 2020a).

### 4. L'analyse statistique

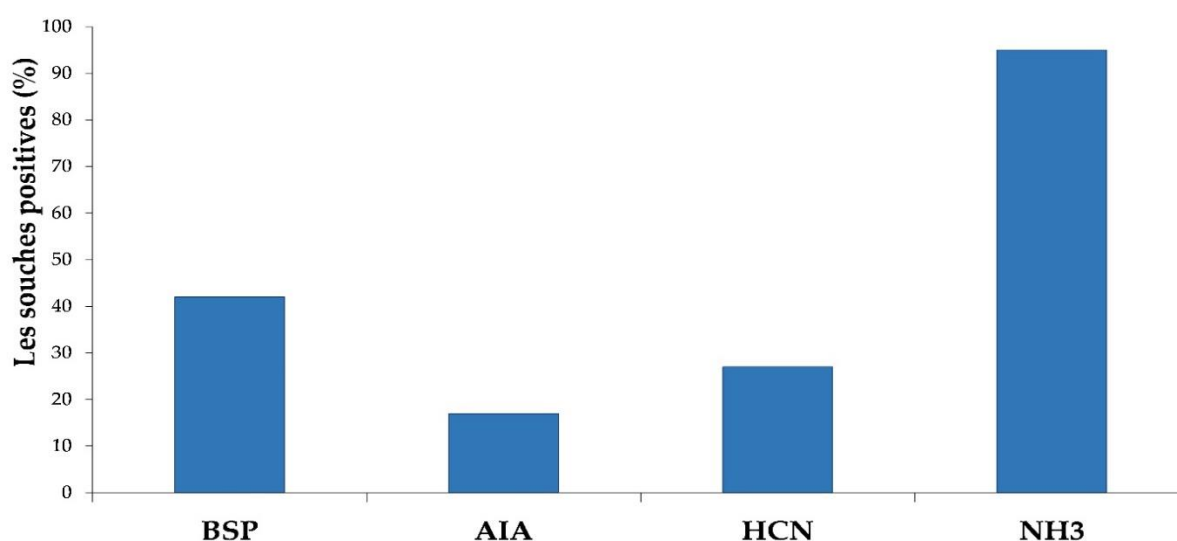
Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  écart type. Les expériences en pots ont été traitées statistiquement par une analyse ANOVA unidirectionnelle, le test post hoc a été appliqué à 5% ( $p < 0,05$ ) de probabilité. Toutes les données ont été traitées avec le logiciel XLSTAT 2014 (Addinsoft, Paris, France).

## **Résultats et discussions**

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des  
plantes (PGPR) des souches d'actinomycètes et leur  
capacité à coloniser *in vitro* *Solanum lycopersicum***

### 1. Les caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB)

Pour évaluer la potentialité des souches pour être utilisées comme des biostimulants et/ou agents de lutte biologique, il est nécessaire d'établir des caractères favorisant la croissance des plantes (PGP). Dans notre étude, différents tests PGP ont été réalisés pour sélectionner des souches prometteuses - parmi les soixante isolats - afin d'améliorer la croissance et le développement des plantes. Les résultats obtenus pour les différents tests (PGP) sont présentés dans la figure 3.



**Figure 3.** Pourcentage des souches (%) présentant des caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB). Sur la figure, les pourcentages de bactéries solubilisant le phosphate (BSP) et les souches produisant de l'AIA (acide indole-3-acétique), l'acide cyanhydrique (HCN), et de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) sont indiqués.

La plupart des souches (70%) étaient capables de produire l'ammoniac, (45%) étaient capables de dissoudre le phosphate inorganique, (18%) étaient capables de produire l'AIA, et (22%) étaient capables de produire l'HCN. Sur la base de ces résultats, et parmi les 60 souches testées, 14 souches ont été sélectionnées comme des souches prometteuses PGPB :

- **D14**, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (Gene Bank accession MG597514).
- **G10**, *Streptomyces iakyrus* (MG597593).
- **G22**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597582).
- **G33**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597585).
- **H12**, *Streptomyces albidoflavus* (MG597552).
- **H14**, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597543).
- **J4**, *Streptomyces thinghirensis* (MG597590).



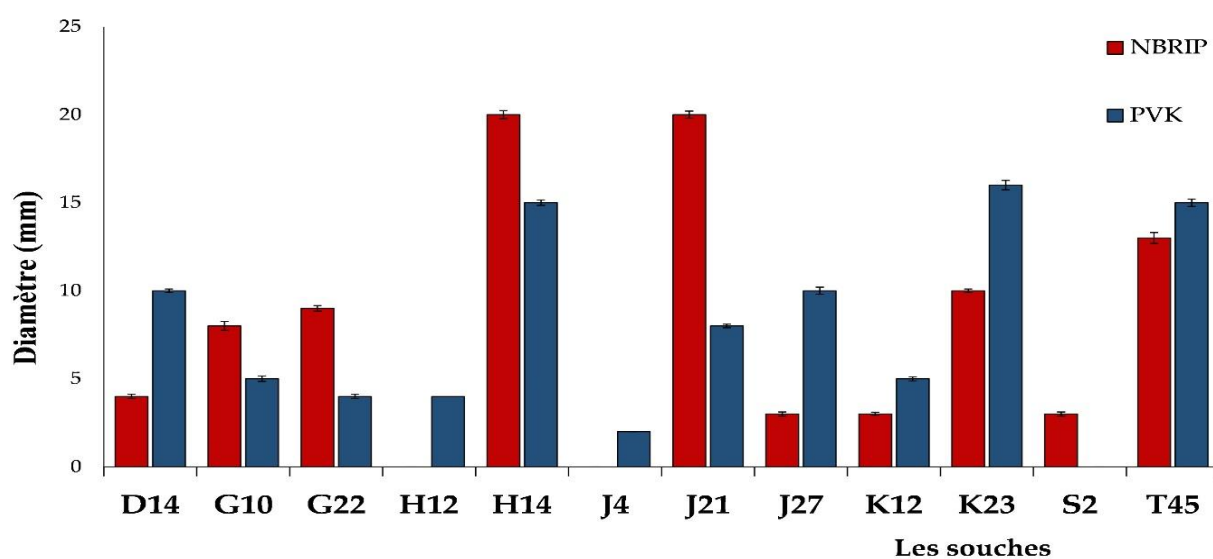
- **J13**, *Streptomyces anulatus* (MG597579).
- **J21**, *Nocardiopsis alba* (MG597576).
- **J27**, *Streptomyces ambofaciens* (MG597599).
- **K12**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597545).
- **K23**, *Streptomyces thinghirensis* (MG597560).
- **S2**, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597572).
- **T45**, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (MG597502).

Ces isolats ont toléré jusqu'à 10% de NaCl lors des tests *in vitro*, suggérant des traits halotolérants (Smati and Kitouni, 2019).

### 1. La solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate sur milieu solide a été révélée par la présence d'une zone claire autour des colonies. La solubilisation du phosphate a été observée dans douze souches parmi les quatorze testées. Les diamètres enregistrés pour ces BSP sont représentés dans la figure 4. La capacité de solubilisation des souches était différente en fonction du milieu de culture utilisé. La plupart des souches (79%) ont montré une capacité de solubilisation dans le milieu PVK, la souche K23 a montré le plus grand diamètre de solubilisation (16 mm). Sur milieu NBRIP, dix souches (71%) ont montré cette capacité, et le diamètre maximum (20 mm) a été observé chez les souches H14 et J21. Les diamètres indiqués par nos souches étaient plus larges que ceux rapportés dans des études similaires (Franco-Correa et al., 2010; Kaur et al., 2013), mais toujours en ligne avec ce qui a été rapporté par plusieurs auteurs pour les milieux NBRIP et PVK (Gangwar et al., 2014; Sebihi et al., 2016). Sur milieu LB, une seule souche (J27) présentait un halo de solubilisation, d'un diamètre de 2 mm. Ce résultat pourrait être dû soit à la richesse du LB en nutriments, qui ne permet pas aux bactéries de solubiliser le phosphate inorganique (Nautiyal, 1999), soit au fait que les bactéries n'ont pas besoin du phosphate car il est déjà présent dans le milieu sous une forme facilement assimilable.

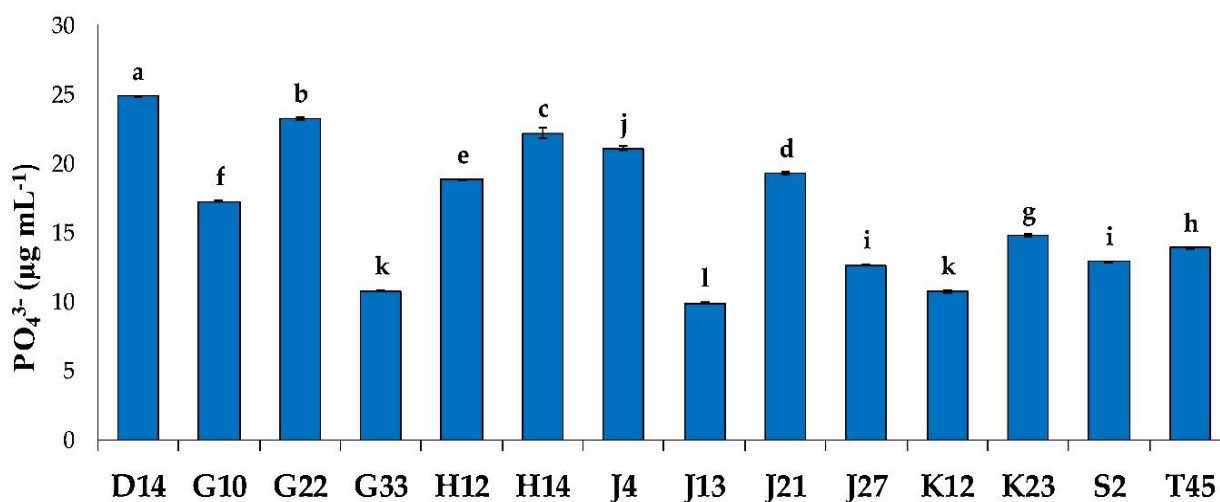
## Résultats et discussions



**Figure4.** Les diamètres d’halos de solubilisation du phosphate par les souches d’actinomycètes sur les milieux de croissance solides de National Botanical Research Institute (NBRIP) et Pikovskaya (PVK). Pour le même support (NBRIP/PVK), les résultats suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc HSD de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Les quantités du soluble phosphore obtenues par les quatorze souches cultivées en milieu liquide PVK sont représentées dans la figure 5. La solubilisation la plus élevée a été obtenue par la souche D14 ( $24,84 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ), des résultats inférieurs mais similaires ont été obtenus par les souches G22 ( $23,25 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ) et H14 ( $22,2 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ). Le taux de solubilisation le plus faible a été enregistré chez la souche J13 ( $9,89 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ).

## Résultats et discussions



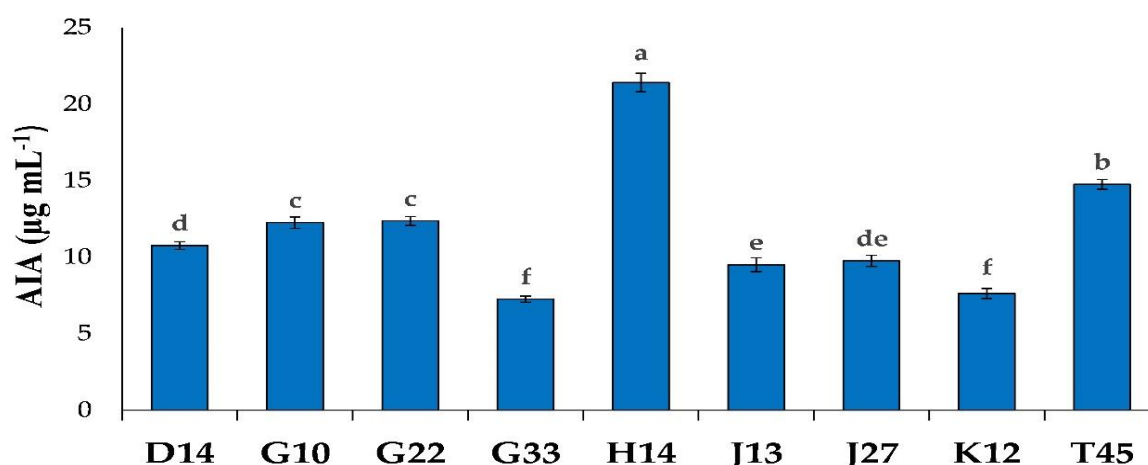
**Figure 5.** Les concentrations du phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) solubilisé par les souches d'actinomycètes cultivées sur le milieu PVK liquide. Les résultats suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc HSD de Tukey ( $p > 0,05$ ).

En milieu PVK solide, seules 11 souches (D14, G10, G22, H12, H14, J4, J21, J27, K12, K23 et T45) ont pu produire un halo de solubilisation autour des colonies (2 à 16 mm de diamètre), tandis que toutes les souches ont pu solubiliser le phosphate sur le milieu PVK liquide. Ces résultats indiquent que, malgré l'absence d'halo de solubilisation autour des colonies G33, J13, et S2 sur milieu solide, ils peuvent solubiliser le phosphate à des taux considérables sur le milieu PVK liquide. Cette absence de corrélation entre la solubilisation du phosphate sur le milieu PVK solide et liquide a été statistiquement confirmée par un test de corrélation. Une faible association négative a été obtenue ( $r = -0,27$ ), suggérant que la solubilisation en milieu liquide est une technique plus fiable que la technique solide (Nautiyal, 1999). La capacité d'utiliser le  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  est également importante pour la production de phytohormones et, par conséquent, pour améliorer indirectement la croissance des plantes (FATMAWATI et al., 2019). Un autre mécanisme microbien de la solubilisation du minéral phosphate est lié à la libération d'acides organiques de faible poids moléculaire, qui chélatent les cations pour lier les phosphates à travers leurs groupes hydroxyles et carboxyles. Par conséquent, ces souches ont le potentiel de mobiliser des insolubles phosphates inorganiques en cas de faible disponibilité du phosphate (FATMAWATI et al., 2019). Les souches de PGP qui sont capables de solubiliser le phosphate inorganique et rendre les formes organiques disponibles pour l'absorption végétale ont également un effet positif sur la croissance des

plantes (Khan et al., 2014; Olanrewaju et al., 2017; Boukaya et al., 2018). Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par plusieurs auteurs (Gangwar et al., 2014. Faried et al., 2019).

### 2. La production de l'acide indole acétique (AIA)

La figure 6 représente la production d'AIA par les différentes souches testées. Parmi les quatorze souches d'actinomycètes, neuf souches (64%) ont la capacité de synthétiser l'AIA avec des taux de production variables ; les quantités les plus élevées d'AIA ont été observées chez la souche H14 ( $21,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ), suivie par les souches T45 ( $14,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), G22 ( $12,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), et G10 ( $12,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Hors que la plus faible production a été obtenue par les souches G33 et K12 ( $7,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figure 6.** Les concentrations d'acide indole-3-acétique (AIA) produites par les souches d'actinomycètes sélectionnées. Les résultats suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test post hoc HSD de Tukey ( $p > 0,05$ ).

L'AIA est une substance favorisant la croissance des plantes qui agit par différentes voies métaboliques (Goudjal et al., 2014; Olanrewaju et al., 2017), elle est impliquée dans l'élongation des racines, la division cellulaire, et la prolifération des poils radiculaires (RADWAN et al., 2002; Ahmad et al., 2005; Wahyudi et al., 2019). Parmi ses différents effets, l'AIA stimule la germination des graines, la longueur des plantules, et le poids sec (Barazani and Friedman, 1999; Goudjal et al., 2014; SILINI, 2014; Boukaya et al., 2018). Environ 80% des rhizobactéries sont capables de produire l'acide indole 3-acétique (AIA) comme un métabolite secondaire (Glick, 1995). Le L-tryptophane est un précurseur de la production d'AIA, ainsi, son ajout dans le milieu de culture favorise et augmente généralement sa synthèse par la bactérie (Glick, 1995). Dans les conditions naturelles, cet acide aminé est fourni par les exsudats racinaires (Dastager et al., 2011). De nombreuses études suggèrent que des petites

## Résultats et discussions

quantités d'AIA sont nécessaires à la croissance primaires des racines (Barazani and Friedman, 1999; Patten and Glick, 2002), et que les bactéries qui sont capables de sécréter des composés indoles supérieures à  $13,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ont une activité PGP. Il a été rapporté que plusieurs espèces d'actinomycètes produisent de l'AIA (Boukaya et al., 2018), qui est influencée par les conditions de culture, la phase de croissance, et la disponibilité du substrat (Mirza et al., 2001). Nos résultats sont en accord avec les données présentes dans la littérature (Sreevidya et al., 2016; Sebihi et al., 2016; Ashwini et al., 2018; FATMAWATI et al., 2019; Wahyudi et al., 2019), suggérant que les souches sélectionnées sont des bons candidats comme agents biostimulants.

### 3. Laproduction de l'acide cyanhydrique, l'ammoniac, et les activités enzymatiques

La production de l'acide cyanhydrique, l'ammoniac, et plusieurs activités enzymatiques sont présentées dans le tableau 1.

**Table1.** Acide cyanhydrique, production d'ammoniac, et les différentes activités enzymatiques détectées pour les souches d'actinomycètes.

	K12	K23	H12	H14	S2	D14	T45	J4	J13	J21	J27	G10	G22	G33
HCN	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
NH <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Caseinase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Chitinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gélatinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lécithinase	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Lipase	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Lipoprotéase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Pectinase	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

(+) ; résultat positif, (-) ; résultats négatif.

Onze souches (79%) étaient positives pour la production de l'HCN, tandis que la capacité de produire l'ammoniac a été exprimée pour les quatorze souches testées. Pour les

## Résultats et discussions

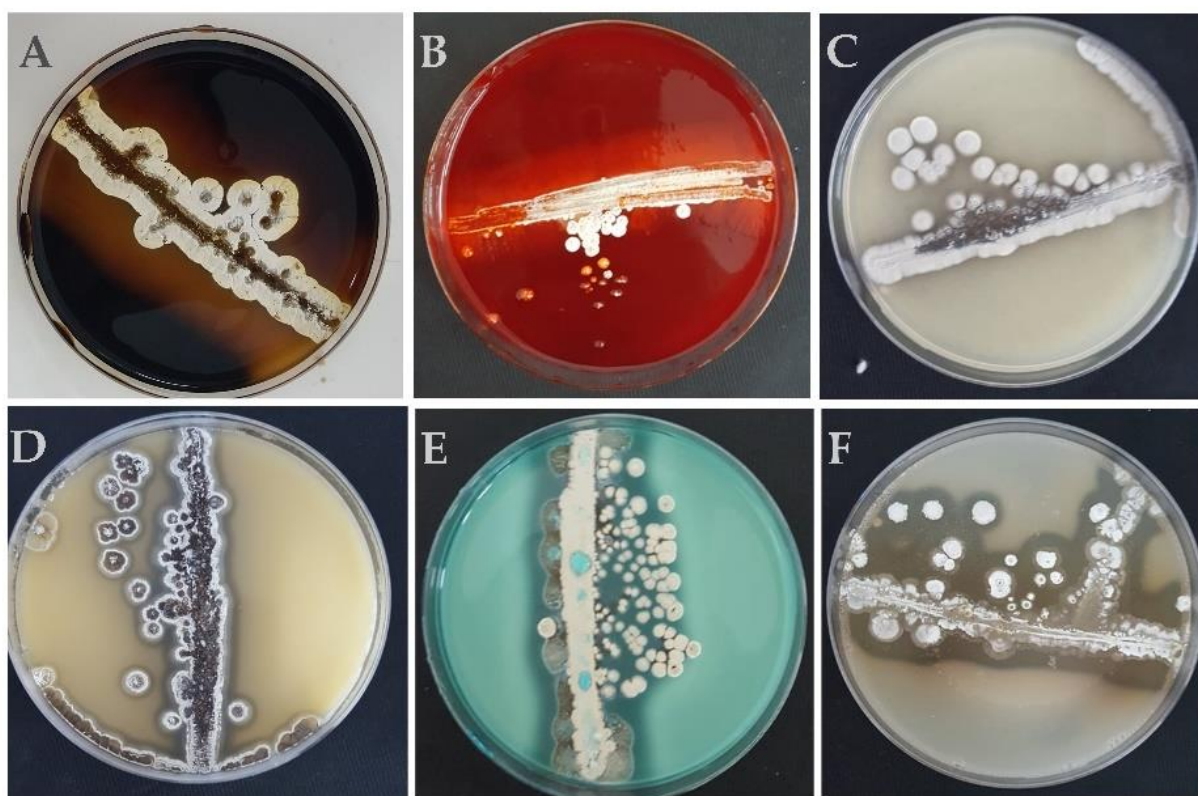
---

souches D14, G22, et T45, aucune activité cyanogène n'a été observée. Au lieu de cela, une production intense d'HCN a été montrée par les souches G10, G33, H12, J4, J13, J27, K12, K23, et S2. Nos résultats sont comparables aux données présentes dans la littérature (Ahmad et al., 2008; Kumar et al., 2012; SILINI, 2014). Ces composés volatils à des faibles quantités peuvent aider la plante à faire face contre les phytopathogènes et à stimuler leur croissance (Bashan and De-Bashan, 2005; SILINI, 2014). Le HCN est un inducteur de la résistance des plantes (Kumar et al., 2012), il interfère avec la voie du cytochrome oxydase provoquant des effets toxiques sur les microorganismes pathogènes (Bashan and De-Bashan, 2005).

De nombreux auteurs rapportent la production d'ammoniac comme un caractère PGP (Joseph et al., 2012), et il a été corrélé avec l'élongation des racines et des pousses des plantes et l'augmentation de la biomasse végétale (Passari et al., 2015; Mota et al., 2017). L'ammoniac participe également à la décomposition de la matière organique, ce qui se traduit par une productivité végétale plus élevée et une plus grande tolérance aux phytoparasites (Mota et al., 2017). Cependant, une forte émission d'ammoniac par les rhizobactéries est toxique pour la plante (Weise et al., 2013), et la production d'ammoniac doit être plutôt considérée comme un trait négatif, à moins qu'elle ne soit pas transformée en  $\text{NO}_2^-$  puis en  $\text{NO}_3^-$  par des bactéries nitrifiantes. Cependant, les protéines qui permettent aux bactéries de produire de l'ammoniac sont peu fréquentes dans la rhizosphère, ou sont présentes en très faibles quantités, tandis que les bactéries nitrifiantes sont généralement présentes dans le sol.

Les différentes activités enzymatiques des quatorze souches d'actinomycètes sont présentées dans le tableau 1. Toutes les souches testées ont montré des activités enzymatiques significatives de la catalase, de la cellulase, de l'amylase, des protéases, de la pectinase, des lipases, et de la chitinase au moyen des tests *in vitro* (exemples de résultats de certains tests d'activités enzymatiques sont présentés dans la figure 7. Ces résultats, bien que pas toujours directement liés aux caractères PGP, montrent certaines caractéristiques qui peuvent être biotechnologiquement intéressantes et d'une valeur commerciale significative. Parmi les mécanismes indirects de la promotion de la croissance des plantes, la production d'enzymes est une fonction clé dans la prévention des infections des plantes causées par des agents pathogènes (Reetha et al., 2014). La présence d'enzymes hydrolytiques joue également un rôle important dans la fertilité des sols en dégradant les polysaccharides et les protéines complexes en des formes plus simples. Ces derniers sont rendus au sol, augmentant son état de fertilité (Sebihi et al., 2016; Turan et al., 2017). La catalase détectée dans toutes les souches (tableau 1)

protège les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. La catalase confère à la bactérie une bonne résistance aux différentes contraintes mécaniques et chimiques environnementales (Kumar et al., 2012; Mushtaq et al., 2019), ce qui lui confère un avantage écologique. Les amylases sont des enzymes thermostables qui contribuent à la dégradation de la matière organique dans les sol et les résidus végétaux (Turan et al., 2017). Les protéases microbiennes contribuent au recyclage de la matière organique dans les sols et jouent un rôle important dans les interactions entre les communautés microbiennes du sol par le biais du clivage des protéines de la paroi cellulaire (Vranova et al., 2013; Stach et al., 2018). Les pectinases sont essentielles à la décomposition des résidus végétaux, contribuant au recyclage des composés carbonés du sol. Les enzymes pectinolytiques améliorent l'invasion des racines par les bactéries, jouant un rôle indispensable dans les interactions plantes-microbes (Vardharajula et al., 2017). La souche G10 (*S. iakyrus*) est la seule capable de dégrader la chitine. Les chitinases inhibent la croissance fongique en hydrolysant la chitine, qui est le principal composant de la paroi cellulaire fongique (Joseph et al., 2012). Ces enzymes sont très importantes à des fins biotechnologiques : elles sont utilisées dans l'ingénierie des plantes résistantes aux phytopathogènes et elles peuvent également être utilisées dans la conservation des semences (Islam and Datta, 2015). Les lipases sont largement distribuées parmi les micro-organismes et sont d'une grande importance industrielle (Pascoal et al., 2018); l'hydrolyse des triglycérides peut contribuer de manière significative au compostage des boues d'épuration (Turan et al., 2017).



**Figure 7.** Criblage sur plaques d'agar (plaques de 90 mm de diamètre) effectué pour les activités enzymatiques de l'amylase (A), de la cellulase (B), de la chitinase (C), de la lécithinase (D), de la pectinase (E) et de la caséinase (F).

### 2. L'étude *in vitro* de l'association bactérie- plante avec le microscope électronique à balayage (MEB)

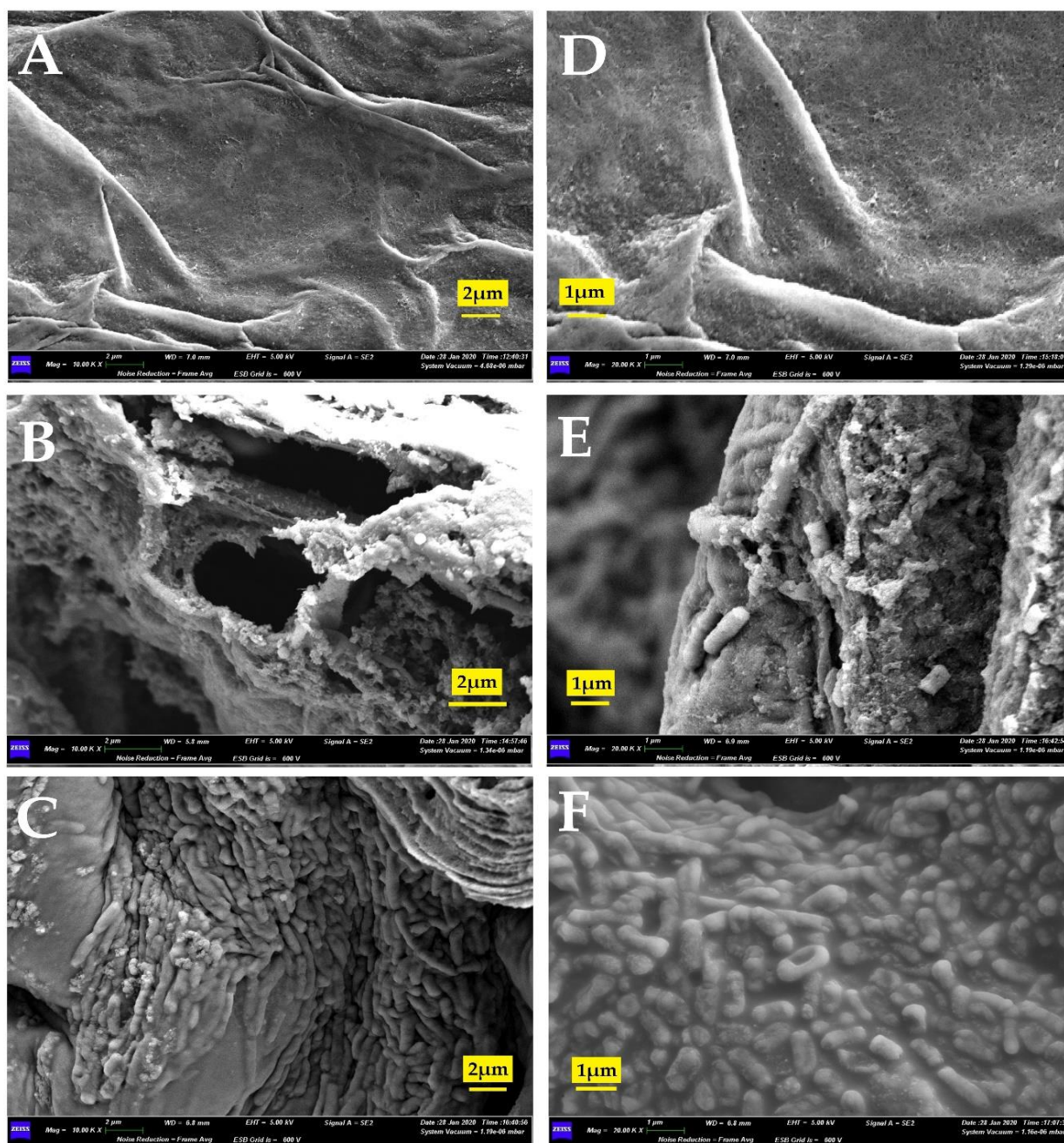
La colonisation bactérienne des racines peut être convenablement analysée par le microscope électronique à balayage (MEB). Cette procédure permet de comprendre certains aspects écologiques des interactions entre les bactéries et les plantes hôtes, ainsi que la rhizocompétence et la dynamique de la colonisation à l'intérieur des tissus racinaires.

L'étude de l'association microbienne avec les racines de *S. lycopersicum*. a été investiguée pour toutes les souches. Les observations du MEB des racines témoins (non inoculées) ainsi que les racines inoculées avec les souches G10 (*S. iakyrus*) et H14 (*N. aegyptica*) sont présentées dans la figure 8. Ces deux souches ont été choisies parmi les autres, car elles ont enregistré les meilleurs taux de croissance lors de la culture *in vitro* de *S. lycopersicum*. De plus, elles sont représentatives des deux genres auxquels appartiennent les autres souches.

Le contrôle (Figure 8A, D) montre des surfaces propres (indicateur des conditions aseptiques), tandis que l'association des souches G10 et H14 sur les parois des cellules



radiculaires était évidente à différents grossissements (Figure 8B, E et 6C, F, respectivement). Les plantules inoculées avec la souche G10 colonisées par des grappes de spores agglomérées (Figure 8B, E) ont montré une croissance remarquable par rapport aux témoins non inoculés. Dans le cas de l'échantillon inoculé avec la souche H14, la présence de spores de différentes longueurs dispersées le long des surfaces des plantules (figure 8C, F) était évidente. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Sreevidya et ses collaborateurs (Sreevidya et al., 2016), qui ont rapporté la capacité de quatre souches de *Streptomyces* à croître et à adhérer à la surface des racines de pois chiche. En ce qui concerne *Nocardiosis*, pour autant que nous le sachions, la présente étude est le premier rapport décrivant la capacité d'association des racines chez les plantules *in vitro*. La capacité d'association racinaire est une caractéristique de base généralement attribuée aux souches avec des traits PGP (Murashige and Skoog, 1962; Dal Cortivo et al., 2017) . Les associations plantes-bactéries sont facilitées par les exsudats racinaires (c'est-à-dire les composés aromatiques et phénoliques, les sucres, les acides aminés, les acides organiques et les glucides) qui se comportent comme des agents chimio-attractifs pour les micro-organismes et aident à la colonisation des racines (Sreevidya et al., 2016). Les actinomycètes, comme les autres PGPB ont la capacité d'adhérer aux racines des plantes et de produire différents composés qui protègent la plante hôte contre les différents stress biotiques et abiotiques (Sreevidya et al., 2016). Au-delà de la production d'auxines, de gibbérellines, et de cytokinines qui favorisent la croissance des plantes (Gamez et al., 2019). Les PGPB libèrent des signaux de détection de quorum. Ces molécules favorisent la synthèse de substances antimicrobiennes qui peuvent protéger la plante contre d'éventuels agents pathogènes présents dans le sol (Primo et al., 2015).



**Figure 8.** Les micrographes obtenus par le microscope électronique à balayage (MEB) des racines fraîches obtenues à partir de plantules de huit jours de *Solanum lycopersicum*. L non inoculées et inoculées avec les souches G10 et H14. L'échantillon de contrôle (A, D) montre des surfaces claires à 10K et 20K de grossissement. Au contraire, la colonisation microbienne est évidente à 10K de grossissement dans les plantules inoculées avec les souches G10 (B) et H14 (C). À 20K, G10 (E) et H14 (F) ont dispersé des spores de différentes longueurs.

### 3. L'expérience en serre sur *Solanum Lycopersicum*

Les graines de tomates ont également été inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes dans une expérience en pot sous serre, et les plantes ont été collectées après

## Résultats et discussions

---

40 JAS. Les plantules inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes ont montré une croissance meilleure comparé aux plantules non inoculées (Figure 9/10).



**Figure 9.** Les plantules de tomates après 40 JAS inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes.

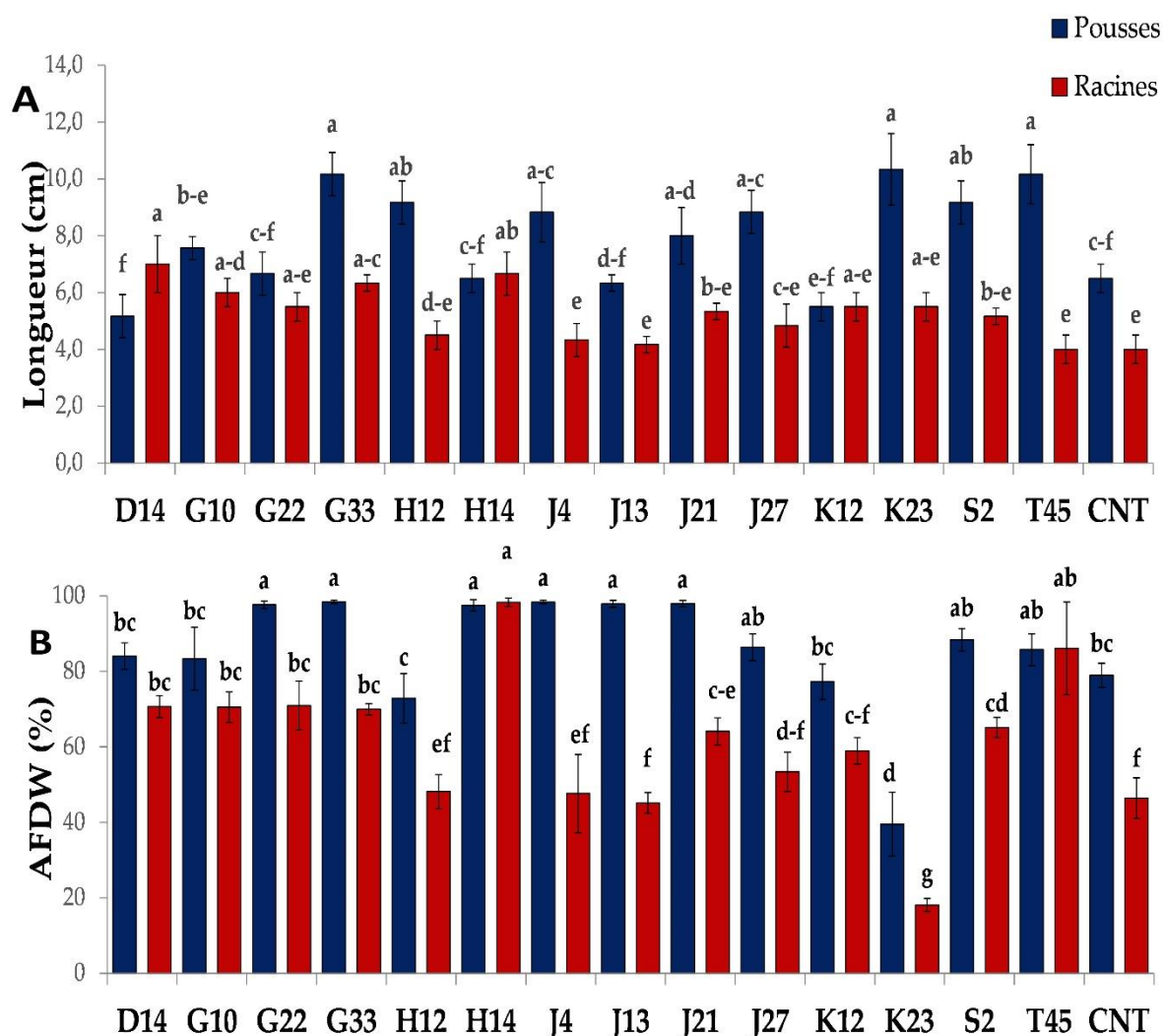


**Figure 10.** Les plantules de tomates après 40 JAS inoculées et non inoculées avec les souches d'actinomycètes.

(A). Control (B). Plantule inoculée avec la souche K23.

Les résultats obtenus sur les longueurs des pousses et des racines et AFDW pour les plantes inoculées (D14 – T45) et pour les plantes témoins (CNT) sont présentés à la figure 11.

## Résultats et discussions



**Figure 11.** La longueur des pousses et des racines (A), poids sec sans cendres (AFDW) (B) des pousses et des racines des plantes de tomates (*Solanum lycopersicum*. L). Les résultats suivis de mêmes lettres de ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc HSD de Tukey ( $p > 0,05$ ).

L'inoculation avec les souches d'actinomycètes a montré des effets variables sur la longueur et le pourcentage d'AFDW des pousses et des racines. La stimulation de ces paramètres était différente selon la souche utilisée. Les longueurs de pousses des plantes inoculées avec les souches K23, G33, T45, H12, et S2 ont enregistré les valeurs les plus élevées ( $p < 0,05$ ), avec une augmentation de la longueur des pousses de 51% en moyenne par rapport au témoin. En ce qui concerne l'AFDW des pousses, les pourcentages les plus élevés ont été enregistrés pour les plantes inoculées avec les souches G33, J4, J21, J13, G22, et H14 ( $p < 0,05$ ). Pour ces échantillons, l'AFDW a augmenté de 24% en moyenne par rapport au contrôle. Les pourcentages d'AFDW les plus faibles ont été enregistrés pour la souche K23 ( $p < 0,05$ ). Des résultats similaires ont été soulignés pour les longueurs des racines et l'AFDW : les meilleures

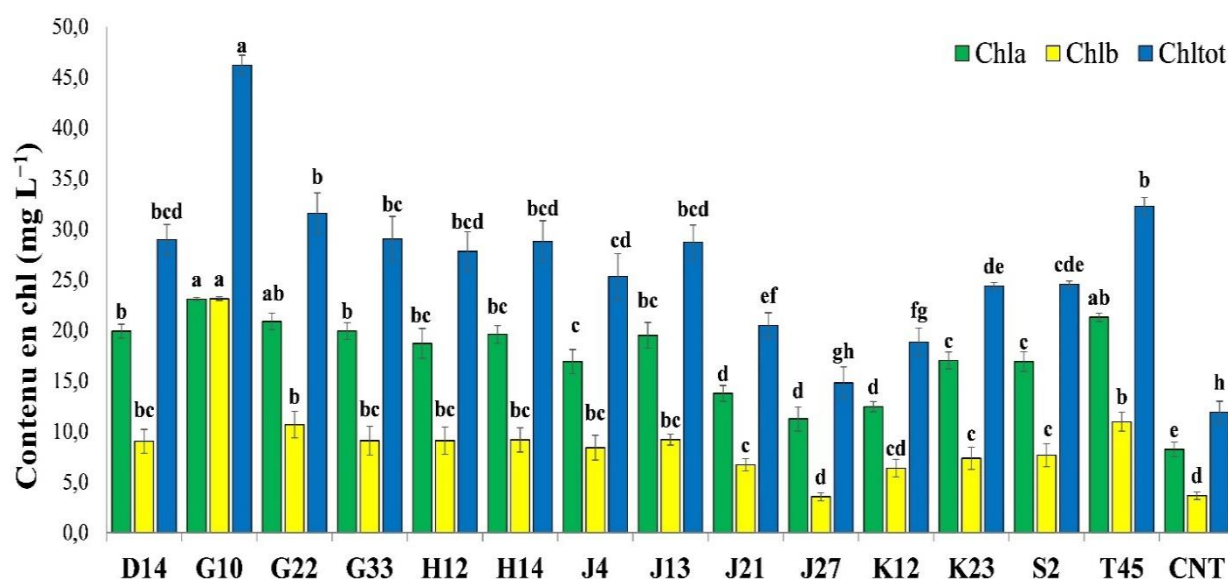
## Résultats et discussions

---

longueurs ont été enregistrées avec les souches D14, H14, G33 et G10, et la meilleure AFDW a été enregistrée dans les plantes inoculées avec les souches H14, T45, G22, D14, G10, G33, S2, et J21 ( $p < 0,05$ ). Dans ces plantes, l'augmentation par rapport au témoin était de 63% et 61% pour les longueurs de racines et l'AFDW respectivement. Pour l'AFDW, les plantes inoculées avec la souche K23 ont enregistré une fois de plus les valeurs les plus faibles ( $p < 0,05$ ).

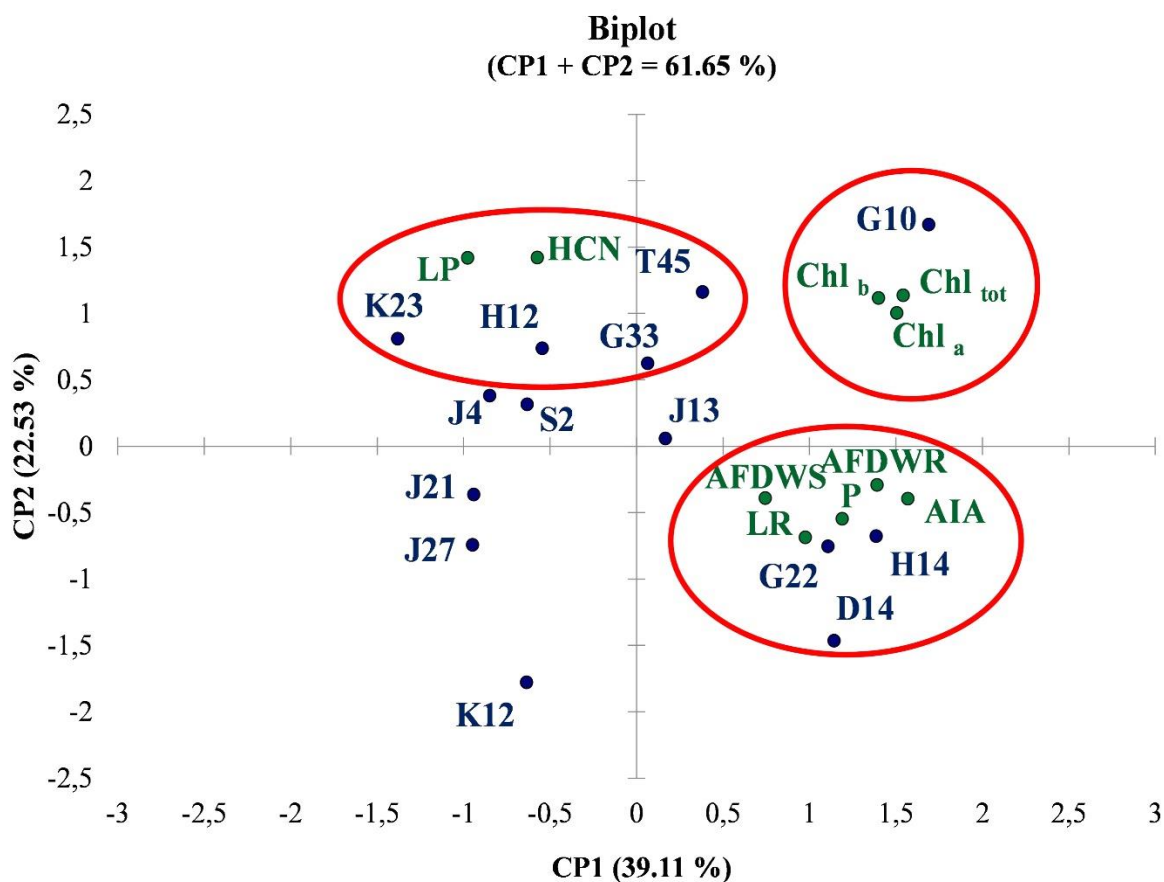
Les pousses des plantes ont également été étudiées pour leur teneur en chlorophylle a (Chla), en chlorophylle b (Chlb), et en chlorophylle totale (Chltot), dont les résultats sont présentés dans la figure 12. L'inoculation avec les souches d'actinomycètes a considérablement amélioré la teneur en chlorophylle des pousses des plantes inoculées par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ). Différents résultats ont été obtenus sur les teneurs en chlorophylle en fonction des souches utilisées. Les teneurs les plus élevées ( $p < 0,05$ ) de Chla ont été observées dans les échantillons inoculés avec les souches G10, T45, et G22 (statistiquement similaires entre elles,  $p > 0,05$ ). La souche G10 a également amélioré de manière significative les teneurs en Chlb ( $p > 0,05$ ) dans les pousses, entraînant des teneurs plus élevées en Chltot par rapport aux autres souches ( $p > 0,05$ ). Ces résultats montrent clairement que l'inoculation par les actinomycètes affecte positivement les caractères morfo physiologiques des plantes. Parmi les traits PGP précédemment soulignés pour ces souches, la production d'AIA joue un rôle important dans la promotion de la croissance. Cette hormone est reconnue pour stimuler l'élongation cellulaire - par conséquent la promotion du développement des plantes - et la teneur en chlorophylle. Nos résultats sont en accord avec ce qui a été précédemment rapporté par d'autres auteurs pour *Streptomyces*. L'étude de Sreevidya et ses collaborateurs (2016) par exemple, a rapporté que différentes souches de *Streptomyces* augmentaient les paramètres de croissance des plantes de pois chiches inoculées par rapport au control. Peu de travaux ont été dirigés vers l'étude de *Nocardiosis*, parmi lesquelles les travaux récents de Patel et Thakker (2019) ont rapporté les effets positifs de l'inoculation par *Nocardiosis* sur la croissance et les paramètres de développement du mil à chandelle. À notre connaissance, le présent travail est le premier qui rapporte l'inoculation par *Nocardiosis* sur des plants de tomates.

## Résultats et discussions



**Figure 12.** Le contenu en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), et en chlorophylle totale (Chltot) de *Solanum lycopersicum* L. non inoculée (CNT) et inoculée avec les souches d'actinomycètes sélectionnées. Les résultats suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test post hoc HSD de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Pour explorer les corrélations potentielles entre la production d'AIA, la solubilisation du phosphate, et la libération de l'H<sub>2</sub>CN montrées *in vitro*, ainsi que les paramètres de croissance des plantes enregistrés dans l'expérience *in planta*, un ensemble de données a été traité par l'algorithme ACP. La figure 13 présente le biplot ACP obtenu pour les différents caractères et les paramètres de croissance des plantes des quatorze souches d'actinomycètes. La variance totale expliquée était de 61,65% avec la première composante (CP1) de 39,11% et la seconde (CP2) 22,53%. À partir du biplot de l'ACP, différents regroupements basés sur les corrélations entre les traits et les paramètres sont évidents. Les AFDW des pousses et des racines et la longueur des racines obtenues par les souches D14, G22 et H14 sont corrélées avec l'AIA et la solubilisation des phosphates. Les teneurs en chlorophylle favorisées par l'inoculation avec la souche G10 sont également positivement influencées par l'AIA et la capacité de solubilisation des phosphates (même corrélation positive sur CP1), ainsi que l'H<sub>2</sub>CN (même corrélation positive sur CP2). L'allongement des pousses favorisé par les souches K23, H12, G33, et T45 est positivement corrélé à la production de l'H<sub>2</sub>CN. Ces bonnes corrélations entre les résultats *in vitro* et *in planta* démontrent que notre approche *in vitro* a permis de sélectionner des souches biostimulantes également efficaces en conditions naturelles. Comme indiqué précédemment, ces caractères sont généralement reconnus pour avoir des effets positifs sur la croissance et le développement des plantes.



**Figure 13.** Biplot obtenu à partir de l'ACP sur l'ensemble de données des résultats *in vitro* et *in planta* (chargements) enregistrés pour les souches d'actinomycètes (scores). Sur la figure: **Chla**, chlorophylle a; **Chlb**, chlorophylle b; **Chltot**, chlorophylle totale; **HCN**, acide cyanhydrique; **LP**, longueur des pousses; **LR**, longueur des racines; **AFDWR**, poids sec des racines sans cendres; **AFDWS**, poids sec des pousses sans cendres; **P**, solubilisation du phosphate; **AIA**, acide indole 3-acétique.

**Evaluation des caractères favorisant la croissance des  
plantes des souches d'actinomycètes et les effets de  
l'inoculation sur *Triticum durum* sous stress salin**



Quatorze souches du genre *Streptomyces* et *Nocardiopsis* sp préalablement sélectionnées pour les différents caractères PGP ont été investiguées pour cette étude.

- **D14**, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (Gene Bank accession MG597514).
- **G10**, *Streptomyces iakyrus* (MG597593).
- **G22**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597582).
- **G33**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597585).
- **H12**, *Streptomyces albidoflavus* (MG597552).
- **H14**, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597543).
- **J4**, *Streptomyces thinghirensis* (MG597590).
- **J13**, *Streptomyces anulatus* (MG597579).
- **J21**, *Nocardiopsis alba* (MG597576).
- **J27**, *Streptomyces ambofaciens* (MG597599).
- **K12**, *Streptomyces xantholiticus* (MG597545).
- **K23**, *Streptomyces thinghirensis* (MG597560).
- **S2**, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597572).
- **T45**, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (MG597502).

### **1. Les caractères favorisant la croissance des plantes (PGPB)**

#### **1. La solubilisation du phosphate sous stress salin**

Les concentrations du phosphore solubilisé par les souches d'actinomycètes cultivées dans les différentes conditions sont indiquées dans le tableau ci-dessous (tableau2).

## Résultats et discussions

**Tableau 2.** Les concentrations du phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) solubilisé par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de NaCl.

La souche	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M	1.25 M	1.5 M
D14	24.8 <sup>aA</sup>	12.1 <sup>cB</sup>	9.1 <sup>cCD</sup>	9.1 <sup>eEF</sup>	12.7 <sup>cB</sup>	17.3 <sup>bA</sup>	10.4 <sup>dCD</sup>
G10	17.2 <sup>aF</sup>	10.4 <sup>cCD</sup>	12.8 <sup>bB</sup>	10.1 <sup>cCDE</sup>	10.7 <sup>cD</sup>	7.1 <sup>dG</sup>	10.5 <sup>cCD</sup>
G22	23.3 <sup>aB</sup>	14.5 <sup>bA</sup>	14.4 <sup>bA</sup>	11.3 <sup>cBC</sup>	10.6 <sup>cdDE</sup>	12.1 <sup>cB</sup>	9.1 <sup>dEF</sup>
G33	10.8 <sup>cL</sup>	9.0 <sup>dEF</sup>	12.4 <sup>dEF</sup>	9.7 <sup>cdDE</sup>	9.1 <sup>dF</sup>	9.9 <sup>cdDE</sup>	14.4 <sup>aA</sup>
H12	18.8 <sup>aE</sup>	9.9 <sup>dDE</sup>	13.3 <sup>dDE</sup>	13.2 <sup>bA</sup>	11.3 <sup>cCD</sup>	9.9 <sup>dDE</sup>	9.2 <sup>dEF</sup>
H14	22.2 <sup>aC</sup>	10.7 <sup>cCD</sup>	13.0 <sup>cCD</sup>	8.5 <sup>dF</sup>	6.6 <sup>eG</sup>	6.3 <sup>eG</sup>	11.4 <sup>cC</sup>
J4	12.1 <sup>bcK</sup>	11.4 <sup>cBC</sup>	7.9 <sup>cBC</sup>	12.9 <sup>bA</sup>	16.5 <sup>aA</sup>	8.4 <sup>eF</sup>	10.1 <sup>dDE</sup>
J13	9.9 <sup>deM</sup>	15.0 <sup>aA</sup>	11.9 <sup>aA</sup>	9.5 <sup>deEF</sup>	9.3 <sup>eEF</sup>	10.8 <sup>cdBCD</sup>	12.8 <sup>bB</sup>
J21	19.3 <sup>aD</sup>	4.6 <sup>fG</sup>	8.5 <sup>fG</sup>	6.0 <sup>eG</sup>	9.1 <sup>cF</sup>	11.5 <sup>bBC</sup>	8.0 <sup>dFG</sup>
J27	12.6 <sup>aJ</sup>	4.8 <sup>dG</sup>	10.0 <sup>dG</sup>	10.7 <sup>bCD</sup>	11.1 <sup>bCD</sup>	11.0 <sup>bBCD</sup>	7.3 <sup>cGH</sup>
K12	10.8 <sup>cL</sup>	13.8 <sup>aA</sup>	12.3 <sup>bB</sup>	10.0 <sup>cDE</sup>	12.3 <sup>bBC</sup>	11.2 <sup>bcBC</sup>	10.0 <sup>cDE</sup>
K23	14.8 <sup>aG</sup>	8.4 <sup>eF</sup>	9.9 <sup>cDC</sup>	12.1 <sup>bAB</sup>	10.5 <sup>cDE</sup>	10.0 <sup>cdDE</sup>	9.4 <sup>deDE</sup>
S2	12.9 <sup>aI</sup>	8.0 <sup>dF</sup>	6.8 <sup>eE</sup>	12.4 <sup>aAB</sup>	7.3 <sup>deG</sup>	9.3 <sup>cEF</sup>	10.5 <sup>bCD</sup>
T45	13.9 <sup>aH</sup>	11.5 <sup>bcBC</sup>	12.2 <sup>bB</sup>	11.3 <sup>bcBC</sup>	13.3 <sup>aB</sup>	10.7 <sup>cCD</sup>	6.5 <sup>dH</sup>

Les résultats suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les lettres minuscules font référence à la comparaison des résultats obtenus par une souche à différentes concentrations de NaCl (même ligne). Les lettres majuscules font référence à la comparaison des résultats obtenus par les quatorze souches par concentrations de NaCl (même colonne).

Toutes les souches ont montré une capacité de solubilisation différente sur le milieu PVK liquide sans addition de NaCl. Le meilleur taux de solubilisation a été observé chez la souche *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, suivi par les souches *S. xantholiticus* G22 et *N. aegyptica* H14 ( $p < 0,05$ ). La solubilisation la plus faible ( $p < 0,05$ ) a été observée chez *S. anulatus* J13. Pour presque toutes les souches, la présence du NaCl dans le milieu a affecté négativement la quantité de solubilisation du phosphore. À l'inverse, pour les souches *S. xantholiticus* G33, *S. thinghirensis* J4, *S. anulatus* J13, et *S. xantholiticus* K12, les meilleures valeurs ont été observées en présence de NaCl. La souche *S. xantholiticus* G33 a montré le taux de solubilisation le plus élevé ( $p < 0,05$ ) à 1,5 M de NaCl, *S. thinghirensis* J4 à 1 M de NaCl, et *S. anulatus* J13 et *S. xantholiticus* K12 à 0,25 M de NaCl. En outre de *S. xantholiticus* G33, les souches *S. anulatus* J13 et *N. aegyptica* S2 ont également montré des concentrations

## Résultats et discussions

---

considérables de phosphore solubilisé à 1,5 M de NaCl L<sup>-1</sup>. Alors que chez les souches *N.dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. albidoflavus* H12, *N. aegyptica* H14, *N. alba* J21, *S. ambofaciens* J27, et *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei*T45, une capacité de solubilisation diminuée de  $\geq 50\%$  ( $p < 0,05$ ) à 1,5 M NaCl. Cependant, pour ces souches, une bonne activité de solubilisation a été conservée.

L'inoculation des plantes avec des bactéries halotolérantes est l'un des moyens les plus durables de faire face aux nombreux effets délétères de la salinité (Läuchli and Grattan, 2007; Bhise and Dandge, 2019; Dong et al., 2019; Hmaeid et al., 2019). Plusieurs micro-organismes ont été signalés comme promoteurs de la croissance des plantes sous stress salin (Jha et al., 2011; Yildirim et al., 2011; Baniaghil et al., 2013). Les bactéries PGP halotolérantes/halophiles sont physiologiquement adaptées aux changements environnementaux et augmentent la tolérance des plantes à la salinité grâce à plusieurs traits PGP (Hmaeid et al., 2019). Dans le présent travail, nous avons proposé l'utilisation des souches d'actinomycètes pour induire une tolérance au stress salin chez le blé. Les actinomycètes halotolérants avec des traits PGP sont déjà reconnus comme des inducteurs de tolérance au sel (Tolba et al., 2019). Cependant, les études sur leur application en tant qu'agents halotolérants sont encore rares.

Parmi les caractères PGP utiles pour l'induction de la tolérance chez les plantes, la solubilisation des phosphates est extrêmement importante pour la croissance et le rendement des cultures (Zhang et al., 2016; Dhillon et al., 2017; Pereira et al., 2020). La salinité diminue la faible teneur disponible en phosphore et limite son absorption par les racines des plantes (Rojas-Tapias et al., 2012; Jiang et al., 2020). Les bactéries solubilisant le phosphate (BSP) peuvent convertir le phosphore insoluble en soluble ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et disponible formes ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_4\text{PO}_4$ ) (Suleman et al., 2018).

La diminution du taux de solubilisation des phosphates dans les environnements salins a été rapportée (Rojas-Tapias et al., 2012; Sadeghi et al., 2012). Dans notre cas, la capacité de solubilisation a été affectée négativement par la présence du NaCl dans le milieu chez presque toutes les souches. Cependant, une bonne capacité de solubilisation a été conservée, probablement en raison de l'origine de ces souches isolées des sols salins. Nos résultats montrent qu'en général, le taux de solubilisation maximal s'est produit en présence d'une certaine quantité de NaCl, en fonction de la souche, et plus bas sans NaCl. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes; de nombreuses bactéries ont besoin du NaCl pour une

## Résultats et discussions

meilleure solubilisation du phosphate inorganique (Kim et al., 1997; Gupta and Sahoo, 2010) et les microorganismes provenant des sols salins sont un outil valable pour améliorer la disponibilité du phosphore dans le sol et améliorer les paramètres de croissance du blé (Boubekri et al., 2021).

### 2. La production de l'acide indole acétique (AIA) sous stress salin

Les concentrations d'AIA produites par les différentes souches d'actinomycètes non exposées et exposées au sel sont indiquées dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Les concentrations d'AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) produites par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de sel.

La souche	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M	1.25 M	1.5 M
D14	10.7 <sup>aD</sup>	4.8 <sup>bH</sup>	-	-	-	-	-
G10	12.2 <sup>bcC</sup>	11.3 <sup>cCD</sup>	13.8 <sup>bc</sup>	25.9 <sup>aA</sup>	6.1 <sup>dE</sup>	6.4 <sup>dD</sup>	6.8 <sup>d</sup>
G22	12.4 <sup>dC</sup>	19.8 <sup>ba</sup>	35.6 <sup>aA</sup>	18.6 <sup>bB</sup>	15.3 <sup>cB</sup>	10.7 <sup>dB</sup>	-
G33	7.2 <sup>F</sup>	-	-	-	-	-	-
H12	-	4.8 <sup>cH</sup>	5.1 <sup>cF</sup>	8.2 <sup>bE</sup>	10.2 <sup>aD</sup>	-	-
H14	21.4 <sup>aA</sup>	6.9 <sup>dFG</sup>	9.7 <sup>cE</sup>	12.8 <sup>bD</sup>	-	-	-
J4	-	9.8 <sup>bcDE</sup>	8.7 <sup>cE</sup>	10.2 <sup>bE</sup>	12.8 <sup>aC</sup>	-	-
J13	9.5 <sup>deE</sup>	8.3 <sup>cEF</sup>	11.6 <sup>dD</sup>	13.9 <sup>cCD</sup>	17.6 <sup>ba</sup>	25.4 <sup>aA</sup>	-
J21	-	6.2 <sup>GH</sup>	-	-	-	-	-
J27	9.8 <sup>cE</sup>	10.2 <sup>cCD</sup>	6.4 <sup>dF</sup>	15.2 <sup>bc</sup>	18.1 <sup>aA</sup>	-	-
K12	7.6 <sup>cF</sup>	11.7 <sup>bc</sup>	15.2 <sup>abc</sup>	8.2 <sup>cE</sup>	14.7 <sup>ab</sup>	-	-
K23	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-
T45	14.8 <sup>abB</sup>	13.9 <sup>abB</sup>	15.8 <sup>ab</sup>	6.0 <sup>cF</sup>	12.9 <sup>bc</sup>	8.2 <sup>cC</sup>	-

Les résultats suivis de mêmes lettres ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les lettres minuscules font référence à la comparaison des résultats obtenus par une souche à différentes concentrations de NaCl (même ligne). Les lettres majuscules renvoient à la comparaison des résultats obtenus par les quatorze souches par concentrations de NaCl (même colonne).

En absence de stress salin, neuf souches ont pu produire l'AIA dont les valeurs varient de  $7,44 \mu\text{g mL}^{-1}$  (G33 et K12) à  $21,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  (H14) ( $p < 0,05$ ). Les souches ont présenté des comportements différents, c'est-à-dire que certaines souches (*S. thinghirensis* K23 et *N.*

## Résultats et discussions

---

*aegyptica* S2) n'ont pas pu produire l'AIA dans les différentes conditions testées, la souche *S.xantholiticus* G33 a produit l'AIA uniquement sans addition de sel et d'autres souches (*S.albidoflavus* H12, *S. thinghirensis* J4 et *N. alba* J21) ont synthétisé l'AIA uniquement en présence de NaCl. Les souches *N. dassonvillei* subsp.*dassonvillei* D14 et *N. aegyptica* H14 ont produit de l'AIA même jusqu'à 0,25 et 0,75 M de NaCl respectivement. Cependant, dans ces dernières souches, la présence du sel a réduit la production de cette molécule. La souche *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 a pu produire des quantités d'AIA similaires ( $p > 0,05$ ) au témoin sans stress salin (0 M NaCl). Chez les autres souches, la production d'AIA était plus élevée en présence qu'en l'absence de NaCl. En particulier, la production d'AIA la plus élevée a été enregistrée à 1,25 M de NaCl pour *S.anulatus* J13, à 1 M de NaCl pour *S. ambofaciens* J27, *S. thinghirensis* J4, et *S. albidoflavus* H12, à 0,75 M pour *S. iakyrus* G10, à 0,5 M pour *S. xantholiticus* G22, et *S. xantholiticus* K12.

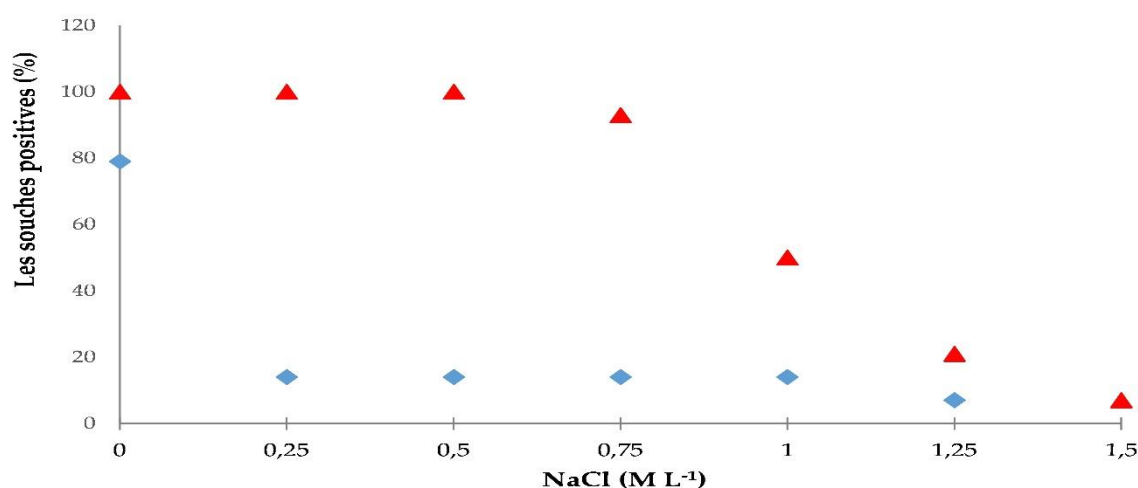
Un autre mécanisme utilisé par les PGPB pour induire la tolérance chez les plantes contre divers stress environnementaux est la régulation de la synthèse des phytohormones (Egamberdieva and Lugtenberg, 2014; Raval and Saraf, 2020). Les phytohormones aident les plantes à tolérer le stress salin en développant une réponse protectrice contre le stress, favorisent la prolifération cellulaire dans le système racinaire, et augmentent la surface d'absorption d'eau et de nutriments grâce à la surproduction de poils racinaires (Arora et al., 2013; Bhise and Dandge, 2019). Parmi les phytohormones, l'AIA influence directement la croissance des plantes et améliore l'absorption des nutriments dans des conditions de stress (Egamberdieva and Kucharova, 2009; Sharma et al., 2019). Les régulateurs de croissance tels que les auxines sont connus pour réduire la dormance induite par la salinité dans les graines de blé (Egamberdieva, 2009). De nombreux PGPB peuvent produire de l'AIA et participer à la croissance et au développement des plantes (AzcON and Barea, 1975). Il a été démontré que le sel inhibe la croissance des plantes, la production de phytohormones, et interfère avec d'importants processus cellulaires (Li and Jiang, 2017). La diminution des taux d'hormones dans le système racinaire de la plante entraîne une réduction de la croissance et du développement (Werner and Finkelstein, 1995). La salinité n'affecte pas la production d'auxines et les processus physiologiques dans les plantes traitées par PGPB tolérantes au sel (Egamberdieva and Lugtenberg, 2014). Quant à nos souches *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *N. aegyptica* H14, et *S. xantholiticus* G33, plusieurs auteurs ont signalé que la présence d'un stress salin

pouvait entraîner une diminution de la synthèse d'AIA (Dodd and Pérez-Alfocea, 2012; Liu et al., 2015; Khan et al., 2016; Soleimani et al., 2017). Selon la littérature (Raval and Saraf, 2020), une amélioration de la synthèse de cette hormone a été trouvée en présence de différentes concentrations de sel comme le cas des souches *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. anulatus* J13, *S. ambofaciens* J27, *S. xantholiticus* K12, et *N. dassonvillei* subsp. *Dassonvillei* T45.

### 3. La production de l'acide cyanhydrique et de l'ammoniac sous stress salin

La capacité des souches d'actinomycètes à produire de l'HCN sans et avec différentes concentrations de sel est illustrée dans la figure 12. En l'absence de NaCl, seules deux souches de *S. xantholiticus* (K12 et G22) et la souche de *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 n'ont pas pu produire de l'HCN. La production de l'HCN est affectée négativement par l'ajout du NaCl dans le milieu, même à de faibles concentrations. À l'exception de deux souches de *N. aegyptica* (S2 et H14), à 0,25 M de NaCl, toutes les souches ont perdu leur capacité à produire ce composé volatil. Cependant, les souches S2 et H14 maintiennent leur capacité de production jusqu'à 1 M NaCl et 1,25 M NaCl respectivement.

Concernant la production de l'ammoniac (figure 14). Toutes les souches partageaient cette capacité en l'absence de NaCl et jusqu'à 0,5 M de NaCl. À 0,75 M de NaCl, seule la souche *S. anulatus* J13 a été affectée négativement par la présence du sel. À des concentrations du sel plus élevées, différents comportements ont été observés selon la souche. A 1 M de NaCl, 50% des souches conservent leur capacité à produire du NH<sub>3</sub> : les souches de *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. xantholiticus* G22, *S. albidoflavus* H12, *N. aegyptica* H14, *S. thinghirensis* J4, *N. alba* J21, et *S. thinghirensis* K23. À 1,25 M de NaCl, les souches de *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. albidoflavus* H12, et *N. aegyptica* H14 étaient les seuls producteurs de NH<sub>3</sub>. À 1,5 M de NaCl, seule la souche H14 de *N. aegyptica* était capable de produire l'ammoniac.



**Figure 14.** La production de l'acide cyanhydrique ((HCN) (en bleu) et de l'ammoniac ((NH<sub>3</sub>) (en rouge) par les souches d'actinomycètes sous différentes concentrations de NaCl.

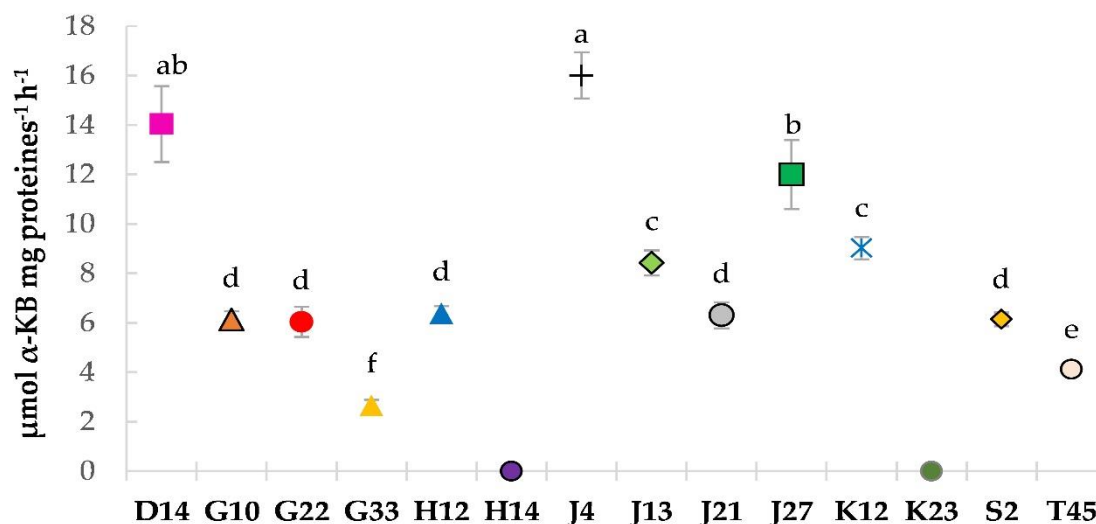
Les cultures soumises à un stress salin peuvent être plus sensibles aux attaques des phytopathogènes, les PGPB peuvent fournir des composés volatils utiles pour la protection des plantes, tels que l'HCN et le NH<sub>3</sub> (Mohamed and Gomaa, 2012; Anwar et al., 2016). Ces composés sont impliqués dans divers processus biochimiques et physiologiques, y compris la signalisation cellulaire et l'amélioration de la croissance des plantes (“(PDF) Plant Growth Promotion by Microbes | Ben Lugtenberg - Academia.edu,” n.d.). L'HCN perturbe les cellules pathogènes en inhibant le transport des électrons et en provoquant la mort cellulaire (Mohamed and Gomaa, 2012). La présence de quantités adéquates de NH<sub>3</sub> augmente la biomasse et la résistance des plantes en induisant la ramification et l'élongation des racines (Anwar et al., 2016). La capacité à produire ces composés volatils a été démontrée par presque toutes nos souches d'actinomycètes non exposées au stress salin. En présence de concentrations croissantes de sel, seule la souche *N. aegyptica* H14 a conservé la capacité de synthèse jusqu'à 1,25 M de NaCl. La production de ces composés est importante pour le développement des plantes, en particulier dans les conditions de stress. En cas de stress salin, le besoin en nutriments pour les activités métaboliques augmente et la présence de composés volatils peut répondre à cette demande (Bhise et al., 2017).

#### 4. L'estimation de l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Les résultats de l'activité ACC désaminase sont présentés sur la figure 15. Parmi les quatorze souches, 12 avaient une activité ACC désaminase. Une activité plus élevée a été

## Résultats et discussions

observée chez *S. thinghirensis* J4, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, et *S. ambofaciens* J27. Hors qu'aucune activité n'a été détectée chez *N. aegyptica* H14 et *S. thinghirensis* K23.



**Figure 15.** L'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase ( $\mu\text{mol } \alpha\text{-KB mg protéines}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) détectée dans les souches d'actinomycètes. Les résultats suivis de même lettres ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

L'éthylène est une hormone gazeuse produite par la plupart des plantes (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2020). Dans les conditions normales, il participe à la croissance et au développement des plantes. Sa libération est régulée par les changements environnementaux et ses niveaux augmentent lors des conditions stressantes devenant nocives pour les plantes (Abeles et al., 1992; Brígido et al., 2015; Goswami and Suresh, 2020). L'ACC désaminase présente chez les PGPB favorise la régulation des niveaux d'éthylène, protégeant les plantes contre les augmentations nocives (Glick et al., 1998; Anwar et al., 2016). Ce trait présent dans la majorité de nos actinomycètes, offre un grand avantage pour le développement durable des cultures dans des conditions stressantes (Misra and Chauhan, 2020). Différentes études ont souligné que la fertilisation avec les PGPB possédant l'ACC désaminase favorise le développement et la croissance des plantes et les protège contre divers stress environnementaux (Glick et al., 1998; Zahir et al., 2004; Bal et al., 2013).



### 2. L'expérience sous serre sur *T. durum*

Au cours de l'expérience en serre, les actinomycètes ont amélioré la tolérance des plantes au sel (tableau 4). Les plantes non inoculées (pas de PGPB/avec stress salin) n'ont pas pu pousser à des concentrations de NaCl  $\geq 0,5$  M. L'inoculation avec les souches *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, et *S. xantholiticus* K12 a permis aux plantes de tolérer jusqu'à une concentration de 1 M de NaCl. À des concentrations de sel plus élevées (1,25 et 1,5 M), aucune croissance n'a été enregistrée. La réponse des plantes inoculées à l'augmentation de la concentration en sel variait selon l'espèce et la souche utilisée. À 0,25 M de NaCl, la meilleure tolérance a été obtenue chez les plantes inoculées avec *S. xantholiticus* G22 et *N. aegyptica* S2.

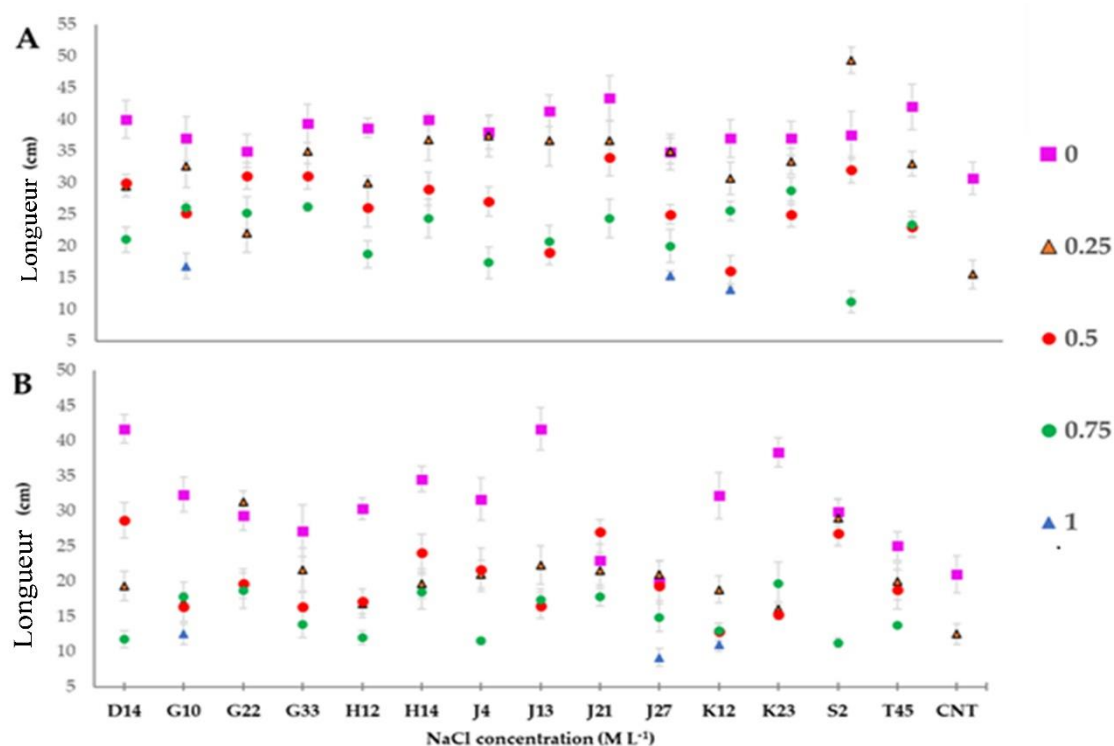
**Table 4.** Taux de survie (%) enregistré lors de l'expérience en serre sur *T. durum* pour les plantes inoculées (PGPB) et non inoculées (CNT).

NaCl (M L <sup>-1</sup> )	Pourcentage de survie (%)	
	PGPB	CNT
0	100	100
0.25	100	100
0.5	100	-
0.75	100	-
1	21	-
1.25	-	-
1.5	-	-

La longueur des pousses et des racines mesurée après 40 JAS chez les plantes inoculées (D14-T45) et les plantes non inoculées (CNT) cultivées sous différents niveaux de salinité est présentée sur la figure 16. La longueur des pousses et des racines a été améliorée chez les plantes inoculées avec les souches d'actinomycètes et non soumises à un stress salin ( $p < 0,05$ ) par rapport aux plantes non inoculées (sans PGPB/pas de stress salin). Une augmentation jusqu'à 41% (traitement avec *N. alba* J21) et jusqu'à 98% (inoculation avec *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 et *S. anulatus* J13) respectivement. Les effets de biostimulation ont été négativement affectés par la présence du sel. La meilleure croissance a été enregistrée pour *N. aegyptica* S2 (+ 218%) et *S. xantholiticus* G22 (+ 151%) en termes de longueur des pousses et

## Résultats et discussions

des racines par rapport au témoin stressé (pas de PGPB/avec stress salin) ( $p < 0,05$ ). À 0,5 M de NaCl, la longueur maximale des pousses a été observée chez les plantes inoculées avec *N. alba* (J21), tandis que le maximum de longueur des racines a été observé chez les plantes inoculées avec *N. dassonvillei* subsp.*dassonvillei* D14 et *N. alba* J21 ( $p < 0,05$ ). À 0,75 M de NaCl, les plantes inoculées avec les souches *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. xantholiticus* G33, *S. xantholiticus* K12, et *S. thinghirensis* K23 ont enregistré la meilleure longueur de pousses ( $p < 0,05$ ). Les plantes traitées avec *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, et *S. thinghirensis* K23, ainsi que ceux inoculées avec *N. aegyptica* H14, *S. anulatus* J13, et *N. alba* J21 ont également enregistré les meilleures longueurs de racines ( $p < 0,05$ ). À 1 M de NaCl, *S. iakyrus* G10 a enregistré à la fois les meilleures longueurs de pousses et de racines ( $p < 0,05$ ).



**Figure 16.** La longueur des pousses (A) et des racines (B) des plantes inoculées et non inoculées cultivées sans (0 M NaCl) et avec NaCl dans les sols (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ )

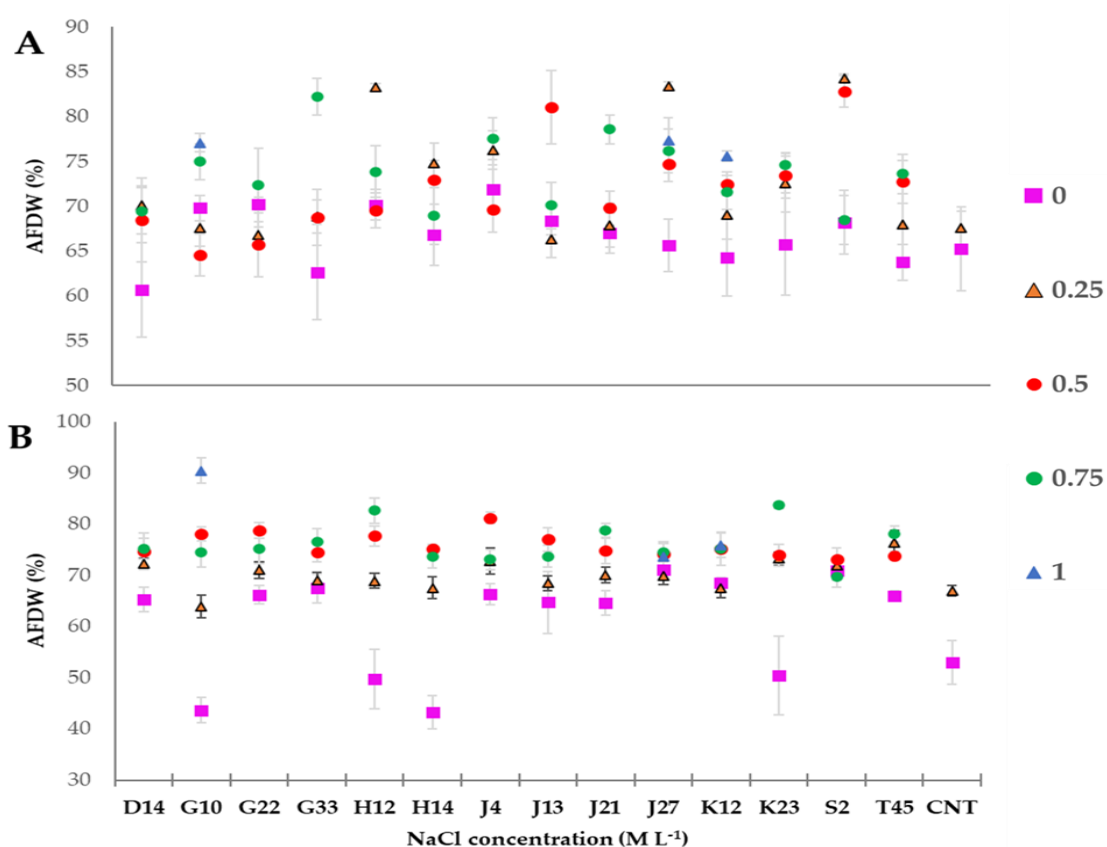
## Résultats et discussions

---

Des tendances similaires ont été enregistrées pour l'AFDW des pousses et des racines. Les résultats de l'AFDW des pousses et des racines obtenues après 40 JAS pour les plantes inoculées (D14-T45) et les plantes non inoculées (CNT) cultivées sous différents niveaux de NaCl sont présentés dans la figure 17. En l'absence de stress salin, l'AFDW des racines a été significativement améliorée par la présence des bactéries ( $p < 0,05$ ). Les meilleures valeurs ont été enregistrées pour les souches *S. xantholiticus* K12, *S. ambofaciens* J27, et *N. aegyptica* S2 avec une augmentation de 32% en moyenne par rapport aux plantes non inoculées (pas de PGPB/pas de stress salin). La tolérance végétale au-dessus de 0,5 M de NaCl favorisée par l'inoculation était différente selon l'actinomycète utilisé. À 0,25 M de NaCl, les plus fortes augmentations d'AFDW ont été enregistrées pour *S. albidoflavus* H12, *S. ambofaciens* J27, et *N. aegyptica* S2 pour les pousses (+ 24% en moyenne) et *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 (+ 14%) pour les racines ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin stressé (sans PGPB/avec stress salin). À 0,5 M de NaCl, la meilleure AFDW des pousses a été observée chez les plantes inoculées avec *N. aegyptica* S2, tandis que la meilleure AFDW des racines chez les plantes inoculées avec la souche *S. thinghirensis* J4 ( $p < 0,05$ ). À 0,75 M de NaCl, la plus grande AFDW des racines a été observée chez les plantes inoculées avec la souche *S. xantholiticus* G33, tandis que les plantes inoculées avec *S. thinghirensis* K23 ont enregistré la plus grande AFDW des racines ( $p < 0,05$ ). À 1 M de NaCl, *S. iakyrus* G10 a enregistré l'AFDW de pousses le plus élevé ( $p < 0,05$ ), tandis qu'aucune différence statistiquement significative n'a été enregistrée entre *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, et *S. xantholiticus* K12 en termes d'AFDW des racines ( $p > 0,05$ ).

En absence d'inoculation et sans stress salin, nous avons observé une croissance normale des plantes, cependant, l'ajout du NaCl affecte négativement le développement de la plante, où la croissance a été arrêtée à 0,5 M d'ajout de NaCl.

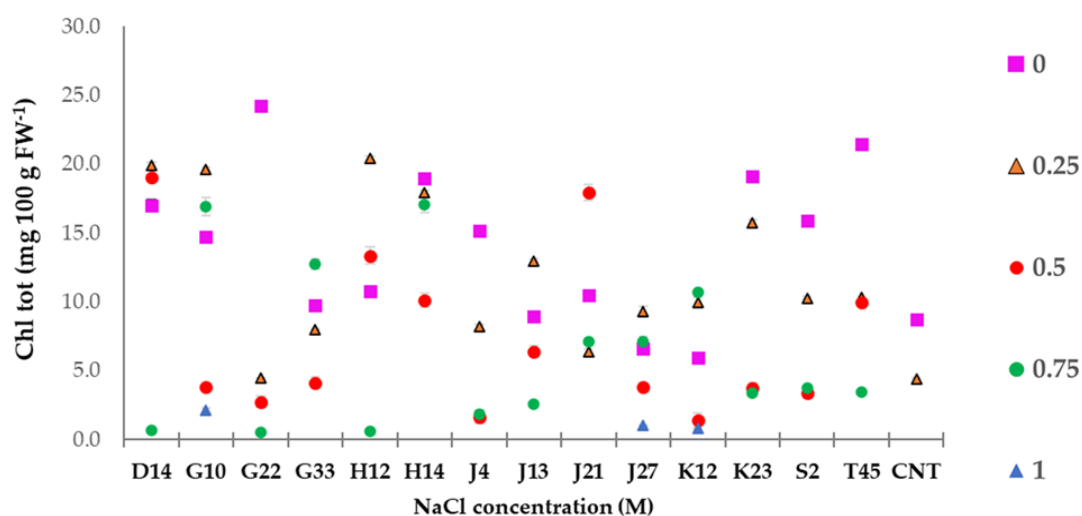
## Résultats et discussions



**Figure 17.** Le pourcentage (%) de poids sec sans cendres (AFDW) des pousses(A) et des racines (B) des plantes inoculées et non inoculées avec les différentes souches d'actinomycètes sans (0 M NaCl) et avec NaCl dans les sols (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, NaCl 1 M) (n = 3).

L'inoculation avec les souches d'actinomycètes a également amélioré la teneur en chlorophylles des feuilles par rapport aux plantes non inoculées (pas de PGPB/pas de stress salin). Les concentrations en chlorophylles totales ( $Chl_{tot}$ ) dans les feuilles des plantes inoculées avec les souches (D14-T45) et non inoculées (CNT) à différents niveaux de NaCl sont présentées à la figure 18.

## Résultats et discussions



**Figure 18.** La teneur en chlorophylles totales (Chl tot) estimée dans les feuilles des plantes inoculées et non inoculées, sans (0 M NaCl) et avec induction de stress salin (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M NaCl) (n = 3).

En absence de stress salin, les teneurs en Chla les plus élevées ont été obtenues dans des échantillons inoculés avec *S. xantholiticus* G22, *N. aegyptica* H14, *S. thinghirensis* K23, et *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 ( $p < 0,05$ ). Les souches *S. xantholiticus* G22 et *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 ont également amélioré la teneur en Chlb, obtenant ainsi le meilleur Chltot ( $p < 0,05$ ). L'induction d'halostress a eu un effet négatif sur les teneurs en chlorophylle. Encore une fois, les meilleurs résultats obtenus à différentes concentrations de NaCl dépendaient de la souche utilisée pour l'inoculation. Pour la Chla, les teneurs les plus élevées ont été obtenues par *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14/ *S. iakyrus* G10/ *S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, et *N. aegyptica* H14 à 0,25, 0,5 et 0,75 M NaCl respectivement ( $p < 0,05$ ). Pour la Chlb, les teneurs les plus élevées ont été obtenues par *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14/ *S. iakyrus* G10/ *S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 et *S. iakyrus* G10 à 0,25, 0,5 et 0,75 M NaCl respectivement ( $p < 0,05$ ). Pour la Chltot, les teneurs les plus élevées ont été obtenues avec l'inoculation par *S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 et *S. iakyrus* G10/ *N. aegyptica* H14 à 0,25, 0,5 et 0,5 M de NaCl respectivement ( $p < 0,05$ ). À 1 M de NaCl, *S. ambofaciens* J27 a enregistré des teneurs en Chla les plus élevées ( $p < 0,05$ ), tandis que *S. iakyrus* G10 a enregistré des teneurs plus élevées en Chla et en Chltot ( $p < 0,05$ ).

L'halostress a affecté de manière significative les rapports entre Chla et Chlb dans les plantes inoculées avec presque toutes les souches. Les rapports Chla/Chlb sont indiqués dans

## Résultats et discussions

le tableau 4. Avec des concentrations croissantes de NaCl jusqu'à 0,75 M, les rapports des chlorophylles dans les plantes inoculées avec *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *N. aegyptica* H14, *N. alba* J21, et *N. aegyptica* S2 sont restés les mêmes ( $p > 0,05$ ). Pour les autres souches, des ratios plus élevés à des concentrations de sel plus élevées ont été observés ( $p < 0,05$ ). Cette tendance indique une bonne tolérance au stress salin. À 1 M, les ratios des plantes inoculées avec *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, et *S. xantholiticus* K12 ont diminué ( $p < 0,05$ ). Parmi ces souches, la plus faible diminution a été observée chez *S. xantholiticus* K12, indiquant la meilleure tolérance au stress salin.

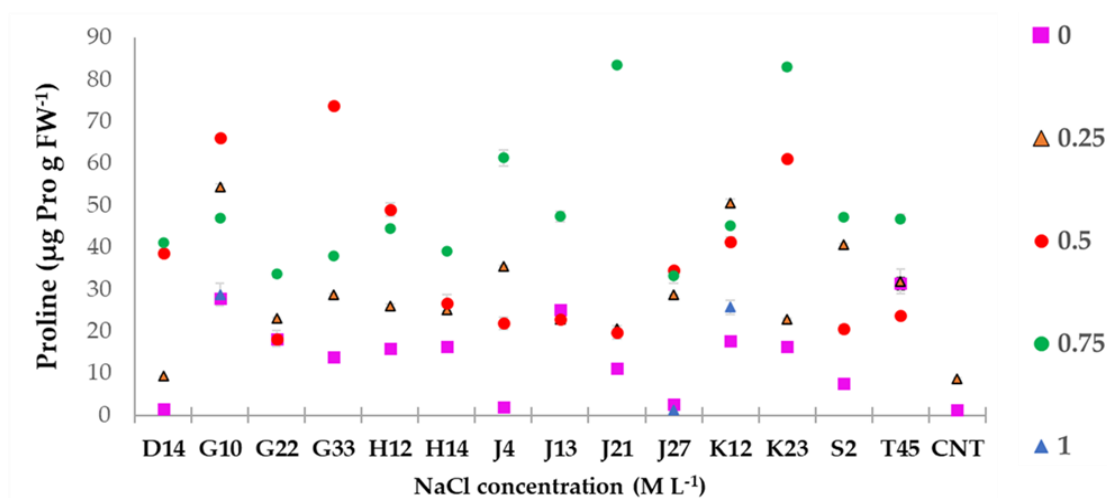
**Tableau 5.** Rapport a / b de la chlorophylle des plantes inoculées et non inoculées sans (NaCl 0 M) et avec induction de stress salin (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M NaCl) (n = 3).

	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M
D14	1.9 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	-
G10	1.9 <sup>bc</sup>	2.0 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.6 <sup>c</sup>	0.3 <sup>d</sup>
G22	1.9 <sup>b</sup>	2.4 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	0.5 <sup>c</sup>	-
G33	2.3 <sup>a</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.2 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>ab</sup>	-
H12	1.8 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	1.8 <sup>b</sup>	7.7 <sup>a</sup>	-
H14	1.9 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	-
J4	2.0 <sup>c</sup>	2.2 <sup>c</sup>	3.5 <sup>b</sup>	4.1 <sup>a</sup>	-
J13	2.3 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	-
J21	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	-
J27	5.5 <sup>a</sup>	1.8 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	2.3 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup>
K12	2.2 <sup>a</sup>	1.9 <sup>ab</sup>	0.2 <sup>c</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.7 <sup>b</sup>
K23	2.0 <sup>b</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	3.2 <sup>a</sup>	-
S2	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	-
T45	1.3 <sup>b</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	-
CNT	2.5 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	-	-	-

Les résultats suivis de mêmes lettres minuscules ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) (n = 3).

## Résultats et discussions

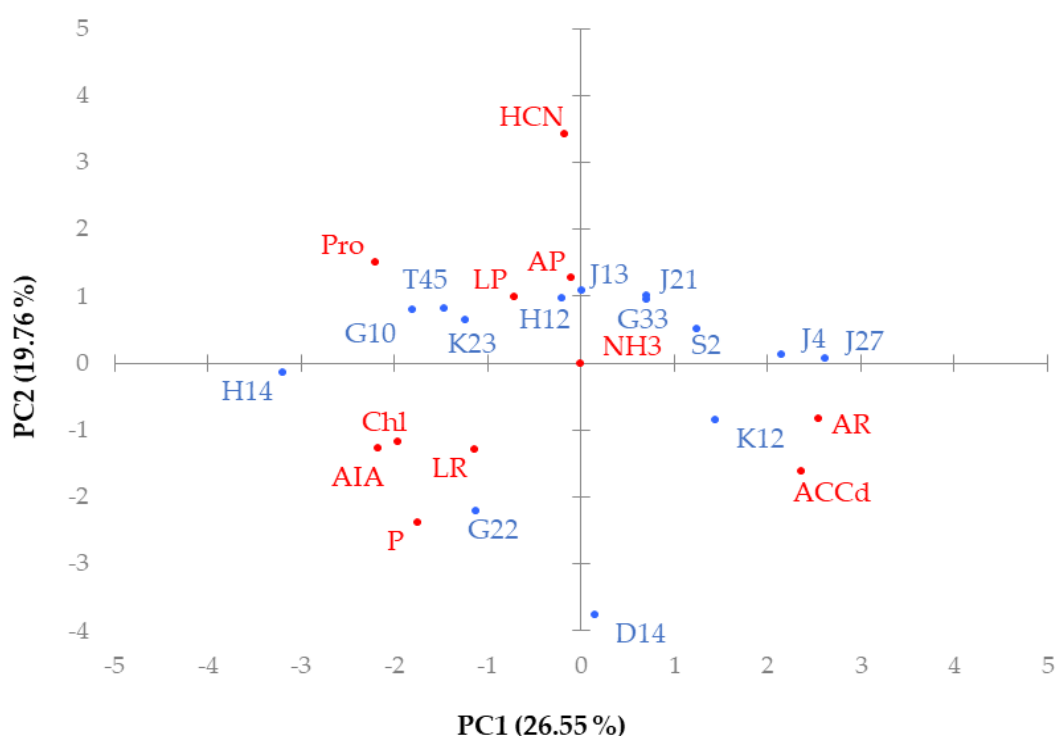
Les résultats de l'accumulation de la proline dans les plantes obtenues après 40 JAS inoculées avec les souches (D14-T45), et celles non inoculées (CNT) sont présentés sur la figure 19. Sans stress salin, il y a une accumulation de la proline dans les pousses végétales. Les plantes inoculées ont une valeur de proline plus élevée que celles non inoculées (pas de PGPB pas de stress salin) avec des accumulations variables en fonction de la souche ( $p < 0,05$ ). Le stress salin a provoqué une augmentation significative de la proline chez les plantes. Les plantes inoculées avaient une accumulation plus élevée de proline en réponse aux concentrations croissantes de NaCl. À 0,25 M de NaCl, les teneurs en proline les plus élevées ont été enregistrées dans les plantes inoculées avec les souches *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* K12, et *N. aegyptica* S2 avec une moyenne de  $49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW (+ 460%,  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin stressé (pas de PGPB/ avec stress salin). À un niveau de NaCl plus élevé, la concentration de proline a augmenté progressivement dans toutes les plantes inoculées. À 0,5 M de NaCl, les plantes inoculées avec *S. iakyrus* G10 et *S. xantholiticus* G33 ont accumulé  $70 \mu\text{g}$  de Pro  $\text{g FW}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). L'accumulation de proline la plus élevée a été enregistrée à 0,75 M ( $83 \mu\text{g Pro g}^{-1}$  FW) dans les plantes inoculées avec *N. alba* J21 et *S. thinghirensis* K23 ( $p < 0,05$ ). Pour les souches *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, et *S. xantholiticus* K12 - les seuls à induire une halotolérance des plantes jusqu'à 1 M de NaCl - des quantités modérées de proline ont été détectées ( $< 30 \mu\text{g Pro g}^{-1}$  FW). Les valeurs les plus faibles ont été obtenues par *S. ambofaciens* J27 ( $p < 0,05$ ).



**Figure 19.** La teneur en proline estimée dans les pousses des plantes inoculées et non inoculées sans (0 M NaCl) et avec induction de stress salin (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

## Résultats et discussions

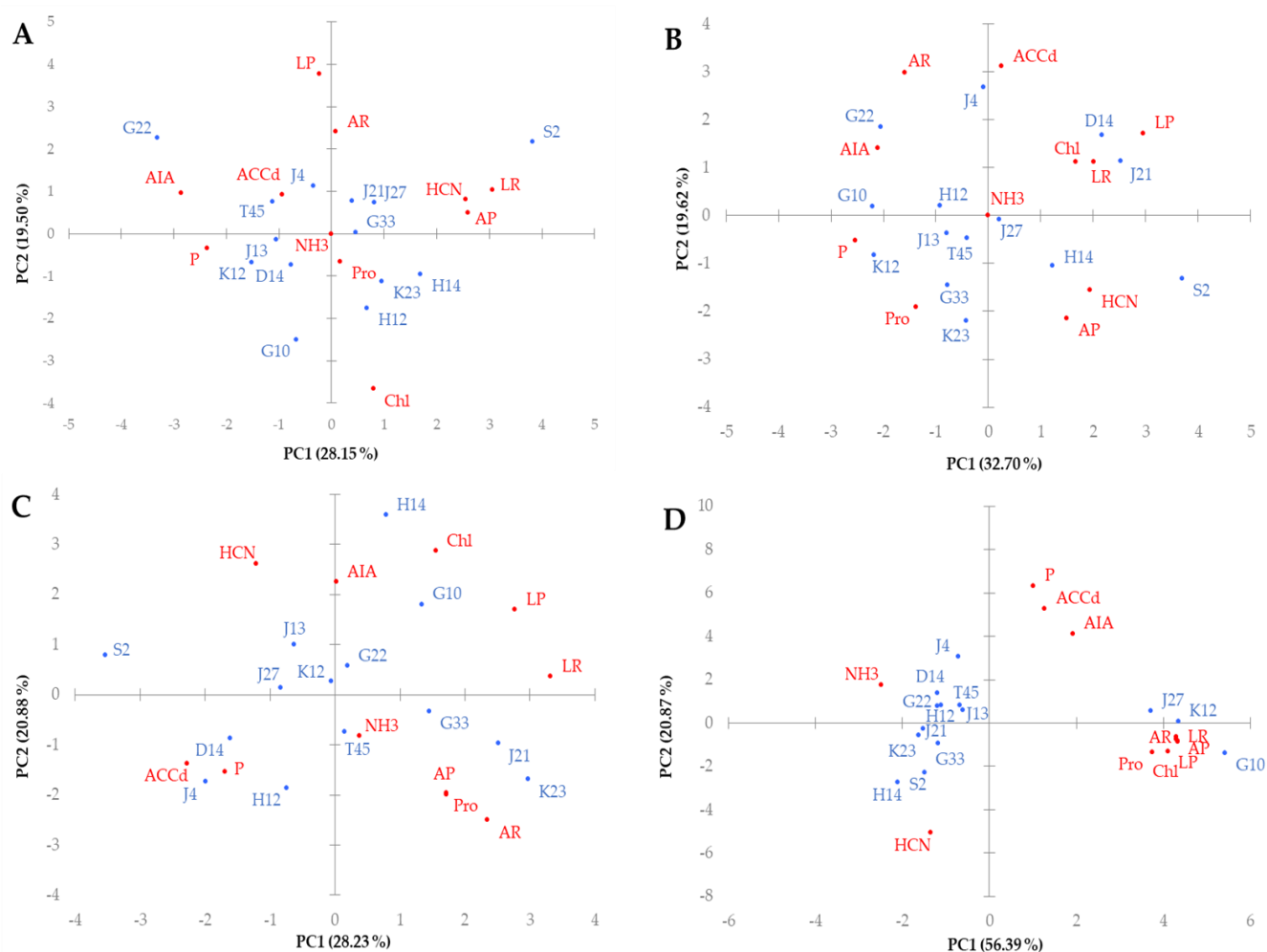
Pour explorer les corrélations potentielles entre les résultats des expériences *in vitro* et *in planta*, les données ont été traitées par l'analyse en composantes principales (ACP). La figure 20 montre le biplot ACP obtenu à partir de la condition 0 M NaCl L<sup>-1</sup>. Selon les corrélations, la longueur des pousses, l'AFDW, et l'accumulation de la proline étaient associés à la production de l'NH<sub>3</sub> et l'HCN. La longueur des racines et les chlorophylles avec la production d'AIA et la solubilisation des phosphates. Et l'AFDW racinaire avec une activité de l'ACC désaminase. Ces associations dans des conditions de stress salin ont changé (Figure 21) et à 1 M de NaCl L<sup>-1</sup>, l'activité de l'ACC désaminase, la production d'AIA, et la solubilisation du phosphate avaient une bonne association avec le cumul de la proline et la tolérance au stress salin (chlorophylles et la longueur et l'AFDW des pousses et des racines). Les différentes corrélations entre les résultats *in vitro* et *in planta* démontrent que l'approche *in vitro* pourrait être utile pour la sélection d'isolats à caractères biostimulants et halotolérants.



**Figure 20.** Biplot obtenu à partir de l'analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble de données des résultats *in vitro* et *in planta* (chargements, en rouge) enregistrés pour les souches d'actinomycètes (scores, en bleu) sans stress salin. Sur la figure : ACCd, activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase ; Chl, chlorophylle totale ; LP, longueur des pousses ; LR, longueur des racines ; AR, poids sec des racines sans cendres ; AP, poids sec des pousses sans cendres ; Pro, proline ; P, solubilisation du phosphate ; AIA, acide indole-3-acétique.



## Résultats et discussions



**Figure 21.** Biplot obtenu à partir de l'analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble de données des résultats *in vitro* et *in planta* (chargements, en rouge) enregistrés pour les souches d'actinomycètes (scores, en bleu) sous différentes concentrations de stress salin (A - 0,25 M NaCl L<sup>-1</sup>, B - NaCl 0,5 M L<sup>-1</sup>, C - NaCl 0,75 M L<sup>-1</sup> et D - NaCl 1 M L<sup>-1</sup>). Sur la figure : ACCd, activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase ; Chl, chlorophylle totale ; LP, longueur des pousses ; LR, longueur des racines ; AR, poids sec des racines sans cendres ; AP, poids sec des pousses sans cendres ; Pro, proline ; P, solubilisation du phosphate ; AIA, acide indole-3-acétique.

À la lumière des traits PGP mentionnés ci-dessus, l'amélioration de la croissance des plantes sous halostress pourrait être le résultat d'une amélioration de l'absorption des nutriments, de la régulation hormonale, et les différentes activités enzymatiques (Stefan et al., 2013; Nagargade et al., 2018; Mohamed et al., 2019). La salinité affecte négativement la croissance et le rendement des plantes avec un impact négatif élevé sur le système racinaire (Shukla et al., 2012; Orhan, 2016; Dong et al., 2019). La présence de NaCl affecte également les parties aériennes, avec une réduction de la photosynthèse due à une diminution de la teneur en

## Résultats et discussions

---

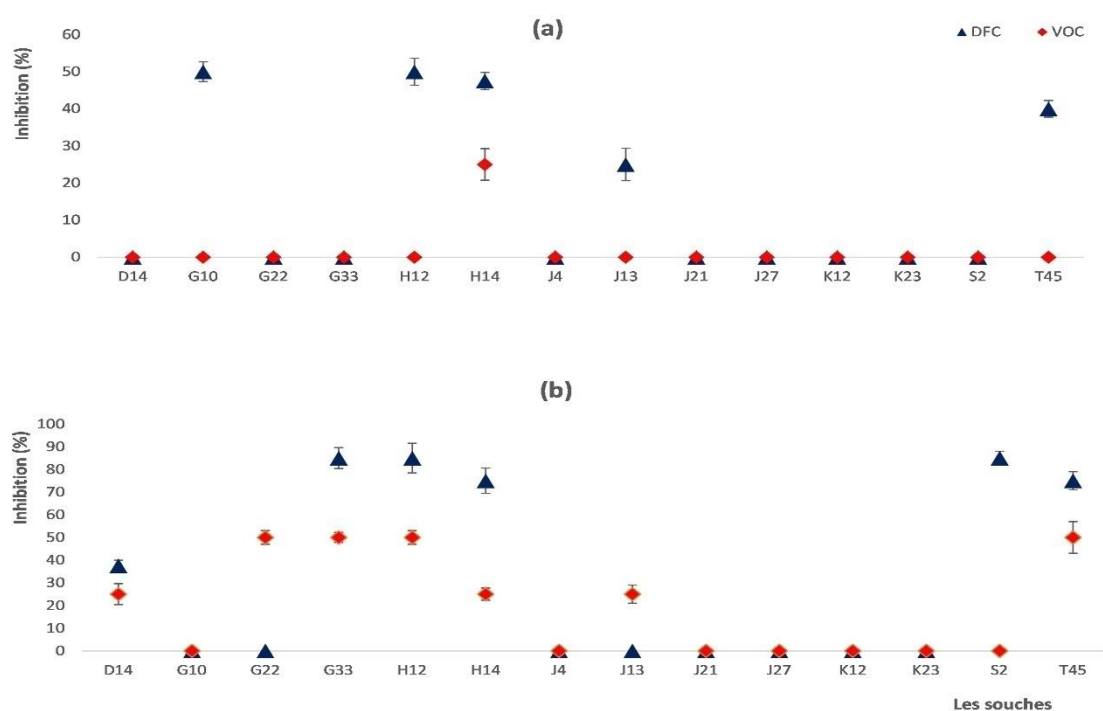
chlorophylles (Yildirim et al., 2008; Tiwari et al., 2010; Sultana et al., 2020). Nos résultats ont souligné une bonne influence de l'inoculation par les actinomycètes sur les plantes. En particulier, l'inoculation avec les souches *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, et *S. xantholiticus* K12 a induit une tolérance à la salinité des plantes jusqu'à 1 M NaCl. La nature des actinomycètes halotolérants utilisés dans cette étude pourrait faire l'objet d'une future étude approfondie sur leur utilisation comme biofertilisants pour améliorer les cultures dans les sols affectés par la salinité. La stratégie de biofertilisation a déjà montré des résultats positifs dans la croissance des plantes et le développement de plusieurs cultures (Egamberdieva and Lugtenberg, 2014; Upadhyay and Singh, 2015; Allam et al., 2018). L'accumulation de la proline est un mécanisme important de la régulation osmotique sous stress salin. Nos résultats ont montré qu'à des concentrations croissantes de NaCl, l'accumulation de proline est plus prononcée dans les plantes inoculées par des souches d'actinomycètes. En réponse aux stress environnementaux, les plantes stockent la proline et d'autres solutés compatibles en tant qu'une réponse adaptative au déséquilibre osmotique. En fait, la proline favorise la rétention d'eau dans le cytoplasme, à des concentrations élevées en sel ; cela semble être un mécanisme de tolérance au stress chez les plantes. La proline est un osmolyte stabilisant les cellules et une source de nitrogène, de carbone, et d'énergie pour la croissance des plantes. Cet acide aminé offre également une tolérance au stress salin par le maintien de la turgescence cellulaire et une protection cellulaire contre les dommages oxydatifs (Ashraf and Foolad, 2007; Huang et al., 2013; Silini et al., 2016; Regni et al., 2019; Xiong et al., 2019; Abbasi et al., 2020; Mahmoud et al., 2020).

**Activité de biocontrôle des souches d'actinomycètes  
contre des agents pathogènes du sol de *Solanum  
lycopersicum* L. et *Daucus carota* L. : Evaluation *in vitro*  
et *in planta***

### 1. Le test d'antagonisme *in vitro*

#### 1.1.L'activité antagoniste avec les composés solubles et volatiles

Les souches d'actinomycètes ont été criblées pour l'activité de lutte biologique *in vitro* avec des composés solubles et volatiles. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (figure 22). L'inhibition des souches fongiques était évidente après 5 jours d'incubation, résultant d'une diminution de la croissance fongique par rapport au témoin. Cinquante-sept (57%) des souches ont une activité antifongique contre les deux pathogènes FORL et RHS avec les composés diffusibles (jusqu'à 85% avec les souches *S. xantholiticus* G33, *S.albidoflavus* H12, et *N. aegyptica* S2). Avec la sécrétion de composés volatiles, 50 % des souches ont la capacité d'inhiber la croissance du RHS (25 % à 50 % d'inhibition), hors que l'inhibition de FORL était démontrée par la souche *N. aegyptica* H14 uniquement.



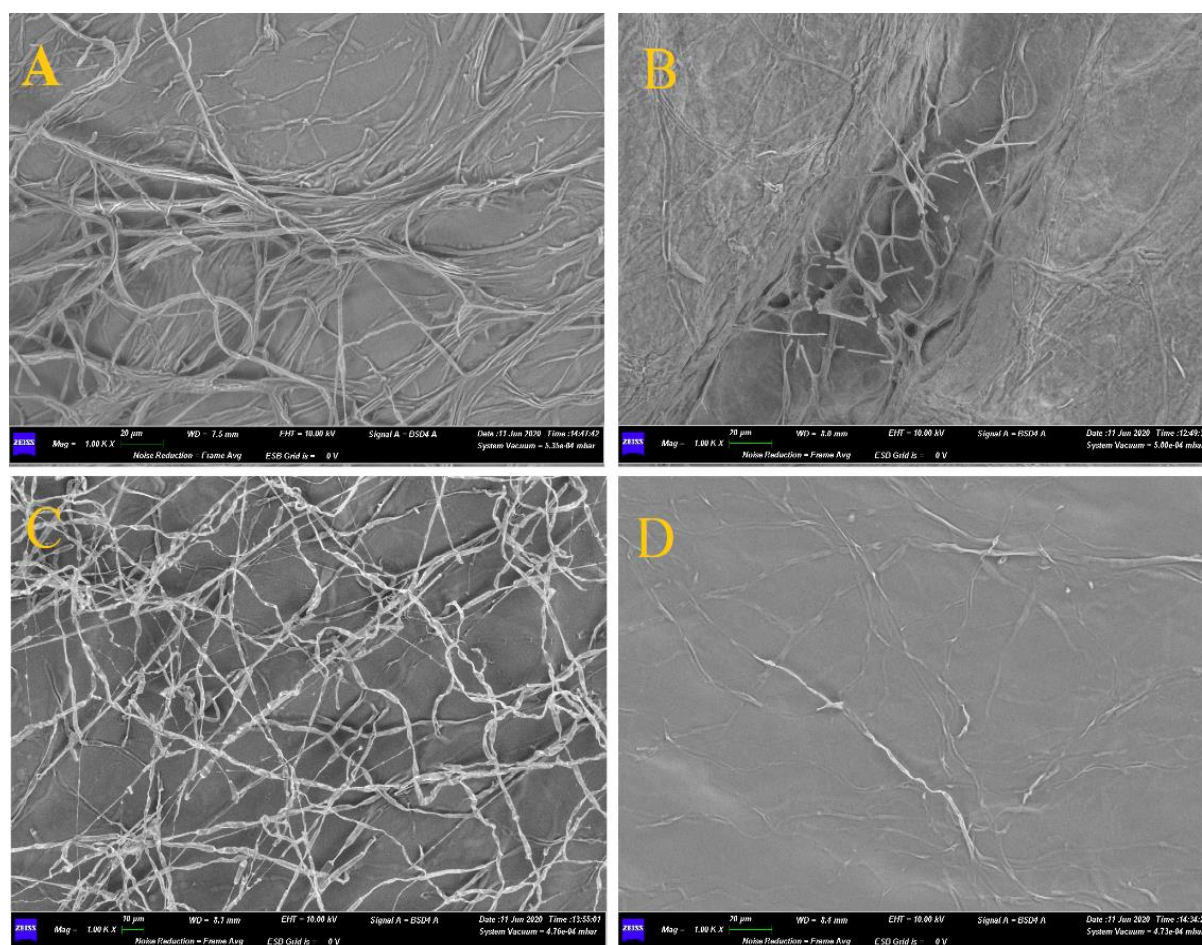
**Figure 22.** Le pourcentage d'inhibition (%) des pathogènes fongiques FORL (a) et RHS (b) par les souches d'actinomycètes avec la production des composés solubles (en bleu) et volatiles (en rouge). La valeur indiquée est la moyenne de trois répétitions (n=3)  $\pm$  erreur standard.

Il a été rapporté que les souches d'actinomycètes isolées des habitats extrêmes sont de bons candidats pour les activités antibactériennes et antifongiques contre un large éventail d'agents pathogènes (Glöckner et al., 2000; Lozupone et al., 2011; Alper et al., 2020). En

particulier le genre *Streptomyces*, qui possède un large pouvoir antimicrobien (Song et al., 2020). L'inhibition de la croissance fongique est due à la sécrétion des métabolites extracellulaires, du parasitisme, et la production des sidérophores et d'enzymes agissant sur la lyse de la paroi cellulaire (Kumar and Dube, 1992; Crawford et al., 1993; Errakhi et al., 2007; Jayasinghe and Parkinson, 2008; Tlemsani et al., 2020). Comme la chitinase, qui joue un rôle important dans l'élimination des pathogènes fongiques (Glick and Bashan, 1997). Le milieu PDA est un support adéquat pour la production de métabolites antifongiques (Jayasinghe and Parkinson, 2008). Diverses actinomycètes ont montré une bonne activité de lutte biologique contre plusieurs champignons pathogènes sur le milieu PDA (Kavitha et al., 2010; Tlemsani et al., 2020). Des composés volatiles tels que l'ammoniac ont été signalés comme des inhibiteurs de la croissance fongique (Howell et al., 1988; Tamreihao et al., 2019). Plusieurs études ont montré l'activité de lutte biologique des souches d'actinomycètes contre différents champignons et bactéries pathogènes (Crawford et al., 1993; Yuan and Crawford, 1995; Valois et al., 1996; Abd-Allah, 2001; Anitha and Rabeeth, 2009; Ningthoujam et al., 2009; Kim and Song, 2016; Kim et al., 2019; Marimuthu et al., 2020; Song et al., 2020; Tlemsani et al., 2020).

### **1.2.L'évaluation de l'interaction pathogène-PGPR avec le microscope électronique à balayage (MEB)**

Les micrographies obtenues par MEB sont présentées dans la figure ci-dessous (figure 23), montrant la structure des hyphes fongiques en absence et en présence de PGPB. Les micrographies de contrôle FORL et RHS (A et C) présentent des hyphes ramifiés et entrelacés avec une structure continue présentant un développement fongique normal. L'interaction FORL-PGPB (B) et RHS-PGPB (D) montrent une détérioration morphologique des filaments et une modification de leur structure qui apparaissent discontinues en raison d'une lyse totale du mycélium.



**Figure 23.** Les micrographies obtenues par MEB des hyphes FORL et RHS en absence et en présence de PGPB. Les panneaux présentent une ramification des hyphes fongiques suite à une croissance normale dans les boîtes témoins FORL et RHS (A et C respectivement). Les structures d'hyphes dans les zones d'interaction FORL et RHS avec PGPB (B et D, respectivement) montrent une déformation des hyphes avec une lyse fongique.

La déformation de la structure fongique résulte de l'hydrolyse de la paroi cellulaire du pathogène (Yulong Li et al., 2020). Les actinomycètes agissent sur les hyphes fongiques en produisant des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire telles que la chitinase, la cellulase, l'amylase, et des composés inhibiteurs de croissance (Yuan and Crawford, 1995; Patil et al., 2010; Li et al., 2017). Il a été démontré que la souche *Streptomyces tsukiyonensis* a la capacité de produire des composés antibactériens qui peuvent inhiber la croissance d'agents pathogènes seuls ou en concordance avec d'autres enzymes de lyse de la paroi cellulaire (Song et al., 2020). Dans notre étude, la déformation des hyphes fongiques par les souches *S. albidoflavus* (H12) et *N. aegyptica* (H14) est en accord avec ce qui a été rapporté sur l'induction d'une hydrolyse de la paroi cellulaire fongique par les souches d'actinomycètes (Patil et al., 2010; Li et al., 2017; Shrivastava et al., 2017).

### 1.3.L'activité antibactérienne

Le tableau ci-dessous (tableau 6) présente les résultats obtenus pour l'activité antibactérienne *in vitro*. Parmi les bactéries pathogènes testées, *Pseudomonas corrugata* I1501 et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* I1240 et I1262 étaient sensibles aux souches d'actinomycètes utilisées. La plupart des souches testées (90 %) présentent au moins une activité contre ces bactéries pathogènes (diamètre d'inhibition jusqu'à 25 mm). L'inhibition de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* I1262 a été montrée par la majorité des souches ; *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G33, *S. albidoflavus* H12, *S. thinghirensis* J4, *S. anulatus* J13, *S. ambofaciens* J27, *S. thinghirensis* K23, et *N. aegyptica* S2 (diamètre d'inhibition jusqu'à 24 mm).

**Tableau 6.** Le test d'antagonisme *in vitro* des souches d'actinomycètes contre les bactéries-test

Les souches pathogènes	D14	G10	G22	G33	H12	H14	J4	J13	J21	J27	K12	K23	S2	T45
<i>P. corrugata</i> I1501	NT	++	NT	++	++	++	-	++	NT	-	NT	-	++	-
<i>P. carotovorum</i> I1240	NT	++	NT	++	+	-	-	++	NT	+	NT	-	-	-
<i>P. carotovorum</i> I1262	NT	++	NT	++	+	-	+	++	NT	+	NT	+	++	-

NT, non testée ; +, inhibition modérée ; ++, forte inhibition ; -, pas d'inhibition.

Les actinomycètes sont connus comme des bons candidats pour la production de divers métabolites secondaires tels que les antibiotiques et les enzymes extracellulaires (Hata et al., 2015; Zhao et al., 2019). Le genre *Streptomyces* est le plus grand producteur d'antibiotiques parmi d'autres micro-organismes et joue un rôle important dans la suppression des maladies des plantes (Benhadj et al., 2020; Wang et al., 2020). Les actinobactéries possèdent une grande diversité de gènes pour la production de métabolites secondaires (Wang et al., 2020). Leur pouvoir de biocontrôle contre les phytopathogènes a été rapporté dans plusieurs études (Oskay et al., 2004; Ladutska, 2019; Zhao et al., 2019; Alper et al., 2020). Parmi les souches d'actinomycètes testés, *S. albidoflavus* (H12) et *N. aegyptica* (H14) présentaient des bonnes activités dans les tests d'antagonisme *in vitro* ; ils ont été combinées en consortium pour

l'activité antifongique et antibactérienne en utilisant le surnageant acellulaire (CFS) et pour la bioprotection induite pour l'expérience sur les plantes.

### 1.4.L'activité antagoniste du CFS

L'inhibition des agents pathogènes fongiques et bactériens a été évaluée à l'aide du spectrophotomètre et par l'ajout du résazurine (bleu d'Alamar). Les puits témoins contenant les milieux de culture (PDA/BN) sont restés bleus après 4 heures d'incubation avec la résazurine. En revanche, les puits contenant l'inoculum fongique/bactérien virent du bleu au rose. Pour le test antifongique, et après 5 jours d'incubation, l'inhibition du FORL était présente chez les inocula testés. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de *N. aegyptica* (H14)<sub>CFS</sub> a été observée dans le septième puits (0,8%) qui était le dernier puit avant le changement de couleur et était significativement plus efficace par rapport à *S. albidoflavus* (H12) et le consortium (CMI=50 %). Les souches *S. albidoflavus* (H12) et *N. aegyptica* (H14) étaient capables d'inhiber la croissance du RHS même à des faibles concentrations de CFS (CMI=0,4%), leur consortium était également efficace avec les différentes concentrations (jusqu'à 0,2%). L'inhibition de la croissance bactérienne était différente selon la souche du pathogène. *S. albidoflavus* (H12)<sub>CFS</sub> était actif contre ; *P. syringae* I1082 (CMI = 0,8%), *P. carotovorum* I1230 (CMI = 1,6%), *P. corrugate* I1501 (CMI = 50%), *P. syringae* pv. *actinidiae* I1539 (CMI = 12,5 %), et *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* I1262 avec toutes les concentrations. Sauf que la souche *N. aegyptica* (H14)<sub>CFS</sub> était actif contre *P. corrugata* I1501 (CMI = 50%) et *P. syringae* pv. *actinidiae* I1539 (CMI = 3 %) uniquement. Le consortium a montré une activité contre la plupart des souches. Cependant, aucune activité n'a été détectée contre la souche *P. carotovorum* I1240. Les cultures de PDA et GN contenant les aliquotes de CMI de chaque inocula testé ont montré que les cellules bactériennes ont repris leur croissance, ce qui explique l'activité bactériostatique du CFS utilisé.

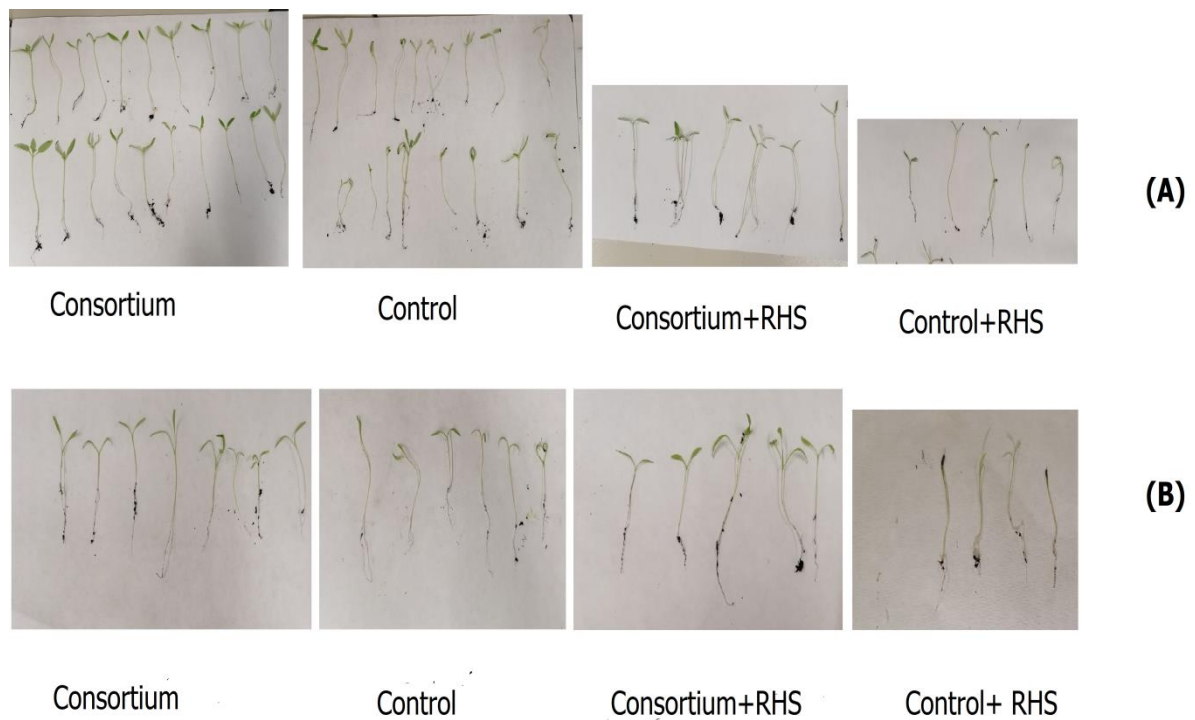
Le filtrat de culture acellulaire était efficace contre les bactéries et les champignons pathogènes par la méthode de micro dilution. L'efficacité du CFS dans l'inhibition des agents pathogènes est due à leur stabilité et de leur teneur en différents métabolites bioactifs secrétées durant la culture (Boukaew et al., 2020; Gu et al., 2020; Kawicha et al., 2020; Pellegrini et al., 2020b). Boukaew et ses collègues (2020) ont signalé le rôle de différents métabolites antifongiques et de l'acide acétique présent dans le filtrat acellulaire de *Streptomycesphilanthi* RL-1-178 dans l'inhibition de la croissance du *Penicillium digitatum in vitro* et également dans



le contrôle de la maladie de la moisissure verte chez les oranges. De même, la souche *Streptomyces endus* OsiSh-2 était active contre *Magnaporthe oryzae* par la production des composés hautement actifs (Xu et al., 2017). L'effet du filtrat de culture bactériens dans le contrôle des phytopathogènes a été montré dans plusieurs études (Li et al., 2011; Manhas and Kaur, 2016; Xu et al., 2017; Tamreihao et al., 2019; Wonglom et al., 2019; Boukaew et al., 2020; Gu et al., 2020; Kawicha et al., 2020; Yulong Li et al., 2020; Pellegrini et al., 2020b).

### **2. L'étude *in planta* de l'activité antagoniste**

La comparaison entre les quatre conditions expérimentales est présentée dans le tableau 7 et le tableau 8 pour la tomate et les carottes respectivement. Après obtention des plantules et apparition des symptômes de la maladie, l'expérimentation a été arrêtée à ce stade. Les paramètres de croissance ; c'est-à-dire la longueur des pousses et des racines, le nombre de feuilles, ainsi que le pourcentage de germination, les dommages, et la teneur en chlorophylle des feuilles ont été enregistrés.



**Figure 24.** La comparaison entre les unités expérimentales obtenues en pré-émergence (A) Plantules de tomate (B) Plantules de carotte.

En absence d'infection, l'inoculation avec le consortium a augmenté la germination de 25 % (tomate) et de 14 % (carottes), les paramètres de croissance, et la teneur en chlorophylle par rapport aux plantes non inoculées (CTL) ( $p < 0,05$ ). Sauf qu'aucune amélioration significative n'a été observée sur la longueur des racines des carottes ( $p > 0,05$ ).

## Résultats et discussions

**Tableau 7.** Résultats de l'expérience de pré-émergence des plantes de tomate avec le consortium (PGPB) dans le contrôle des pathogènes fongiques et bactériens.

<i>S. lycopersicum</i>						
Paramètres	Germination (%)	Dommages (degré)	Longueur des Plantes (cm)	Longueur des racines (cm)	Feuilles (n°)	Chl (a+b)
CTL	80	0,0	6,5 cd	1,1 d	2,6 ef	3,39 d
PGPB	100	0,0	10,9 a	2,8 a	5,1 a	9,42 a
CTL+FORL	52	3,4	4,1 fg	0,9 d	3,2 cde	1,65 ef
PGPB+FORL	80	3,0	8,1 b	1,3 d	3,9 bc	6,32 b
CTL+RHS	52	4,5	4,2 fg	1,9 bc	2,2 f	1,92 e
PGPB+RHS	60	3,9	7,5 bc	2,3 b	3,7 bc	3,47 d
CTL+ <i>Pseudomonas syringae</i>	48	4,1	4,9 ef	1,0 d	2,6 def	1,21 f
PGPB+ <i>Pseudomonas syringae</i>	64	3,9	5,7 de	1,8 c	4,0 b	4,91 c
CTL+ <i>Pseudomonas corrugata</i>	60	3,8	3,0 g	1,0 d	1,9 f	1,68 ef
PGPB+ <i>Pseudomonas corrugate</i>	88	3,5	7,0 bc	2,0 bc	3,3 cd	3,14 d
LSD	-	-	4,5	4,5	4,5	5,01

CNT (sans PGPB/infection), PGPB (avec PGPB/pas d'infection), PGPB+INF (avec PGPB/infection), INF (avec infection/pas de PGPB), LSD, la différence la moins significative. Les résultats suivis de mêmes lettres ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

L'infection fongique a causé de graves dommages (extension >20 mm avec l'infection par RHS). Le traitement avec le consortium (PGPR+F) a légèrement réduit les dégâts, mais a conservé une bonne germination par rapport au témoin (F) (jusqu'à 100 % de plus que le témoin). La promotion de la croissance des plantes par les PGPB a été maintenue en termes de longueur de tige ( $p < 0,05$ ) et de teneur en chlorophylle chez les plants de tomates infectés par les champignons, et par le véritable développement des feuilles chez les carottes ( $p < 0,05$ ).

## Résultats et discussions

L'amélioration de la croissance des plantes en cas de bactérisation a réduit la protection des plantes contre les maladies, mais a permis un développement plus ou moins meilleur que le témoin dans les deux variétés (meilleure longueur des tiges et des racines, nombre de feuilles, et teneur totale en chlorophylle ( $p < 0,05$ ). Le traitement par le consortium semble efficace dans l'atténuation de l'infection causée par *P. corrugate* avec 88 % de survie et un bon développement des paramètres de croissance et de la teneur en chlorophylle ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin (F).

**Tableau 8.** Résultats de la pré-émergence des plantes de carotte avec le consortium (PGPB) dans le contrôle des pathogènes fongiques et bactériens.

<i>D. carota</i>						
Paramètres	Germination (%)	Dommages (degré)	Longueur des plantes (cm)	Longueur des racines (cm)	Feuilles (n°)	Chl (a+b)
CTL	88	0,0	4,5 bc	1,7 a	2,0 b	4,93 d
PGPR	100	0,0	5,4 a	1,9 a	3,0 a	15,54 a
CTL+RHS	20	5,0	3,3 c	1,1 b	1,0 c	0,45 e
PGPR+RHS	40	3,4	4,6 abc	1,1 b	1,9 b	0,98 e
CTL+ <i>Pectobacterium carotovorum</i> I1230	28	4,9	3,3 c	0,9 b	1,9 b	1,34 e
PGPR+ <i>Pectobacterium carotovorum</i> I1230	52	3,8	3,9 c	1,3 b	2,5 a	7,99 c
CTL+ <i>Pectobacterium carotovorum</i> I1240	40	4,7	3,6 c	1,1 b	2,0 b	5,48 d
PGPR+ <i>Pectobacterium carotovorum</i> I1240	52	3,5	5,3 ab	1,8 a	2,5 a	9,33 b
LSD	-	-	4,4	4,38	4,38	4,9

CNT (sans PGPB/infection), PGPB (avec PGPB/pas d'infection), PGPB+INF (avec PGPB/infection), INF (avec infection/pas de PGPB), LSD, la différence la moins significative. Les résultats suivis de mêmes lettres ne sont pas significativement différents selon le test post-hoc LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

Les actinomycètes ont la capacité de coloniser les racines des plantes et de sécréter des métabolites antifongiques et antibactériens qui agissent contre le développement des maladies (Bakker et al., 2010; Soltanzadeh et al., 2016). La production d'antibiotiques par les actinomycètes renforce les relations symbiotiques avec les plantes par la lutte des phytopathogènes et l'amélioration de la croissance et le développement des plantes (Singh and Gaur, 2016; Vurukonda et al., 2018). Le potentiel des actinomycètes en tant qu'agents de lutte biologique implique les activités antagonistes, diverses activités favorisant la croissance des plantes telles que la solubilisation du phosphate, la production de l'acide indole acétique (AIA), le cyanure d'hydrogène et l'ammoniac, et l'induction de la résistance systémique pour améliorer les défenses des plantes (Hata et al., 2015; El-Shatoury et al., 2020). Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation avec un consortium d'actinomycètes atténue les symptômes d'infection causées par les champignons et les bactéries pathogènes dans l'expérience de pré-émergence, et permet un développement normal des plantes en fonction des agents pathogènes utilisés ( $p < 0,05$ ). L'application de bactéries combinées est une bonne stratégie pour le contrôle des agents pathogènes (El\_Komy et al., 2020; Pellegrini et al., 2020a). Plusieurs études ont montré que l'application d'inoculum en mélange est plus efficace qu'un inoculum seul (Bora et al., 2015, 2016; Debasis et al., 2020; El\_Komy et al., 2020; Pellegrini et al., 2020a; Saikia and Bora, 2020; Verma et al., 2020). Les principaux mécanismes par lesquels les actinomycètes contrôlent les maladies des plantes sont la production de métabolites antibactériens et antifongiques et l'induction de résistance chez les plantes (El-Shatoury et al., 2020; Yulong Li et al., 2020). Elles sont considérées comme un important producteur de bio-pesticides agricoles en raison de leur capacité de produire divers métabolites bioactifs tels que les antibiotiques (He et al., 2020). Les *Streptomyces* sécrètent divers métabolites, enzymes lytiques, et antibiotiques, qui agissent contre les composés polymères tels que la chitine, la cellulose, l'hémicellulose des agents pathogènes (Soltanzadeh et al., 2016). La sécrétion de ces composés conduit à un contrôle direct contre les phytopathogènes (Cuppels et al., 2013; Soltanzadeh et al., 2016). Diverses études ont démontré le pouvoir des actinomycètes dans le contrôle des maladies des plantes causées par *Fusarium oxysporum* (Getha and Vikineswary, 2002; Anitha and Rabeeth, 2009; Manasa et al., 2013; Saengnak et al., 2013; Lu et al., 2016; Wei et al., 2020) et *Rhizoctonia solani* (Rothrock and Gottlieb, 1981; Cao et al., 2004; Patil et al., 2010, 2011; Khair, 2011; Goudjal et al., 2014; Yandigeri et al., 2015; Singh et al., 2017).

## **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives

La présente étude a permis la sélection de quatorze PGPB en fonction de leurs caractères favorisant la croissance des plantes parmi soixante actinomycètes préalablement isolées dans deux sites algériens salins. Les souches G10 (*S. iakyrus*) et H14 (*N. aegyptica*) ont montré les meilleures capacités de biostimulation de *Solanum lycopersicum*. L. *in vitro*. Des observations par microscope électronique à balayage (MEB) ont souligné les bonnes capacités d'association de ces souches avec les racines des plantules. Les cultures en serre en pot de *Solanum lycopersicum*.L. ont montré que l'inoculation avec les quatorze actinomycètes sélectionnées améliorait la croissance de la plante et ses caractéristiques morpho-physiologiques. Les meilleures propriétés biostimulantes *in planta* ont été enregistrées pour les plantes inoculées avec les souches G33 (*S. xantholiticus*) suivie par H14 (*N. aegyptica*), G10 (*S. iakyrus*), T45 (*N. dassonvillei* subsp. *Dassonvillei*), G22 (*S. xantholiticus*), D14 (*N. dassonvilleisp*), et J13 (*S. anulatus*). Les autres souches ont également montré des propriétés biostimulantes intéressantes. De bonnes corrélations ont été enregistrées entre la production d'AIA, la solubilisation du phosphate, et la libération de l'HCN dans les résultats *in vitro*, ainsi que les paramètres de croissance et de développement des plantes des échantillons inoculés avec D14, G22, G33, H14, J13, et T45. De même, ces souches ont été testées pour leur capacité à induire une tolérance au stress salin chez les plantes jusqu'à 1 M NaCl. Parmi les quatorze actinomycètes, la meilleure induction de tolérance a été enregistrée pour les plantes inoculées avec les souches G10 (*S. iakyrus*), J27 (*S. ambofaciens*), et K12 (*S. xantholiticus*). Les quatorze PGPB avaient un bon pouvoir *in vitro* dans l'inhibition des souches pathogènes par la méthode de double culture et par le CFS. L'inhibition de la croissance fongique a été illustrée par la détérioration des filaments fongiques comme le montrent les micrographes du MEB. L'inoculation par le consortium a montré un bon effet dans l'amélioration de la croissance des tomates et des carottes par rapport au témoin et dans l'atténuation des symptômes d'infection causés par les agents pathogènes. La présente étude fournit des informations utiles sur l'utilisation des souches d'actinomycètes comme des bioinoculants. Compte tenu de leur origine, leurs propriétés biostimulantes prometteuses, l'halotolérance, et leur rôle dans le contrôle des maladies des plantes, nos souches pourraient trouver une application en culture végétale sur des sols normaux et à haute salinité. D'autres études devraient être entreprises pour évaluer la possibilité de produire des biofertilisants avec ces souches. L'efficacité des formulations doit également être

## **Conclusion et perspectives**

---

étudiée dans des expériences en plein champ et sur différentes cultures. Même s'il est nécessaire de faire des recherches plus approfondies, les résultats obtenus dans le présent travail sont un bon point de départ pour le développement de biofertilisants utiles pour surmonter la forte salinité des sols et entraver les maladies des plantes. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour évaluer leur effet avec d'autres plantes et contre divers agents pathogènes.



## **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- A. Abdel-Rahman, E., Mahmoud, A.M., Khalifa, A.M., Ali, S.S., 2016.** Physiological and pathophysiological reactive oxygen species as probed by EPR spectroscopy: The underutilized research window on muscle ageing. *The Journal of physiology* 594, 4591–4613.
- Aakerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., Sistonen, L.E.A., 2007.** Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, 15–27.
- Abbas, S.R., Ahmad, S.D., Sabir, S.M., Shah, A.H., 2014.** Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. *Journal of soil science and plant nutrition* 14, 233–243.
- Abbasi, S., Sadeghi, A., Safaie, N., 2020.** *Streptomyces* alleviate drought stress in tomato plants and modulate the expression of transcription factors *ERF1* and *WRKY70* genes. *Scientia Horticulturae* 265, 109206.
- Abd-Allah, E.F., 2001.** *Streptomycesplicatus* as a model biocontrol agent. *Folia microbiologica* 46, 309–314.
- Abdelaziz, M.E., Kim, D., Ali, S., Fedoroff, N.V., Al-Babili, S., 2017.** The endophytic fungus *Piriformospora indica* enhances *Arabidopsis thaliana* growth and modulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis under salt stress conditions. *Plant Science* 263, 107–115.
- Abdullah, A.S., Moffat, C.S., Lopez-Ruiz, F.J., Gibberd, M.R., Hamblin, J., Zerihun, A., 2017.** Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in plant science* 8, 1806.
- Abed, Y., Davin-Regli, A., Bollet, C., De Micco, P., 1995.** Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of clinical microbiology* 33, 1418–1420.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E., 1992.** Ethylene in plant biology. 2nd edn Academic Press. New York 414.
- Adams, I.P., Skelton, A., Macarthur, R., Hodges, T., Hinds, H., Flint, L., Nath, P.D., Boonham, N., Fox, A., 2014.** Carrot yellow leaf virus is associated with carrot internal necrosis. *PLoS One* 9, e109125.

- Adegboye, M.F., Babalola, O.O., 2012.** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research* 7, 2255–2261.
- Adékambi, T., Butler, R.W., Hanrahan, F., Delcher, A.L., Drancourt, M., Shinnick, T.M., 2011.** Core gene set as the basis of multilocus sequence analysis of the subclass Actinobacteridae. *PLoS One* 6, e14792.
- Aderem, A., 2005.** Systems biology: its practice and challenges. *Cell* 121, 511–513.
- Agarwal, P., Singh, P.C., Chaudhry, V., Shirke, P.A., Chakrabarty, D., Farooqui, A., Nautiyal, C.S., Sane, A.P., Sane, V.A., 2019.** PGPR-induced OsASR6 improves plant growth and yield by altering root auxin sensitivity and the xylem structure in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology* 240, 153010.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science* 26, 1–20.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research* 163, 173–181.
- Ahmad, F., Ahmad, I., KHAN, M.S., 2005.** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29, 29–34.
- Alam, M.T., Merlo, M.E., Takano, E., Breitling, R., 2010.** Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Molecular phylogenetics and evolution* 54, 763–772.
- Ali, B., Sabri, A.N., Hasnain, S., 2010.** Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 1379–1384.
- Ali, S.Z., Sandhya, V., Grover, M., Kishore, N., Rao, L.V., Venkateswarlu, B., 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biology and Fertility of Soils* 46, 45–55.
- Allam, N.G., Kinany, R., El-Refai, E., Ali, W.Y., 2018.** Potential use of beneficial salt tolerant bacteria for improving wheat productivity grown in salinized soil. *J Microbiol Res* 8, 43–53.
- Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017.** Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology* 8, 971.

- Alper, D., Güven, K., Şahin, N., 2020.** Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. *Microbial Pathogenesis* 104134.
- Ambavaram, M.M., Basu, S., Krishnan, A., Ramegowda, V., Batlang, U., Rahman, L., Baisakh, N., Pereira, A., 2014.** Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nature communications* 5, 1–14.
- Amir, H., Lagrange, A., Hassaine, N., Cavaloc, Y., 2013.** Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23, 585–595.
- Anitha, A., Rabeeth, M., 2009.** Control of Fusarium wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. *Afr J Basic Appl Sci* 1, 9–14.
- Antoun, H., 2013.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition, Volume 5.
- 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. *Frontiers in microbiology* 7, 1334.
- Aprile, A., Havlickova, L., Panna, R., Marè, C., Borrelli, G.M., Marone, D., Perrotta, C., Rampino, P., De Bellis, L., Curn, V., 2013.** Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC genomics* 14, 1–18.
- Arasu, M.V., Esmail, G.A., Al-Dhabi, N.A., 2016.** Hypersaline Actinomycetes and their biological applications, in: *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen, p. 229.
- Arnon, D.I., 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* 24, 1.
- Arora, N.K., Fatima, T., Mishra, I., Verma, M., Mishra, J., Mishra, V., 2018.** Environmental sustainability: challenges and viable solutions. *Environmental Sustainability* 1, 309–340.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, R., 2013.** Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs, in *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, pp. 411–449.
- Arshad, M., Shaharoon, B., Mahmood, T., 2008.** Inoculation with *Pseudomonas spp.* containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18, 611–620.

- Arya, R., Mishra, N.K., Sharma, A.K., 2016. *Brevibacillus borstelensis* and *Streptomyces albogriseolus* have roles to play in degradation of herbicide, sulfosulfuron. 3 Biotech 6, 246.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and experimental botany 59, 206–216.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant science 166, 3–16.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., 2006. Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in a salt-affected soil. International Journal of Environmental Science & Technology 3, 43–51.
- Ashwini, M., Doddamani, L.C., Babar, S.R., 2018. Characterization and evaluation of actinomycete isolates for traits associated with plant growth promotion. J. Pharmacogn. Phytochem 7, 1177–1180.
- Atieno, M., Herrmann, L., Nguyen, H.T., Phan, H.T., Nguyen, N.K., Srean, P., Than, M.M., Zhiyong, R., Tittabutr, P., Shutsrirung, A., 2020. Assessment of biofertilizer use for sustainable agriculture in the Great Mekong Region. Journal of environmental management 275, 111300.
- Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.-P., Göker, M., 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. Standards in genomic sciences 2, 117–134.
- Avramova, V., AbdElgawad, H., Zhang, Z., Fotschki, B., Casadevall, R., Vergauwen, L., Knapen, D., Taleisnik, E., Guisez, Y., Asard, H., 2015. Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. Plant physiology 169, 1382–1396.
- Ayadi, M., Cavez, D., Miled, N., Chaumont, F., Masmoudi, K., 2011. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) and their role in abiotic stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry 49, 1029–1039.
- AzcON, R., Barea, J.M., 1975. Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. Plant and Soil 43, 609–619.
- Bachofer, R., Oltmanns, O., Lingens, F., 1973. Isolation and characterization of a *Nocardia*-like soil-bacterium, growing on carboxanilide fungicides. Archiv für Mikrobiologie 90, 141–149.

- Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., 2004.** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils* 40, 188–193.
- Bai, Y., Zhou, X., Smith, D.L., 2003.** Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop science* 43, 1774–1781.
- Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., Vivanco, J.M., 2005.** Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434, 217–221.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.
- Bakker, M.G., Glover, J.D., Mai, J.G., Kinkel, L.L., 2010.** Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil streptomycetes. *Applied Soil Ecology* 46, 35–42.
- Bal, H.B., Nayak, L., Das, S., Adhya, T.K., 2013.** Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil* 366, 93–105.
- Balogh, G., Péter, M., Glatz, A., Gombos, I., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J.L., Vigh, L., 2013.** Key role of lipids in heat stress management. *FEBS letters* 587, 1970–1980.
- Baniaghil, N., Arzanesh, M.H., Ghorbanli, M., Shahbazi, M., 2013.** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress. *J Appl Environ Biol Sci* 3, 17–27.
- Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Zea-Bonilla, T., Pérez-Jiménez, R.M., Martín, M., Rivilla, R., 2011.** *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied and environmental microbiology* 77, 5412–5419.
- Barazani, O.Z., Friedman, J., 1999.** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25, 2397–2406.
- Barka, E.A., Nowak, J., Clément, C., 2006.** Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and environmental microbiology* 72, 7246–7252.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016.** Taxonomy, physiology, and

- natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 1–43.
- Barnabás, B., Jäger, K., Fehér, A., 2008.** The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, cell & environment* 31, 11–38.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2014.** ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology* 171, 884–894.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2012.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 227–235.
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S.S., Pandey, A., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2017.** Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and *TaCTR1/TaDREB2* expression. *Physiologia plantarum* 161, 502–514.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.-P., 2014.** Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil* 378, 1–33.
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E., 2005.** Plant growth promoting. *Encyclopedia of soils in the environment* 1, 103–115.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1998.** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1225–1228.
- Bashan, Y., Puente, M.E., de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., 2008.** Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. *Plant-microbe interactions* 661, 69–93.
- Beever, R.E., Burns, D.J.W., 1981.** Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi, in: *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp. 127–219.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z., 2019.** Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science* 31, 706–712.

- Benhadj, M., Metrouh, R., Menasria, T., Gacemi-Kirane, D., Slim, F.Z., Ranque, S., 2020.** Broad-spectrum antimicrobial activity of wetland-derived *Streptomyces sp.* ActiF450. EXCLI journal 19, 360.
- Bennur, T., Kumar, A.R., Zinjarde, S., Javdekar, V., 2015.** *Nocardioopsis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. Microbiological Research 174, 33–47.
- Bennur, T., Kumar, A.R., Zinjarde, S., Javdekar, V., 2014.** *Nocardioopsis* species as potential sources of diverse and novel extracellular enzymes. Applied microbiology and biotechnology 98, 9173–9185.
- Bennur, T., Ravi Kumar, A., Zinjarde, S.S., Javdekar, V., 2016.** *Nocardioopsis* species: a potential source of bioactive compounds. Journal of applied microbiology 120, 1–16.
- Berd, D., 1973.** Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. Applied microbiology 25, 665–681.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M., Bakker, P.A., 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in plant science 17, 478–486.
- Berg, G., Marten, P., Minkwitz, A., Bruckner, S., 2001.** Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces sp.* DSMZ 12424/Effiziente biologische Bekämpfung pilzlicher Pflanzenkrankheiten durch *Streptomyces sp.* DSMZ 12424. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection 1–10.
- Berg, G., Smalla, K., 2009.** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS microbiology ecology 68, 1–13.
- Besser, J., 2015.** Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control, in: Pulse Field Gel Electrophoresis. Springer, pp. 3–7.
- Bharti, N., Yadav, D., Barnawal, D., Maji, D., Kalra, A., 2013.** *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress. World Journal of Microbiology and Biotechnology 29, 379–387.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 1327–1350.
- Bhatti, A.A., Haq, S., Bhat, R.A., 2017.** Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. Microbial pathogenesis 111, 458–467.



- Bhise, K.K., Bhagwat, P.K., Dandge, P.B., 2017.** Plant growth-promoting characteristics of salt tolerant *Enterobacter cloacae* strain KBPD and its efficacy in amelioration of salt stress in *Vigna radiata* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 36, 215–226.
- Bhise, K.K., Dandge, P.B., 2019.** Mitigation of salinity stress in plants using plant growth promoting bacteria. *Symbiosis* 79, 191–204.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5, 9–19.
- Bitá, C., Gerats, T., 2013.** Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science* 4, 273.
- Blackwood, K.S., He, C., Gunton, J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., Kabani, A.M., 2000.** Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2846–2852.
- Blümel, J., Blümel, E., Yassin, A.F., Schmidt-Rotte, H., Schaal, K.P., 1998.** Typing of *Nocardia farcinica* by pulsed-field gel electrophoresis reveals an endemic strain as source of hospital infections. *Journal of clinical microbiology* 36, 118–122.
- Bora, L.C., Lohit, K., Kuldeep, T., Nath, B.C., Rinku, S., 2015.** Molecular characterizations of microbial antagonists and development of bioformulations for management of bacterial wilt of Naga chilli (*Capsicum chinens* Jacq.) in Assam. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3, 109–122.
- Bora, L.C., Lohit, K., Kuldeep, T., Parveen, K., Joli, D., Rinku, S., 2016.** Yield enhancement and bacterial wilt suppression in Bhut jolokia (*Capsicum assamicum*) using consortia of microbial antagonists. *Biopesticides International* 12, 165–171.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O’Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., Triplett, E.W., 1996.** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1935–1943.
- Boroujeni, M.E., Arijit, D., Prashanthi, K., Sandeep, S., Sourav, B., 2012.** Enzymatic screening and random amplified polymorphic DNA fingerprinting of soil streptomycetes isolated from Wayanad district in Kerala, India. *Journal of Biological Sciences* 12, 43–50.
- Botta, A.L., Santacecilia, A., Ercole, C., Cachio, P., Del Gallo, M., 2013.** In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology* 30, 666–674.

- Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., 2021.** The Screening of Potassium-and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms* 9, 470.
- Bouchet, V., Huot, H., Goldstein, R., 2008.** Molecular genetic basis of ribotyping. *Clinical microbiology reviews* 21, 262–273.
- BOUDERSA, N., CHAIB, G., AICHA, A., CHERFIA, R., BOUDERBANE, H., BOUDOUR, L., 2021.** Assessment of biological and agronomic diversity of seven durum wheat varieties cultivated in the Northeastern region of Algeria. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 22.
- Boukaew, S., Petlamul, W., Prasertsan, P., 2020.** Comparison of the biocontrol efficacy of culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RL-1-178 and acetic acid against *Penicillium digitatum*, in vitro and in vivo. *European Journal of Plant Pathology* 1–11.
- Boukaya, N., Goudjal, Y., Zamoum, M., Chaabane Chaouch, F., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A., 2018.** Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterisation of *Streptosporangium becharensis* SG1 as a promising biocontrol agent. *Biocontrol Science and Technology* 28, 858–873.
- Brencic, A., Winans, S.C., 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69, 155–194.
- Brígido, C., Duan, J., Glick, B.R., 2015.** Methods to study 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase in plant growth-promoting bacteria, in *Handbook for Azospirillum*. Springer, pp. 287–305.
- Brown, A.D., Simpson, J.R., 1972.** Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Microbiology* 72, 589–591.
- Buchanan, R.E., 1917.** Studies in the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the schizomycetes. *Journal of bacteriology* 2, 155.
- Buckwalter, S.P., Olson, S.L., Connelly, B.J., Lucas, B.C., Rodning, A.A., Walchak, R.C., Deml, S.M., Wohlfiel, S.L., Wengenack, N.L., 2016.** Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other aerobic Actinomycetes. *Journal of clinical microbiology* 54, 376–384.
- Cameron, R.K., Dixon, R.A., Lamb, C.J., 1994.** Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 5, 715–725.

- Camille, D., 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier.
- Campos, E.V., Proença, P.L., Oliveira, J.L., Bakshi, M., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., 2019.** Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators* 105, 483–495.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2004.** Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology* 39, 425–430.
- Cao, P., Liu, C., Sun, P., Fu, X., Wang, S., Wu, F., Wang, X., 2016.** An endophytic *Streptomyces sp.* strain DHV3-2 from diseased root as a potential biocontrol agent against *Verticillium dahliae* and growth elicitor in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Antonie van Leeuwenhoek* 109, 1573–1582.
- Cappuccino, J.G., Sherman, N., 1992.** Biochemical activities of microorganisms. *Microbiology, A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Co. California, USA 188–247.
- Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., Woodrow, P., 2011.** Salinity stress and salt tolerance. *Abiotic stress in plants—Mechanisms and adaptations* 1, 21–38.
- Castell, C., Terradas, J., Tenhunen, J.D., 1994.** Water relations, gas exchange, and growth of resprouts and mature plant shoots of *Arbutus unedo* L. and *Quercus ilex* L. *Oecologia* 98, 201–211.
- Chaiharn, M., Chunnaleuchanon, S., Kozo, A., Lumyong, S., 2008.** Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *Current Applied Science and Technology* 8, 18–23.
- Chang, W.-S., Van De Mortel, M., Nielsen, L., De Guzman, G.N., Li, X., Halverson, L.J., 2007.** Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of bacteriology* 189, 8290–8299.
- Chauhan, A.K., Maheshwari, D.K., Kim, K., Bajpai, V.K., 2016.** Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 colonizing *Curcuma longa* L.: isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting activities. *Canadian Journal of Microbiology* 62, 880–892.
- Chaurasia, A., Meena, B.R., Tripathi, A.N., Pandey, K.K., Rai, A.B., Singh, B., 2018.** Actinomycetes: an unexplored microorganisms for plant growth promotion and

- biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34, 132.
- Cehili, F., Boudour, L., Bouchtab, K., 2017.** Etude de la variabilité agronomique et biochimique des quatre génotypes d'une variété de blé dur cultivé en Algérie (*Triticum durum* Desf.). *Eur Sci J* 13, 409–425.
- Chen, C., Bélanger, R.R., Benhamou, N., Paulitz, T.C., 1999.** Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas spp.* against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *European Journal of Plant Pathology* 105, 477–486.
- Chen, H., Jiang, J.-G., 2010.** Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* 18, 309–319.
- Cheng, Z., Woody, O.Z., McConkey, B.J., Glick, B.R., 2012.** Combined effects of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and salinity stress on the *Brassica napus* proteome. *Applied Soil Ecology* 61, 255–263.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Ghouli, M., Yahiaoui, B., Arif, F., 2013.** Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research* 7, 4562–4571.
- Cho, K., Toler, H., Lee, J., Ownley, B., Stutz, J.C., Moore, J.L., Augé, R.M., 2006.** Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of plant Physiology* 163, 517–528.
- Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N., 2007.** Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* 47, 289–297.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N., Piccoli, P.N., 2015.** *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* 153, 79–90.
- Cole, St., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. 3rd, 1998.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 396, 190–190.
- Colli Mull, J.G., de la Riva de la Riva, G.A., Vargas-Sámano, C.D., Pérez-Machado, G., Agüero-Chapin, G., 2017.** Plant growth promoting bacteria isolated from a Mexican natural ecosystem induce water stress resistance in maize and sorghum plants. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 9, 209–219.

- Collins, M.D., Smida, J., Dorsch, M., Stackebrandt, E., 1988.** *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 38, 385–391.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010a.** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry 42, 669–678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A., 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and environmental microbiology 71, 4951–4959.
- Compant, S., Van Der Heijden, M.G., Sessitsch, A., 2010b.** Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions. FEMS microbiology ecology 73, 197–214.
- Cook, A.E., Meyers, P.R., 2003.** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1907–1915.
- Costa, F.G., Zucchi, T.D., Melo, I.S. de, 2013.** Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology 56, 948–955.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., Moënne-Loccoz, Y., 2009.** *Pseudomonas fluorescens* and closely related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. Letters in applied microbiology 48, 505–512.
- Cowan, D.A., 2009.** Cryptic microbial communities in Antarctic deserts. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 19749–19750.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K., 2011.** Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC plant biology 11, 1–14.
- Crawford, D.L., 1988.** Biodegradation of agricultural and urban wastes.
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A., 1993.** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Applied and environmental microbiology 59, 3899–3905.
- Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A., 2004.** Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. Canadian Journal of Botany 82, 273–281.

- Cuppels, D.A., Higham, J., Traquair, J.A., 2013.** Efficacy of selected streptomycetes and a streptomycete+ pseudomonad combination in the management of selected bacterial and fungal diseases of field tomatoes. *Biological Control* 67, 361–372.
- Da Costa, M.S., Santos, H., Galinski, E.A., 1998.** An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Biotechnology of extremophiles* 117–153.
- Da Jeong Shin, S.-J.Y., Hong, J.K., Weon, H.-Y., Song, J., Sang, M.K., 2019.** Effect of *Bacillus aryabhatai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 on Growth Promotion and Alleviation of Heat and Drought Stresses in Chinese cabbage. *The plant pathology journal* 35, 178.
- Dal Cortivo, C., Barion, G., Visioli, G., Mattarozzi, M., Mosca, G., Vameralli, T., 2017.** Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: assessment of plant-microbe interactions by ESEM. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247, 396–408.
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science* 2, 53.
- Das, S., Lyla, P.S., Khan, S.A., 2008.** Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26, 166–177.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K., Pandey, A., 2011.** Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 259–265.
- Dastagir, M.R., 2019.** Role of Microorganisms in Managing Climate Change Impacts, in: *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Springer, pp. 1–16.
- De-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., 2012.** The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61, 171–189.
- De Oliveira, M.F., da Silva, M.G., Van Der Sand, S.T., 2010.** Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* 161, 565–572.
- De Rybel, B., Mähönen, A.P., Helariutta, Y., Weijers, D., 2016.** Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 30.

- Debasis, M., Ganeshamurthy, A.N., Komal, S., Radha, T.K., Rupa, T.R., 2020.** Plant growth promotion and biocontrol activity of some typical harsh environment rhizomicrobes and their effects on *Amaranthus cruentus* plants. *Research Journal of Biotechnology* Vol 15, 1.
- Del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., Santoyo, G., 2020.** ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research* 235, 126439.
- Devulder, G., De Montclos, M.P., Flandrois, J.-P., 2005.** A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, 293–302.
- Dhillon, J., Torres, G., Driver, E., Figueiredo, B., Raun, W.R., 2017.** World phosphorus use efficiency in cereal crops. *Agronomy Journal* 109, 1670–1677.
- Dien, D.C., Mochizuki, T., Yamakawa, T., 2019.** Effect of various drought stresses and subsequent recovery on proline, total soluble sugar and starch metabolisms in rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Plant Production Science* 22, 530–545.
- Ding, Z.-G., Li, M.-G., Zhao, J.-Y., Ren, J., Huang, R., Xie, M.-J., Cui, X.-L., Zhu, H.-J., Wen, M.-L., 2010.** Naphthospirozone A: an unprecedented and highly functionalized polycyclic metabolite from an alkaline mine waste extremophile. *Chemistry—A European Journal* 16, 3902–3905.
- DJABALLAH, C., 2010.** BIODIVERSITE DES ACTINOMYCETES HALOPHILES ET HALOTOLÉRANTS ISOLES DE LA SEBKHA DE AIN M’LILA.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Rossi, M., Forni, C., Smati, M., Del Gallo, M., Kitouni, M., 2021.** Characterization of Plant Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Triticum durum* of Actinomycetes Isolates under Salt Stress Conditions. *Soil Systems* 5, 26.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., Kitouni, M., 2020.** Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability* 12, 4617.
- Dodd, I.C., Belimov, A.A., Sobeih, W.Y., Safronova, V.I., Grierson, D., Davies, W.J., 2004.** Will modifying plant ethylene status improve plant productivity in water-limited environments, in: *Handbook and Abstracts for the 4th International Science Congress*, Brisbane, Australia.
- Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F., 2012.** Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 63, 3415–3428.

- Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I., Belimov, A.A., 2010.** Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology* 157, 361–379.
- Donate-Correa, J., León-Barrios, M., Pérez-Galdona, R., 2005.** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil* 266, 261–272.
- Dong, W., Liu, X., Lv, J., Gao, T., Song, Y., 2019.** The expression of alfalfa *MsPP2CA1* gene confers ABA sensitivity and abiotic stress tolerance on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 143, 176–182.
- Doran, J.W., 1996.** Soil health and sustainability. *Advances in Agron.* 56, 1–54.
- Doumbou, C.L., Hamby Salove, M.K., Crawford, D.L., Beaulieu, C., 2001.** Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82, 85–102.
- Driedonks, N., Xu, J., Peters, J.L., Park, S., Rieu, I., 2015.** Multi-level interactions between heat shock factors, heat shock proteins, and the redox system regulate acclimation to heat. *Frontiers in plant science* 6, 999.
- Dworkin, M., Foster, J.W., 1958.** Experiments with some microorganisms, which utilize ethane and hydrogen. *Journal of bacteriology* 75, 592.
- Ebel, C., BenFeki, A., Hanin, M., Solano, R., Chini, A., 2018.** Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) TIFY family and role of *Triticum Durum* Td TIFY11a in salt stress tolerance. *PloS one* 13, e0200566.
- Egamberdieva, D., 2009.** Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 861–864.
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., 2009.** Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and Fertility of Soils* 45, 563–571.
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., Chebotar, V., Tikhonovich, I., Kamilova, F., Validov, S.Z., 2011.** Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and fertility of soils* 47, 197–205.
- Egamberdieva, D., Lugtenberg, B., 2014.** Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants, in *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1. Springer, pp. 73–96.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S.D., Mishra, J., Arora, N.K., 2019.** Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in microbiology* 10, 2791.



- El\_Komy, M.H., Hassouna, M.G., Abou-Taleb, E.M., Al-Sarar, A.S., Abobakr, Y., 2020.** A mixture of *Azotobacter*, *Azospirillum*, and *Klebsiella* strains improves root-rot disease complex management and promotes growth in sunflowers in calcareous soil. *European Journal of Plant Pathology* 156, 713–726.
- El-Shatoury, S.A., Ameen, F., Moussa, H., Wahid, O.A., Dewedar, A., AlNadhari, S., 2020.** Biocontrol of chocolate spot disease (*Botrytis cinerea*) in faba bean using endophytic actinomycetes *Streptomyces*: a field study to compare application techniques. *PeerJ* 8, e8582.
- Ensign, J.C., 1978.** Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology* 32, 185–219.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M., 2007.** Evidences of biological control capacities of *Streptomyces spp.* against *Sclerotium rolfisii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1503–1509.
- Eshraghi, S.S., 2012.** Molecular typing of *Nocardia* species. *Journal of Medical Bacteriology* 1, 38–45.
- Etesami, H., Beattie, G.A., 2017.** Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions, in: *Probiotics and Plant Health*. Springer, pp. 163–200.
- Etesami, H., Glick, B.R., 2020.** Halotolerant plant growth-promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany* 104124.
- Etesami, H., Maheshwari, D.K., 2018.** Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety* 156, 225–246.
- Euzéby, J.P., 1997.** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 590–592.
- Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., 2017.** Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in plant science* 8, 1147.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F.A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., 2015.** Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4907–4921.

- FAO (2015) Global soil partnership- world soil charter. <http://www.fao.org/3/a-mn442 e.pdf> - Recherche Google,” n.d.).
- Faried, A.-S.M., Mohamed, H.M., El-Dsouky, M.M., El-Rewainy, H.M., 2019. Isolation and characterization of phosphate solubilizing actinomycetes from rhizosphere soil (PhD Thesis). Ph. D. Thesis, Fac of Agric, Assiut University, Assiut, Egypt.
- Fatima, T., Arora, N.K., 2019. Plant growth-promoting rhizospheric microbes for remediation of saline soils, in: Phyto and Rhizo Remediation. Springer, pp. 121–146.
- FATMAWATI, U., MERYANDINI, A., NAWANGSIH, A.A., Wahyudi, A.T., 2019. Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 20.
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N.E., Dinneny, J.R., 2016. Growing out of stress: the role of cell-and organ-scale growth control in plant water-stress responses. The Plant Cell 28, 1769–1782.
- Flowers, T.H., Williams, S.T., 1977. Measurement of growth rates of streptomycetes: comparison of turbidimetric and gravimetric techniques. Microbiology 98, 285–289.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M.X., Barea, J.-M., 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 45, 209–217.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., Bahl, H., 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Archives of microbiology 176, 421–426.
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., Usami, R., 2005. Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula sp.* strain S-1. Extremophiles 9, 85–89.
- Galinski, E.A., 1995. Osmoadaptation in bacteria. Advances in microbial physiology 37, 273–328.
- Galinski, E.A., 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. Experientia 49, 487–496.
- Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., Rodriguez, F., 2019. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). Microbiological research 220, 12–20.
- Gandhimathi, R., Kiran, G.S., Hema, T.A., Selvin, J., Raviji, T.R., Shanmughapriya, S., 2009. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-

- associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess and biosystems engineering* 32, 825–835.
- Gangwar, M., Dogra, S., Gupta, U.P., Kharwar, R.N., 2014.** Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. *Afr J Microbiol Res* 8, 184–191.
- Gao, B., Gupta, R.S., 2012.** Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 76, 66–112.
- Garbeva, P., Van Elsas, J.D., Van Veen, J.A., 2008.** Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and soil* 302, 19–32.
- Garbeva, P. van, Van Veen, J.A., Van Elsas, J.D., 2004.** Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 243–270.
- Garg, N., Singla, R., 2004.** Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16, 137–146.
- Gasmi, M., 2017.** Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité chitino lytique à partir du sol de la région de Laghouat. Optimisation de la production de chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 par la méthode des surfaces de réponse.
- Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., Boubakri, H., 2019.** Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. *Annals of Microbiology* 69, 395–405.
- Geissbuhler, H., Brenneisen, P., Fischer, H.-P., 1982.** Frontiers in crop production: chemical research objectives. *Science* 217, 505–510.
- Genilloud, O., 2017.** Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural product reports* 34, 1203–1232.
- Getha, K., Vikineswary, S., 2002.** Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 303–310.
- Geurts, R., Bisseling, T., 2002.** Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell* 14, S239–S249.
- Girard, G., Willemsse, J., Zhu, H., Claessen, D., Bukarasam, K., Goodfellow, M., van Wezel, G.P., 2014.** Analysis of novel kitasatosporae reveals significant evolutionary

- changes in conserved developmental genes between *Kitasatospora* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 365–380.
- Glick, B.R., 2014.** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research* 169, 30–39.
- Glick, B.R., 2012.** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012.
- Glick, B.R., 2010.** Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances* 28, 367–374.
- Glick, B.R., 2005.** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters* 251, 1–7.
- Glick, B.R., 2004.** Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in applied microbiology* 56, 291–312.
- Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology* 41, 109–117.
- Glick, B.R., Bashan, Y., 1997.** Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology advances* 15, 353–378.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J., 1998.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology* 190, 63–68.
- Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R., 2000.** Comparative 16S rRNA analysis of Lake Bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and environmental microbiology* 66, 5053–5065.
- Goldstein, A.H., 1994.** Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC 197–203.
- Gond, S.K., Bergen, M.S., Torres, M.S., White, J.F., Kharwar, R.N., 2015.** Effect of bacterial endophyte on expression of defense genes in Indian popcorn against *Fusariummoniliforme*. *Symbiosis* 66, 133–140.
- Goode, M.J., Sasser, M., 1980.** Prevention-the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 64, 831–834.
- Goodfellow, M., 1989.** Search and discovery of industrially significant actinomycetes. *Microbial products: new approaches*.

- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1985.** Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press.
- Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., 1993.** Handbook of new bacterial systematics. Academic Press.
- Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Davenport, R., Chun, J., Curtis, T., 1998.** Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Water Science and Technology* 37, 511–519.
- Goodfellow, M., Williams, S.T., 1983.** Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology* 37, 189–216.
- Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951.** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology* 26, 192.
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016.** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2, 1127500.
- Goswami, M., Suresh, D., 2020.** Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere* 30, 40–61.
- Gottlieb, D., 1973.** General consideration and implications of the Actinomycetales., in: *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. pp. 1–10.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A., 2014.** Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research* 169, 59–65.
- 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 Science and Technology* 26, 1691–1705.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., Traas, J., 2004.** In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 74–87.
- Granier, C., Tardieu, F., 1999.** Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiology* 119, 609–620.
- Gray, E.J., Smith, D.L., 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry* 37, 395–412.

- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C., 1998.** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 369–378.
- Grobelak, A., Napora, A., Kacprzak, M., 2015.** Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering* 84, 22–28.
- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B., 2011.** Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1231–1240.
- Grover, M., Bodhankar, S., Maheswari, M., Srinivasarao, C., 2016.** Actinomycetes as mitigators of climate change and abiotic stress, in: *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Springer, pp. 203–212.
- Gu, L., Zhang, K., Zhang, N., Li, X., Liu, Z., 2020.** Control of the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* using culture filtrate extract from *Streptomyces deccanensis* QY-3. *Antonie van Leeuwenhoek* 113, 1573–1585.
- Gull, A., Lone, A.A., Wani, N.U.I., 2019.** Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants* 1–19.
- Guo, J., Chi, J., 2014.** Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in Cd-contaminated soil. *Plant and soil* 375, 205–214.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y., 2008.** A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 149–159.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V., 2015.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol* 7, 096–102.
- Gupta, N., Sahoo, D., 2010.** Evaluation of in vitro solubilization potential of phosphate solubilising *Streptomyces* isolated from phyllosphere of *Heritiera fomes* (mangrove). *African Journal of microbiology research* 4, 136–142.
- Halfeld-Vieira, B. de A., Vieira Júnior, J.R., Romeiro, R. da S., Silva, H.S.A., Baracat-Pereira, M.C., 2006.** Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 41, 1247–1252.
- Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Ventosa, A., 2013.** Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles* 17, 1–13.

- Hankin, L., Zucker, M., Sands, D.C., 1971.** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied Microbiology* 22, 205–209.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008.** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312, 7–14.
- Hassan, N., Hassan, M.A.E., Farrag, E.S., Hyakumachi, M., Sallam, M.A.A., n.d.** Isolation of Endophytic Actinomycetes from Leaves of Tomato Plants and Their Activities against Bacterial Speck Disease.
- Hastuti, R.D., Lestari, Y., Suwanto, A., SARASWATI, R., 2012.** Endophytic *Streptomyces* spp. as biocontrol agents of rice bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *HAYATI Journal of Biosciences* 19, 155–162.
- Hata, E.M., Sijam, K., Ahmad, Z.A.M., Yusof, M.T., Azman, N.A., 2015.** In vitro Antimicrobial Assay of Actinomycetes in Rice Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and as Potential Plant Growth Promoter. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58, 821–832.
- He, H., Hao, X., Zhou, W., Shi, N., Feng, J., Han, L., 2020.** Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol Actinomycete strain A217. *Journal of Applied Microbiology* 128, 1143–1152.
- Heidari, M., Golpayegani, A., 2012.** Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 11, 57–61.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., Horn, M., 2003.** Microbial diversity of marine sponges. *Sponges (Porifera)* 59–88.
- Hmaeid, N., Wali, M., Mahmoud, O.M.-B., Pueyo, J.J., Ghnaya, T., Abdelly, C., 2019.** Efficient rhizobacteria promote growth and alleviate NaCl-induced stress in the plant species *Sulla carnosa*. *Applied Soil Ecology* 133, 104–113.
- Hobson, G., Grierson, D., 1993.** Tomato, in: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Springer, pp. 405–442.
- Hopwood, D.A., 2007.** *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press.
- Howell, C.R., Beier, R.C., Stipanovic, R.D., 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium preemergence* damping-off by the bacterium. *Phytopathology* 78, 1075–1078.

- <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2173-4.pdf> Nature, 580, pages 367–371 (2020) - Recherche Google,” n.d.).
- <http://www.fao.org/docrep/010/a1075e/a1075e00.htm> - Recherche Google,” n.d.).
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., Shao, H., Long, X., 2013. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem artichoke plantlets. PloS one 8, e62085.
- Hussain, F., Usman, F., 2019. Fungal Biotic Stresses in Plants and Its Control Strategy, in: Abiotic and Biotic Stress in Plants. IntechOpen.
- Husson, E., Hadad, C., Huet, G., Laclef, S., Lesur, D., Lambertyn, V., Jamali, A., Gottis, S., Sarazin, C., Van Nhien, A.N., 2017. The effect of room temperature ionic liquids on the selective biocatalytic hydrolysis of chitin via sequential or simultaneous strategies. Green Chemistry 19, 4122–4131.
- Hutcheon, G.W., Vasisht, N., Bolhuis, A., 2005. Characterisation of a highly stable  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. Extremophiles 9, 487–495.
- Ibrahim, A.H., Desoukey, S.Y., Fouad, M.A., Kamel, M.S., Gulder, T.A., Abdelmohsen, U.R., 2018. Natural product potential of the genus *Nocardioopsis*. Marine drugs 16, 147.
- Ichikawa, N., Oguchi, A., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kitani, S., Watanabe, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Kishi, E., Sasagawa, M., 2010. Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216T: an evolutionary snapshot of the family Streptomycetaceae. DNA research 17, 393–406.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular plant-microbe interactions 20, 619–626.
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M.S., Riaz, M., Shahzad, S.M., Imran, Q., Ali, I., 2016. Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. Plant Physiology and Biochemistry 108, 456–467.
- Islam, R., Datta, B., 2015. Diversity of chitinases and their industrial potential. Int J Appl Res 1, 55–60.
- Javed, Z., Tripathi, G.D., Mishra, M., Dashora, K., 2020. Actinomycetes–The microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 101893.
- Jayasinghe, B.D., Parkinson, D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Applied soil ecology 38, 109–118.



- Jha, D., Kulshreshtha, S., Chauhan, S., 2020.** Plant microbial ecology as a potential option for stress management in plants, in: *Plant Microbe Symbiosis*. Springer, pp. 331–360.
- Jha, Y., Subramanian, R.B., Patel, S., 2011.** Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 797–802.
- Jiang, H., Wang, T., Chi, X., Wang, M., Chen, N., Chen, M., Pan, L., Qi, P., 2020.** Isolation and characterization of halotolerant phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing the peanut rhizosphere in salt-affected soil. *Geomicrobiology Journal* 37, 110–118.
- Jogawat, A., Bisht, D., Johri, A.K., 2019.** Root Endosymbiont-mediated Priming of Host Plants for Abiotic Stress Tolerance. *Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology* 283–300.
- Joseph, B., Ranjan Patra, R., Lawrence, R., 2012.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 1, 141–152.
- Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S., 1976.** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological reviews* 40, 469.
- Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S., 1973.** Endospores of actinomycetes: dormancy and germination, in: *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. pp. 179–195.
- Kalyani, B.S., Krishna, P.S., Sreenivasulu, K., 2019.** Screening and identification of novel isolate *Streptomyces* sp., NLKPB45 from Nellore coastal region for its biomedical applications. *Saudi journal of biological sciences* 26, 1655–1660.
- Kamekura, M., 1986.** Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiology Reviews* 2, 145–150.
- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Khan, A.L., Kim, M.-J., Park, J.-M., Kim, B.-R., Shin, D.-H., Lee, I.-J., 2014.** Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant physiology and biochemistry* 84, 115–124.
- Kasotia, A., Varma, A., Choudhary, D.K., 2015.** Pseudomonas-mediated mitigation of salt stress and growth promotion in *Glycine max*. *Agricultural Research* 4, 31–41.
- Kaur, T., Sharma, D., Kaur, A., Manhas, R.K., 2013.** Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46, 1756–1768.

- Kaurichev, I.S., Panov, N.P., Stratonovich, M.V., Grechin, I.P., Sávich, V.I., Ganzhara, N.F., Mershin, A.P., 1980.** Prácticas de edafología.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., 2010.** Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces sp.* TK-VL\_333. *Research in Microbiology* 161, 335–345.
- Kawicha, P., Laopha, A., Chamnansing, W., Sopawed, W., Wongcharone, A., Sangdee, A., 2020.** Biocontrol and plant growth-promoting properties of *Streptomyces* isolated from vermicompost soil. *Indian Phytopathology* 1–12.
- Kempf, B., Bremer, E., 1998.** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology* 170, 319–330.
- Kent, A.D., Triplett, E.W., 2002.** Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews in Microbiology* 56, 211–236.
- Khabbaz, S.E., Ladhalakshmi, D., Babu, M., Kandan, A., Ramamoorthy, V., Saravanakumar, D., Al-Mughrabi, T., Kandasamy, S., 2019.** Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)—A Versatile Tool for Plant Health Management. *Can. J. Pestic. Pest Manag.* 1, 1–25.
- Khabbaz, S.E., Zhang, L., Cáceres, L.A., Sumarah, M., Wang, A., Abbasi, P.A., 2015.** Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Annals of Applied Biology* 166, 456–471.
- Khair, A., 2011.** In vitro antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS28 against some phytopathogenic fungi. *African Journal of Agricultural Research* 6, 2835–2842.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M., 2009.** Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J agric biol sci* 1, 48–58.
- Khan, A.L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Hamayun, M., Lee, I.-J., 2015.** Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum*: An example of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA3. *Journal of Hazardous Materials* 295, 70–78.
- Khan, M.A., Boër, B., Öztürk, M., Clüsener-Godt, M., Gul, B., Breckle, S.-W., 2016.** *Sabkha Ecosystems: Volume V: The Americas*. Springer.

- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E., 2014.** Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, in: Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 31–62.
- Khiangte, L., Lalfakzuala, R., 2011.** In vitro production of growth regulator (IAA) and Phosphatase by phosphate solubilizing bacteria. *Sci. Technol. J* 5, 32–35.
- Kim, H.-R., Song, H.-G., 2016.** Antifungal activity of *Streptomyces costaricanus* HR391 against some plant-pathogenic fungi. *Korean Journal of Microbiology* 52, 437–443.
- Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B., 1997.** *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology letters* 153, 273–277.
- Kim, Y.-C., Glick, B.R., Bashan, Y., Ryu, C.-M., 2012.** Enhancement of plant drought tolerance by microbes, in: *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, pp. 383–413.
- Kim, Y.C., Jung, H., Kim, K.Y., Park, S.K., 2008.** An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European journal of plant pathology* 120, 373–382.
- Kim, Y.G., Kang, H.K., Kwon, K.-D., Seo, C.H., Lee, H.B., Park, Y., 2015.** Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 10380–10387.
- Kim, Y.J., Kim, J., Rho, J.-Y., 2019.** Antifungal Activities of *Streptomyces blastmyceticus* Strain 12-6 against Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology* 47, 329–334.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004.** Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods* 58, 169–188.
- Kitouni, M., 2007.** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d’antibiotiques à partir d’écosystèmes extrêmes.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., 2005.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the northeast of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale* 15, 45–51.
- Klähn, S., Hagemann, M., 2011.** Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental microbiology* 13, 551–562.

- Kloepper, J.W., 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, in: Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, 1978. pp. 879–882.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885–886.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S., 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- Kroppenstedt, R.M., 1985.** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. Society for Applied Bacteriology. Technical Series 173–199.
- Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Goodfellow, M., 1990.** Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Systematic and applied microbiology* 13, 148–160.
- Kuiper, I., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J., 2001.** Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 1197–1205.
- Kumar, A., Maurya, B.R., Raghuvanshi, R., 2014.** Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 121–128.
- Kumar, Ajay, Singh, R., Giri, D.D., Singh, P.K., Pandey, K.D., 2014.** Effect of *Azotobacter chroococcum* CL13 inoculation on growth and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 275–283.
- Kumar, A., Verma, H., Singh, V.K., Singh, P.P., Singh, S.K., Ansari, W.A., Yadav, A., Singh, P.K., Pandey, K.D., 2017.** Role of *Pseudomonas sp.* in sustainable agriculture and disease management, in: *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, pp. 195–215.
- Kumar, Ajay, Kumar, Amit, Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent research in science and technology* 4, 1–5.
- Kumar, B.D., Dube, H.C., 1992.** Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 539–542.

- Kurtböke, D.İ., French, J.R., Hayes, R.A., Quinn, R.J., 2014.** Eco-taxonomic insights into actinomycete symbionts of termites for discovery of novel bioactive compounds. *Biotechnological applications of biodiversity* 111–135.
- Kurtböke, D.I., 2017.** Ecology and habitat distribution of actinobacteria, in: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer, pp. 123–149.
- Kushner, D.J., 1988.** Physiology of halophilic eubacteria. *Halophilic bacteria* 109–138.
- Kushner, D.J., 1978.** *Microbial life in extreme environments*. Academic Press.
- Küster, E., Williams, S.T., 1964.** Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202, 928–929.
- Kyaw, E.P., Soe, M.M., San San Yu, Z.K.L., Lynn, T.M., 2019.** Study on plant growth promoting activities of *Azotobacter* isolates for sustainable agriculture in Myanmar. *J. Biotech. Biores* 1, 1–6.
- Labeda, D.P., 1987.** 12. Actinomycete taxonomy: generic characterization.
- Ladutska, E.I., 2019.** ISOLATION OF ACTINOMYCETES WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST GRAM-NEGATIVE PHYTOPATHOGENIC BACTERIA. *Journal of Agriculture and Environment*.
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K., White Jr, J.F., 2018.** Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in applied microbiology* 66, 268–276.
- Läuchli, A., Grattan, S.R., 2007.** Plant growth and development under salinity stress, in: *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, pp. 1–32.
- Leaungvutiviroj, C., Ruangphisarn, P., Hansanimitkul, P., Shinkawa, H., Sasaki, K., 2010.** Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub> fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 1098–1101.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P., 1967.** Biology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology* 21, 71–100.
- Lee, Y.-K., Lee, J.-H., Lee, H.-K., 2001.** Microbial symbiosis in marine sponges. *Journal of Microbiology* 39, 254–264.
- Lentzen, G., Schwarz, T., 2006.** Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 623–634.

- Li, H.Q., Jiang, X.W., 2017.** Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology* 64, 235–241.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016.** Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. Rijeka, Croatia: InTech 59–86.
- Li, Q., Jiang, Y., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Jiang, D., Hsiang, T., 2011.** Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control* 58, 139–148.
- Li, Y., He, F., Lai, H., Xue, Q., 2017.** Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology* 149, 299–311.
- Li, Yongbin, Li, Q., Guan, G., Chen, S., 2020.** Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *PeerJ* 8, e9062.
- Li, Y., Tao, H., Zhang, B., Huang, S., Wang, P., 2018.** Timing of water deficit limits maize kernel setting in association with changes in the source-flow-sink relationship. *Frontiers in plant science* 9, 1326.
- Li, Y.-Q., Li, M.-G., Li, W., Zhao, J.-Y., Ding, Z.-G., Cui, X.-L., Wen, M.-L., 2007.** Griseusin D, a new pyranonaphthoquinone derivative from a alkaphilic *Nocardopsis* sp. *The Journal of antibiotics* 60, 757–761.
- Li, Yulong, Guo, Q., He, F., Li, Yunzhou, Xue, Q., Lai, H., 2020.** Biocontrol of Root Diseases and Growth Promotion of the Tuberos Plant *Aconitum carmichaelii* Induced by Actinomycetes Are Related to Shifts in the Rhizosphere Microbiota. *Microbial ecology* 79, 134–147.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013.** Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling* 19, 998–1011.
- Lin, Q.S., Chen, S.H., Hu, M.Y., Haq, M.U., Yang, L., Li, H., 2011.** Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge. *International Journal of Environmental Science & Technology* 8, 45–56.
- Lipton, D.S., Blanchar, R.W., Blevins, D.G., 1987.** Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* 85, 315–317.

- Liu, W., Li, R.-J., Han, T.-T., Cai, W., Fu, Z.-W., Lu, Y.-T., 2015.** Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 168, 343–356.
- Lloyd, A.B., 1969.** Dispersal of streptomycetes in air. *Microbiology* 57, 35–40.
- Lobell, D.B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J., 2011.** Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333, 616–620.
- Long, Y., Jiang, J., Hu, X., Zhou, J., Hu, J., Zhou, S., 2019.** Actinobacterial community in Shuanghe Cave using culture-dependent and-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35, 1–12.
- Loucif L, Bendjama E, Gacemi-Kirane D, Rolain J-M (2014)** Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS. *Microbiol Res* 169(12):940–947 -
- Lowlor, D.W., Cornic, G., 2002.** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275–294.
- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R., 2011.** UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal* 5, 169–172.
- Lu, D., Ma, Z., Xu, X., Yu, X., 2016.** Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Journal of basic microbiology* 56, 929–933.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B., 2012.** Road map of the phylum Actinobacteria, in: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 1–28.
- Ludwig, W., Klenk, H.-P., 2005.** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. *Bergey's manual® of systematic bacteriology* 49–66.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 63, 541–556.
- Lugtenberg, B.J., Malfanova, N., Kamilova, F., Berg, G., 2013.** Plant growth promotion by microbes. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* 2, 561–573.
- Lynch, J.M., Brimecombe, M.J., De Leij, F.A., 2001.** Rhizosphere. e LS.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sa, T., 2007.** Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69, 220–228.

- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005.** Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 444, 139–158.
- Maheshwari, D.K., Dheeman, S., Agarwal, M., 2015.** Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture, in: *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. Springer, pp. 159–182.
- Maheshwari, D.K., Saraf, M., Aeron, A., 2011.** *Bacteria in agrobiologie*. Springer.
- Mahmoud, K., 2015.** Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces sp.* grown on orange waste powder. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4, 685–693.
- Mahmoud, O.M.B., Hidri, R., Talbi-Zribi, O., Taamalli, W., Abdelly, C., Djébal, N., 2020.** Auxin and proline producing rhizobacteria mitigate salt-induced growth inhibition of barley plants by enhancing water and nutrient status. *South African Journal of Botany* 128, 209–217.
- Maiden, M.C., 2006.** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561–588.
- Maleki, M., Naghavi, M.R., Alizadeh, H., Poostini, K., Abd Mishani, C., 2014.** Comparison of protein changes in the leaves of two bread wheat cultivars with different sensitivity under salt stress. *Annual Research & Review in Biology* 1784–1797.
- Manasa, M., Yashoda, K., Pallavi, S., Vivek, M.N., Onkarappa, R., Kekuda, T.R.P., 2013.** Biocontrol potential of *Streptomyces* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. zingiberi (causal agent of rhizome rot of ginger). *J Adv Sci Res* 4, 1–3.
- Manhas, R.K., Kaur, T., 2016.** Biocontrol potential of *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 toward *Alternaria brassicicola* to control damping off and black leaf spot of *Raphanus sativus*. *Frontiers in plant science* 7, 1869.
- 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.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001.** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73–83.
- Marimuthu, S., Karthic, C., Mostafa, A.A., Al-Enazi, N.M., Abdel-Raouf, N., Sholkamy, E.N., 2020.** Antifungal activity of *Streptomyces sp.* SLR03 against tea fungal plant pathogen *Pestalotiopsis theae*. *Journal of King Saud University-Science* 32, 3258–3264.



- Marshall, J.G., Dumbroff, E.B., 1999.** Turgor regulation via cell wall adjustment in white spruce. *Plant physiology* 119, 313–320.
- Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R., 2010.** Cohen. *Planta* 232, 533–543.
- Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J.M., Azcón, R., 2007.** Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial ecology* 54, 543.
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L., 1972.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 79–91.
- McLellan, C.A., Turbyville, T.J., Wijeratne, E.K., Kerschen, A., Vierling, E., Queitsch, C., Whitesell, L., Gunatilaka, A.L., 2007.** A rhizosphere fungus enhances *Arabidopsis* thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. *Plant Physiology* 145, 174–182.
- Meena, K.K., Sorty, A.M., Bitla, U.M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Singh, D.P., Prabha, R., Sahu, P.K., Gupta, V.K., 2017.** Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Frontiers in plant science* 8, 172.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Tripathi, Y.N., Zehra, A., Marwal, A., Upadhyay, R.S., 2020.** PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology* 60, 828–861.
- Mendes, L.W., Kuramae, E.E., Navarrete, A.A., Van Veen, J.A., Tsai, S.M., 2014.** Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME journal* 8, 1577–1587.
- Meyer, J., 1976.** *Nocardiopsis*, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26, 487–493.
- Mia, M.B., Shamsuddin, Z.H., Mahmood, M., 2010.** Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *Int J Agric Biol* 12, 459–467.
- Micheli, M.R., Bova, R., Pascale, E., D'Ambrosio, E., 1994.** Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research* 22, 1921.

- Millán-Aguiñaga, N., Soldatou, S., Brozio, S., Munnoch, J.T., Howe, J., Hoskisson, P.A., Duncan, K.R., 2019.** Awakening ancient polar Actinobacteria: diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiology* 165, 1169–1180.
- Miller, D.J., Fort, P.E., 2018.** Heat shock proteins regulatory role in neurodevelopment. *Frontiers in neuroscience* 12, 821.
- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A., 2001.** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil* 237, 47–54.
- Misra, S., Chauhan, P.S., 2020.** ACC deaminase-producing rhizosphere competent *Bacillus* spp. mitigate salt stress and promote *Zea mays* growth by modulating ethylene metabolism. *3 Biotech* 10, 1–14.
- Mohamed, H.I., Gomaa, E.Z., 2012.** Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica* 50, 263–272.
- Mohamed, I., Eid, K.E., Abbas, M.H., Salem, A.A., Ahmed, N., Ali, M., Shah, G.M., Fang, C., 2019.** Use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171, 539–548.
- Mohammadipanah, F., Dehghani, M., 2017.** Classification and taxonomy of Actinobacteria, in: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer, pp. 51–77.
- Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2008.** Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular plant-microbe interactions* 21, 1001–1009.
- Mota, M.S., Gomes, C.B., Souza Júnior, I.T., Moura, A.B., 2017.** Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian journal of microbiology* 48, 62–70.
- Munns, R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* 25, 239–250.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473–497.
- Mushtaq, S., Shafiq, M., Ashraf, T., Haider, M.S., Ashfaq, M., Ali, M., 2019.** Characterization of plant growth promoting activities of bacterial endophytes and their antibacterial potential isolated from citrus. *J. Anim. Plant Sci* 29, 978–991.

- Nabati, J., Kafi, M., Nezami, A., Moghaddam, P.R., Masoumi, A., Mehrjerdi, M.Z., 2011.** Effect of salinity on biomass production and activities of some key enzymatic antioxidants in kochia (*Kochia scoparia*). *Pakistan Journal of Botany* 43, 539–548.
- Nachit, M.M., Elouafi, I., 2004.** Durum wheat adaptation in the Mediterranean dryland: Breeding, stress physiology, and molecular markers. *Challenges and strategies of dryland agriculture* 32, 203–218.
- Nagargade, M., Tyagi, V., Singh, M.K., 2018.** Plant growth-promoting rhizobacteria: a biological approach toward the production of sustainable agriculture, in: *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer, pp. 205–223.
- Nandi, M., Selin, C., Brawerman, G., Fernando, W.D., de Kievit, T., 2017.** Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control* 108, 47–54.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2017.** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 68, 12–26.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., 2000.** Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere* 41, 653–658.
- Nath, S., Matozzo, V., Bhandari, D., Faggio, C., 2019.** Growth and liver histology of *Channa punctatus* exposed to a common biofertilizer. *Natural product research* 33, 1591–1598.
- Nautiyal, C.S., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters* 170, 265–270.
- Naveed, M., Hussain, M.B., Zahir, Z.A., Mitter, B., Sessitsch, A., 2014.** Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation* 73, 121–131.
- Nesha, R., Siddiqui, Z.A., 2013.** Interactions of *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, and *Meloidogyne javanica* on the Disease Complex of Carrot. *International Journal of Vegetable Science* 19, 403–411.
- Nievola, C.C., Carvalho, C.P., Carvalho, V., Rodrigues, E., 2017.** Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature* 4, 371–405.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P., 2011.** Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 15, 327–337.

- Ningthoujam, S., Sanasam, S., Tamreihao, K., Nimaich, S., 2009.** Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. *African journal of microbiology research* 3, 737–742.
- Nitsch, B., Kutzner, H.J., 1969.** Egg-yolk agar as a diagnostic medium for streptomycetes. *Experientia* 25, 220–221.
- Nonomura, H., 1974.** Key for classification and identification of 458 species of the streptomycetes included in ISP. *J. Ferment. Technol.* 52, 78–92.
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J.P., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., Göker, M., 2018.** Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in microbiology* 9, 2007.
- Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O., 2019.** *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology* 103, 1179–1188.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017.** Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 197.
- Oleson, B.T., 1994.** World wheat production, utilization and trade, in: *Wheat*. Springer, pp. 1–11.
- OLOGUNDUDU, A.F., ADELUSI, A.A., AKINWALE, R.O., 2014.** Effect of Salt Stress on Germination and Growth Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.). *Notulae Scientia Biologicae* 6.
- Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982.** Phosphorus in AL Page,(Ed). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monographs* 9.
- Oren, A., 2014.** Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* 18, 825–834.
- Oren, A., 2008.** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4, 1–13.
- Oren, A., 2002.** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 56–63.
- Oren, A., 1999.** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews* 63, 334–348.
- Orhan, F., 2016.** Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian journal of microbiology* 47, 621–627.

- Oskay, A.M., Üsame, T., Cem, A., 2004.** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology* 3, 441–446.
- Otieno, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N., 2015.** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology* 6, 745.
- Ouerghi, Z., Rémy, R., Ouelhazi, L., Ayadi, A., Brulfert, J., 2000.** Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. *ELECTROPHORESIS: An International Journal* 21, 2487–2491.
- Øvre\aaas, L., Jensen, S., Daae, F.L., Torsvik, V., 1998.** Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2739–2742.
- Ozdeniz, E., 2019.** The Role of Free Proline and Soluble Carbohydrates in Water Gypsum Stress on Some Gypsophyte and Gypsovag Plants. *Planta Daninha* 37.
- Pace, L., Pellegrini, M., Palmieri, S., Rocchi, R., Lippa, L., Del Gallo, M., 2020.** Plant growth-promoting rhizobacteria for in vitro and ex vitro performance enhancement of Apennines' Genepì (*Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*), an endangered phytotherapeutic plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 56, 134–142.
- Pace, N.R., 1997.** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.
- Pagnani, G., Galieni, A., Stagnari, F., Pellegrini, M., Del Gallo, M., Pisante, M., 2020.** Open field inoculation with PGPR as a strategy to manage fertilization of ancient *Triticum* genotypes. *Biology and Fertility of Soils* 56, 111–124.
- Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergi, M., Sterzo, C.L., Pisante, M., 2018.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial crops and products* 123, 75–83.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M.V., Senthil-Kumar, M., 2017.** Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in plant science* 8, 537.
- Pandey, V., Ansari, M.W., Tula, S., Yadav, S., Sahoo, R.K., Shukla, N., Bains, G., Badal, S., Chandra, S., Gaur, A.K., 2016.** Dose-dependent response of

- Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. *Planta* 243, 1251–1264.
- Panneerselvam, P., Selvakumar, G., Ganeshamurthy, A.N., Mitra, D., Senapati, A., 2020.** Enhancing pomegranate (*Punica granatum* L.) plant health through the intervention of a *Streptomyces* consortium. *Biocontrol Science and Technology* 1–13.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015.** Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4056–4075.
- Parveen, K., Bora, L.C., Borah, P.K., 2017.** Management of lettuce rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in hydroponically grown crop using microbial consortia. *Indian Phytopathology* 70, 232–237.
- Pascoal, A., Estevinho, L.M., Martins, I.M., Choupina, A.B., 2018.** Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. *Physiological and molecular plant pathology* 104, 119–126.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Gupta, V.K., Yadav, M.K., Saikia, R., Singh, B.P., 2015.** In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS one* 10, e0139468.
- Pathom-Aree, W., Stach, J.E., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2006.** Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10, 181–189.
- Patil, H.J., Srivastava, A.K., Kumar, S., Chaudhari, B.L., Arora, D.K., 2010.** Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 2163–2170.
- Patil, H.J., Srivastava, A.K., Singh, D.P., Chaudhari, B.L., Arora, D.K., 2011.** Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop protection* 30, 1269–1273.
- Patkowska, E., 2020.** Soil-borne microorganisms threatening carrot cultivated with the use of cover crops. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 19, 71–86.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology* 68, 3795–3801.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology* 42, 207–220.
- (PDF) Plant Growth Promotion by Microbes | Ben Lugtenberg - Academia.edu,**” n.d.).

- Pellegrini, M., Ercole, C., Di Zio, C., Matteucci, F., Pace, L., Del Gallo, M., 2020a.** In vitro and in planta antagonistic effects of plant growth-promoting rhizobacteria consortium against soilborne plant pathogens of *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*. FEMS microbiology letters 367, fnaa099.
- Pellegrini, M., Pagnani, G., Bernardi, M., Mattedi, A., Spera, D.M., Gallo, M.D., 2020b.** Cell-Free Supernatants of Plant Growth-Promoting Bacteria: A Review of Their Use as Biostimulant and Microbial Biocontrol Agents in Sustainable Agriculture. Sustainability 12, 9917.
- Pepper, I.L., 2019.** Biotic characteristics of the environment, in: Environmental and Pollution Science. Elsevier, pp. 61–87.
- Pereira, N.C.M., Galindo, F.S., Gazola, R.P.D., Dupas, E., Rosa, P.A.L., Mortinho, E.S., 2020.** Corn Yield and Phosphorus Use Efficiency Response to Phosphorus Rates Associated With Plant Growth Promoting Bacteria. Frontiers in Environmental Science 8, 40.
- Perrot-Rechenmann, C., 2010.** Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2, a001446.
- Petrović, G., Jovičić, D., Nikolić, Z., Tamindžić, G., Ignjatov, M., Milošević, D., Milošević, B., 2016.** Comparative study of drought and salt stress effects on germination and seedling growth of pea. Genetika 48, 373–381.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., Voesenek, L.A., 2006.** The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends in plant science 11, 176–183.
- Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., Van Loon, L.C., 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. The Plant Cell 10, 1571–1580.
- Pikovskaya, R.I., 1948.** Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17, 362–370.
- Pineda, A., Dicke, M., Pieterse, C.M., Pozo, M.J., 2013.** Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? Functional Ecology 27, 574–586.
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., Gunde-Cimerman, N., 2014.** Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. Frontiers in microbiology 5, 199.
- Pochon, J., Tardieux, P., 1962.** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle.

- Polti, M.A., Aparicio, J.D., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J., 2014.** Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 88, 48–55.
- Ponmurugan, P., Gopi, C., 2006.** In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of biotechnology* 5, 348–350.
- Porcel, R., Zamarreño, Á.M., García-Mina, J.M., Aroca, R., 2014.** Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC plant biology* 14, 1–12.
- Pospíšil, P., 2016.** Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in plant science* 7, 1950.
- Poulsen, M., Cafaro, M., Boomsma, J.J., Currie, C.R., 2005.** Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Molecular Ecology* 14, 3597–3604.
- Pozo, M.J., Van Der Ent, S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M., 2008.** Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 180, 511–523.
- Pranay, K., Padmadeo, S.R., Jha, V., Prasad, B., 2019.** Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. *J Appl Biol Biotechnol* 7, 57–62.
- Prasad, P., Bedi, S., Singh, T., 2012.** In vitro cellulose rich organic material degradation by cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Malaysian Journal of Microbiology* 8, 164–169.
- Primo, E.D., Ruiz, F., Masciarelli, O., Giordano, W., 2015.** Biofilm formation and biosurfactant activity in plant-associated bacteria, in: *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. Springer, pp. 337–349.
- Procópio, R.E. de L., Silva, I.R. da, Martins, M.K., Azevedo, J.L. de, Araújo, J.M. de, 2012.** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 466–471.
- Prudence, S.M., Addington, E., Castaño-Espriu, L., Mark, D.R., Pintor-Escobar, L., Russell, A.H., McLean, T.C., 2020.** Advances in actinomycete research: an ActinoBase review of 2019. *Microbiology* 166, 683.
- Qin, Y., Druzhinina, I.S., Pan, X., Yuan, Z., 2016.** Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances* 34, 1245–1259.



- Quan, C.S., Wang, X., Fan, S.D., 2010.** Antifungal compounds of plant growth promoting rhizobacteria and its action mode, in: *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer, pp. 117–156.
- Que, F., Hou, X.-L., Wang, G.-L., Xu, Z.-S., Tan, G.-F., Li, T., Wang, Y.-H., Khadr, A., Xiong, A.-S., 2019.** Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family. *Horticulture research* 6, 1–15.
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., Hatti-Kaul, R., 2010.** Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 85, 1687–1696.
- RADWAN, T.E.-S.E.-D., MOHAMED, Z.K., REIS, V., 2002.** Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*.
- Radzki, W., Mañero, F.G., Algar, E., García, J.L., García-Villaraco, A., Solano, B.R., 2013.** Bacterial siderophores efficiently provide iron-to-iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 321–330.
- Rai, P.K., Singh, M., Anand, K., Saurabh, S., Kaur, T., Kour, D., Yadav, A.N., Kumar, M., 2020.** Role and potential applications of plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 49–60.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 1996.** The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 1088–1092.
- Rajkumar, M., Freitas, H., 2008.** Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology* 99, 3491–3498.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection* 20, 1–11.
- Ramasamy, D., Mishra, A.K., Lagier, J.-C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2014.** A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64, 384–391.
- 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 microbiology ecology 55, 369–381.
- Rashad, Y.M., Al-Askar, A.A., Ghoneem, K.M., Saber, W.I., Hafez, E.E., 2017.** Chitinolytic *Streptomyces griseorubens* E44G enhances the biocontrol efficacy against Fusarium wilt disease of tomato. Phytoparasitica 45, 227–237.
- Raval, K.M., Vaswani, P.S., Majumder, D.R., 2012.** Biotransformation of a single amino acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. Int J Sci Res 2, 2250–3153.
- Raval, V.H., Saraf, M., 2020.** Biosynthesis and purification of indole-3-acetic acid by halotolerant rhizobacteria isolated from Little Runn of Kachchh. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 23, 101435.
- Redenbach, M., Scheel, J., Schmidt, U., 2000.** Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. Antonie Van Leeuwenhoek 78, 227–235.
- Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., Ravimycin, T., 2014.** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. International Letters of Natural Sciences 8.
- Regni, L., Del Pino, A.M., Mousavi, S., Palmerini, C.A., Baldoni, L., Mariotti, R., Mairech, H., Gardi, T., D'Amato, R., Proietti, P., 2019.** Behavior of four olive cultivars during salt stress. Frontiers in plant science 10, 867.
- Rejeb, I.B., Pastor, V., Mauch-Mani, B., 2014.** Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. Plants 3, 458–475.
- Reponen, T.A., Gazonko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C., 1998.** Characteristics of airborne actinomycete spores. Applied and environmental microbiology 64, 3807–3812.
- Richardson, A.E., 1994.** Soil microorganisms and phosphorus availability.
- Roberti, R., Bergonzoni, F., Finestrelli, A., Leonardi, P., 2015.** Biocontrol of *Rhizoctonia solani* disease and biostimulant effect by microbial products on bean plants. Italian Journal of Mycology 44, 49–61.
- Roberts, M.A., Crawford, D.L., 2000.** Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. Applied and environmental microbiology 66, 2555–2564.
- Roberts, M.F., 2005.** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline systems 1, 1–30.

- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006.** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil* 287, 15–21.
- Rodríguez-Valera, F., 1988.** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. *Halophilic bacteria* 1, 3–30.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17, 319–339.
- Roessler, M., Müller, V., 2001.** Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental microbiology* 3, 743–754.
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R., 2012.** Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 61, 264–272.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2006.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions* 19, 827–837.
- Rothrock, C.S., Gottlieb, D., 1981.** Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* 34, 830–835.
- Rubatzky, V.E., Quiros, C.F., Simon, P.W., 1999.** Carrots and related vegetable Umbelliferae. CABI publishing.
- Ruiz-Lozano, J.M., Porcel, R., Azcón, C., Aroca, R., 2012.** Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental Botany* 63, 4033–4044.
- Sabella, E., Aprile, A., Negro, C., Nicolì, F., Nutricati, E., Vergine, M., Luvisi, A., De Bellis, L., 2020.** Impact of climate change on durum wheat yield. *Agronomy* 10, 793.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, M.G., Dalvand, Y., Askari, H., 2012.** Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1503–1509.
- Saengnak, V., Chaisiri, C., Nalumpang, S., 2013.** Antagonistic *Streptomyces* species can protect chili plants against wilt disease caused by *Fusarium*. *J Agric Technol* 9, 1895–1908.
- Saharan, B.S., Nehra, V., 2011a.** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* 21, 30.

- Saibi, W., Feki, K., Yacoubi, I., Brini, F., 2015.** Bridging between proline structure, functions, metabolism, and involvement in organism physiology. *Applied biochemistry and biotechnology* 176, 2107–2119.
- Saikia, K., Bora, L.C., 2020.** Exploring actinomycetes and endophytes of rice ecosystem for induction of disease resistance against bacterial blight of rice. *European Journal of Plant Pathology* 1–13.
- Sakakibara, H., 2006.** Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431–449.
- Salam, N., Jiao, J.-Y., Zhang, X.-T., Li, W.-J., 2020.** Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 70, 1331–1355.
- Santra, S.C., Mallick, A., Samal, A.C., 2015.** Biofertilizer for bioremediation. Recent trends in biofertilizers, IK International Publishing House Pvt. Ltd 205–234.
- Saravanakumar, D., Samiyappan, R., 2007.** ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1283–1292.
- Saubidet, M.I., Fatta, N., Barneix, A.J., 2002.** The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and soil* 245, 215–222.
- Savci, S., 2012.** An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development* 3, 73.
- Savi, D.C., Aluizio, R., Galli-Terasawa, L., Kava, V., Glienke, C., 2016.** 16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. *Antonie van Leeuwenhoek* 109, 801–815.
- Sayed, R.Z., Chincholkar, S.B., Reddy, M.S., Gangurde, N.S., Patel, P.R., 2013.** Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression, in: *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer, pp. 449–471.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Bothast, R.J., 1997.** Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathology* 87, 177–183.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A., Kondorosi, E., 1998.** The Rhizobiaceae. Spalink, HP, Kondorosi, A. y Hooykaas, PJJ Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.

- Schuppler, U., n.d. He. PH, John. PC, Munns. R.(1998).** Effect of water stress on cell division and Cdc2-Like cell cycle Kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* 117, 667–678.
- Sebihi, F.Z., Benguedouar, A., Benhizia, Y., Sanchez, J., Gallego, E., 2016.** Evaluation of multi-trait plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* isolated from Constantine Wheat rhizosphere soil (Algeria) and screening there antifungal activity against two species of *Fusarium*. *Advances in Environmental Biology* 10, 102–116.
- Sharma, A., Johri, B.N., 2003.** Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological research* 158, 243–248.
- Sharma, K., Sharma, S., Sharma, P., Prasad, S.R., 2019.** Role of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Rhizobacteria and its Effect on Plant Growth of Mustard Crop under Salt Stress Condition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 8, 2439–2445.
- Sharma, M., Dangi, P., Choudhary, M., 2014.** Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 801–832.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013.** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 587.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., Zhang, X., 2013.** Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC genomics* 14, 271.
- Shilev, S., 2013.** Soil rhizobacteria regulating the uptake of nutrients and undesirable elements by plants, in: *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, pp. 147–167.
- Shivakrishna, P., Reddy, K.A., Rao, D.M., 2018.** Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi journal of biological sciences* 25, 285–289.
- Shivannavar, C.T., Katoch, V.M., Sharma, V.D., Patil, M.A., Katoch, K., Bharadwaj, V.P., Sharma, R.K., Bhatia, A.S., Agrawal, B.M., 1996.** Determination of mycobacterial phylogeny on the basis of immunological relatedness of superoxide dismutases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 1164–1169.

- Shrivastava, P., Kumar, R., Yandigeri, M.S., 2017.** In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Saudi journal of biological sciences 24, 192–199.
- Shukla, P.S., Agarwal, P.K., Jha, B., 2012.** Improved salinity tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. Journal of plant growth regulation 31, 195–206.
- SILINI, A., 2014.** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité d'*Azotobacter* et sur la croissance du ble dur en milieu salin (PhD Thesis).
- Silini, A., Cherif-Silini, H., Yahiaoui, B., 2016.** Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. African Journal of Microbiology Research 10, 387–399.
- Silva, E.C. da, Silva, M.F., Nogueira, R.J., Albuquerque, M.B., 2010.** Growth evaluation and water relations of *Erythrina velutina* seedlings in response to drought stress. Brazilian Journal of Plant Physiology 22, 225–233.
- Silveira, J.A.G., de Almeida Viégas, R., da Rocha, I.M.A., Moreira, A.C. de O.M., de Azevedo Moreira, R., Oliveira, J.T.A., 2003.** Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. Journal of Plant Physiology 160, 115–123.
- Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Briard, M., Nothnagel, T., Michalik, B., Kwon, Y.-S., 2008.** Carrot, in: Vegetables II. Springer, pp. 327–357.
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K.D., Singh, P.K., Kumar, A., 2019.** Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens, in: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Elsevier, pp. 41–66.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R., 1999.** Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 89, 92–99.
- Singh, R.P., Jha, P.N., 2016.** The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS one 11, e0155026.
- Singh, S., Ladha, J.K., Gupta, R.K., Bhushan, L., Rao, A.N., Sivaprasad, B., Singh, P.P., 2007.** Evaluation of mulching, intercropping with Sesbania and herbicide use for weed management in dry-seeded rice (*Oryza sativa* L.). Crop Protection 26, 518–524.
- Singh, S.P., Gaur, R., 2016.** Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. Journal of Applied Microbiology 121, 506–518.

- Singh, S.P., Gupta, R., Gaur, R., Srivastava, A.K., 2017.** Antagonistic actinomycetes mediated resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. against *Rhizoctonia solani* Kühn. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 87, 789–798.
- Skidmore, A.M., Dickinson, C.H., 1976.** Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society 66, 57–64.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G., 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Applied and environmental microbiology 67, 4742–4751.
- Smati, M., Kitouni, M., 2019.** Diversity of actinobacteria in the marshes of Ezzemoul and Djendli in northeastern Algeria. European Journal of Ecology 5, 41–53.
- Smith, S.E., Facelli, E., Pope, S., Smith, F.A., 2010.** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. Plant and Soil 326, 3–20.
- Soleimani, R., Alikhani, H.A., Towfighi, H., Khavazi, K., Pourbabaee, A.A., 2017.** Isolated bacteria from saline–sodic soils alter the response of wheat under high-adsorbed sodium and salt stress. International Journal of Environmental Science and Technology 14, 143–150.
- Soltanzadeh, M., Soltani Nejad, M., Shahidi Bonjar, G.H., 2016.** Application of Soil-borne Actinomycetes for Biological Control against Fusarium Wilt of Chickpea (*Cicerarietinum*) caused by *Fusarium solani* fsp *pisi*. Journal of Phytopathology 164, 967–978.
- Song, L., Jiang, N., Wei, S., Lan, Z., Pan, L., 2020.** Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against *Colletotrichum dematium* of *sarcandra glabra*. Mycobiology 48, 37–43.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS microbiology reviews 31, 425–448. Sponsel, V.M., 2003. Gibberellins.
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., Varshney, R.K., 2016.** Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. Brazilian journal of microbiology 47, 85–95.

- Sriprang, R., Hayashi, M., Ono, H., Takagi, M., Hirata, K., Murooka, Y., 2003.** Enhanced accumulation of Cd<sup>2+</sup> by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. Applied and environmental microbiology 69, 1791–1796.
- Srivastava, N., Nandi, I., Ibeyama, A., Gupta, S., Sarethy, I.P., 2019.** Microbial diversity of a Himalayan forest and characterization of rare actinomycetes for antimicrobial compounds. 3 Biotech 9, 27.
- Srivastava, S., Verma, P.C., Chaudhry, V., Singh, Namrata, Abhilash, P.C., Kumar, K.V., Sharma, N., Singh, Nandita, 2013.** Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. Journal of hazardous materials 262, 1039–1047.
- Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bull, A.T., 2003.** New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. Environmental microbiology 5, 828–841.
- Stach, N., Kaszycki, P., Władyska, B., Dubin, G., 2018.** Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp., in: Pet-To-Man Travelling Staphylococci. Elsevier, pp. 135–145.
- Stackebrandt, E., 2006.** Taxonomic parameters revisited tarnished gold standards. Microbiol. Today 33, 152–155.
- Stackebrandt, E., GOEBEL, B.M., 1994.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International journal of systematic and evolutionary microbiology 44, 846–849.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M., 2013.** Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. Romanian Biotechnological Letters 18, 8132–8143.
- Stevens, H., Brinkhoff, T., Rink, B., Vollmers, J., Simon, M., 2007.** Diversity and abundance of Gram-positive bacteria in a tidal flat ecosystem. Environmental microbiology 9, 1810–1822.
- Su, F., Jacquard, C., Villaume, S., Michel, J., Rabenoelina, F., Clément, C., Barka, E.A., Dhondt-Cordelier, S., Vaillant-Gaveau, N., 2015.** *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in plant science 6, 810.



- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., Lopez, M.J., Capel, C., Moreno, J., 2007.** Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusariumoxysporum* f. sp. melonis. *Crop Protection* 26, 46–53.
- Subramanian, P., Mageswari, A., Kim, K., Lee, Y., Sa, T., 2015.** Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp. strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by activation of their antioxidant capacity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28, 1073–1081.
- Suihko, M.-L., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 2006.** Occurrence and characterization of actinobacteria and thermoactinomycetes isolated from pulp and board samples containing recycled fibres. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 183–191.
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B.M., Mirza, M.S., 2018.** Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one* 13, e0204408.
- Sultana, S., Paul, S.C., Parveen, S., Alam, S., Rahman, N., Jannat, B., Hoque, S., Rahman, M.T., Karim, M.M., 2020.** Isolation and identification of salt-tolerant plant-growth-promoting rhizobacteria and their application for rice cultivation under salt stress. *Canadian journal of microbiology* 66, 144–160.
- Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R., Lou, B., 2010.** *Piriformosporaindica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of plant physiology* 167, 1009–1017.
- Sun, H.H., White, C.B., Dedinas, J., Cooper, R., Sedlock, D.M., 1991.** Methylpendolmycin, an indolactam from a *Nocardioopsis* sp. *Journal of natural products* 54, 1440–1443.
- Sunita, K., Mishra, I., Mishra, J., Prakash, J., Arora, N.K., 2020.** Secondary Metabolites from Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Ameliorating Salinity Stress in Plants. *Frontiers in Microbiology* 11, 2619.
- Suzuki, M., Takahashi, M., Tsukamoto, T., Watanabe, S., Matsushashi, S., Yazaki, J., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Nakanishi, H., Mori, S., 2006.** Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *The Plant Journal* 48, 85–97.
- Sykes, G., Skinner, F.A., 1973.** Actinomycetales; characteristics and practical importance. The Society for Applied Bacteriology Symposium. Series No. 2., in: Actinomycetales;

- Characteristics and Practical Importance. The Society for Applied Bacteriology Symposium. Series No. 2.
- Sziderics, A.H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E., 2007.** Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Canadian journal of microbiology 53, 1195–1202.
- Tahir, H.A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M.V., Gao, X., 2017.** Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. Frontiers in Microbiology 8, 171.
- Tamreihao, K., Nimaichand, S., Chanu, S.B., Devi, K.A., Lynda, R., Jeeniita, N., Ningthoujam, D.S., Roy, S.S., 2019.** *Streptomyces manipurensis* MBRL 201T as potential candidate for biocontrol and plant growth promoting agent for rice.
- Tanaka, Y., Omura, S., 1993.** Agroactive compounds of microbial origin. Annual Review of Microbiology 47, 57–87.
- Teh, C.H., Nazni, W.A., Norazah, A., Lee, H.L., 2017.** Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. BMC microbiology 17, 36.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W., 1999.** Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature 401, 914–917.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A.-C., 2017.** Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. Frontiers in plant science 8, 49.
- Tindall, B.J., Kämpfer, P., Euzéby, J.P., Oren, A., 2006.** Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 2715–2720.
- Tiwari, J.K., Munshi, A.D., Kumar, R., Pandey, R.N., Arora, A., Bhat, J.S., Sureja, A.K., 2010.** Effect of salt stress on cucumber: Na<sup>+</sup>–K<sup>+</sup> ratio, osmolyte concentration, phenols and chlorophyll content. Acta physiologiae plantarum 32, 103–114.
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P.S., Nautiyal, C.S., 2016.** *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. Plant Physiology and Biochemistry 99, 108–117.
- Tlemsani, M., Fortas, Z., Dib, S., Bellahcen, M., 2020.** In vitro antagonism between actinomycete isolates and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*: The causative agent of chickpea vascular wilt. South Asian Journal of Experimental Biology 10, 255–267.

- Tolba, S.T., Ibrahim, M., Amer, E.A., Ahmed, D.A., 2019.** First insights into salt tolerance improvement of Stevia by plant growth-promoting *Streptomyces* species. Archives of microbiology 201, 1295–1306.
- Torsvik, Vigdis, Goksøyr, J., Daae, F.L., 1990.** High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and environmental microbiology 56, 782–787.
- Torsvik, V., Øvre\aaas, L., 2002.** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current opinion in microbiology 5, 240–245.
- Torsvik, V., Salte, K., Sørheim, R., Goksøyr, J., 1990.** Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. Applied and environmental microbiology 56, 776–781.
- Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., Zitouni, A., 2015.** Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. Journal of basic microbiology 55, 221–228.
- Trujillo, M.E., 2008.** Actinobacteria. eLS.
- Turan, M., Nikerel, E., Kaya, K., Kitir, N., Gunes, A., Mokhtari, N.E.P., Tüfenkçi, Ş., Karaman, M.R., Çimrin, K.M., 2017.** Enzyme Dynamic in Plant Nutrition Uptake and Plant Nutrition. Enzyme Inhibitors and Activators 225–242.
- Upadhyay, S.K., Singh, D.P., 2015.** Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biology 17, 288–293.
- Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Dery, C., Brzezinski, R., Beaulieu, C., 1996.** . Applied and Environmental Microbiology 62, 1630–1635.
- Van Dissel, D., Claessen, D., van Wezel, G.P., 2014.** Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. Advances in applied microbiology 89, 1–45.
- Van Loon, L.C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria, in: New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research. Springer, pp. 243–254.
- Van Loon, L.C., Bakker, P., 2005.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, in: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, pp. 39–66.
- Van Loon, L.C., Bakker, P., Pieterse, C.M.J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual review of phytopathology 36, 453–483.

- Vance, C.P., 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant physiology* 127, 390–397.
- Vardharajula, S., SkZ, A., Shiva Krishna Prasad Vurukonda, S., Shrivastava, M., 2017. Plant growth promoting endophytes and their interaction with plants to alleviate abiotic stress. *Current Biotechnology* 6, 252–263.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Auni6n, C., Nieto, J.J., 2008. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* 4, 1–9.
- Vargas, L., Santa Brígida, A.B., 2014. JPM Filho, TG de Carvalho, CA Rojas, D. Vanechoutte, M. Van Bel, L. Farrinelli, P. CG Ferreira, K. Vandepoele, and AS Hemerly.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules* 21, 573.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C., Marquez, M.C., 2008. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils, in: *Microbiology of Extreme Soils*. Springer, pp. 87–115.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 62, 504–544.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D., 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 351–372.
- Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 895–908.
- Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Kumar, A., 2013. Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering* 51, 282–286.
- Verma, M., Lal, D., Kaur, Jaspreet, Saxena, A., Kaur, Jasvinder, Anand, S., Lal, R., 2013. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Research in microbiology* 164, 718–728.

- Verma, P.P., Shelake, R.M., Sharma, P., Kim, J.-Y., Das, S., Kaur, M., 2020. Microbes in Crop Production: Formulation and Application, in: Microbial Diversity, Interventions and Scope. Springer, pp. 51–73.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., Goormachtig, S., 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend? FEMS microbiology ecology 92.
- Vickers, N.J., 2017. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? Current biology 27, R713–R715.
- Viswanathan, R., 1999. Induction of Systematic Resistance Against Red Rot Disease In Sugarcane By Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PhD Thesis). Tamil Nadu Agricultural University; Coimbatore.
- Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P., 2013. Proteolytic activity in soil: A review. Applied Soil Ecology 70, 23–32.
- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. International journal of molecular sciences 19, 952.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Takabe, T., 2016. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. AIMS Microbiol 2, 42–54.
- Wahyudi, A.T., Priyanto, J.A., Afrista, R., Kurniati, D., Astuti, R.I., Akhdiya, A., 2019. Plant growth promoting activity of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere. Online J. Biol. Sci 19, 1–8.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant physiology 132, 44–51.
- Wang, L., Guo, Q., Li, H., Li, Y., Lai, H., Xue, Q., 2020. Biocontrol actinomycetes better protects cell membranes in celery (*Apium graveolens* L.) under freezing stress in the presence of fungal pathogen, in: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, p. 012036.
- Wang, Y., Jiang, Y., 2016. Chemotaxonomy of actinobacteria. Actinobacteria–basics and biotechnological applications/D. Dhanasekaran.–InTech.–2016. doi 10, 61482.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., Mei, L., 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. Biology open 7.
- Warwick, S., Bowen, T., McVeigh, H., Embley, T.M., 1994. A phylogenetic analysis of the family Pseudonocardiaceae and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with

- 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 293–299.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, Rge., Stackebrandt, E., 1987.** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37, 463–464.
- Wayne, P.A., 2011.** Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- Wei, G., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1996.** Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*.
- Wei, G., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1991.** Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81, 1508–1512.
- Wei, Y., Zhao, Y., Zhou, D., Qi, D., Li, K., Tang, W., Chen, Y., Jing, T., Zang, X., Xie, J., 2020.** A Newly Isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *Frontiers in microbiology* 11, 1712.
- Weise, T., Kai, M., Piechulla, B., 2013.** Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PloS one* 8, e63538.
- Welbaum, G.E., Sturz, A.V., Dong, Z., Nowak, J., 2004.** Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 175–193.
- Weller, D.M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology* 26, 379–407.
- Weraduwege, S.M., Chen, J., Anozie, F.C., Morales, A., Weise, S.E., Sharkey, T.D., 2015.** The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* 6, 167.
- Werner, J.E., Finkelstein, R.R., 1995.** *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 93, 659–666.
- Wildermuth, H., Wehrli, E., Horne, R.W., 1971.** The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of ultrastructure research* 35, 168–180.
- Williams, S.T., 1990.** Actinomycetes—The ray fungi. *Mycologist* 4, 110–114.

- Williams, S.T., Vickers, J.C., 1988.** Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes* 88, 265–270.
- Wonglom, P., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S., Matsui, K., Sunpapao, A., 2019.** *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*. *Biological Control* 138, 104046.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T., Smith, L.T., 2001.** Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130, 437–460.
- Wu, L.-M., Fang, Y., Yang, H.-N., Bai, L.-Y., 2019.** Effects of drought-stress on seed germination and growth physiology of quinclorac-resistant *Echinochloa crusgalli*. *Plos one* 14, e0214480.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2005.** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125, 155–166.
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., Ma, Y., 2019.** Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *MicrobiologyOpen* 8, e00813.
- Xiong, Y.-W., Gong, Y., Li, X.-W., Chen, P., Ju, X.-Y., Zhang, C.-M., Yuan, B., Lv, Z.-P., Xing, K., Qin, S., 2019.** Enhancement of growth and salt tolerance of tomato seedlings by a natural halotolerant actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 isolated from a coastal halophyte. *Plant and Soil* 445, 307–322.
- Xu, J.G., Johnson, R.L., 1995.** Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil* 173, 3–10.
- Xu, T., Li, Y., Zeng, X., Yang, X., Yang, Y., Yuan, S., Hu, X., Zeng, J., Wang, Z., Liu, Q., 2017.** Isolation and evaluation of endophytic *Streptomyces endus* OsiSh-2 with potential application for biocontrol of rice blast disease. *Journal of the science of food and agriculture* 97, 1149–1157.
- Xynias, I.N., Mylonas, I., Korpetis, E.G., Ninou, E., Tsballa, A., Avdikos, I.D., Mavromatis, A.G., 2020.** Durum wheat breeding in the Mediterranean region: Current status and future prospects. *Agronomy* 10, 432.

- Yandigeri, M.S., Malviya, N., Solanki, M.K., Shrivastava, P., Sivakumar, G., 2015.** Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1217–1225.
- Yang, C.-H., Crowley, D.E., 2000.** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and environmental microbiology* 66, 345–351.
- Yang, J., Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science* 14, 1–4.
- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., Li, C., 2010.** Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology* 46, 49–54.
- Yildirim, E., Turan, M., Ekinici, M., Dursun, A., Cakmakci, R., 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria ameliorate deleterious effect of salt stress on lettuce. *Sci Res Essays* 6, 4389–4396.
- Yildirim, E., Turan, M., Guvenc, I., 2008.** Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress. *Journal of plant nutrition* 31, 593–612.
- Yuan, W.M., Crawford, D.L., 1995.** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3119–3128.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W.T., 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in agronomy* 81, 98–169.
- Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M.S., Saif, S., Rizvi, A., 2015.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. *Scientia Horticulturae* 193, 231–239.
- Zarea, M.J., Hajinia, S., Karimi, N., Goltapeh, E.M., Rejali, F., Varma, A., 2012.** Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry* 45, 139–146.
- Zehr, J.P., Turner, P.J., 2001.** Nitrogen fixation: nitrogenase genes and gene expression. *Methods in microbiology* 30, 271–286.
- Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U.N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., Bowen, B.P., 2018.** Dynamic root exudate chemistry and microbial



- substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature microbiology* 3, 470–480.
- Zhang, L., Khabbaz, S.E., Wang, A., Li, H., Abbasi, P.A., 2015.** Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium crown* and root rot disease of tomato. *Journal of applied microbiology* 118, 685–703.
- Zhang, S., Gao, P., Tong, Y., Norse, D., Lu, Y., Powlson, D., 2015.** Overcoming nitrogen fertilizer over-use through technical and advisory approaches: A case study from Shaanxi Province, northwest China. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 209, 89–99.
- ZHANG, W., Chong, W., Rui, X., WANG, L., 2019.** Effects of salinity on the soil microbial community and soil fertility. *Journal of Integrative Agriculture* 18, 1360–1368.
- Zhang, W., Luo, Q., Zhang, Y., Fan, X., Ye, T., Mishra, S., Bhatt, P., Zhang, L., Chen, S., 2020.** Quorum Quenching in a Novel *Acinetobacter* sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microorganisms* 8, 1100.
- Zhang, W., Yu, R., 2014.** Molecule mechanism of stem cells in *Arabidopsis thaliana*. *Pharmacognosy reviews* 8, 105.
- Zhang, Y., Thomas, C.L., Xiang, J., Long, Y., Wang, X., Zou, J., Luo, Z., Ding, G., Cai, H., Graham, N.S., 2016.** QTL meta-analysis of root traits in *Brassica napus* under contrasting phosphorus supply in two growth systems. *Scientific reports* 6, 33113.
- Zhang, Y., Yakrus, M.A., Graviss, E.A., Williams-Bouyer, N., Turenne, C., Kabani, A., Wallace, R.J., 2004.** Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation. *Journal of clinical microbiology* 42, 5582–5587.
- Zhao, J., Han, L., Yu, M., Cao, P., Li, D., Guo, X., Liu, Y., Wang, X., Xiang, W., 2019.** Characterization of *Streptomyces sporangiiformans* sp. nov., a Novel Soil Actinomycete with Antibacterial Activity against *Ralstonia solanacearum*. *Microorganisms* 7, 360.
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J., Stackebrandt, E., 2009.** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 589–608.

## Références bibliographiques

---

Zong, K., Huang, J., Nara, K., Chen, Y., Shen, Z., Lian, C., 2015. Inoculation of ectomycorrhizal fungi contributes to the survival of tree seedlings in a copper mine tailing. *Journal of Forest Research* 20, 493–500.

## Annexes

## Annexes

### Annexe 1 : Composition du milieu International Streptomyces Project No. 2 (ISP2)

#### Milieu ISP2

Extrait de levure	4 g/l
Extrait de Malt	10 g/l
Glucose	4 g/l
CaCO <sub>3</sub>	2 g/l
Agar	15-20 g/l
Eau distillée	1L
pH	7

### Annexe 2: Composition du milieu National Botanical Research Institutes's Growth Medium (NBRIP)

#### NBRIP

Glucose	10 g/l
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25 g/l
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10 g/l
KCl	0.2 g/l
Extrait de levure	0.1 g/l
Agar	15 g/l
Eau distillée	1L
pH	7

### Annexe 3 : Composition du milieu Pikovskaya (PVK)

#### PVK

Glucose	10 g/l
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g/l
NaCl	0.2 g/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g/l
KCl	0.2 g/l
Extrait de levure	0.5 g/l
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.002 g/l
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.002 g/l
Agar	15 g/l
Eau distillée	1L

pH

7

**Annexe 4 : Composition du milieu Luria Bertani (LB)**

<b>LB</b>	
<b>Glucose</b>	10 g/l
<b>Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	5 g/l
<b>NaCl</b>	5 g/l
<b>Extrait de levure</b>	5 g/l
<b>Tryptone</b>	10 g/l
<b>Agar</b>	15 g/l
<b>Eau distillée</b>	1 L
<b>pH</b>	7

**Annexe 5 : Courbe d'étalonnage pour déterminer la quantité du phosphore soluble**

Préparation d'une solution stock de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> contenant 0.4393g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dilués dans 1 litre d'eau distillé pour faire une concentration de 100µl / ml de Phosphate.

Pour préparer une gamme étalonnage à partir d'une solution de 2 µg/ml : 20ml de la solution stock est dilués pour 1litre d'eau distillée. 2,5, 5, 10, 20, et 25 ml de la solution (2µg/ml) sont transférés à des flacons de 50ml de volume, après ajout de 5ml de la solution réactionnel, le volume est complété avec d'eau distille ajusté à 50ml, l'absorbance est lue à 620nm après 30min.

**Annexe 6 : Composition du milieu GBA**

<b>GBA</b>	
<b>Glycérol</b>	20 g/l
<b>Amidon soluble</b>	20 g/l
<b>Peptone</b>	10 g/l
<b>Extrait de viande</b>	5 g/l
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	3 g/l
<b>Agar</b>	15 g/l
<b>Eau distillée</b>	1L
<b>pH</b>	7

## Annexe 7 : Composition du milieu MP7

<b>MP7</b>	
Glucose	05 g/l
Pectine	05 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	04 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	06 g/l
extrait de levure	01 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	02 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0.001 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00001 g/l
MnSO <sub>4</sub>	0.00001 g/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00007 g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00005 g/l
MoO <sub>3</sub>	0.00001 g/l
eau distillée	1L
Agar	15 g/l
pH	7.2-7.4

## Annexe 8 : Composition du milieu Mineral Minimum Dworkin-Foster (DF)

<b>DF</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µg/l
MoO <sub>3</sub>	10 µg/l
CuSO <sub>4</sub>	50 µg/l
ZnSO <sub>4</sub>	70 µg/l
MnSO <sub>4</sub>	10 µg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
glucose	02 g/l
Acide gluconique	02 g/l
Acide citrique	02 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	02 g/l
Eau distillée	1L
pH	7,2



Article

# Actinomyceete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*

Rihab Djebaili <sup>1,2</sup>, Marika Pellegrini <sup>2</sup>, Maria Smati <sup>1</sup>,  
Maddalena Del Gallo <sup>2,\*</sup> and Mahmoud Kitouni <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiological Engineering and Applications, University of Brothers Mentouri, Constantine 1, Chaâbat Erssas Campus, Ain El Bey Road, Constantine 25000, Algeria; djebaili.rihab@umc.edu.dz (R.D.); mariasmati87@gmail.com (M.S.); mahmoudkitouni@yahoo.fr (M.K.)

<sup>2</sup> Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, Coppito, 67010 L'Aquila, Italy; marika.pellegrini@guest.univaq.it

\* Correspondence: maddalena.delgallo@univaq.it; Tel.: +39-0862-433258

Received: 27 April 2020; Accepted: 2 June 2020; Published: 5 June 2020

**Abstract:** Excessive use of chemical products in agriculture is causing significant environmental pollution and the loss of lands and fertility of agricultural soils. Plant-growth-promoting bacteria are a valid alternative strategy for sustainable agriculture. The aim of this study was to select actinomyceete strains based on their plant-growth-promoting traits and to investigate their root association abilities and biostimulant effects on *Solanum lycopersicum*. The strains were investigated for their phosphate solubilization ability, production of indole-3-acetic acid, hydrocyanic acid, and ammonia, and several enzymatic activities. Bacteria–plant–root associations were studied by scanning electron microscopy. A greenhouse experiment was carried out to assess inoculation effects. Of sixty isolates, fourteen strains showed significant plant-growth-promoting traits. All fourteen strains solubilized phosphate, produced ammonia, and showed several enzymatic activities at different rates. The production of indole-3-acetic acid was shown by nine strains, while hydrocyanic acid production was observed in eleven of them. Scanning electron microscopy revealed that strains have good in vitro plant root association and colonization abilities. In planta inoculation by actinomyceete strains positively influenced plant growth parameters. The best results were shown by seven actinomyceete strains, suggesting their possible utilization as biofertilizer agents for sustainable agriculture.

**Keywords:** PGPB; actinomyceetes; phosphate solubilization; indole-3-acetic acid; hydrocyanic acid; tomato; biofertilizer

---

## 1. Introduction

With population increase and territory occupation by humans, improvement of crop productivity has become one of the major concerns in satisfying food needs worldwide [1]. Application of chemical fertilizers is the simplest way to qualitatively and quantitatively increase crop yields. For this reason, demand for fertilizers and pesticides has grown dramatically and is expected to continue growing more and more in the next years [2]. However, an indiscriminate use of chemicals in agriculture entails quite a few environmental problems—i.e., water, air, and soil contamination. It causes toxicity in non-target organisms, as well as in humans due to the occurrence in food as residues. Furthermore, a decrease of chemicals' effectiveness was observed due to an ensuing resistance by pests [3].



Biofertilization can replace the use of agrochemicals in agriculture. Biofertilization is considered as a key element towards the development of a sustainable agriculture. Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) have a positive effect on crop productivity by preserving soil fertility [4], whilst safeguarding human health and keeping the diversity of living organisms [5,6]. These microorganisms promote plant growth and development through several mechanisms (direct and indirect). These include: Organic matter decomposition and nutritional element recycling [7], atmospheric nitrogen fixation, mineral solubilization (e.g., phosphorus), and phytohormone production (e.g., auxins, cytokinins, gibberellins) [8]. These microorganisms help the plant respond to several biotic and abiotic stresses through different mechanisms, such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity, release of enzymes, and production of siderophores [9–11]. Currently, soil salinity is one of the major concerns in agriculture [12] that limits water absorption and induces accumulation of toxic ions in the different plants' organs [13]. The application of halotolerant plant-growth-promoting (PGP) strains can be a valid tool to reduce the harmful effects of saline stress and to improve crop productivity [14].

The PGPB group includes a wide range of species [7,9,11,15]. Within this group, a significant role is played by actinomycetes. These ubiquitous Gram-positive bacteria— aerobic, but with some anaerobic strains—are widely distributed in the soil, in which they occupy 10% to 50% of the microbial community [16,17]. They exhibit a remarkable pleomorphism, displaying the greatest differentiation among bacteria by forming complicated structures, such as spores, spore chains, sporangia, and sporangiospores. While individual bacteria are rod-shaped or coccoid—the latter form is generally called a spore or arthrospore, even if it is not a real spore because it is a vital form that divides, keeping this form—actinomycete colonies form fungus-like branched networks of hyphae. This morphology allows them to create a strong bond with the soil particles within the rhizosphere, allowing strong associations with plants [18].

Several authors reported positive influence on plants treated by actinomycete strains, either singularly or in consortium. In particular, actinomycetes improve plant growth through direct mechanisms, such as phytohormone synthesis (i.e., indole-3-acetic acid (IAA) [19,20], ethylene, gibberellic acid, and cytokines [21]), supply of nutrients to plants through the solubilization of essential elements, such as phosphate [22], production of siderophores, and fixation of atmospheric nitrogen [18]. Moreover, many actinomycetes can control phytopathogens through antifungal, insecticide, and antibacterial activities [18] and production of hydrolytic enzymes and hydrogen cyanide [23,24].

The aim of the present work was to select actinomycete strains with plant-growth-promoting traits, to assess their abilities and patterns of root association and colonization, and to determine their effects on the growth of *Solanum lycopersicum*. Actinomycete isolates were firstly screened through several in vitro plant-growth-promoting (PGP) traits (i.e., phosphate solubilization ability, production of indole-3-acetic acid, hydrocyanic acid, and ammonia, and several enzymatic activities). Strains with interesting traits were investigated for their root association and colonization abilities and biostimulant effects on *S. lycopersicum*. Root association and colonization abilities were studied in in vitro seedlings using scanning electron microscopy (SEM). Biostimulant properties were assessed through a greenhouse experiment.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Actinomycete Strains and Culture Conditions

Sixty actinomycete strains of the genus *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp., isolated from two different sites in the Northeast region of Algeria—Ezzemoul sebkha (35°53'14" N; 06°30'20" E) and Djendli sebkha (35°43'15" N; 06°32'23" E)—as previously reported in Smati and Kitouni [25], were investigated for their PGP traits.

A primary screening to select PGPB strains was carried out: Abilities to solubilize phosphate and to produce indole 3-acetic acid (IAA) and hydrocyanic acid (HCN).

Spore production by each strain was determined by cultivation on ISP2 agar medium (the International *Streptomyces* Project No. 2) at 30 °C for 7 days. Spore suspensions were prepared by sterile distilled water addition into the plates. The concentration of the spores was adjusted spectrophotometrically to a final density of  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . Spore suspensions were utilized differently depending on the test carried out (descriptions reported in each paragraph).

## 2.2. Plant-Growth-Promoting Traits

### 2.2.1. Phosphate Solubilization

To assess the strains' ability to dissolve inorganic phosphate, 5 mm agar plugs of each actinomycete strains (collected from cultivated plates of ISP2 media kept at 30 °C for 7 days) were placed in plates with three different media containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  as the only source of phosphate: NBRIP (National Botanical Research Institute's Growth Medium) [26], PVK (Pikovskaya) [27], and LB (Luria Bertani) modified by glucose addition. The solubilization ability was estimated by measuring the transparent area formed around the colony after 7 days of incubation at 30 °C. The diameter of the solubilization halo for each isolate was determined by subtracting colony diameter from the total one (diameter of the halo – diameter of the colony) [28].

Quantification of solubilized phosphate was carried out in liquid PVK. Spore suspension of each strain (100  $\mu\text{L}$ ) was inoculated in 10 mL of liquid PVK medium and incubated at 30 °C for 7 days in a rotary shaker at 150 rpm. After incubation, the cultures were centrifuged at 3000 rpm for 20 min [28], and the solubilized phosphorus was quantified in the supernatant by the colorimetric method of Olsen and Sommers [29].

### 2.2.2. Production of Indole-3-Acetic Acid

Production of IAA was assessed as described by Wahyudi et al. [21] and modified as follows: Spore suspension of each strain (100  $\mu\text{L}$ ) was inoculated in NBRIP medium supplemented with tryptophan (0.2% w/v) and incubated at 30 °C for 7 days at 150 rpm. After incubation, cultures were then centrifuged at 3000 rpm for 20 min. A total of 1 mL of supernatant was mixed with 4 mL of Salkowski's reagent [30]. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min away from light sources. Optical density was read at 530 nm and the concentrations of IAA in the samples were calculated using the IAA standard curve [31].

### 2.2.3. Production of Hydrocyanic Acid and Ammonia and Enzymatic Activities

A 100  $\mu\text{L}$  spore suspension of each strain was spread on Trypticase Soy Agar (TSA) medium supplemented with glycine ( $4.4 \text{ g L}^{-1}$ ). A Whatman paper—same diameter as the dish—was soaked in a solution of picric acid (0.5%) and sodium carbonate (2%), and was placed on top of the agar on each inoculated Petri dish, sealed with parafilm, and incubated at 30 °C for 7 days. The production of hydrocyanic acid (HCN) was assessed by observing paper color change. A coloring from yellow to orange or brown indicates production of HCN [32].

The production of ammonia was carried out on peptone water medium; 10 mL of peptone water was inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of each spore suspension. After incubation for 7 days at 30 °C, 0.5 mL of Nessler's reagent was added to each tube. Yellow color development was considered as a positive result [33].

Amylase, caseinase, catalase, cellulase, chitinase, gelatinase, lecithinase, lipase, lipoproteinase, and pectinase enzymatic activities were assessed as follows:

- Amylase: Strains were streaked on the Glycerol Bouillon Agar (GBA) medium ( $20 \text{ g L}^{-1}$  soluble starch,  $20 \text{ mL L}^{-1}$  glycerol,  $10 \text{ g L}^{-1}$  peptone,  $5 \text{ g L}^{-1}$  meat extract,  $3 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ ,  $15 \text{ g L}^{-1}$  agar—pH  $7.0 \pm 0.2$ ). The cultures were incubated at 30 °C for 7 days, and amylase production was detected after immersion of the dishes with a Lugol solution. A positive outcome was underlined by the presence of a clear discoloration zone around the colonies [34].

- Caseinase: Strains were streaked on skim milk agar [35]. After incubation for 7 days at 30 °C, the presence of a clear discoloration zone around the colonies indicates degradation of the casein [36].
- Catalase: An isolated colony from ISP2 agar culture was placed on a slide and a few drops of hydrogen peroxide were deposited on the colony. A positive catalase reaction results from the appearance of bubbles after the release of O<sub>2</sub> [37].
- Cellulase: Strains were streaked on the ISP2 medium supplemented with 1% of cellulose. After incubation for 7 days at 30 °C, dishes were immersed in a Congo red solution (1% w/v) for 20 min and then washed with a NaCl solution (1N). A positive reaction is indicated by the development of a clear discoloration zone around the streak [38].
- Chitinase: Strains were streaked on nutrient agar supplemented with 1% chitin. After 7 days of incubation at 30 °C, the appearance of clear areas around the colonies was considered as a sign of chitinase production.
- Gelatinase: Strains were inoculated in tubes containing nutritive gelatin medium. After an incubation for 21 days at 30 °C, tubes were placed in the refrigerator for 1 h. If the gelatin becomes solid, this means that it was not attacked; if it remains liquid, this means that an extracellular enzyme has hydrolyzed it [39].
- Lecithinase, lipase, and lipoproteinase: Strains were streaked on agar medium containing egg yolk and prepared following the method described by Dellaras [39]. After plate incubation at 30 °C for 7 days, the presence of the enzymes was assessed as follows: (i) Lecithinase: Appearance of an opaque halo of white-yellowish pearl, with a clear edge under the streak or at the borders; (ii) Lipase: Appearance of an oily and shiny pearly white halo; (iii) Lipoproteinase: Appearance of a clear halo around the streak [40].
- Pectinase: Strains were streaked on MP7 agar [38]; after incubation for 7 days at 30 °C, the dishes were flooded with a solution of Cu-acetate at 10% for 15 min. The appearance of a clear halo indicates the presence of pectinolytic activity [41].

### 2.3. In Vitro Association Study by Scanning Electron Microscopy

Spore suspensions of each strain (10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>) were used to inoculate in vitro seedlings to assess the ability of the actinomycetes to colonize plant roots [42]. Tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) of the Saint Pierre variety were utilized for the experiments.

To stimulate germination, seeds were put in sterile distilled water for 24 h. Then, they were sterilized on a 20% (w/v) sodium hypochlorite solution (NaClO) for 15 min in a shaker, followed by several washes in sterile distilled water. Seeds were then treated in ethanol at 70% (w/v) for 3 min and, finally, rinsed three times with distilled water for 15 min [43].

Inoculation of seeds was obtained by 1 h of immersion in the inoculum. Control seeds were treated with the same procedure but using sterile distilled water.

Inoculated and non-inoculated seeds were transferred into culture boxes containing 50 mL of MS medium—Murashige and Skoog [44]—containing 1% agar and 3% sucrose at a final pH of 5.8, and incubated in a growth chamber with a controlled environment (22 °C, photoperiod 16 h light and 8 h dark, active photo-synthetical radiation 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 65% relative humidity).

After 8 days, the fresh seedling roots were sampled and sections of 5 mm diameter were prepared. A solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2–7.4) was used to fix sections. After fixation at 4 °C for 24 h, the excised sections were dehydrated in 70% and 100% ethanol (20 min for every treatment) and treated with Hexamethyldisilazane (HMDS) [42]. The dried samples were covered with chromium, and the observations were carried out with scanning electron microscopy (SEM) under the conditions previously described in Pagnani et al. [42].

### 2.4. Greenhouse Experiment on *Solanum Lycopersicum*

The fourteen selected actinomycete strains were inoculated on tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) of the Saint Pierre variety. The seed surface was sterilized with a sodium hypochlorite solution 20% (v/v) and washed several times with sterile distilled water [45].

The inoculation was carried out by dipping the seeds in the different spore suspensions ( $10^6$  mL<sup>-1</sup>) for 1 h; seeds immersed in sterile distilled water were used as a control. Inoculated and uninoculated seeds were sown in pots ( $\Phi = 10$  cm) filled with soil (pH 7.9, electrical conductivity 332  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, 5% organic matter, and 0.7% humidity rate) and were irrigated with tap water twice a week.

Forty days after sowing (DAS), plants were sampled, collecting shoots and roots separately. The following parameters were investigated: Lengths, fresh weight, dry weight (oven drying at 105 °C for 48 h), ash-free dry weight (AFDW), and chlorophyll contents.

AFDW was determined by subtracting dry weight from the ashes' weight (obtained using a muffle furnace at 450 °C for 16 h) as follows:

$$\text{AFDW (\%)} = \frac{\text{dry weight} - \text{ashes weight}}{\text{dry weight}} \times 100. \quad (1)$$

Chlorophyll a (Chl<sub>a</sub>), chlorophyll b (Chl<sub>b</sub>), and total chlorophyll (Chl<sub>tot</sub>) contents were determined following the method described by Arnon [46]. Briefly, 0.5 g of leaves from each sample, finely cut, were homogenized in 10 mL of acetone 80% and stored at -10 °C overnight; after centrifugation at 14,000 rpm for 5 min, supernatant absorbance was read at 663 for chlorophyll a and at 645 nm for chlorophyll b. The chlorophyll concentrations in the samples were calculated through the following equations:

$$\text{Chl}_a(\text{mg L}^{-1}) = 12.41 (\text{OD } 663) - 2.59 (\text{OD } 645) \quad (2)$$

$$\text{Chl}_b(\text{mg L}^{-1}) = 22.9 (\text{OD } 645) - 4.68 (\text{OD } 663) \quad (3)$$

$$\text{Chl}_{\text{tot}}(\text{mg L}^{-1}) = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b. \quad (4)$$

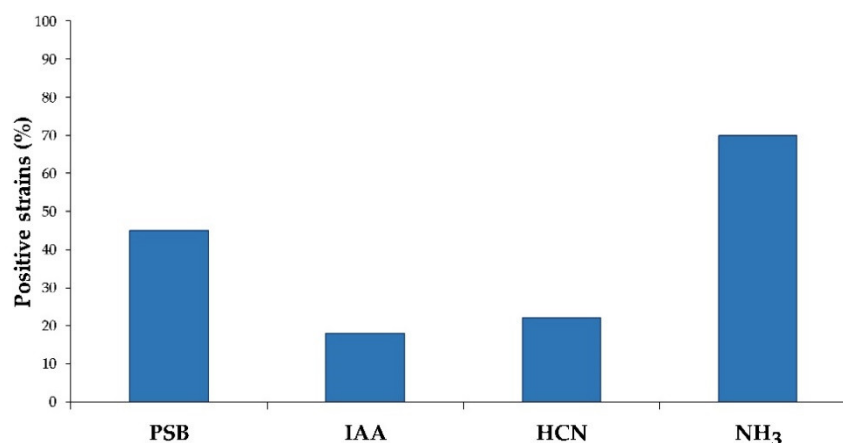
## 2.5. Statistical Analysis

Each experiment was carried out in triplicate, and data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), utilizing Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc test to compare the mean values to a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). ANOVA was performed using Statistica 10.0 software (Dell Software, Round Rock, TX, USA). To evaluate potential correlations among the IAA, phosphate solubilization, and HCN traits showed in vitro and the plant-growth parameters recorded in the greenhouse experiment, the dataset was processed by the Principal Component Analysis (PCA) algorithm using XLSTAT 2014 software (Addinsoft, Paris, France).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Plant-Growth-Promoting Traits

To assess the potentiality of any strain to be used as biostimulant and/or biocontrol agent, it is necessary to establish its plant-growth-promoting (PGP) traits. In our study, different PGP tests were performed to select promising strains—among the sixty isolates—to improve plant growth and development. In Figure 1, the graphic summary of the results obtained by PGP tests is shown.



**Figure 1.** Frequencies of strains (%) that showed plant-growth-promoting traits. In the figure, the percentages of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) and of strains producing IAA (indole-3-acetic acid), hydrocyanic acid (HCN), and ammonia (NH<sub>3</sub>) are shown.

Most of the strains (70%) were able to produce ammonia, 45% were able to dissolve inorganic phosphate, 18% were able to produce IAA, and 22% were able to produce HCN.

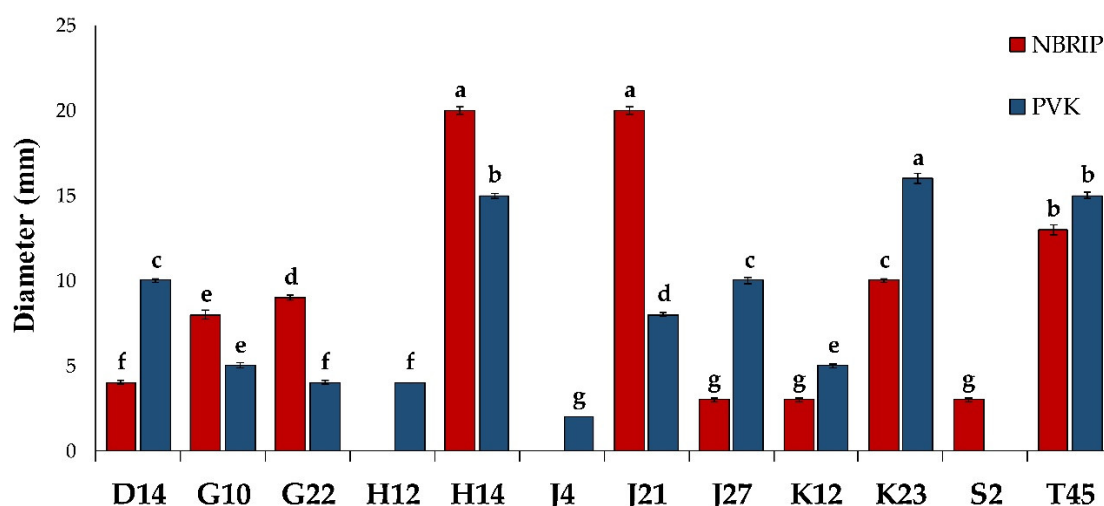
Based on these results, among the 60 strains tested, 14 strains were selected as promising PGPB:

- D14, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (Gene Bank accession MG597514).
- G10, *Streptomyces iakyrus* (MG597593).
- G22, *Streptomyces xantholiticus* (MG597582).
- G33, *Streptomyces xantholiticus* (MG597585).
- H12, *Streptomyces albidoflavus* (MG597552).
- H14, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597543).
- J4, *Streptomyces thinghirensis* (MG597590).
- J13, *Streptomyces anulatus* (MG597579).
- J21, *Nocardiopsis alba* (MG597576).
- J27, *Streptomyces ambofaciens* (MG597599).
- K12, *Streptomyces xantholiticus* (MG597545).
- K23, *Streptomyces thinghirensis* (MG597560).
- S2, *Nocardiopsis aegyptica* (MG597572).
- T45, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (MG597502).

These isolates tolerated up to 10% NaCl during in vitro testing, suggesting halotolerant traits [25].

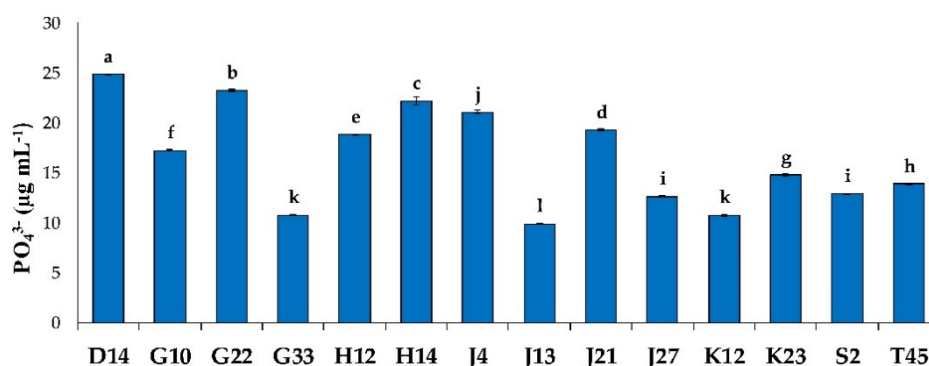
### 3.1.1. Phosphate Solubilization

The solubilization of phosphate on solid media was revealed by the presence of a discoloration zone around the strain colonies. Among the fourteen strains, phosphate solubilization was observed in twelve of them. The diameters recorded for these PSB are shown in Figure 2. Strain solubilization capability was different based on culture medium. On PVK medium, most of the strains showed solubilization capability (79%). In this medium, strain K23 showed the largest solubilization diameter (16 mm). On NBRIP medium, ten strains (71%) showed this capability, and the maximum diameter (20 mm) was observed for strains H14 and J21. The diameters shown by our strains were wider than those reported in similar studies [47,48], but still in line with what was reported by several authors for NBRIP and PVK media [49,50]. On LB medium, only one strain (J27) had a solubilization halo, with a diameter of 2 mm. This result could be due either to the LB's richness in nutrients, which does not allow bacteria to solubilize inorganic phosphorus [26], or to the fact that bacteria do not need phosphate because it is already present in the medium in a more easily assimilable form.



**Figure 2.** Halo diameters of phosphate solubilization by the actinomycete strains on solid National Botanical Research Institute's Growth Medium (NBRIP) and Pikovskaya (PVK) media. For the same medium (NBRIP or PVK), results followed by the same case letter are not significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ).

In Figure 3, the amounts of phosphorus solubilized by the fourteen strains grown in PVK liquid medium are shown. The highest solubilization was obtained by strain D14 ( $24.84 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ); lower but similar results were obtained for G22 ( $23.25 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ) and H14 ( $22.2 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ) strains. The lowest solubilization rate was recorded for the J13 strain ( $9.89 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ).



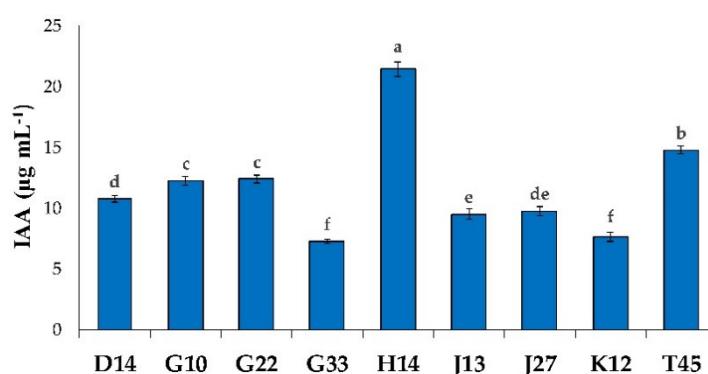
**Figure 3.** Concentrations of phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) solubilized by actinomycete strains grown on liquid PVK medium. Results followed by the same case letter are not significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ).

On solid PVK medium, only 11 strains (D14, G10, G22, H12, H14, J4, J21, J27, K12, K23, and T45) were able to produce a solubilization halo around the colony (2 to 16 mm in diameter), while all the other strains were able to solubilize phosphate on a liquid medium. These results indicate that, despite the absence of a solubilization halo around the colonies by G33, J13, and S2 on solid medium, they can solubilize phosphate at considerable rates on liquid PVK medium. This absence of correlation between solid and liquid PVK solubilization was also statistically confirmed by a correlation test. A weak negative association was obtained ( $r = -0.27$ ), suggesting that liquid medium solubilization is a more reliable technique compared to the solid one [26]. The ability to use  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  is also important for phytohormone production and, thus, for indirectly improving plant growth [31]. Another rhizosphere microbial mechanism of mineral phosphate solubilization is related to the release of low molecular weight organic acids, which chelate cations to bind phosphates through their hydroxyl and carboxyl groups. Therefore, these isolates have the potential to mobilize insoluble

inorganic phosphate under low phosphate availability [31]. PGP strains that are able to solubilize inorganic phosphate and make the organic forms available for plant absorption [23,51] have a positive outcome on plant growth [18]. Our findings are consistent with those obtained by several authors [49,52].

### 3.1.2. Production of Indole-3-Acetic Acid

In Figure 4, the IAA production by the different strains is shown. Among the fourteen actinomycetes, nine strains (64%) showed the ability to synthesize IAA. Variable production rates were also detected; the highest amounts of IAA were observed for strain H14 (21.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.05$ ), followed by the T45 (14.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), G22 (12.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and G10 (12.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) strains. The lowest production was observed for strains G33 and K12 (7.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) produced by the selected actinomycete strains. Results followed by the same case letter are not significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ).

IAA is a plant-growth-promoting substance that acts through different metabolic pathways [18,19]; it is involved in root elongation, cell division, and proliferation of root hairs [21,53,54]. Among its different effects, it stimulates seed germination, seedling length, and dry weight, and it is produced by many PGPB [19,23,55,56]. About 80% of rhizobacteria are capable of producing indole-3-acetic acid (IAA) as a secondary metabolite [57]. L-tryptophan is a precursor of IAA production; thus, its addition to cultural medium generally promotes and increases its synthesis by the bacterium [57]. In natural conditions, this amino acid is supplied by root exudates [58]. Many studies suggest that small amounts of IAA are necessary for the primary roots' growth [55,59] and that bacteria with the ability to secrete amounts of indole compound higher than 13.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  have PGP activity. Several species of actinomycetes have been reported to produce IAA [23], which is influenced by the culture conditions, the growth phase, and the availability of substrate [60]. Our results are in accordance with the data present in the literature [21,31,50,61,62], suggesting that the selected strains are good candidates as biostimulant agents.

### 3.1.3. Production of Hydrocyanic Acid, Ammonia, and Enzymatic Activities

Hydrocyanic acid production, ammonia, and several enzymatic activities are shown in Table 1.

**Table 1.** Hydrocyanic acid, ammonia production, and enzymatic activities detected for the actinomycete strains.

	K12	K23	H12	H14	S2	D14	T45	J4	J13	J21	J27	G10	G22	G33
HCN	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
NH <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Caseinase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Chitinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Lipase	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Lipoprotease	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Pectinase	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

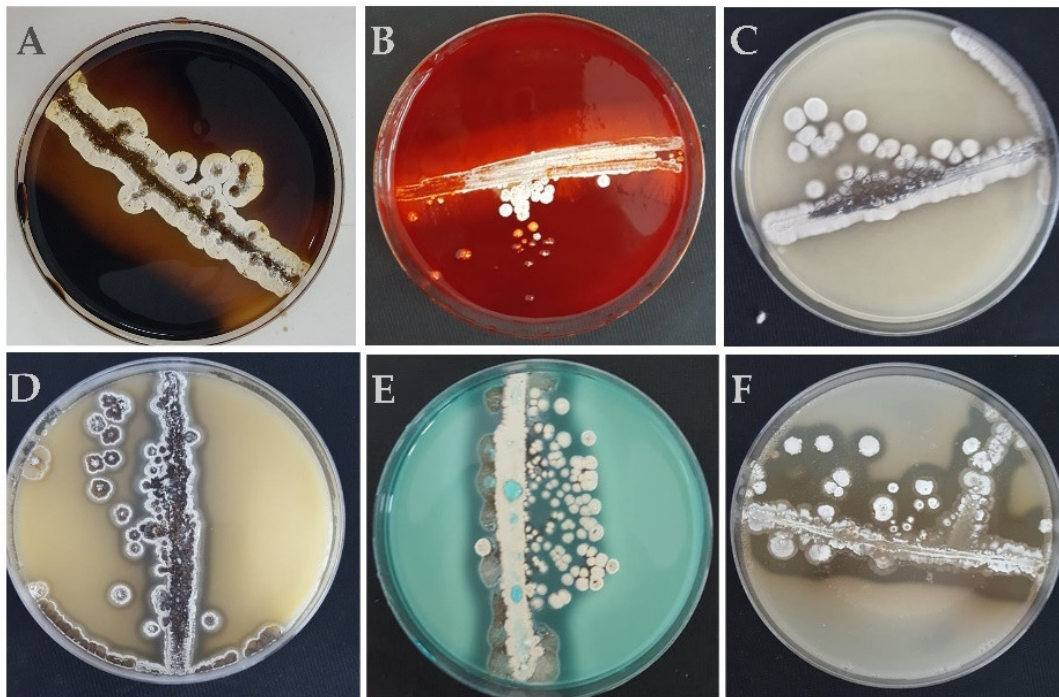
HCN production was detected only in eleven of the tested isolates, while the capability to produce ammonia was expressed for all fourteen strain. For strains D14, G22, and T45, no cyanogenic activity was observed. Instead, intense HCN production was shown by G10, G33, H12, J4, J13, J27, K12, K23, and S2 strains. Our findings are comparable with the data present in the literature [56,63,64]. These volatile compounds, in such a low amount, can help the plant to counteract phytopathogens and stimulate its growth [56,65]. HCN is an inducer of plant resistance [64] that interferes with the cytochrome oxidase pathway, with toxic effects on sensitive pathogen microorganisms [65].

Many authors report ammonia production as a PGP trait [66], and it has been correlated with plant root and shoot elongation and increasing plant biomass [67,68]. Ammonia also participates in organic matter decomposition, resulting in higher plant productivity and higher phytoparasite tolerance [67]. However, high ammonia emission by rhizobacteria is toxic for the plant [69], and ammonia production should be considered, instead, as a negative trait, unless it is transformed into NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and then into NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by nitrifying bacteria. Anyway, proteins that allow bacteria to produce ammonia are infrequent in the rhizosphere, or are present in a very low amount, while nitrifying bacteria are usually present in the soil.

The different enzymatic activities of the fourteen actinomycete strains are shown in Table 1. All of the tested strains showed significant enzymatic activities of catalase, cellulase, amylase, proteases, pectinase, lipases, and chitinase by means of in vitro tests (examples of the outcomes of some enzymatic activities tests are shown in Figure 5). These results, although not always directly related to the PGP traits, show some characteristics that can be biotechnologically interesting and of significant commercial value. Among the indirect mechanisms of plant growth promotion, the production of enzymes is a key function in the prevention of plant infection caused by pathogens [70]. The presence of hydrolytic enzymes also plays an important role in soil fertility by degrading complex polysaccharides and proteins into simpler forms. The latter are given back to the soil, increasing its fertility status [50,71]. Catalase, detected in all strains (Table 1), protects cells against oxidative damages caused by reactive oxygen species (ROS) by catalyzing the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen. Catalase confers to the bacterium a good resistance to various environmental mechanical and chemical constraints [64,72], giving an ecological advantage. Amylases are thermostable enzymes that contribute to the degradation of soil organic matter, plant residues, and composting, speeding up the process [71]. Microbial proteases contribute to recycling organic matter in soil and play an important role in the interactions among soil microbial communities through cell wall protein cleavage [73,74]. Pectinases are essential for the decomposition of plant residues, contributing to the recycling of carbon compounds in the soil. Pectinolytic enzymes improve root invasion by bacteria, playing an indispensable role in plant–microbe interactions [75]. Strain G10 is the only one capable of degrading chitin. Chitinases inhibit fungal growth by



hydrolyzing chitin, which is the major component of the fungal cell wall [66]. These enzymes are very important for biotechnological purposes: They are used in the engineering of plants that are resistant to phytopathogens and they can be used also in seed preservation [76]. Lipases are widely distributed among microorganisms and are of great industrial importance [77]; triglyceride hydrolysis can significantly contribute to the composting of sewage sludges [71].



**Figure 5.** Agar-plate-based (90 mm diameter plates) screening carried out for amylase (A), cellulase (B), chitinase (C), lecithinase (D), pectinase (E), and caseinase (F) enzymatic activities.

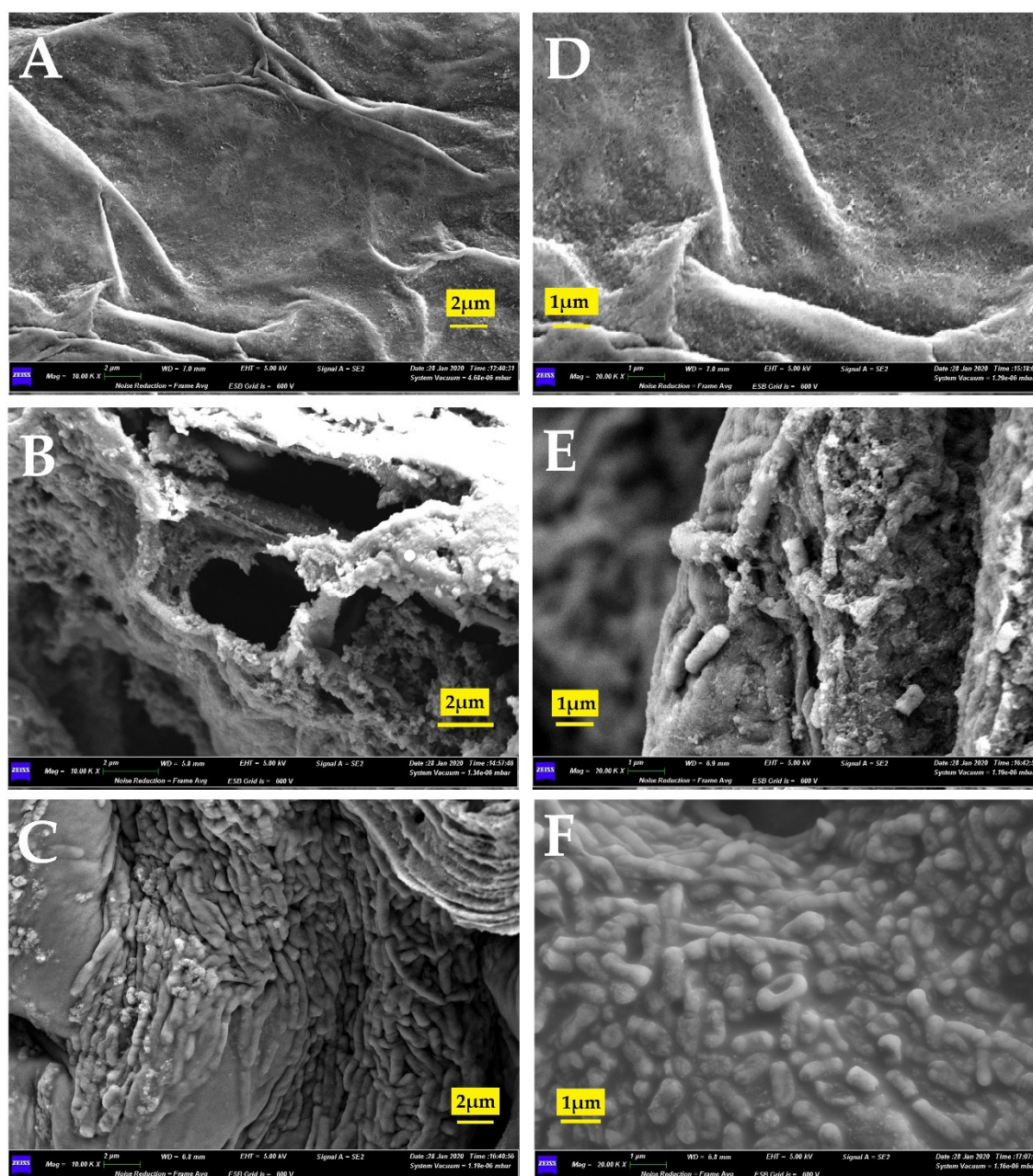
### 3.2. In Vitro Association Study by Scanning Electron Microscopy (SEM)

Bacterial root colonization can be properly analyzed by SEM. This procedure allows the understanding of some ecological aspects of the interactions among bacteria and host plants, as well as rhizocompetence and colonization dynamics inside root tissues.

Association abilities were underlined for all strains by SEM investigation. In Figure 6, one can observe the SEM micrographs of the control roots (not inoculated) together with roots inoculated with G10—*Streptomyces iakyrus* (MG597593)—and H14—*Nocardiopsis aegyptica* (MG597543)—strains. These two strains were chosen over the others, as they recorded the best growth rates during in vitro cultivation of *S. lycopersicum*. In addition, they are representative of the two genera to which the other strains belong.

The control (Figure 6A,D) shows clean surfaces (indicator of aseptic conditions), while the G10 and H14 strains' association on root cell walls was evident at different magnifications (Figure 6B,E and 6C,F, respectively). Seedlings inoculated with strain G10, colonized by clusters of agglomerated spores (Figure 6B,E), showed remarkable growth in comparison with uninoculated controls. In the case of the sample inoculated with strain H14, the presence of spores of various lengths, dispersed along the surfaces of the seedlings (Figure 6C,F), was evident. Our findings are similar to those obtained by Sreevidya and collaborators [62], who reported the ability of four *Streptomyces* strains to grow and adhere to chickpea root surfaces. Regarding *Nocardiopsis*, as far as we know, the present study is the first report describing root association ability in in vitro seedlings. Root association ability is a basic characteristic generally attributed to strains with PGP traits [44,78]. Plant–bacteria associations are facilitated by root exudates (i.e., aromatic and phenolic compounds, sugars, amino acids, organic acids, and carbohydrates), which behave as chemo-attractants for microorganisms,

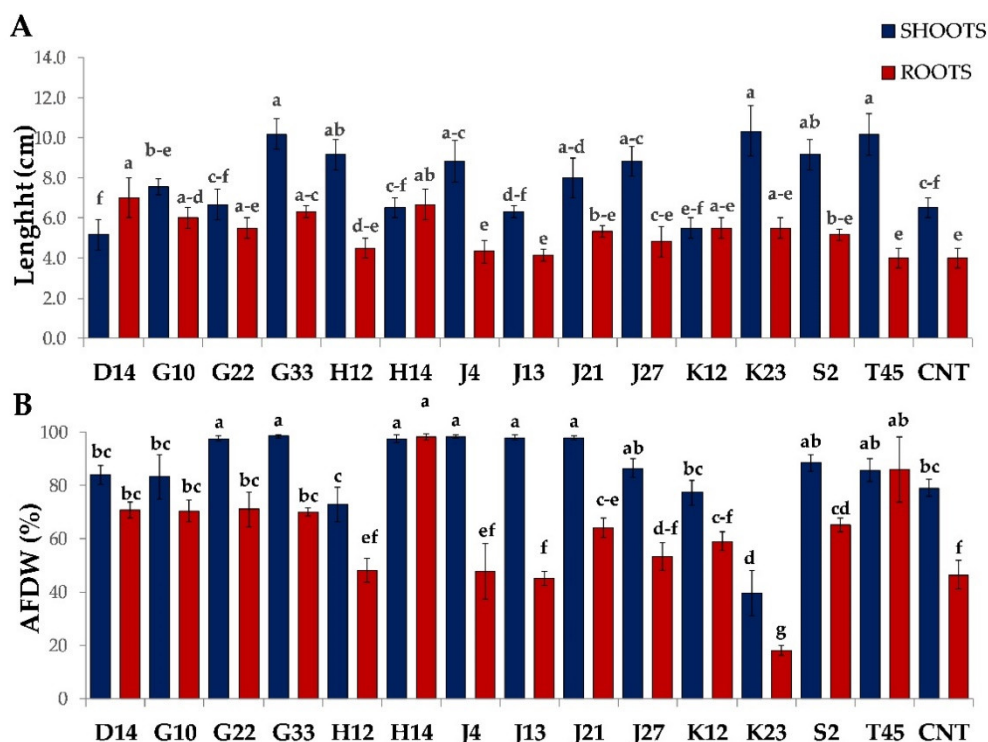
helping in root colonization [62]. Actinomycetes, like other PGPB, have the ability to adhere to plant roots and to produce different compounds that protect the host plant against biotic and abiotic stress [62]. Beyond the production of auxins, gibberellins, and cytokinins [5], which promote plant growth, PGPB release quorum sensing signals. These molecules promote the synthesis of antimicrobial substances that can protect the plant against possible pathogens present in the soil [79].



**Figure 6.** Micrographs under scanning electron microscopy of fresh roots obtained from eight-day seedlings of *Solanum lycopersicum* not inoculated and inoculated with strains G10 and H14. The control sample (A,D) shows clear surfaces at 10K and 20K of magnification. On the contrary, microbial colonization is evident at 10K of magnification in seedlings inoculated with G10 (B) and H14 strains (C). At 20K, G10 (E) and H14 (F) dispersed spores of various lengths.

### 3.3. Greenhouse Experiment on *Solanum Lycopersicum*

Tomato seeds were also inoculated with the different strains in a pot greenhouse experiment, and plants were collected at 40 DAS. The results obtained on shoot and root lengths and AFDW for the inoculated plants (D14–T45) and for the control plants (CNT) are shown in Figure 7.



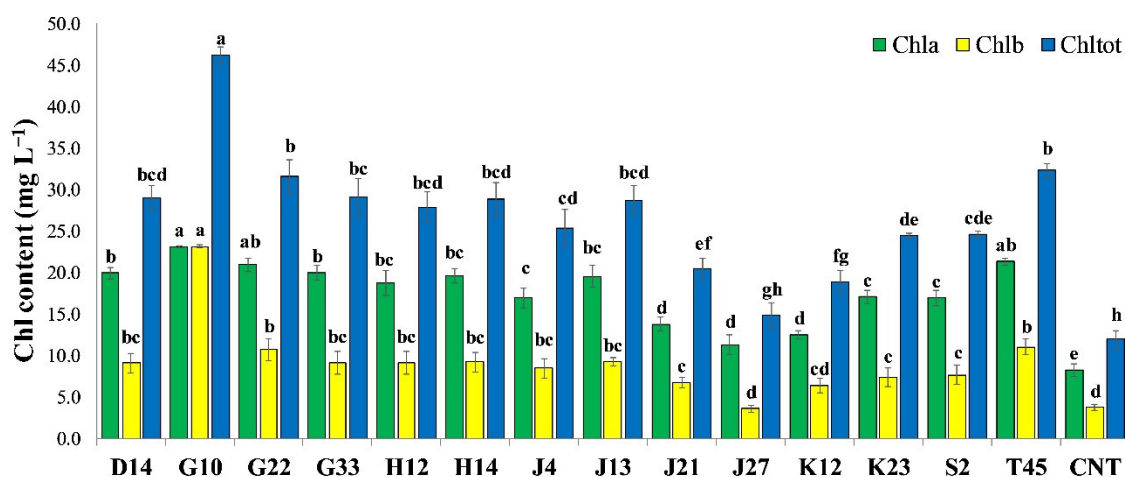
**Figure 7.** Shoot and root length (A), ash-free dry weight (AFDW) (B) of shoots and roots of tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Results followed by same case letters are not significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ).

Inoculation with actinomycete strains showed variable effects on lengths and AFDW of shoots and roots. The stimulation of these parameters was different according to the inoculated strain. Shoot lengths of plants inoculated with K23, G33, T45, H12, and S2 strains recorded the highest values ( $p < 0.05$ ), with a shoot length increase of 51% on average with respect to the control. Regarding shoot AFDW, the highest percentages were recorded for plants inoculated with G33, J4, J21, J13, G22, and H14 strains ( $p < 0.05$ ). Compared to the control, for these samples, the AFDW increased 24% on average. The lowest AFDW percentages were recorded for K23 ( $p < 0.05$ ). Similar trends were underlined by root lengths and AFDW: The best lengths were recorded with strains D14, H14, G33, and G10, and the best AFDW was recorded in plants inoculated with strains H14, T45, G22, D14, G10, G33, S2, and J21 ( $p < 0.05$ ). In these plants, the increase with respect to the control was 63% and 61% for root lengths and AFDW, respectively. For AFDW, plants inoculated with strain K23 recorded, once again, the lowest values ( $p < 0.05$ ).

Plant shoots were also investigated for their chlorophyll a (Chl<sub>a</sub>), chlorophyll b (Chl<sub>b</sub>), and total chlorophyll (Chl<sub>tot</sub>) contents, whose results are shown in Figure 8. Inoculation with actinomycete strains significantly improved shoot chlorophyll contents of inoculated plants with respect to the control ( $p < 0.05$ ). Different results were obtained on chlorophyll contents depending on the inoculated strain. The highest contents ( $p < 0.05$ ) of Chl<sub>a</sub> were observed in samples inoculated with strains G10, T45 and G22 (statistically similar to each other,  $p > 0.05$ ). Strain G10 also significantly improved Chl<sub>b</sub> contents ( $p > 0.05$ ) in the shoot, resulting in higher contents of Chl<sub>tot</sub> compared to the other strains ( $p > 0.05$ ). These findings clearly show that actinomycete inoculation positively affects plant morpho-physiological characteristics. Among the PGP traits previously underlined for these

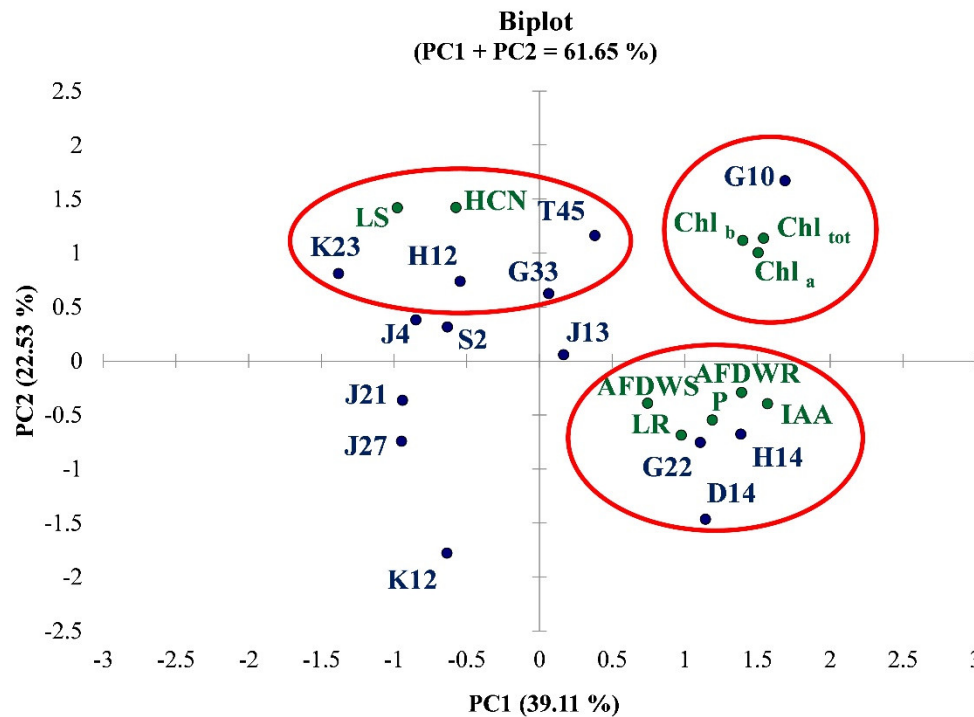
strains, IAA production plays an important role in growth promotion. This hormone is recognized to stimulate cell elongation—with consequent promotion of plant development—and chlorophyll content. Our results are in agreement with what was previously reported by other authors for *Streptomyces*. The study of Sreevidya and collaborators [62], for example, reported that different *Streptomyces* strains increased plant growth parameters of inoculated chickpeas.

Few studies have been directed to the study of *Nocardopsis*, among which the recent work of Patel and Thakker [80] reported positive effects on growth and developmental parameters of pearl millet. As far as we know, the present work is the first that reports the inoculation of *Nocardopsis* on tomato plants.



**Figure 8.** Contents of chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb), and total chlorophyll (Chltot) on *Solanum lycopersicum* not inoculated (CNT) and inoculated with the selected actinomycete strains. Results followed by same case letter are not significantly different according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ).

To explore potential correlations among IAA production, phosphate solubilization, and HCN release traits shown in vitro, as well as the plant growth parameters recorded in the in planta experiment, a dataset was processed by the PCA algorithm. Figure 9 reports the PCA biplot obtained for the different traits and plant growth parameters (loadings) obtained for the fourteen strains (scores). The total variance explained was 61.65%, with the first component (PC1) accounting for 39.11% and the second (PC2) for 22.53%. From the PCA biplot, different groupings based on correlations among traits and parameters are evident. AFDWs of shoots and roots and root length obtained by strains D14, G22, and H14, are correlated with IAA and phosphate solubilization. Chlorophyll contents promoted by the inoculation with the G10 strain are also positively influenced by IAA and phosphate solubilization capability (same positive correlation on PC1), as well as HCN (same positive correlation on PC2). The shoot elongation promoted by strains K23, H12, G33, and T45 is positively correlated with HCN production. These good correlations between in vitro and in planta results demonstrate that our in vitro approach allowed the selection of biostimulant strains that are also effective in natural conditions. As previously discussed, these traits are usually recognized to have positive effects on plant growth and development.



**Figure 9.** Biplot obtained from the PCA on the dataset of *in vitro* and *in planta* results (loadings) recorded for actinomycete strains (scores). In the figure: Chl<sub>a</sub>, chlorophyll a; Chl<sub>b</sub>, chlorophyll b; Chl<sub>tot</sub>, total chlorophyll; HCN, hydrocyanic acid; LS, length of shoots; LR, length of roots; AFDWR, ash-free dry weight of roots; AFDWS, ash-free dry weight of shoots; P, phosphate solubilization; IAA, indole-3-acetic acid.

#### 4. Conclusions

The present study allowed the selection of fourteen PGPB based on their plant-growth-promoting traits among sixty actinomycetes previously isolated in two Algerian sites. The strains G10—*Streptomyces iakyrus* (MG597593)—and H14—*Nocardioopsis aegyptica* (MG597543)—showed the best biostimulation abilities during *in vitro* cultivations of *Solanum lycopersicum*. Observations by scanning electron microscopy underlined the good association capabilities of these strains with seedling roots. Pot greenhouse cultivations of *Solanum lycopersicum* showed that inoculation with the fourteen selected actinomycetes enhanced plant growth, improving its morpho-physiological characteristics. The best *in planta* biostimulant properties were recorded for plants inoculated with strain G33 (*Streptomyces xantholiticus* MG597585), followed by H14, G10, T45 (*Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* MG597502), G22 (*Streptomyces xantholiticus* MG597582), D14 (*Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* MG597514), and J13 (*Streptomyces anulatus* MG597579). The other strains also showed interesting biostimulant properties. Good correlations were recorded among IAA production, phosphate solubilization, and HCN release in *in vitro* results, as well as plant growth and development parameters of samples inoculated with D14, G22, G33, H14, J13, and T45. Further studies should deal with the combination of these strains in consortium, assess their compatibility, and evaluate a possible synergistic effect often described for PGPB consortia. Moreover, their effectiveness should be investigated on different crop plants and under different field conditions. These strains should also be assayed for their salt stress tolerance *in vitro* (e.g., ACC deaminase activity, PGP traits under salt stress) and *in planta* (e.g., plant tolerance induction). Salinity of soils is one of current agriculture problems that negatively affects growth and plant development, limiting the productivity of crops. Among the proposals provided to overcome this problem, there is the use of transgenic plants. However, transgenic plant development is expensive and takes a long time for product validation. A practical alternative to reduce negative effects induced by salinity is the use of PGPB. Among them, salt-halotolerant strains are physiologically adapted to abiotic changes and can

increase the salt tolerance capacity in plants. Thus, given their origin, promising biostimulant properties, and halotolerant traits, our strains could find application in crop cultivation on high-salinity soils. Even so, the present study provides useful information on the utilization of actinomycetal strains as biofertilizers for sustainable agriculture. The growing environmental concern suggests further research and development of these new products, which are relevant to human and planet health. Although there is still more fundamental and applied research to be done, PGPB use rather than use of chemical fertilizers and pesticides—or with a reduced amount of them—can be a successful agricultural practice worldwide that is both efficacious and sustainable.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K.; methodology, conceptualization M.S.; formal analysis, R.D.; investigation, R.D. and M.P.; resources, M.K. and M.D.G.; data curation, R.D. and M.P.; writing—original draft preparation, R.D. and M.P.; writing—review and editing, M.D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria.

**Acknowledgments:** We acknowledge Lorenzo Arrizza for the technical support in the SEM analysis.

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

## References

- Nath, S.; Matozzo, V.; Bhandari, D.; Faggio, C. Growth and liver histology of *Channa punctatus* exposed to a common biofertilizer. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 1591–1598.
- Savci, S. An agricultural pollutant: Chemical fertilizer. *Int. J. Environ. Sci. Dev.* **2012**, *3*, 73.
- Campos, E.V.; Proença, P.L.; Oliveira, J.L.; Bakshi, M.; Abhilash, P.C.; Fraceto, L.F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecol. Indic.* **2019**, *105*, 483–495.
- Mia, M.B.; Shamsuddin, Z.H.; Mahmood, M. Use of plant growth promoting bacteria in banana: A new insight for sustainable banana production. *Int. J. Agric. Biol.* **2010**, *12*, 459–467.
- Gamez, R.; Cardinale, M.; Montes, M.; Ramirez, S.; Schnell, S.; Rodriguez, F. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiol. Res.* **2019**, *220*, 12–20.
- Wu, S.C.; Cao, Z.H.; Li, Z.G.; Cheung, K.C.; Wong, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma* **2005**, *125*, 155–166.
- Gupta, G.; Parihar, S.S.; Ahirwar, N.K.; Snehi, S.K.; Singh, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2015**, *7*, 096–102.
- Shilev, S. Soil rhizobacteria regulating the uptake of nutrients and undesirable elements by plants. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*; Springer: New Delhi, India, 2013; pp. 147–167.
- Bhattacharyya, P.N.; Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1327–1350.
- Glick, B.R.; Bashan, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* **1997**, *15*, 353–378.
- Kyaw, E.P.; Soe, M.M.; San San Yu, Z.K.L.; Lynn, T.M. Study on plant growth promoting activities of *Azotobacter* isolates for sustainable agriculture in Myanmar. *J. Biotech. Biores.* **2019**, *1*, JBB.000524.
- Ivushkin, K.; Bartholomeus, H.; Bregt, A.K.; Pulatov, A.; Franceschini, M.H.D.; Kramer, H.; van Loo, E.N.; Jaramillo Roman, V.; Finkers, R. UAV based soil salinity assessment of cropland. *Geoderma* **2019**, *338*, 502–512, doi:10.1016/j.geoderma.2018.09.046.
- Zanetti, F.; Zegada-Lizarazu, W.; Lambertini, C.; Monti, A. Salinity effects on germination, seedlings and full-grown plants of upland and lowland switchgrass cultivars. *Biomass Bioenergy* **2019**, *120*, 273–280, doi:10.1016/j.biombioe.2018.11.031.
- Egamberdieva, D.; Wirth, S.; Bellingrath-Kimura, S.D.; Mishra, J.; Arora, N.K. Salt-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Enhancing Crop Productivity of Saline Soils. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2791, doi:10.3389/fmicb.2019.02791.

15. Pace, L.; Pellegrini, M.; Palmieri, S.; Rocchi, R.; Lipa, L.; Del Gallo, M. Plant growth-promoting rhizobacteria for In Vitro and Ex Vitro performance enhancement of Apennines' genepi (*Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*), an endangered phytotherapeutic plant. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **2020**, *56*, 134–142.
16. Olanrewaju, O.S.; Babalola, O.O. *Streptomyces*: Implications and interactions in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1179–1188.
17. Toumatia, O.; Yekkour, A.; Goudjal, Y.; Riba, A.; Coppel, Y.; Mathieu, F.; Sabaou, N.; Zitouni, A. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J. Basic Microbiol.* **2015**, *55*, 221–228.
18. Olanrewaju, O.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 197.
19. Goudjal, Y.; Toumatia, O.; Yekkour, A.; Sabaou, N.; Mathieu, F.; Zitouni, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 59–65.
20. Jog, R.; Nareshkumar, G.; Rajkumar, S. Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria*; Springer: Singapore, Singapore, 2016; pp. 33–45.
21. Wahyudi, A.T.; Priyanto, J.A.; Afrista, R.; Kurniati, D.; Astuti, R.I.; Akhdiya, A. Plant growth promoting activity of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere. *Online J. Biol. Sci.* **2019**, *19*, 1–8.
22. Jog, R.; Pandya, M.; Nareshkumar, G.; Rajkumar, S. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology* **2014**, *160*, 778–788.
23. Boukaya, N.; Goudjal, Y.; Zamoum, M.; Chaabane Chaouch, F.; Sabaou, N.; Mathieu, F.; Zitouni, A. Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterisation of *Streptosporangium becharense* SG1 as a promising biocontrol agent. *Biocontrol Sci. Technol.* **2018**, *28*, 858–873.
24. Chen, W.; Xie, T.-T.; Zeng, H. Formation, antibiotic resistance, and control strategies of *Staphylococcus epidermidis* biofilm. In *Bacterial Biofilms*; IntechOpen: London, UK, 2019.
25. Smati, M.; Kitouni, M. Diversity of actinobacteria in the marshes of Ezzemoul and Djendli in northeastern Algeria. *Eur. J. Ecol.* **2019**, *5*, 41–53.
26. Nautiyal, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 265–270.
27. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* **1948**, *17*, 362–370.
28. Hafsa, C.S.; Allaoua, S.; Mostefa, G.; Bilal, Y.; Fouzia, A. Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 4562–4571.
29. Olsen, S.R.; Sommers, L.E.; Page, A.L. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis*, 2nd ed.; Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds; American Society of Agronomy: Madison, WI, USA, 1982; pp. 403–430.
30. Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* **1951**, *26*, 192.
31. Fatmawati, U.; Meryandini, A.; Nawangsih, A.A.; Wahyudi, A.T. Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. *Biodivers. J. Biol. Divers.* **2019**, *20*, 2970–2977.
32. Donate-Correa, J.; León-Barrios, M.; Pérez-Galdona, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil* **2005**, *266*, 261–272.
33. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. *Microbiology—A Laboratory Manual*; The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.: Menlo Park, CA, USA, 1992; pp. 188–247.
34. Pranay, K.; Padmadeo, S.R.; Jha, V.; Prasad, B. Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. *J. Appl. Biol. Biotech.* **2019**, *7*, 57–62.
35. Chaiham, M.; Chunhaleuchanon, S.; Kozo, A.; Lumyong, S. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *Curr. Appl. Sci. Technol.* **2008**, *8*, 18–23.
36. Raval, K.M.; Vaswani, P.S.; Majumder, D.R. Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int. J. Sci. Res.* **2012**, *2*, 2250–3153.
37. Nonomura, H. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **1974**, *52*, 78–92.

38. Prasad, P.; Bedi, S.; Singh, T. In Vitro cellulose rich organic material degradation by cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Malays. J. Microbiol.* **2012**, *8*, 164–169.
39. Dellaras, C. *Pratique en Microbiologie de Laboratoire? Recherche de Bactéries et de Levures-Moisissures*; Lavoisier: Paris, France, 2014; pp. 65–120.
40. Nitsch, B.; Kutzner, H.J. Egg-yolk agar as a diagnostic medium for *Streptomyces*. *Experientia* **1969**, *25*, 220–221.
41. Hankin, L.; Zucker, M.; Sands, D.C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1971**, *22*, 205–209.
42. Pagnani, G.; Galièni, A.; Stagnari, F.; Pellegrini, M.; Del Gallo, M.; Pisante, M. Open field inoculation with PGPR as a strategy to manage fertilization of ancient *Triticum* genotypes. *Biol. Fertil. Soils* **2020**, *56*, 111–124.
43. Pagnani, G.; Pellegrini, M.; Galièni, A.; D’Egidio, S.; Matteucci, F.; Ricci, A.; Stagnari, F.; Sergi, M.; Sterzo, C.L.; Pisante, M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* ‘Finola’ cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 75–83.
44. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497.
45. Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B. Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2016**, *10*, 387–399.
46. Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **1949**, *24*, 1–15.
47. Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M.X.; Barea, J.-M. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, *45*, 209–217.
48. Kaur, T.; Sharma, D.; Kaur, A.; Manhas, R.K. Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2013**, *46*, 1756–1768.
49. Gangwar, M.; Dogra, S.; Gupta, U.P.; Kharwar, R.N. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2014**, *8*, 184–191.
50. Sebihi, F.Z.; Benguedouar, A.; Benhizia, Y.; Sanchez, J.; Gallego, E. Evaluation of multi-trait plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* isolated from Constantine Wheat rhizosphere soil (Algeria) and screening there antifungal activity against two species of *Fusarium*. *Adv. Environ. Biol.* **2016**, *10*, 102–116.
51. Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahmad, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J., Eds; Springer: Cham, Switzerland, 2014; pp. 31–62.
52. Faried, A.-S.M. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Actinomycetes from Rhizosphere Soil. Ph.D. Thesis, Fac of Agric, Assiut University, Assiut, Egypt, 2019.
53. Ahmad, F.; Ahmad, I.; KHAN, M.S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* **2005**, *29*, 29–34.
54. Radwan, T.E.-S.E.-D.; Mohamed, Z.K.; Reis, V. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis* **2002**, *32*, 39–54.
55. Barazani, O.Z.; Friedman, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2397–2406.
56. Silini, A. Effets des Molécules Osmoprotectrices sur la Survie et L’activité de *Azotobacter* et sur la Croissance du blé dur en Milieu Salin. Ph.D. Thesis, Université Ferhat Abbas de Sétif, Sétif, Algeria, 2013.
57. Glick, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 109–117.
58. Dastager, S.G.; Deepa, C.K.; Pandey, A. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 259–265.
59. Patten, C.L.; Glick, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3795–3801.
60. Mirza, M.S.; Ahmad, W.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand, P.; Malik, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane In Vitro. *Plant Soil* **2001**, *237*, 47–54.
61. Ashwini, M.; Doddamani, L.C.; Babar, S.R. Characterization and evaluation of actinomycete isolates for traits associated with plant growth promotion. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2018**, *7*, 1177–1180.



62. Sreevidya, M.; Gopalakrishnan, S.; Kudapa, H.; Varshney, R.K. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 85–95.
63. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 173–181.
64. Kumar, A.; Kumar, A.; Devi, S.; Patil, S.; Payal, C.; Negi, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: An In Vitro study. *Recent Res. Sci. Technol.* **2012**, *4*, 1–5.
65. Bashan, Y.; De-Bashan, L.E. Bacteria/Plant growth-promotion. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*; Hillel, D., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2005; Volume 1, pp. 103–115.
66. Joseph, B.; Ranjan Patra, R.; Lawrence, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* **2012**, *1*, 141–152.
67. Mota, M.S.; Gomes, C.B.; Souza Júnior, I.T.; Moura, A.B. Bacterial selection for biological control of plant disease: Criterion determination and validation. *Braz. J. Microbiol.* **2017**, *48*, 62–70.
68. Passari, A.K.; Mishra, V.K.; Gupta, V.K.; Yadav, M.K.; Saikia, R.; Singh, B.P. In Vitro and In Vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139468.
69. Weise, T.; Kai, M.; Piechulla, B. Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63538.
70. Reetha, S.; Selvakumar, G.; Bhuvanewari, G.; Thamizhiniyan, P.; Ravimycin, T. Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Int. Lett. Nat. Sci.* **2014**, *13*, 75–80.
71. Turan, M.; Nikerel, E.; Kaya, K.; Kitir, N.; Gunes, A.; Mokhtari, N.E.P.; Tüfenkçi, Ş.; Karaman, M.R.; Çimrin, K.M. Enzyme Dynamic in Plant Nutrition Uptake and Plant Nutrition. In *Enzyme Inhibitors and Activators*; Senturk, M., Ed.; Inctechopen: London, UK, 2017; pp. 225–242.
72. Mushtaq, S.; Shafiq, M.; Ashraf, T.; Haider, M.S.; Ashfaq, M.; Ali, M. Characterization of plant growth promoting activities of bacterial endophytes and their antibacterial potential isolated from citrus. *J. Anim. Plant Sci.* **2019**, *29*, 978–991.
73. Vranova, V.; Rejsek, K.; Formanek, P. Proteolytic activity in soil: A review. *Appl. Soil Ecol.* **2013**, *70*, 23–32.
74. Stach, N.; Kaszycki, P.; Władzyka, B.; Dubin, G. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. In *Pet-to-Man Travelling Staphylococci*; Savini, V., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 135–145.
75. Vardharajula, S.; SkZ, A.; Shiva Krishna Prasad Vurukonda, S.; Shrivastava, M. Plant growth promoting endophytes and their interaction with plants to alleviate abiotic stress. *Curr. Biotechnol.* **2017**, *6*, 252–263.
76. Islam, R.; Datta, B. Diversity of chitinases and their industrial potential. *Int. J. Appl. Res.* **2015**, *1*, 55–60.
77. Pascoal, A.; Estevinho, L.M.; Martins, I.M.; Choupina, A.B. Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2018**, *104*, 119–126.
78. Dal Cortivo, C.; Barion, G.; Visioli, G.; Mattarozzi, M.; Mosca, G.; Vamerali, T. Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2017**, *247*, 396–408.
79. Primo, E.D.; Ruiz, F.; Masciarelli, O.; Giordano, W. Biofilm formation and biosurfactant activity in plant-associated bacteria. In *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*; Maheshwari, D., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; Volume 12, pp. 337–349.
80. Patel, K.B.; Thakker, J.N. Growth promotion and biocontrol activity of *Nocardiopsis dassonvillei* strain YM12: An isolate from coastal agricultural land of Khambhat. *Vegetos* **2019**, *32*, 571–582.





## Article

# Characterization of Plant Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Triticum durum* of Actinomycetes Isolates under Salt Stress Conditions

Rihab Djebaili <sup>1,2</sup> , Marika Pellegrini <sup>2,\*</sup> , Massimiliano Rossi <sup>3</sup> , Cinzia Forni <sup>3</sup> , Maria Smati <sup>1</sup>, Maddalena Del Gallo <sup>2,\*</sup> and Mahmoud Kitouni <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Microbiological Engineering and Applications, Chaâbat Erssas Campus, University of Brothers Mentouri Constantine 1, Ain El Bey Road, 25000 Constantine, Algeria; djebaili.rihab@umc.edu.dz (R.D.); mariasmati87@gmail.com (M.S.); mahmoudkitouni@yahoo.fr (M.K.)
- <sup>2</sup> Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, Coppito, 67010 L'Aquila, Italy
- <sup>3</sup> Department of Biology, University of Rome "TorVergata", 00133 Roma, Italy; massimiliano87rossi@hotmail.com (M.R.); forni@uniroma2.it (C.F.)
- \* Correspondence: marika.pellegrini@univaq.it (M.P.); maddalena.delgallo@univaq.it (M.D.G.)

**Abstract:** This study aimed to characterize the halotolerant capability, in vitro, of selected actinomycetes strains and to evaluate their competence in promoting halo stress tolerance in durum wheat in a greenhouse experiment. Fourteen isolates were tested for phosphate solubilization, indole acetic acid, hydrocyanic acid, and ammonia production under different salt concentrations (i.e., 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5 M NaCl). The presence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity was also investigated. Salinity tolerance was evaluated in durum wheat through plant growth and development parameters: shoot and root length, dry and ash-free dry weight, and the total chlorophyll content, as well as proline accumulation. In vitro assays have shown that the strains can solubilize inorganic phosphate and produce indole acetic acid, hydrocyanic acid, and ammonia under different salt concentrations. Most of the strains (86%) had 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity, with significant amounts of  $\alpha$ -ketobutyric acid. In the greenhouse experiment, inoculation with actinomycetes strains improved the morpho-biochemical parameters of durum wheat plants, which also recorded significantly higher content of chlorophylls and proline than those uninoculated, both under normal and stressed conditions. Our results suggest that inoculation of halotolerant actinomycetes can mitigate the negative effects of salt stress and allow normal growth and development of durum wheat plants.

**Keywords:** PGPB; actinomycetes; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase; durum wheat; salt stress; halotolerance



**Citation:** Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Rossi, M.; Forni, C.; Smati, M.; Del Gallo, M.; Kitouni, M. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Triticum durum* of Actinomycetes Isolates under Salt Stress Conditions. *Soil Syst.* **2021**, *5*, 26. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5020026>

Academic Editor: Holger Heuer

Received: 3 March 2021

Accepted: 8 April 2021

Published: 10 April 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Agriculture is affected by climate change, excessive uses of chemicals, exploitation of groundwater in areas close to the sea, and insufficient drainage, which increased soil exposure to salt stress [1]. Salinity is a major problem affecting agricultural productivity, especially in arid and semi-arid soils [1–5]. Salinity degrades soil fertility and interferes with the normal development of plants, severely affecting crop productivity [3,6,7]. High salt concentration affects plant growth also by disturbing physiological and biochemical functioning [8]. The decrease in the acquisition of nutrients and the accumulation of Na<sup>+</sup> ions [9] causes osmotic stress and closure of the stomata, which reduces the leaf water level and alters CO<sub>2</sub> uptake and photosynthesis [4,10]. Salinity affects plant organization and the various plant organs; causes turgor loss and membrane dysfunction, which consequently lead to ionic toxicity and cellular dehydration [3,5]. Furthermore, the decrease in water

status due to salinity alters photosynthesis causing the generation of reactive oxygen species (ROS) [11,12].

Plant-microorganisms associations help plants overcome various environmental stresses [13] and are essential for maintaining soil health [3]. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are recognized as active against the negative effects of environmental stress, thanks to the induced systemic tolerance (IST) [3,14–16]. The IST mechanisms induced by PGPB includes [1,17,18]: solubilization of nutrients; activation of stress-responsive genes; regulation of phytohormone synthesis (e.g., 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity); promotion of antioxidant defenses; regulation of osmotic balance (e.g., proline accumulation), turgor pressure, ion homeostasis, and production of volatile organic compounds. Moreover, halophilic/halotolerant PGPB can survive in the presence of high salt concentrations [19]. Halophily/halotolerance and IST mechanisms induced by PGPB allow plants to survive under high salt concentrations [2,19–23].

Several studies have demonstrated the role of PGPB in salt stress mitigation, mainly in *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. strains [24–26]. However, studies on the halophilic/halotolerant microbiota are still needed to provide new perspectives in the design of bioformulations useful in agriculture [26]. Several studies have demonstrated that Actinobacteria are one of the most common class found in saline soils [27,28].

Our previous studies have shown that several actinomycetes isolated from Algerian saline soils (salt tolerance up to 10% (i.e., 1.7 M)) [29] have good in vitro and in planta (*Solanum lycopersicum* L.) plant growth-promoting (PGP) traits under normal conditions [30]. In this study, we advanced the hypothesis that these strains could be valid agents to salt stress tolerance. To test this hypothesis, we evaluated halotolerance traits in vitro with different PGP activities (i.e., phosphate solubilization, indole acetic acid production, hydrocyanic acid, and ammonia production under saline stress and ACC deaminase activity). Then, a greenhouse experiment was carried out in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) to evaluate the inoculation effects on plant growth and in the mitigation of salt stress.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Actinomycetes Strains

The actinomycetes strains were isolated from two saline sites in the northeast region of Algeria, Ezzemoul sebka—35°53'14" North; 06°30'20" East; pH 8.6; EC (electrical conductivity) 1600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; organic matter 6.0%; moisture and organic matter 6.0%; sand 52.8%; slit 22.4%; clay 24.8%—and Djendli sebka—35°43'15" North; 06°32'23" East; pH 8.0; EC 1101  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; organic matter 6.2%; moisture and organic matter 5.8%, sand 31.0%; slit 32.7%; clay 36.3% [29,30]. The soil samples were taken according to the Pochon and Tardieux method [31]. Briefly, the samples were taken by removing the first five centimeters of the top soil layer. Then, around 100 g of soil from the underlying layer were taken and transported into sterile tubes to the laboratory [31].

The spore production of each strain was obtained by cultivation on the International Streptomyces Project-2 (ISP-2) agar medium at 30 °C for 7 days. The spore suspensions were prepared by adding sterile distilled water into the plates; the mixtures were filtrated through a syringe containing hydrophilic cotton to eliminate the mycelia. Spore concentrations were adjusted spectrophotometrically to a final density of  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . The spore suspensions were utilized differently, depending on the test carried out (descriptions given in each paragraph).

### 2.2. Estimation of PGP Traits under Salt Stress

The actinomycetes strains were studied for different PGP traits with the addition of various salt concentrations (i.e., 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5 M NaCl); phosphate solubilization, indole acetic acid (IAA), hydrocyanic acid (HCN), and ammonia ( $\text{NH}_3$ ) production. Based on PGP test carried out, different procedures and media were utilized.

### 2.2.1. Hydrocyanic Acid and Ammonia Production

The cyanogenic activity was detected on Trypticase Soy Agar medium (TSA) added with glycine ( $4.4 \text{ g L}^{-1}$ ). A Whatman paper was soaked in a solution of picric acid (0.5%) and sodium carbonate (2%) and was placed on the lid of each inoculated plate. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at  $30^\circ \text{C}$  for 7 days. After incubation, a change in the Whatman paper's color to orange or brown is considered as a positive result [32]. The ammonia production ( $\text{NH}_3$ ) was evaluated in peptone water, change of color from yellow to brown after addition of Nessler's reagent has been marked as a positive result [33].

### 2.2.2. Phosphate Solubilization Ability

Phosphate solubilization was evaluated on 5 mL of Pikovskaya (PVK) liquid medium [34], inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of each spore suspension of the different actinomycetes strains. Broth cultures were kept growing at  $30^\circ$  for 7 days with moderate agitation (150 rpm). The quantification of soluble phosphorus was determined according to the Olsen and Sommers method [35] and the results were expressed as  $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ .

### 2.2.3. Production of Indole-3-Acetic Acid

For IAA production, the spore suspension of each strain (100  $\mu\text{L}$ ) was inoculated in 5 mL of the National Botanical Research Institutes' phosphate growth medium (NBRIP) supplemented with tryptophan (0.2%) [36–40]. The broth cultures were kept to grow at  $30^\circ \text{C}$  for 7 days at 150 rpm. After incubation, the cultures were centrifuged at 3000 rpm for 20 min, then 1 mL of the clear supernatant was mixed with 4 mL of the Salkowski reagent [41]. The mixture was incubated at  $37^\circ \text{C}$  for 30 min in the dark and optical density was read at 530 nm (SPEKOL 1300 UV VIS spectrophotometer, Analytik Jena, Jena, Germany). IAA (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as standard ( $y = 0.0089x + 0.0113$ ;  $R^2 = 0.9975$ ) and results were expressed as  $\mu\text{g IAA mL}^{-1}$ .

### 2.3. Estimation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Activity

The estimation of ACC deaminase activity was carried out following the procedure described by Brígido et al. [42]; 200  $\mu\text{L}$  of each spore suspension was inoculated in 15 mL of ISP-2 liquid medium and incubated for 3 days at  $30^\circ \text{C}$  with shaking (200 rpm). The cultures were then centrifuged and washed twice with 10 mL of DF (Dworkin and Foster) salts minimum medium without a nitrogen source [43]. Cell pellets were resuspended in 15 mL of minimum DF salt medium with 3 mM of ACC and incubated for 3 days at  $30^\circ \text{C}$  with shaking, followed by centrifugation and washing step with 5 mL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6). The cell suspensions were transferred into 1.5 mL microcentrifuge tubes, the supernatant was removed after centrifugation at  $10,000 \times g$  for 1 min and the cell pellet was used for enzymatic activity test. The pellet of the different actinomycetes strains was resuspended in 400  $\mu\text{L}$  of 0.1 M Tris—HCl (pH 8.0) with 20  $\mu\text{L}$  of toluene. Moreover, 50  $\mu\text{L}$  of cell lysate from each strain was distributed in each of three microtubes, where 5  $\mu\text{L}$  of ACC (0.5 M) was added in two tubes, while the third tube served as a negative control. Another negative control was also prepared to contain 50  $\mu\text{L}$  of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) and 5  $\mu\text{L}$  of 0.5 M ACC. After adding the ACC, the cell suspensions were vortexed for 5 s, after that, all the tubes were incubated at  $30^\circ \text{C}$  for 30 min. After the incubation, 500  $\mu\text{L}$  of 0.56 M HCl was added to each tube then vortexed for 5 s. The cells were centrifuged for 5 min at  $10,000 \times g$  at room temperature. The solution of  $\alpha$ -ketobutyrate (Sigma) in 0.1 M TRIS-HCl (pH 8.0) was used as standard. Absorbances of the reaction mixtures were detected at 540 nm (Cary Bio 50 UV VIS spectrophotometer, Varian, Palo Alto, CA, USA). The ACC deaminase activity of the strains was determined with a calibration curve of  $\alpha$ -ketobutyrate (5, 10, 15, 20, and 25  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ). ACC deaminase activity of the strains was expressed as  $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ . Protein content was estimated according to the Bradford method [44] using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. A

calibration curve with BSA (1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used to determine the total protein concentration of the extracts.

#### 2.4. Greenhouse Experiment on *Triticum durum*

The experiment was carried on durum wheat (*Triticum durum*) of the Cirta R1 variety, with susceptibilities to abiotic stresses comparable to other *Triticum durum* parental genotypes [45–47]. To obtain optimal germination rate, the seeds were kept in sterile distilled water for 24 h. The seeds were surface sterilized with a 20% (*v/v*) sodium hypochlorite solution washed several times with sterile distilled water [5] and left to dry in sterile conditions for 3 h. The inoculation was carried out by immersing the seeds in spore suspensions ( $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) of the different isolates for 1 h with moderate agitation; seeds dipped in sterile distilled water were used as control (uninoculated) [30]. The experiment was performed as follows: CNT (without PGPB and with/without salt stress), PGPB (with PGPB and with/without salt stress). The inoculated and not-inoculated seeds were sown in pots with three seeds per pot ( $\phi = 10$  cm), on which the inner surface was disinfected with ethanol (70%), filled with autoclaved soil (pH 8.27, electrical conductivity  $332 \mu\text{S cm}^{-1}$ , 5% organic matter, humidity rate 0.7%) grown in natural light conditions and irrigated with tap water for 10 days. Each experimental unit consisted of five replications. The plants were then irrigated twice a week with NaCl solution at increasing concentrations 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5 M during 4 weeks. Not salt stressed plants (0 M NaCl  $\text{L}^{-1}$ ) were irrigated with tap water only [4]. Forty days after sowing (DAS), roots and shoots were collected separately. Shoots and roots lengths (by ruler), fresh weight (FW), dry weight (oven drying at  $105^\circ\text{C}$  for 48 h), and ash-free dry weight (AFDW) were determined [30].

##### 2.4.1. Chlorophyll Measurement

Chlorophyll a ( $\text{Chl}_a$ ), chlorophyll b ( $\text{Chl}_b$ ), and total chlorophyll ( $\text{Chl}_{\text{tot}}$ ) contents were detected after 40 DAS as described by Arnon [48]. Briefly, 0.5 g of plant leaves or stem tissues from each sample were finely cut and homogenized in 10 mL of 80% acetone and stored at  $-10^\circ\text{C}$  overnight in the dark, after centrifugation at 14,000 rpm for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 663 and 645 nm (SPEKOL 1300 UV VIS spectrophotometer, Analytik Jena) to determine chlorophyll a ( $\text{Chl}_a$ ) and b ( $\text{Chl}_b$ ) and total ( $\text{Chl}_{\text{tot}}$ ) following the Equations (1)–(3).

$$\text{Chl}_a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 12.41 \text{ (OD 663)} - 2.59 \text{ (OD 645)} \quad (1)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 22.9 \text{ (OD 645)} - 4.68 \text{ (OD 663)} \quad (2)$$

$$\text{Chl}_{\text{tot}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad (3)$$

Results were expressed as  $\text{mg } 100 \text{ g FW}^{-1}$ . The Chl a: Chl b ratio was calculated to observe the stress effects on this parameter.

##### 2.4.2. Proline Determination

Proline content was detected in fresh leaves after 40 DAS according to the method described by Naidu et al. [49]. Briefly, 0.5 g of the leaves were transferred to tubes containing 5 mL of a methanol:chloroform:distilled water (60:25:15) mixture. The tubes were heated at  $60^\circ\text{C}$  for 2 min and the mixtures were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. To the supernatant (1 mL) was added 4 mL of ninhydrin solution, 4 mL of glacial acetic acid, and 1 mL of distilled water. Then, the mixture was heated at  $90^\circ\text{C}$  for 45 min, cooled to room temperature and absorbance was determined at 520 nm (SPEKOL 1300 UV VIS spectrophotometer, Analytik Jena). Proline (Sigma) was used as reference standard ( $y = 0.0314x + 0.0409$ ;  $R^2 = 0.9993$ ) and the results were expressed as  $\mu\text{g proline g fresh weight}^{-1}$  ( $\mu\text{g Pro g FW}^{-1}$ ).

## 2.5. Statistical Analysis

All data obtained are the means of three replicates. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Separation of the means was carried out with a Tukey's post-hoc test with a probability level of 5%. Data of in vitro and in planta experiments were processed by the Principal Component Analysis (PCA) algorithm. All statistical calculations were carried out using Statistica 10.0 software (Dell Software, Round Rock, TX, USA) and XLSTAT 2014 software (Addinsoft, Paris, France).

## 3. Results

### 3.1. Actinomycetes Strains

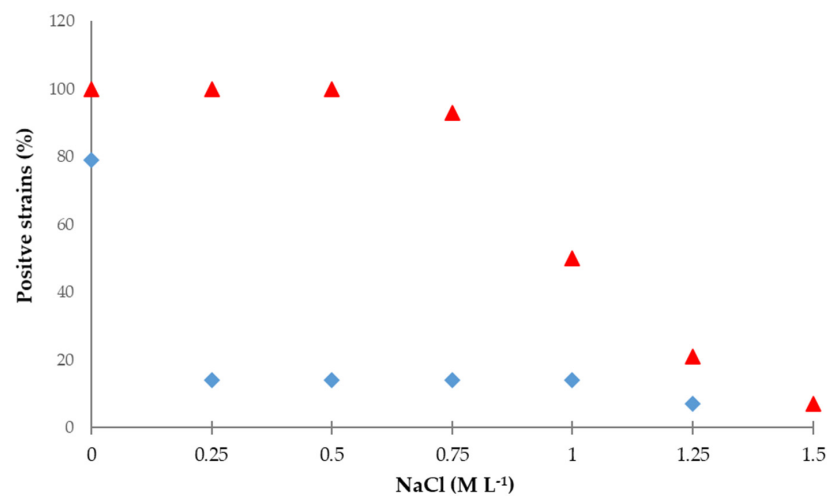
Fourteen strains of the genus *Streptomyces* and *Nocardioopsis* were investigated for this study.

- *Nocardioopsis aegyptica* (MG597543)—H14;
- *Nocardioopsis aegyptica* (MG597572)—S2;
- *Nocardioopsis alba* (MG597576)—J21;
- *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (MG597514)—D14;
- *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (MG597502)—T45.
- *Streptomyces albidoflavus* (MG597552)—H12;
- *Streptomyces ambofaciens* (MG597599)—J27;
- *Streptomyces anulatus* (MG597579)—J13;
- *Streptomyces iakyrus* (MG597593)—G10;
- *Streptomyces thinghirensis* (MG597560)—K23;
- *Streptomyces thinghirensis* (MG597590)—J4;
- *Streptomyces xantholiticus* (MG597545)—K12;
- *Streptomyces xantholiticus* (MG597582)—G22;
- *Streptomyces xantholiticus* (MG597585)—G33;

### 3.2. Hydrocyanic Acid and Ammonia Production under Salt Stress

The ability of actinomycetes strains to produce HCN without and under different salt concentrations is shown in Figure 1. In the absence of NaCl, only two strains of *S. xantholiticus* (K12 and G22) and strain of *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 did not produce HCN. HCN production is negatively affected by the addition of NaCl in the medium, even at low concentrations. Except for two strains of *N. aegyptica* (S2 and H14), at 0.25 M NaCl all strains lost their ability to produce this volatile compound. However, strains S2 and H14 retain their ability to produce HCN up to 1 M NaCl and 1.25 M NaCl, respectively.

In Figure 1, the ability of actinomycetes strains to produce NH<sub>3</sub> at different salt concentrations is shown. All strains shared the ability to produce NH<sub>3</sub> in the absence of NaCl and up to 0.5 M NaCl. At 0.75 M NaCl, only strain *S. anulatus* J13 was negatively affected. At higher salt concentrations, different behaviors were observed, depending on the strain. At 1 M NaCl, 50% of the strains retain their ability to produce NH<sub>3</sub>: strains *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. xantholiticus* G22, *S. albidoflavus* H12, *N. aegyptica* H14, *S. thinghirensis* J4, *N. alba* J21, and *S. thinghirensis* K23. At 1.25 M NaCl, strains *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. albidoflavus* H12, and *N. aegyptica* H14 were the only NH<sub>3</sub> producers. At 1.5 M NaCl, only *N. aegyptica* strain H14 was able to produce it.



**Figure 1.** Hydrocyanic acid (HCN, in blue) and ammonia (NH<sub>3</sub>, in red) production by the strains under different NaCl concentrations.

### 3.3. Phosphate Solubilization under Salt Stress

In Table 1, the concentrations of phosphorus solubilized by the strains grown in the different conditions are shown. All strains showed a different capability to solubilize phosphate on PVK liquid medium without NaCl. Best solubilization rate was observed for strain *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, followed by strains *S. xantholiticus* G22 and *N. aegyptica* H14 ( $p < 0.05$ ). The lowest solubilization ( $p < 0.05$ ) was observed for strain *S. anulatus* J13. For almost all strains, the presence of NaCl in the medium negatively affected the amount of phosphorus solubilization. Conversely, for strains *S. xantholiticus* G33, *S. thinghirensis* J4, *S. anulatus* J13, and *S. xantholiticus* K12, the best values were observed in the presence of NaCl. *S. xantholiticus* G33 showed highest solubilization rate ( $p < 0.05$ ) at 1.5 M NaCl; *S. thinghirensis* J4 at 1 M NaCl; and *S. anulatus* J13 and *S. xantholiticus* K12 at 0.25 M NaCl. Besides *S. xantholiticus* G33, *S. anulatus* J13 and *N. aegyptica* S2 strains also showed considerable concentrations of solubilized phosphorus at 1.5 M NaCl L<sup>-1</sup>. While in strains *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *S. iakyryus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. albidoflavus* H12, *N. aegyptica* H14, *N. alba* J21, *S. ambofaciens* J27 and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45, a solubilization capability decreased by  $\geq 50\%$  ( $p < 0.05$ ) at 1.5 M NaCl. However, for these strains, a good solubilization activity was kept.

### 3.4. Indole Acetic Acid Production under Salt Stress

In Table 2, the concentrations of IAA produced by the different strains not exposed and exposed to salt are shown. In the absence of salt stress, nine strains could produce IAA. Different behavior was detected among the strains, i.e., some strains (*S. thinghirensis* K23 and *N. aegyptica* S2) did not produce IAA in the conditions tested; strain *S. xantholiticus* G33 produced IAA only without salt and other strains (*S. albidoflavus* H12, *S. thinghirensis* J4, and *N. alba* J21) synthesized IAA only in the presence of NaCl. *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 and *N. aegyptica* H14 produced IAA even with up to 0.25 and 0.75 M NaCl, respectively. However, in the latter strains, the presence of salt decreased IAA production. *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45—that tolerates salinity up to 1.25 M NaCl and up to 0.5 M NaCl—was able to produce IAA amounts similar ( $p > 0.05$ ) to the control without salt stress (0 M NaCl). In the other strains, IAA production was higher in the presence of NaCl than without. In particular, the highest IAA production was recorded: at 1.25 M NaCl for *S. anulatus* J13; at 1 M NaCl for *S. ambofaciens* J27, *Streptomyces thinghirensis* J4, and *S. albidoflavus* H12; at 0.75 M for *S. iakyryus* G10; at 0.5 M for *S. xantholiticus* G22 and *S. xantholiticus* K12.

**Table 1.** Concentrations of phosphorus ( $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ ) solubilized by the actinomycetes strains under different NaCl concentrations.

Strain	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M	1.25 M	1.5 M
D14	24.8 <sup>aA</sup>	12.1 <sup>cB</sup>	9.1 <sup>cCD</sup>	9.1 <sup>eEF</sup>	12.7 <sup>cB</sup>	17.3 <sup>bA</sup>	10.4 <sup>dCD</sup>
G10	17.2 <sup>aF</sup>	10.4 <sup>cCD</sup>	12.8 <sup>bB</sup>	10.1 <sup>cCDE</sup>	10.7 <sup>cD</sup>	7.1 <sup>dG</sup>	10.5 <sup>cCD</sup>
G22	23.3 <sup>aB</sup>	14.5 <sup>bA</sup>	14.4 <sup>bA</sup>	11.3 <sup>cBC</sup>	10.6 <sup>cdDE</sup>	12.1 <sup>cB</sup>	9.1 <sup>dEF</sup>
G33	10.8 <sup>cL</sup>	9.0 <sup>dEF</sup>	12.4 <sup>dEF</sup>	9.7 <sup>cdDE</sup>	9.1 <sup>dF</sup>	9.9 <sup>cdDE</sup>	14.4 <sup>aA</sup>
H12	18.8 <sup>aE</sup>	9.9 <sup>dDE</sup>	13.3 <sup>dDE</sup>	13.2 <sup>bA</sup>	11.3 <sup>cCD</sup>	9.9 <sup>dDE</sup>	9.2 <sup>dEF</sup>
H14	22.2 <sup>aC</sup>	10.7 <sup>cCD</sup>	13.0 <sup>cCD</sup>	8.5 <sup>dF</sup>	6.6 <sup>eG</sup>	6.3 <sup>eG</sup>	11.4 <sup>cC</sup>
J4	12.1 <sup>bcK</sup>	11.4 <sup>cBC</sup>	7.9 <sup>cBC</sup>	12.9 <sup>bA</sup>	16.5 <sup>aA</sup>	8.4 <sup>eF</sup>	10.1 <sup>dDE</sup>
J13	9.9 <sup>deM</sup>	15.0 <sup>aA</sup>	11.9 <sup>aA</sup>	9.5 <sup>deEF</sup>	9.3 <sup>eEF</sup>	10.8 <sup>cdBCD</sup>	12.8 <sup>bB</sup>
J21	19.3 <sup>aD</sup>	4.6 <sup>fG</sup>	8.5 <sup>fG</sup>	6.0 <sup>eG</sup>	9.1 <sup>cF</sup>	11.5 <sup>bBC</sup>	8.0 <sup>dFG</sup>
J27	12.6 <sup>aJ</sup>	4.8 <sup>dG</sup>	10.0 <sup>dG</sup>	10.7 <sup>bCD</sup>	11.1 <sup>bCD</sup>	11.0 <sup>bBCD</sup>	7.3 <sup>cGH</sup>
K12	10.8 <sup>cL</sup>	13.8 <sup>aA</sup>	12.3 <sup>bB</sup>	10.0 <sup>cDE</sup>	12.3 <sup>bBC</sup>	11.2 <sup>bcBC</sup>	10.0 <sup>cDE</sup>
K23	14.8 <sup>aG</sup>	8.4 <sup>eF</sup>	9.9 <sup>cDC</sup>	12.1 <sup>bAB</sup>	10.5 <sup>cDE</sup>	10.0 <sup>cdDE</sup>	9.4 <sup>deDE</sup>
S2	12.9 <sup>aI</sup>	8.0 <sup>dF</sup>	6.8 <sup>eE</sup>	12.4 <sup>aAB</sup>	7.3 <sup>deG</sup>	9.3 <sup>cEF</sup>	10.5 <sup>bCD</sup>
T45	13.9 <sup>aH</sup>	11.5 <sup>bcBC</sup>	12.2 <sup>bB</sup>	11.3 <sup>bcBC</sup>	13.3 <sup>aB</sup>	10.7 <sup>cCD</sup>	6.5 <sup>dH</sup>

Results followed by different case letters are not significantly different according to Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ). Lower-case letters refer to the comparison of results obtained per strain at different NaCl concentrations (same row). Upper-case letters refer to the comparison of results obtained by the fourteen strains per NaCl concentrations (same column).

**Table 2.** Concentrations of indole acetic acid (IAA) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) produced by actinomycetes strains under different salt concentrations.

Strain	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M	1.25 M	1.5 M
D14	10.7 <sup>aD</sup>	4.8 <sup>bH</sup>	-	-	-	-	-
G10	12.2 <sup>bcC</sup>	11.3 <sup>cCD</sup>	13.8 <sup>bC</sup>	25.9 <sup>aA</sup>	6.1 <sup>dE</sup>	6.4 <sup>dD</sup>	6.8 <sup>d</sup>
G22	12.4 <sup>dC</sup>	19.8 <sup>bA</sup>	35.6 <sup>aA</sup>	18.6 <sup>bB</sup>	15.3 <sup>cB</sup>	10.7 <sup>dB</sup>	-
G33	7.2 <sup>F</sup>	-	-	-	-	-	-
H12	-	4.8 <sup>cH</sup>	5.1 <sup>cF</sup>	8.2 <sup>bE</sup>	10.2 <sup>aD</sup>	-	-
H14	21.4 <sup>aA</sup>	6.9 <sup>dFG</sup>	9.7 <sup>cE</sup>	12.8 <sup>bD</sup>	-	-	-
J4	-	9.8 <sup>bcDE</sup>	8.7 <sup>cE</sup>	10.2 <sup>bE</sup>	12.8 <sup>aC</sup>	-	-
J13	9.5 <sup>deE</sup>	8.3 <sup>cEF</sup>	11.6 <sup>dD</sup>	13.9 <sup>cCD</sup>	17.6 <sup>bA</sup>	25.4 <sup>aA</sup>	-
J21	-	6.2 <sup>GH</sup>	-	-	-	-	-
J27	9.8 <sup>cE</sup>	10.2 <sup>cCD</sup>	6.4 <sup>dF</sup>	15.2 <sup>bC</sup>	18.1 <sup>aA</sup>	-	-
K12	7.6 <sup>cF</sup>	11.7 <sup>bC</sup>	15.2 <sup>aBC</sup>	8.2 <sup>cE</sup>	14.7 <sup>aB</sup>	-	-
K23	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-
T45	14.8 <sup>abB</sup>	13.9 <sup>abB</sup>	15.8 <sup>aB</sup>	6.0 <sup>cF</sup>	12.9 <sup>bC</sup>	8.2 <sup>cC</sup>	-

Results followed by different case letters are not significantly different according to Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ). Lower-case letters refer to the comparison of the results obtained per strain at different NaCl concentrations (same row). Upper-case letters refer to the comparison of the results obtained by the fourteen strains per NaCl concentrations (same column).

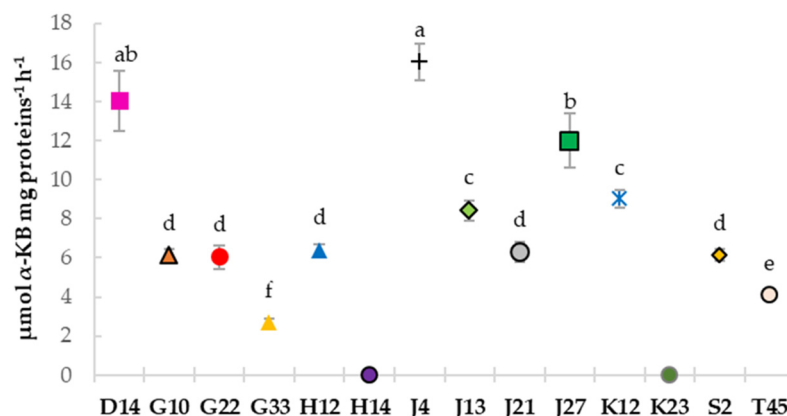
### 3.5. Estimation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Activity

The results for ACC deaminase activity are shown in Figure 2. Among the fourteen isolates, 12 strains had ACC deaminase activity. Higher activity was observed in *S. thinghirensis* J4, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, and *S. ambofaciens* J27. No activity was detected in *N. aegyptica* (H14) and *S. thinghirensis* K23.



### 3.6. Greenhouse Experiment on *T. durum*

During the greenhouse experiment, the bacteria improved plant tolerance to salt (Table 3). The uninoculated plants (no PGPB/with salt stress) were not able to grow at NaCl concentrations  $\geq 0.5$  M. Inoculation with strains *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, and *S. xantholiticus* K12 allowed plants to tolerate NaCl up to a concentration of 1 M. At higher salt concentrations (1.25 and 1.5 M), no growth was recorded. The response of the inoculated plants to the increase of salt concentration varied according to the species and strain inoculated. At 0.25 M NaCl, the best tolerance was obtained in plants inoculated with *S. xantholiticus* G22 and *N. aegyptica* S2.



**Figure 2.** 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity ( $\mu\text{mol } \alpha\text{-KB mg proteins}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) detected in the actinomycetes isolates. Results followed by different case letters are not significantly different according to Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ).

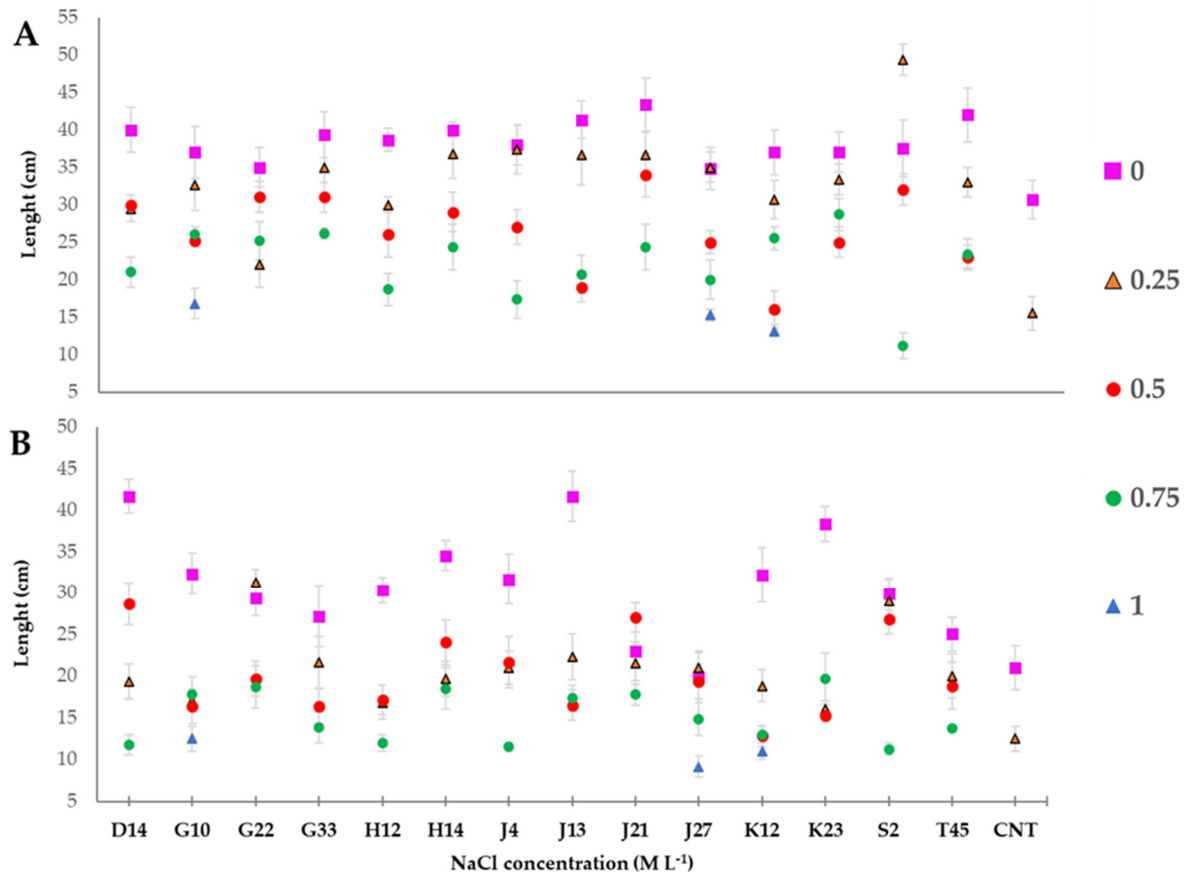
**Table 3.** Survival rate (%) recorded during the greenhouse experiment on *T. durum* for inoculated plant growth-promoting bacteria (PGPB) and uninoculated plants (CNT).

NaCl (M L <sup>-1</sup> )	Survival Rate (%)	
	PGPB	CNT
0	100	100
0.25	100	100
0.5	100	-
0.75	100	-
1	21	-
1.25	-	-
1.5	-	-

Shoots and roots lengths measured after 40 DAS in inoculated plants (D14 and T45) and uninoculated plants (CNT) grown under different levels of salinity are shown in Figure 3. Statistical comparison of data is presented in Figure S1 of Supplementary Materials.

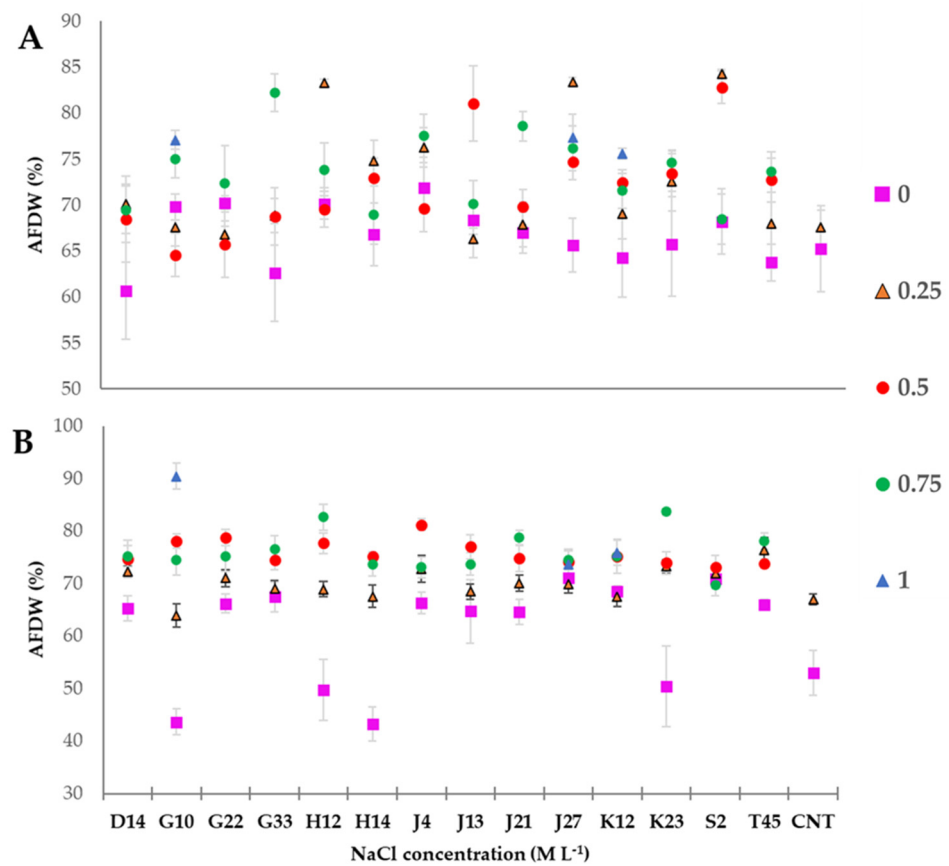
Shoots and roots length was improved in plants inoculated with actinomycetes strains and not subjected to saline stress ( $p < 0.05$ , Figure S1A). Compared to the uninoculated plants (without PGPB/no salt stress), the lengths of the shoot and root showed an increase of up to 41% (*N. alba* J21) and up to 98% (inoculated with *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 and *S. anulatus* J13, respectively). The biostimulating effects were negatively affected by the presence of the salt. Best growth was recorded for *N. aegyptica* S2 (+218%) and *S. xantholiticus* G22 (+151%) in terms of shoot and root length compared to the stressed control (no PGPB/with salt stress) ( $p < 0.05$ , Figure S1B). At 0.5 M NaCl, the maximum shoot length was observed in plants inoculated with *N. alba* (J21), while, the maximum root length was observed in plants inoculated with *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, and *N. alba* J21 ( $p < 0.05$ , Figure S1C). At 0.75 M NaCl, plants inoculated with strains *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. xantholiticus* G33, *S. xantholiticus* K12, and *S. thinghirensis* K23 recorded best shoot length ( $p < 0.05$ , Figure S1D); *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, and *S.*

*thinghirensis* K23, together with those inoculated with *N. aegyptica* H14, *S. anulatus* J13, *N. alba* J21, also recorded best root lengths ( $p < 0.05$ ). At 1 M NaCl, *S. iakyrus* G10 recorded both the best shoot and root lengths ( $p < 0.05$ , Figure S1E).



**Figure 3.** Shoot (A) and root (B) length of inoculated and uninoculated plants grown without (0 M NaCl) and with NaCl in the soils (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

Similar trends were recorded for AFDW of shoots and roots. The results of AFDW of shoots and roots obtained after 40 DAS for inoculated plants (D14–T45) and uninoculated plants (CNT) cultivated under different levels of NaCl are shown in Figure 4. Statistical comparison of data is in Figure S2 of Supplementary Materials. In the absence of salt stress, roots AFDW was significantly improved by the presence of the bacteria ( $p < 0.05$ , Figure S2A). Best values were recorded for strains *S. xantholiticus* K12, *S. ambofaciens* J27, and *N. aegyptica* S2, with a 32% increase on average compared to the uninoculated plants (no PGPB/no salt stress). Plant tolerance over 0.5 M NaCl—promoted by the inoculation—was different according to the actinomycete used. At 0.25 M NaCl, the highest AFDW increases were recorded for *S. albidoflavus* H12, *S. ambofaciens* J27, and *N. aegyptica* S2 for shoots (+24% on average), and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 (+14%) for the roots ( $p < 0.05$ , Figure S2B) compared to the stressed control (without PGPB/with salt stress). At 0.5 M NaCl, the best shoot length was observed in plants inoculated with *N. aegyptica* S2; while, the best root length in plants inoculated with strain *S. thinghirensis* J4 ( $p < 0.05$ , Figure S2C). At 0.75 M NaCl, the greatest root length was observed in plants inoculated with strain *S. xantholiticus* G33 while plants inoculated with *S. thinghirensis* K23 recorded the greatest root length ( $p < 0.05$ , Figure S2D). At 1 M NaCl, *S. iakyrus* G10 recorded the highest shoot AFDW ( $p < 0.05$ , Figure S2E); while, no statistically significant differences were recorded among *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, and *S. xantholiticus* K12 in terms of root AFDW ( $p > 0.05$ , Figure S2E).



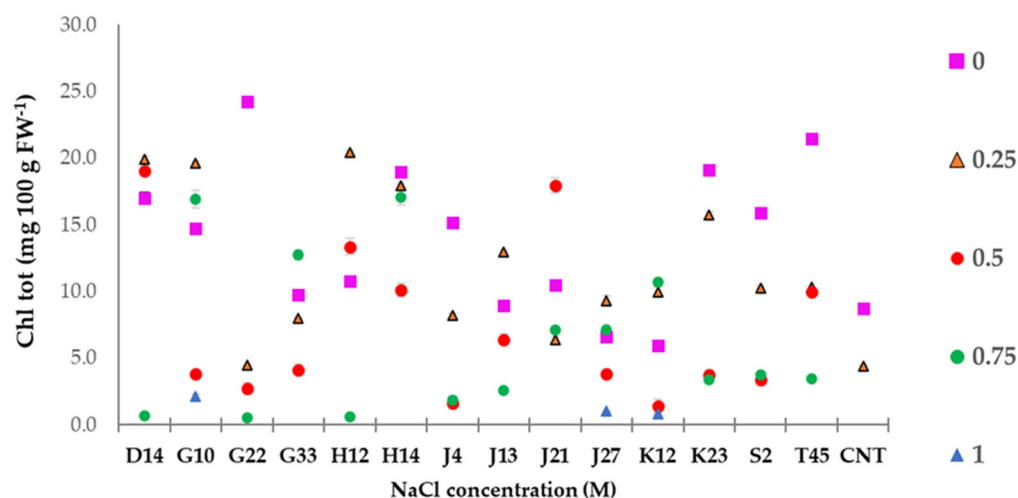
**Figure 4.** Shoot (A) and roots (B) ash-free dry weight (AFDW) percentage (%) of inoculated and uninoculated plants with the different actinomycetes strains without (0 M NaCl) and with NaCl in the soils (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

In the absence of inoculation and without salt stress, we observed normal plant growth; however, the addition of NaCl negatively affected the development of the plant, where growth was stopped at 0.5 M of NaCl addition.

Inoculation with actinomycetes strains also improved chlorophylls content of leaves compared to the uninoculated plants (no PGPB/no salt stress). The concentrations of total chlorophylls ( $\text{Chl}_{\text{tot}}$ ) in leaves of plants inoculated with strains D14 and T45 and uninoculated (CNT), at different levels of NaCl, are shown in Figure 5. Chlorophyll a and b concentrations and statistical comparison of data are in Figure S3 of Supplementary Materials.

In the absence of salt stress, the highest  $\text{Chl}_a$  contents were obtained in samples inoculated with *S. xantholiticus* G22, *N. aegyptica* H14, *S. thinghirensis* K23, and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 ( $p < 0.05$ , Figure S3A). *S. xantholiticus* G22 and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 also improved  $\text{Chl}_b$  content, thus obtaining the best  $\text{Chl}_{\text{tot}}$  ( $p < 0.05$ , Figure S3A). The induction of halo stress negatively affected the chlorophyll contents. Again, the best results obtained at different NaCl concentrations depended on the strain used for inoculation. For  $\text{Chl}_a$ , the highest contents were obtained by inoculating *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14/*S. iakyrus* G10/*S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, and *N. aegyptica* H14 at 0.25, 0.5, and 0.75 M NaCl, respectively ( $p < 0.05$ , Figure S3B–D). For  $\text{Chl}_b$ , the highest contents were obtained by *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14/*S. iakyrus* G10/*S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, and *S. iakyrus* G10 at 0.25, 0.5, and 0.7 M NaCl, respectively ( $p < 0.05$ , Figure S3B–D). For  $\text{Chl}_{\text{tot}}$ , the highest contents were obtained with inoculation of *S. albidoflavus* H12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, and *S. iakyrus* G10/*N. aegyptica* H14 at 0.25, 0.5, and 0.7 M NaCl, respectively ( $p < 0.05$ , Figure S3B–D). At 1 M NaCl, *S. ambofaciens* J27 recorded

highest Chl<sub>a</sub> contents ( $p < 0.05$ , Figure S3E), while *S. iakyrus* G10 recorded higher contents of both Chl<sub>a</sub> and tot ( $p < 0.05$ , Figure S3E).



**Figure 5.** Contents of total chlorophylls (Chl<sub>tot</sub>) estimated in leaves of inoculated and uninoculated plants without (0 M NaCl) and with salt stress induction (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

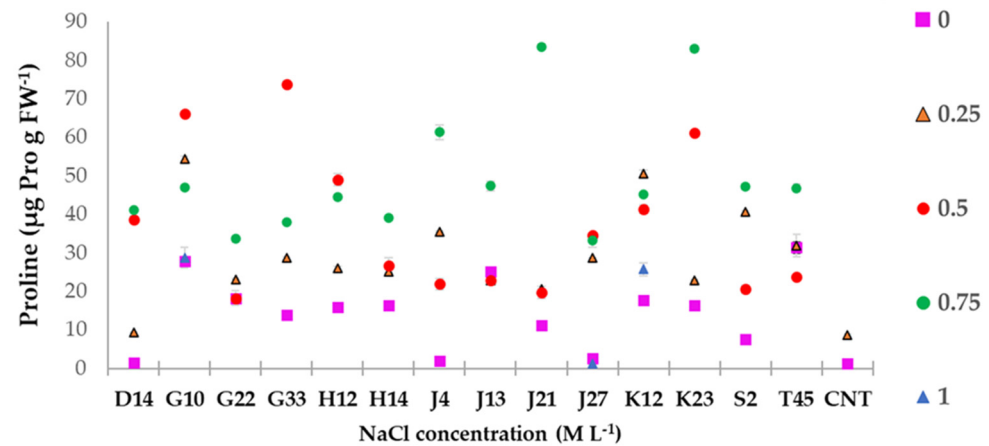
Halo stress significantly affected the ratios between Chl<sub>a</sub> and Chl<sub>b</sub> in plants inoculated with almost all strains. Chl<sub>a</sub>/Chl<sub>b</sub> ratios are in Table 4. With increasing NaCl concentrations up to 0.75 M, the chlorophylls ratios in plants inoculated with *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *N. aegyptica* H14, *N. alba* J21, and *N. aegyptica* S2 remained the same ( $p > 0.05$ ). For the other strains, higher ratios at higher salt concentrations were observed ( $p < 0.05$ ). This trend indicates good salt stress tolerance. At 1M, the ratios in plants inoculated with *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, and *S. xantholiticus* K12 decreased ( $p < 0.05$ ). Among these strains, the lowest decrease was observed by *S. xantholiticus* K12, indicating the best tolerance to salt stress.

**Table 4.** Chlorophyll a/b ratio of inoculated and uninoculated plants without (0 M NaCl) and with salt stress induction (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

	0 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M	1 M
D14	1.9 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	-
G10	1.9 <sup>bc</sup>	2.0 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.6 <sup>c</sup>	0.3 <sup>d</sup>
G22	1.9 <sup>b</sup>	2.4 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	0.5 <sup>c</sup>	-
G33	2.3 <sup>a</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.2 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>ab</sup>	-
H12	1.8 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	1.8 <sup>b</sup>	7.7 <sup>a</sup>	-
H14	1.9 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	-
J4	2.0 <sup>c</sup>	2.2 <sup>c</sup>	3.5 <sup>b</sup>	4.1 <sup>a</sup>	-
J13	2.3 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	-
J21	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	-
J27	5.5 <sup>a</sup>	1.8 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	2.3 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup>
K12	2.2 <sup>a</sup>	1.9 <sup>ab</sup>	0.2 <sup>c</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.7 <sup>b</sup>
K23	2.0 <sup>b</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	3.2 <sup>a</sup>	-
S2	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	-
T45	1.3 <sup>b</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	-
CNT	2.5 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	-	-	-

Results followed by different lower case letters are not significantly different according to Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ).

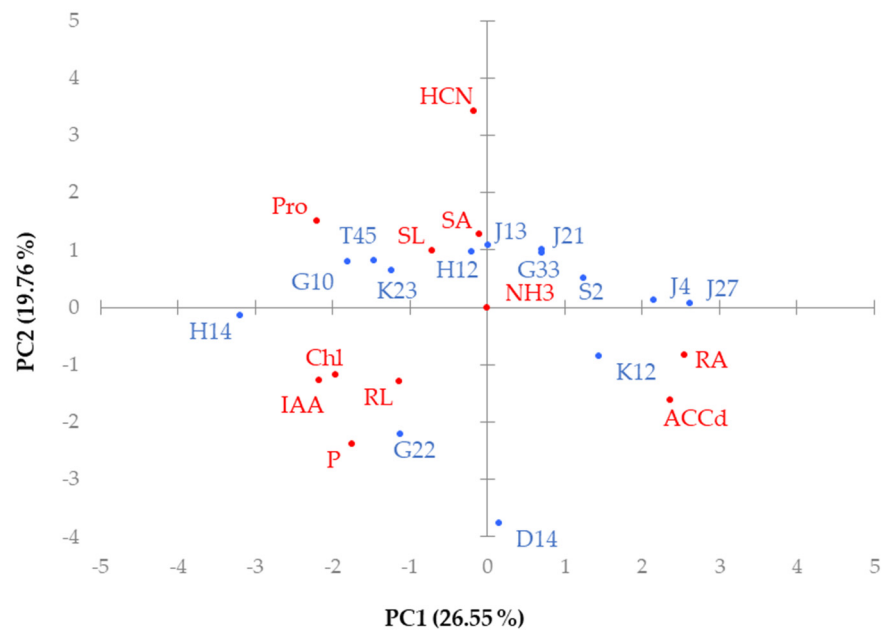
The results of proline accumulation in plants obtained after 40 DAS inoculated with strains D14 and T45, and uninoculated ones (CNT) are presented in Figure 6. Statistical comparison of data is in Figure S4 of Supplementary Materials.



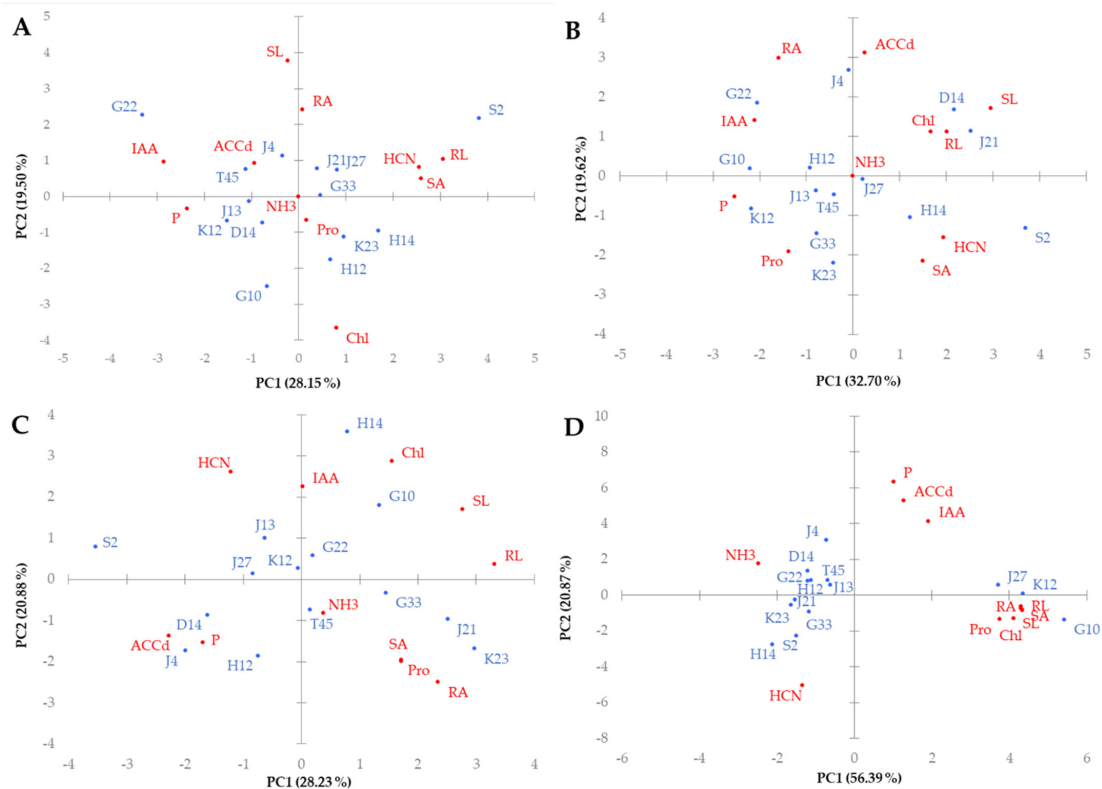
**Figure 6.** Proline content estimated in shoots of inoculated and uninoculated plants without (0 M NaCl) and with salt stress induction (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M NaCl) ( $n = 3$ ).

Without salt stress, there is an accumulation of proline in plant shoots. The inoculated plants have a higher proline value than the uninoculated ones (no PGPB/no salt stress), with variable accumulations depending on the strain ( $p < 0.05$ , Figure S4A). Salt stress caused a significant proline increase in plants. Inoculated plants had a higher accumulation of proline in response to the increasing NaCl concentrations. At 0.25 M NaCl, the highest proline contents were recorded in plants inoculated with strains *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* K12, and *N. aegyptica* S2 with an average of  $49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW (+ 460%,  $p < 0.05$ , Figure S4B) compared to the stressed control (no PGPB/salt stress). At higher NaCl, the proline concentration gradually increased in all inoculated plants. At 0.5 M NaCl, plants inoculated with *S. iakyrus* G10 and G33 accumulated  $70 \mu\text{g Pro g FW}^{-1}$  ( $p < 0.05$ , Figure S4C). The highest proline accumulation was recorded at 0.75 M ( $83 \mu\text{g Pro g}^{-1}$  FW) in plants inoculated with *N. alba* J21 and *S. thinghirensis* K23 ( $p < 0.05$ , Figure S4D). For strains *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, and *S. xantholiticus* K12—the only ones that induced plant halotolerance up to 1 M NaCl—moderated amounts of proline were detected ( $<30 \mu\text{g Pro g}^{-1}$  FW). The lowest values were obtained for *S. ambofaciens* J27 ( $p < 0.05$ , Figure S4E).

To explore potential correlations between the outcomes of in vitro and in planta experiments, the data were processed by the Principal component analysis (PCA). Figure 7 shows the PCA biplot obtained from the 0 M NaCl  $\text{L}^{-1}$  condition. According to the correlations, shoot length, AFDW, and proline accumulation were associated with the production of  $\text{NH}_3$  and HCN, root length and chlorophylls with IAA production and phosphate solubilization, and root AFDW with ACC deaminase activity. These associations under salt stress conditions changed (Figure 8) and at 1 M NaCl  $\text{L}^{-1}$ , the ACC deaminase activity, IAA production, and phosphate solubilization had a good association with proline accumulation and salt stress tolerance (chlorophylls and roots and shoots length and AFDW). The different correlations between in vitro and in planta results demonstrate that the in vitro approach could be useful for the selection of isolates with biostimulating and halotolerant traits.



**Figure 7.** Biplot obtained from the principal component analysis (PCA) on the dataset of in vitro and in planta results (loadings, in red) recorded for actinomycete strains (scores, in blue) without salt stress. In the figure: ACCd, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity; Chl, total chlorophyll; SL, length of shoots; RL, length of roots; RA, ash-free dry weight of roots; SA, ash-free dry weight of shoots; Pro, proline; P, phosphate solubilization; IAA, indole-3-acetic acid.



**Figure 8.** Biplot obtained from the principal component analysis (PCA) on the dataset of in vitro and in planta results (loadings, in red) recorded for actinomycete strains (scores, in blue) under different salt stress concentrations ((A)—0.25 M NaCl L<sup>-1</sup>, (B)—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>, (C)—0.75 M NaCl L<sup>-1</sup>, and (D)—1 M NaCl L<sup>-1</sup>). In the figure: ACCd, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity; Chl, total chlorophyll; SL, length of shoots; RL, length of roots; RA, ash-free dry weight of roots; SA, ash-free dry weight of shoots; Pro, proline; P, phosphate solubilization; IAA, indole-3-acetic acid.

#### 4. Discussion

Plant inoculation with halotolerant bacteria is one of the most sustainable ways to cope with the numerous deleterious effects of salinity [50–53]. Several microorganisms have been reported as promoters of plant growth under saline stress [12,16,54]. Halotolerant/halophilic PGP bacteria are physiologically adapted to environmental changes and increase plant tolerance to salinity thanks to several PGP traits [52]. In the present work, we proposed the use of actinomycetes isolates to induce salt stress tolerance in wheat. Halotolerant actinomycetes with PGP traits are already recognized as inducers of salt tolerance [55]. However, studies on their application as halotolerant agents are still scarce.

Among PGP traits useful for the induction of tolerance in plants, phosphate solubilization is extremely important for the growth and yield of crops [26,56–60]. Salinity decreases the low available content of phosphorous [58] and limits its absorption by the plant root [61]. Phosphate solubilizing bacteria (PSB) can convert insoluble phosphorus to soluble ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) and available (e.g.,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) [62].

A decrease in phosphate solubilization rate in a saline environment is reported [61,63]. In our case, the solubilization capability was negatively affected by the presence of NaCl in almost all strains. However, a good solubilization ability has been kept, possibly due to the origin of these strains isolated from saline soils. Our findings show that generally, the maximum solubilization rate occurred in the presence of a certain amount of NaCl, depending on the strain, and lower without NaCl. These findings are in accordance with previous studies; many bacteria require NaCl for better solubilization of inorganic phosphate [64,65] and microorganisms originating from saline soils are a valid tool to improve the availability of phosphorus in soil and improve wheat growth parameters [66].

Another mechanism used by PGPB to induce tolerance in plants against various environmental stresses is the regulation of phytohormones synthesis [67,68]. Phytohormones help plants tolerate salt stress by developing a protective response against stress, promote cell proliferation in the root system and increase the surface area for water and nutrient uptake through the overproduction of root hairs [50,69]. Among phytohormones, IAA directly influences plant growth, improving nutrient uptake, and plant health under stress conditions [70,71]. Growth regulators, such as auxins, are known to reduce salinity-induced dormancy in wheat seeds [72]. Many PGPB can produce IAA and participate in plant growth and development [73]. Salt has been shown to inhibit plant growth, phytohormone production, and interfere with important cellular processes [74]. The decrease in hormone levels in the plant's root system results in a reduction in growth and development [75]. Salinity does not affect auxins production and physiological processes in plants treated by salt-tolerant PGPB [67]. As for our strains *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14, *N. aegyptica* H14, and *S. xantholiticus* G33, several authors reported that the presence of salt stress may cause a decrease in IAA synthesis [76–79]. According to the literature [68], an improvement on the synthesis of this hormone was found in the presence of different salt concentrations in the case of strains *S. iakyrus* G10, *S. xantholiticus* G22, *S. anulatus* J13, *S. ambofaciens* J27, *S. xantholiticus* K12, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45.

Crops subjected to saline stress may be more susceptible to phytopathogen attacks, PGPB can provide volatile compounds useful for plant protection, such as HCN and  $\text{NH}_3$  [80,81]. These compounds are involved in various biochemical and physiological processes, including cell signaling and plant growth improvement [82]. HCN disrupts pathogenic cells by inhibiting electron transport, causing cell death [81]. The presence of adequate amounts of  $\text{NH}_3$  increases plants' biomass and resistance, by inducing root branching and elongation [80]. The ability to produce these volatile compounds was shown by nearly all our actinomycetes isolates not exposed to salt stress. In the presence of increasing concentrations of salt, only strain *N. aegyptica* H14 retained both synthesis abilities up to 1.25 M NaCl. The production of these compounds is important for plant development, particularly under stress conditions. Under salt stress, the need for nutrients for metabolic activities increases and the presence of volatile compounds can meet this demand [83].

Substances that inhibit growth also endanger the plant physiological status under salt stress conditions. Among them, ethylene is a gaseous hormone produced by most plants [84]. In normal conditions, it is involved in plant growth and development. Its release is regulated by environmental changes [17] and its levels increase during stressful conditions [85], becoming harmful for plants [42,85]. The ACC deaminase present in PGPB promotes the regulation of the ethylene levels, protecting plants against harmful increases [80,86]. This trait, present in almost all actinomycetes, provides a great advantage for crop's sustainable development in stressful conditions [87]. Different studies underline that fertilization with PGPB possessing ACC deaminase promotes plant growth development [86,88] and provides plant protection against various environmental stresses [89].

In light of the PGP traits mentioned above, the improvement of plant growth under halo stress could be the result of an improvement of nutrients uptake, hormones regulation [90,91], and enzymatic activities [92]. Salinity negatively affects plant growth and yield [93,94] with a high negative impact on the root system [51]. The presence of NaCl affects also aerial parts, with a reduction in photosynthesis due to a decrease of chlorophylls content [7,95,96]. Our findings underline a good influence of actinomycetes inoculation on plants. In particular, the inoculation with strains *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27, and *S. xantholiticus* K12 induced a plant salinity tolerance up to 1 M NaCl. The nature of halotolerant actinomycetes used in this study may be the subject of a future in-depth study on their use as biofertilizers to improve crops in soils affected by salinity. Biofertilization strategy already showed positive outcomes in plant growth and development of several crops [67,97,98]. The accumulation of proline is an important mechanism for osmotic regulation under salt stress. Our results showed that at increasing NaCl concentrations, the accumulation of proline is more pronounced in plants inoculated by actinomycetes strains. In response to environmental stresses, plants store proline and other compatible solutes as an adaptive response to osmotic unbalance. In fact, proline promotes water retention in the cytoplasm, at high salt concentrations; it appears to be a mechanism for stress tolerance in plants. Proline is an osmolyte stabilizing the cells and a source of nitrogen, carbon, and energy for plant growth. This amino acid provides also tolerance to salt stress by cell turgor maintenance and cells protection against oxidative damages [4,5,99–103].

## 5. Conclusions

Salinity is currently one of the main problems of agricultural soil with a strong negative impact on crops productivity. To overcome this problem only a few effective and sustainable actions have been proposed. Therefore, studies on sustainable strategies to overcome soil salinity should be encouraged. A promising tool for improving crop productivity under salt stress conditions is inoculation with halophilic/halotolerant PGPB.

The present study allowed to select PGPB based on their ability to induce salt stress tolerance in plants up to 1 M NaCl. Among fourteen isolates of actinomycetes, the best induction of tolerance was recorded for plants inoculated with strain *S. iakyrus* G10, *S. ambofaciens* J27. *S. xantholiticus* K12 also showed an interesting tolerance induction at 1M NaCl. Further studies should be undertaken to evaluate the possibility of producing biofertilizers with these strains. Moreover, these strains could be joined in a consortium, to evaluate possible synergistic effects. The effectiveness of the formulations should be also investigated in open field experiments and on different crops. Even if it is necessary to make further investigation, the results obtained in the present work are a good starting point for the development of biofertilizers useful for overcoming the high salinity in soils.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/soilsystems5020026/s1>, Figure S1: Comparison of shoot and root length obtained for the inoculated (D14-T45) and uninoculated plants (CNT) without salt stress induction (A—0 M NaCl L<sup>-1</sup>) and under different salt stress concentrations (B—0.25 M NaCl L<sup>-1</sup>; C—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; D—0.75 M NaCl L<sup>-1</sup>; E—1 M NaCl L<sup>-1</sup>) (n = 3), Figure S2: Comparison of shoot and root ash-free dry weight (AFDW) obtained for the inoculated (D14-T45) and uninoculated plants (CNT) without salt stress



induction (A—0 M NaCl L<sup>-1</sup>) and under different salt stress concentrations (B—0.25 M NaCl L<sup>-1</sup>; C—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; D—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; E—0.75 M NaCl L<sup>-1</sup>; F—1 M NaCl L<sup>-1</sup>) (n = 3), Figure S3: Comparison of Chlorophylls a, b and total (Chl a, b and tot) obtained for the inoculated (D14-T45) and uninoculated plants (CNT) without salt stress induction (A—0 M NaCl L<sup>-1</sup>) and under different salt stress concentrations (B—0.25 M NaCl L<sup>-1</sup>; C—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; D—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; E—0.75 M NaCl L<sup>-1</sup>; F—1 M NaCl L<sup>-1</sup>) (n = 3), Figure S4: Comparison of proline accumulation obtained for the inoculated (D14-T45) and uninoculated plants (CNT) without salt stress induction (A—0 M NaCl L<sup>-1</sup>) and under different salt stress concentrations (B—0.25 M NaCl L<sup>-1</sup>; C—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; D—0.5 M NaCl L<sup>-1</sup>; E—0.75 M NaCl L<sup>-1</sup>; F—1 M NaCl L<sup>-1</sup>) (n = 3).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K. and M.D.G.; methodology, M.S. and C.F.; formal analysis, R.D., M.R. and M.P.; investigation, R.D., and M.P.; resources, M.K., C.F., and M.D.G.; data curation, R.D. and M.P.; writing—original draft preparation, R.D. and M.P.; writing—review and editing, C.F. and M.D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

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

## References

1. Fatima, T.; Arora, N.K. Plant Growth-Promoting Rhizospheric Microbes for Remediation of Saline Soils. In *Phyto and Rhizo Remediation*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 121–146.
2. Bharti, N.; Yadav, D.; Barnawal, D.; Maji, D.; Kalra, A. Exiguobacterium Oxidotolerans, a Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Improves Yield and Content of Secondary Metabolites in *Bacopa Monnieri* (L.) Pennell under Primary and Secondary Salt Stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 379–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Etesami, H.; Glick, B.R. Halotolerant Plant Growth-Promoting Bacteria: Prospects for Alleviating Salinity Stress in Plants. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *178*, 104124. [[CrossRef](#)]
4. Mahmoud, O.M.B.; Hidri, R.; Talbi-Zribi, O.; Taamalli, W.; Abdelly, C.; Djéballi, N. Auxin and Proline Producing Rhizobacteria Mitigate Salt-Induced Growth Inhibition of Barley Plants by Enhancing Water and Nutrient Status. *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *128*, 209–217. [[CrossRef](#)]
5. Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Yahiaoui, B. Growing Varieties Durum Wheat (*Triticum Durum*) in Response to the Effect of Osmolytes and Inoculation by *Azotobacter Chroococcum* under Salt Stress. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2016**, *10*, 387–399.
6. FAO. 2015 Global Soil Partnership—World Soil Charter. Available online: <http://www.fao.org/3/mn442e/mn442e.pdf> (accessed on 13 August 2020).
7. Sultana, S.; Paul, S.C.; Parveen, S.; Alam, S.; Rahman, N.; Jannat, B.; Hoque, S.; Rahman, M.T.; Karim, M.M. Isolation and Identification of Salt-Tolerant Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Application for Rice Cultivation under Salt Stress. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66*, 144–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Egamberdieva, D.; Kucharova, Z.; Davranov, K.; Berg, G.; Makarova, N.; Azarova, T.; Chebotar, V.; Tikhonovich, I.; Kamilova, F.; Validov, S.Z. Bacteria Able to Control Foot and Root Rot and to Promote Growth of Cucumber in Salinated Soils. *Biol. Fertil. Soils* **2011**, *47*, 197–205. [[CrossRef](#)]
9. Evelin, H.; Kapoor, R.; Giri, B. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Alleviation of Salt Stress: A Review. *Ann. Bot.* **2009**, *104*, 1263–1280. [[CrossRef](#)]
10. Ruiz-Lozano, J.M.; Porcel, R.; Azcón, C.; Aroca, R. Regulation by Arbuscular Mycorrhizae of the Integrated Physiological Response to Salinity in Plants: New Challenges in Physiological and Molecular Studies. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 4033–4044. [[CrossRef](#)]
11. Ashraf, M.; Harris, P.J.C. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Sci.* **2004**, *166*, 3–16. [[CrossRef](#)]
12. Baniaghil, N.; Arzanesh, M.H.; Ghorbanli, M.; Shahbazi, M. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Growth Parameters, Antioxidant Enzymes and Microelements of Canola under Salt Stress. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* **2013**, *3*, 17–27.
13. Yang, J.; Klopper, J.W.; Ryu, C.-M. Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress. *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 1–4. [[CrossRef](#)]
14. Bai, Y.; Zhou, X.; Smith, D.L. Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of *Bacillus* Strains with *Bradyrhizobium Japonicum*. *Crop Sci.* **2003**, *43*, 1774–1781. [[CrossRef](#)]
15. Egamberdieva, D.; Davranov, K.; Wirth, S.; Hashem, A.; Abd\_Allah, E.F. Impact of Soil Salinity on the Plant-Growth-Promoting and Biological Control Abilities of Root Associated Bacteria. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 1601–1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Jha, Y.; Subramanian, R.B.; Patel, S. Combination of Endophytic and Rhizospheric Plant Growth Promoting Rhizobacteria in *Oryza Sativa* Shows Higher Accumulation of Osmoprotectant against Saline Stress. *Acta Physiol. Plant.* **2011**, *33*, 797–802. [[CrossRef](#)]
17. Goswami, M.; Suresh, D. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Alleviators of Abiotic Stresses in Soil: A Review. *Pedosphere* **2020**, *30*, 40–61. [[CrossRef](#)]
18. Ilangumaran, G.; Smith, D.L. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Amelioration of Salinity Stress: A Systems Biology Perspective. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1768. [[CrossRef](#)]
19. Zahir, Z.A.; Nadeem, S.M.; Khan, M.Y.; Binyamin, R.; Waqas, M.R. Role of Halotolerant Microbes in Plant Growth Promotion under Salt Stress Conditions. In *Saline Soil-Based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 209–253.
20. Burg, M.B.; Ferraris, J.D.; Dmitrieva, N.I. Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 1441–1474. [[CrossRef](#)]
21. Jha, B.; Singh, V.K.; Weiss, A.; Hartmann, A.; Schmid, M. *Zhihengliuella Somnathii* Sp. Nov., a Halotolerant Actinobacterium from the Rhizosphere of a Halophyte *Salicornia Brachiata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2015**, *65*, 3137–3142. [[CrossRef](#)]
22. Jha, B.; Gontia, I.; Hartmann, A. The Roots of the Halophyte *Salicornia Brachiata* Are a Source of New Halotolerant Diazotrophic Bacteria with Plant Growth-Promoting Potential. *Plant Soil* **2012**, *356*, 265–277. [[CrossRef](#)]
23. Mahmood, A.; Kataoka, R.; Turgay, O.C.; Yaprak, A.E. Halophytic Microbiome in Ameliorating the Stress. In *Ecophysiology, Abiotic Stress Responses and Utilization of Halophytes*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 171–194.
24. Kaushal, M.; Wani, S.P. Rhizobacterial-Plant Interactions: Strategies Ensuring Plant Growth Promotion under Drought and Salinity Stress. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *231*, 68–78. [[CrossRef](#)]
25. Numan, M.; Bashir, S.; Khan, Y.; Mumtaz, R.; Shinwari, Z.K.; Khan, A.L.; Khan, A.; Ahmed, A.-H. Plant Growth Promoting Bacteria as an Alternative Strategy for Salt Tolerance in Plants: A Review. *Microbiol. Res.* **2018**, *209*, 21–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pereira, N.C.M.; Galindo, F.S.; Gazola, R.P.D.; Dupas, E.; Rosa, P.A.L.; Mortinho, E.S. Corn Yield and Phosphorus Use Efficiency Response to Phosphorus Rates Associated With Plant Growth Promoting Bacteria. *Front. Environ. Sci.* **2020**, *8*, 40. [[CrossRef](#)]
27. Rath, K.M.; Fierer, N.; Murphy, D.V.; Rousk, J. Linking Bacterial Community Composition to Soil Salinity along Environmental Gradients. *ISME J.* **2019**, *13*, 836–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. ZHANG, W.; Chong, W.; Rui, X.; WANG, L. Effects of Salinity on the Soil Microbial Community and Soil Fertility. *J. Integr. Agric.* **2019**, *18*, 1360–1368. [[CrossRef](#)]
29. Smati, M.; Kitouni, M. Diversity of Actinobacteria in the Marshes of Ezzemoul and Djendli in Northeastern Algeria. *Eur. J. Ecol.* **2019**, *5*, 41–53. [[CrossRef](#)]
30. Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Smati, M.; Gallo, M.D.; Kitouni, M. Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum Lycopersicum*. *Sustainability* **2020**, *12*, 4617. [[CrossRef](#)]
31. Pochon, J.; Tardieux, P. *Techniques d'analyse En Microbiologie Du Sol*; Editions de la Tourelle: Paris, France, 1962; Volume 11.
32. Donate-Correa, J.; León-Barrios, M.; Pérez-Galdona, R. Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in *Chamaecytisus Proliferus* (Tagasaste), a Forage Tree-Shrub Legume Endemic to the Canary Islands. *Plant Soil* **2005**, *266*, 261–272. [[CrossRef](#)]
33. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. Biochemical Activities of Microorganisms. In *Microbiology—A Laboratory Manual*; The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.: Menlo Park, CA, USA, 1996.
34. Pikovskaya, R.I. Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of Some Microbial Species. *Mikrobiologiya* **1948**, *17*, 362–370.
35. Olsen, S.R.; Sommers, L.E. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis Part 2 Chemical and Microbiological Properties*; Page, A.L., Ed.; (Soil Science Society of America); American Society of Agronomy: Madison, WI, USA, 1982; pp. 403–430.
36. Khiangte, L.; Lalfakzuala, R. In Vitro Production of Growth Regulator (IAA) and Phosphatase by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Sci. Technol. J* **2011**, *5*, 32–35. [[CrossRef](#)]
37. Leangvutiviroj, C.; Ruangphisarn, P.; Hansanimitkul, P.; Shinkawa, H.; Sasaki, K. Development of a New Biofertilizer with a High Capacity for N<sub>2</sub> Fixation, Phosphate and Potassium Solubilization and Auxin Production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 1098–1101. [[CrossRef](#)]
38. Nautiyal, C.S. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 265–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ponmurugan, P.; Gopi, C. In Vitro Production of Growth Regulators and Phosphatase Activity by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *5*, 348–350.
40. Wahyudi, A.T.; Priyanto, J.A.; Afrista, R.; Kurniati, D.; Astuti, R.I.; Akhdiya, A. Plant Growth Promoting Activity of Actinomycetes Isolated from Soybean Rhizosphere. *Online J. Biol. Sci.* **2019**, *19*, 1–8. [[CrossRef](#)]
41. Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol.* **1951**, *26*, 192. [[CrossRef](#)]
42. Brígido, C.; Duan, J.; Glick, B.R. Methods to Study 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase in Plant Growth-Promoting Bacteria. In *Handbook for Azospirillum*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 287–305.
43. Dworkin, M.; Foster, J.W. Experiments with Some Microorganisms Which Utilize Ethane and Hydrogen. *J. Bacteriol.* **1958**, *75*, 592. [[CrossRef](#)]
44. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]

45. Ayadi, M.; Cavez, D.; Miled, N.; Chaumont, F.; Masmoudi, K. Identification and Characterization of Two Plasma Membrane Aquaporins in Durum Wheat (*Triticum Turgidum* L. Subsp. Durum) and Their Role in Abiotic Stress Tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **2011**, *49*, 1029–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Maleki, M.; Naghavi, M.R.; Alizadeh, H.; Poostini, K.; Abd Mishani, C. Comparison of Protein Changes in the Leaves of Two Bread Wheat Cultivars with Different Sensitivity under Salt Stress. *Annu. Res. Rev. Biol.* **2014**, *4*, 1784–1797. [[CrossRef](#)]
47. Ouerghi, Z.; Rémy, R.; Ouelhazi, L.; Ayadi, A.; Brulfert, J. Two-Dimensional Electrophoresis of Soluble Leaf Proteins, Isolated from Two Wheat Species (*Triticum Durum* and *Triticum Aestivum*) Differing in Sensitivity towards NaCl. *Electrophor. Int. J.* **2000**, *21*, 2487–2491. [[CrossRef](#)]
48. Arnon, D.I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiol.* **1949**, *24*, 1. [[CrossRef](#)]
49. Naidu, B.P.; Cameron, D.F.; Konduri, S.V. Improving Drought Tolerance of Cotton by Glycinebetaine Application and Selection. In Proceedings of the 9th Australian Agronomy Conference, Wagga Wagga, Australia, 20–23 July 1998.
50. Bhise, K.K.; Dandge, P.B. Mitigation of Salinity Stress in Plants Using Plant Growth Promoting Bacteria. *Symbiosis* **2019**, *79*, 191–204. [[CrossRef](#)]
51. Dong, W.; Liu, X.; Lv, J.; Gao, T.; Song, Y. The Expression of Alfalfa MsPP2CA1 Gene Confers ABA Sensitivity and Abiotic Stress Tolerance on Arabidopsis Thaliana. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *143*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hmaeid, N.; Wali, M.; Mahmoud, O.M.-B.; Pueyo, J.J.; Ghnaya, T.; Abdelly, C. Efficient Rhizobacteria Promote Growth and Alleviate NaCl-Induced Stress in the Plant Species *Sulla Carnosa*. *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *133*, 104–113. [[CrossRef](#)]
53. Läuchli, A.; Grattan, S.R. Plant Growth and Development under Salinity Stress. In *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 1–32.
54. Yildirim, E.; Turan, M.; Ekinçi, M.; Dursun, A.; Cakmakci, R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Ameliorate Deleterious Effect of Salt Stress on Lettuce. *Sci. Res. Essays* **2011**, *6*, 4389–4396.
55. Tolba, S.T.; Ibrahim, M.; Amer, E.A.; Ahmed, D.A. First Insights into Salt Tolerance Improvement of Stevia by Plant Growth-Promoting Streptomyces Species. *Arch. Microbiol.* **2019**, *201*, 1295–1306. [[CrossRef](#)]
56. Dhillon, J.; Torres, G.; Driver, E.; Figueiredo, B.; Raun, W.R. World Phosphorus Use Efficiency in Cereal Crops. *Agron. J.* **2017**, *109*, 1670–1677. [[CrossRef](#)]
57. Fink, J.R.; Inda, A.V.; Bavaresco, J.; Sánchez-Rodríguez, A.R.; Barrón, V.; Torrent, J.; Bayer, C. Diffusion and Uptake of Phosphorus, and Root Development of Corn Seedlings, in Three Contrasting Subtropical Soils under Conventional Tillage or No-Tillage. *Biol. Fertil. Soils* **2016**, *52*, 203–210. [[CrossRef](#)]
58. Jiang, H.; Wang, T.; Chi, X.; Wang, M.; Chen, N.; Chen, M.; Pan, L.; Qi, P. Isolation and Characterization of Halotolerant Phosphate Solubilizing Bacteria Naturally Colonizing the Peanut Rhizosphere in Salt-Affected Soil. *Geomicrobiol. J.* **2020**, *37*, 110–118. [[CrossRef](#)]
59. Lollato, R.P.; Figueiredo, B.M.; Dhillon, J.S.; Arnall, D.B.; Raun, W.R. Wheat Grain Yield and Grain-Nitrogen Relationships as Affected by N, P, and K Fertilization: A Synthesis of Long-Term Experiments. *Field Crop. Res.* **2019**, *236*, 42–57. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, Y.; Thomas, C.L.; Xiang, J.; Long, Y.; Wang, X.; Zou, J.; Luo, Z.; Ding, G.; Cai, H.; Graham, N.S. QTL Meta-Analysis of Root Traits in Brassica Napus under Contrasting Phosphorus Supply in Two Growth Systems. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33113. [[CrossRef](#)]
61. Rojas-Tapias, D.; Moreno-Galván, A.; Pardo-Díaz, S.; Obando, M.; Rivera, D.; Bonilla, R. Effect of Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) on Amelioration of Saline Stress in Maize (*Zea Mays*). *Appl. Soil Ecol.* **2012**, *61*, 264–272. [[CrossRef](#)]
62. Suleman, M.; Yasmin, S.; Rasul, M.; Yahya, M.; Atta, B.M.; Mirza, M.S. Phosphate Solubilizing Bacteria with Glucose Dehydrogenase Gene for Phosphorus Uptake and Beneficial Effects on Wheat. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204408. [[CrossRef](#)]
63. Sadeghi, A.; Karimi, E.; Dahaji, P.A.; Javid, M.G.; Dalvand, Y.; Askari, H. Plant Growth Promoting Activity of an Auxin and Siderophore Producing Isolate of Streptomyces under Saline Soil Conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1503–1509. [[CrossRef](#)]
64. Gupta, N.; Sahoo, D. Evaluation of in Vitro Solubilization Potential of Phosphate Solubilising Streptomyces Isolated from Phyllosphere of Heritiera Fomes (Mangrove). *Afr. J. Microbiol. Res.* **2010**, *4*, 136–142.
65. Kim, K.Y.; Jordan, D.; Krishnan, H.B. Rahnella Aquatilis, a Bacterium Isolated from Soybean Rhizosphere, Can Solubilize Hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *153*, 273–277. [[CrossRef](#)]
66. Boubekri, K.; Soumare, A.; Mardad, I.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L. The Screening of Potassium-and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms* **2021**, *9*, 470. [[CrossRef](#)]
67. Egamberdieva, D.; Lugtenberg, B. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Alleviate Salinity Stress in Plants. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 73–96.
68. Raval, V.H.; Saraf, M. Biosynthesis and Purification of Indole-3-Acetic Acid by Halotolerant Rhizobacteria Isolated from Little Runn of Kachchh. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101435.
69. Arora, N.K.; Tewari, S.; Singh, R. Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and indirect PGPRs. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 411–449.
70. Egamberdieva, D.; Kucharova, Z. Selection for Root Colonising Bacteria Stimulating Wheat Growth in Saline Soils. *Biol. Fertil. Soils* **2009**, *45*, 563–571. [[CrossRef](#)]

71. Sharma, K.; Sharma, S.; Sharma, P.; Prasad, S.R. Role of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Rhizobacteria and Its Effect on Plant Growth of Mustard Crop under Salt Stress Condition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2019**, *8*, 2439–2445. [CrossRef]
72. Egamberdieva, D. Alleviation of Salt Stress by Plant Growth Regulators and IAA Producing Bacteria in Wheat. *Acta Physiol. Plant.* **2009**, *31*, 861–864. [CrossRef]
73. Azcón, R.; Barea, J.M. Synthesis of Auxins, Gibberellins and Cytokinins By *Azotobacter Vinelandii* And *Azotobacter Beijerinckii* Related to Effects Produced on Tomato Plants. *Plant Soil* **1975**, *43*, 609–619. [CrossRef]
74. Li, H.Q.; Jiang, X.W. Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) Improves Salt Tolerance of Maize Seedling. *Russ. J. Plant Physiol.* **2017**, *64*, 235–241. [CrossRef]
75. Werner, J.E.; Finkelstein, R.R. Arabidopsis Mutants with Reduced Response to NaCl and Osmotic Stress. *Physiol. Plant.* **1995**, *93*, 659–666. [CrossRef]
76. Dodd, I.C.; Pérez-Alfocea, F. Microbial Amelioration of Crop Salinity Stress. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3415–3428. [CrossRef] [PubMed]
77. Khan, M.A.; Boër, B.; Öztürk, M.; Clüsener-Godt, M.; Gul, B.; Breckle, S.-W. *Sabkha Ecosystems: Volume V: The Americas*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; Volume 48.
78. Liu, W.; Li, R.-J.; Han, T.-T.; Cai, W.; Fu, Z.-W.; Lu, Y.-T. Salt Stress Reduces Root Meristem Size by Nitric Oxide-Mediated Modulation of Auxin Accumulation and Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2015**, *168*, 343–356. [CrossRef] [PubMed]
79. Soleimani, R.; Alikhani, H.A.; Towfighi, H.; Khavazi, K.; Pourbabaee, A.A. Isolated Bacteria from Saline–Sodic Soils Alter the Response of Wheat under High Adsorbed Sodium and Salt Stress. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2017**, *14*, 143–150. [CrossRef]
80. Anwar, S.; Ali, B.; Sajid, I. Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-Vitro and in-Vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1334. [CrossRef]
81. Mohamed, H.I.; Gomaa, E.Z. Effect of Plant Growth Promoting *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Fluorescens* on Growth and Pigment Composition of Radish Plants (*Raphanus Sativus*) under NaCl Stress. *Photosynthetica* **2012**, *50*, 263–272. [CrossRef]
82. Plant Growth Promotion by Microbes Ben Lugtenberg—Academia.Edu. Available online: [https://www.academia.edu/15172071/Plant\\_Growth\\_Promotion\\_by\\_Microbes](https://www.academia.edu/15172071/Plant_Growth_Promotion_by_Microbes) (accessed on 23 August 2020).
83. Bhise, K.K.; Bhagwat, P.K.; Dandge, P.B. Plant Growth-Promoting Characteristics of Salt Tolerant Enterobacter Cloacae Strain KBPD and Its Efficacy in Amelioration of Salt Stress in *Vigna radiata* L. *J. Plant Growth Regul.* **2017**, *36*, 215–226. [CrossRef]
84. Del Carmen Orozco-Mosqueda, M.; Glick, B.R.; Santoyo, G. ACC Deaminase in Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB): An Efficient Mechanism to Counter Salt Stress in Crops. *Microbiol. Res.* **2020**, *235*, 126439. [CrossRef] [PubMed]
85. Abeles, F.B.; Morgan, P.W.; Saltveit, M.E. *Ethylene in Plant Biology*, 2nd ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1992; Volume 414.
86. Glick, B.R.; Penrose, D.M.; Li, J. A Model for the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-Promoting Bacteria. *J. Theor. Biol.* **1998**, *190*, 63–68. [CrossRef] [PubMed]
87. Misra, S.; Chauhan, P.S. ACC Deaminase-Producing Rhizosphere Competent *Bacillus* Spp. Mitigate Salt Stress and Promote Zea Mays Growth by Modulating Ethylene Metabolism. *3 Biotech* **2020**, *10*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
88. Zahir, Z.A.; Arshad, M.; Frankenberger, W.T. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Adv. Agron.* **2004**, *81*, 98–169.
89. Bal, H.B.; Nayak, L.; Das, S.; Adhya, T.K. Isolation of ACC Deaminase Producing PGPR from Rice Rhizosphere and Evaluating Their Plant Growth Promoting Activity under Salt Stress. *Plant Soil* **2013**, *366*, 93–105. [CrossRef]
90. Mohamed, I.; Eid, K.E.; Abbas, M.H.; Salem, A.A.; Ahmed, N.; Ali, M.; Shah, G.M.; Fang, C. Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Mycorrhizae to Improve the Growth and Nutrient Utilization of Common Bean in a Soil Infected with White Rot Fungi. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *171*, 539–548. [CrossRef]
91. Nagargade, M.; Tyagi, V.; Singh, M.K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: A Biological Approach toward the Production of Sustainable Agriculture. In *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 205–223.
92. Stefan, M.; Munteanu, N.; Stoleru, V.; Mihasan, M. Effects of Inoculation with Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Photosynthesis, Antioxidant Status and Yield of Runner Bean. *Rom. Biotechnol. Lett.* **2013**, *18*, 8132–8143.
93. Orhan, F. Alleviation of Salt Stress by Halotolerant and Halophilic Plant Growth-Promoting Bacteria in Wheat (*Triticum Aestivum*). *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 621–627. [CrossRef]
94. Shukla, P.S.; Agarwal, P.K.; Jha, B. Improved Salinity Tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the Interaction of Halotolerant Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Plant Growth Regul.* **2012**, *31*, 195–206. [CrossRef]
95. Tiwari, J.K.; Munshi, A.D.; Kumar, R.; Pandey, R.N.; Arora, A.; Bhat, J.S.; Sureja, A.K. Effect of Salt Stress on Cucumber: Na<sup>+</sup>–K<sup>+</sup> Ratio, Osmolyte Concentration, Phenols and Chlorophyll Content. *Acta Physiol. Plant.* **2010**, *32*, 103–114. [CrossRef]
96. Yildirim, E.; Turan, M.; Guvenc, I. Effect of Foliar Salicylic Acid Applications on Growth, Chlorophyll, and Mineral Content of Cucumber Grown under Salt Stress. *J. Plant Nutr.* **2008**, *31*, 593–612. [CrossRef]
97. Allam, N.G.; Kinany, R.; El-Refai, E.; Ali, W.Y. Potential Use of Beneficial Salt Tolerant Bacteria for Improving Wheat Productivity Grown in Salinized Soil. *J. Microbiol. Res.* **2018**, *8*, 43–53.
98. Upadhyay, S.K.; Singh, D.P. Effect of Salt-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Wheat Plants and Soil Health in a Saline Environment. *Plant Biol.* **2015**, *17*, 288–293. [CrossRef] [PubMed]
99. Abbasi, S.; Sadeghi, A.; Safaie, N. *Streptomyces* Alleviate Drought Stress in Tomato Plants and Modulate the Expression of Transcription Factors ERF1 and WRKY70 Genes. *Sci. Hort.* **2020**, *265*, 109206. [CrossRef]
100. Ashraf, M.; Foolad, M.R. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *59*, 206–216. [CrossRef]

101. Huang, Z.; Zhao, L.; Chen, D.; Liang, M.; Liu, Z.; Shao, H.; Long, X. Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Regni, L.; Del Pino, A.M.; Mousavi, S.; Palmerini, C.A.; Baldoni, L.; Mariotti, R.; Mairech, H.; Gardi, T.; D'Amato, R.; Proietti, P. Behavior of Four Olive Cultivars during Salt Stress. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 867. [[CrossRef](#)]
103. Xiong, Y.-W.; Gong, Y.; Li, X.-W.; Chen, P.; Ju, X.-Y.; Zhang, C.-M.; Yuan, B.; Lv, Z.-P.; Xing, K.; Qin, S. Enhancement of Growth and Salt Tolerance of Tomato Seedlings by a Natural Halotolerant Actinobacterium *Glutamicibacter Halophytocola* KLBMP 5180 Isolated from a Coastal Halophyte. *Plant Soil* **2019**, *445*, 307–322. [[CrossRef](#)]

## Article

# Biocontrol of Soil-Borne Pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by Plant Growth-Promoting Actinomycetes: In Vitro and In Planta Antagonistic Activity

Rihab Djebaili <sup>1,2</sup>, Marika Pellegrini <sup>1,\*</sup>, Claudia Ercole <sup>1</sup>, Beatrice Farda <sup>1</sup>, Mahmoud Kitouni <sup>2</sup> and Maddalena Del Gallo <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, Coppito, 67100 L'Aquila, Italy; djebaili.rihab@umc.edu.dz (R.D.); claudia.ercole@univaq.it (C.E.); beatrice.farda@student.univaq.it (B.F.); maddalena.delgallo@univaq.it (M.D.G.)

<sup>2</sup> Laboratory of Microbiological Engineering and Applications, University of Brothers Mentouri Constantine 1, Ain El Bey Road, Constantine 25000, Algeria; mahmoudkitouni@yahoo.fr

\* Correspondence: marika.pellegrini@univaq.it; Tel.: +39-0862433246

**Abstract:** Biotic stress caused by pathogenic microorganisms leads to damage in crops. Tomato and carrot are among the most important vegetables cultivated worldwide. These plants are attacked by several pathogens, affecting their growth and productivity. Fourteen plant growth-promoting actinomycetes (PGPA) were screened for their in vitro biocontrol activity against *Solanum lycopersicum* and *Daucus carota* microbial phytopathogens. Their antifungal activity was evaluated against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and *Rhizoctonia solani* (RHS). Antibacterial activity was evaluated against *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Strains that showed good in vitro results were further investigated in vitro (cell-free supernatants activity, scanning electron microscope observations of fungal inhibition). The consortium of the most active PGPA was then utilized as biocontrol agents in planta experiments on *S. lycopersicum* and *D. carota*. The *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardopsis aegyptica* H14 strains showed the best in vitro biocontrol activities. The diffusible and volatile compounds and cell-free supernatants of these strains showed both antifungal (in vitro inhibition up to 85%, hyphal desegregation and fungicidal properties) and antibacterial activity (in vitro inhibition >25 mm and bactericidal properties). Their consortium was also able to counteract the infection symptoms of microbial phytopathogens during in planta experiments, improving plant status. The results obtained highlight the efficacy of the selected actinomycetes strains as biocontrol agents of *S. lycopersicum* and *D. carota*.

**Keywords:** PGPB; actinomycetes; antifungal activity; antibacterial activity; cell culture filtrate; SEM; tomato; carrot



**Citation:** Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Ercole, C.; Farda, B.; Kitouni, M.; Del Gallo, M. Biocontrol of Soil-Borne Pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by Plant Growth-Promoting Actinomycetes: In Vitro and In Planta Antagonistic Activity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1305. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101305>

Academic Editors: Anton Hartmann and Diogo Neves Proença

Received: 22 September 2021

Accepted: 8 October 2021

Published: 12 October 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and carrot (*Daucus carota* L.) are among the most important vegetables of the Solanaceae and Apiaceae families [1,2]. These plants are attacked by several soil-borne pathogens that induce severe diseases, which affect plant productivity. *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* are among the most important ubiquitous fungal pathogens of several plants, including tomato and carrot [3,4]. Several bacterial pathogens attacks can also affect tomato and carrot productivity. Among these, tomato spot disease caused by *Pseudomonas syringae* induces necrotic lesions on the different parts of the plant [5], and *Pectobacterium carotovorum* causes carrot soft rot [6]. Chemical treatments are available to counteract these diseases. However, these compounds are converted into toxic derivatives [7], and their application harms the environment and nontarget organisms [8]. Plants, through beneficial microorganism enlistment via root exudates, counteract the

attacks of soil-borne pathogens [9,10]. Among these microorganisms, known as plant growth-promoting bacteria (PGPB), actinomycetes are an important source of bioactive and antimicrobial metabolites and control a wide range of phytopathogens [11]. Actinomycetes can be used as biostimulants, biopesticides, bioherbicides, and biological control agents [12,13], thanks to numerous agroactive compounds and through direct and indirect mechanisms [14]. The few effective formulations commercially available for agricultural use require an expansion of scientific knowledge on the subject. The present work aims to select a consortium of actinomycetes as a valid biocontrol agent for tomato and carrot. We screened the biocontrol capabilities of fourteen *Streptomyces* spp. and *Nocardiopsis* spp. actinomycetes that have already been demonstrated to be used as biostimulants [15] and salt stress-tolerance agents [16]. Given these capabilities, we hypothesized that these strains could be valid biocontrol agents against fungal and bacterial pathogens. To test our hypotheses, we screened the actinomycetes in vitro for antifungal and antibacterial antagonistic activities. We combined the most effective actinomycetes in a consortium and subjected them to further in vitro screening, evaluating the effects on fungal hyphae and the antibiofilm and antimicrobial activities of cell-free supernatants. Finally, we evaluated the efficacy of in planta biocontrol in tomato and carrot plants in greenhouse experiments.

## 2. Results

### 2.1. Antibacterial Activity

#### 2.1.1. In Vitro Antibacterial Activity of Selected Actinomycetes

The in vitro biocontrol activity against pathogenic bacteria was evaluated by dual culture, investigating the activity of diffusible compounds (classic Petri dishes). An interesting inhibitory effect was observed for seven of the fourteen actinomycetes. The other strains showed no inhibitory effect or moderate single-strain-specific inhibition (<25 mm). Table 1 presents the results recorded for actinomycetes with efficacy against at least two pathogenic strains.

**Table 1.** In vitro antibacterial activity of the selected actinomycetes strains against *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PC1 and PC2).

	SiG10	SxG33	SaH12	NaH14	SaJ13	SaJ27	NaS2
<i>P. syringae</i>	+	+	+++	+++	+	–	–
<i>P. corrugata</i>	++	++	+++	+++	++	–	++
<i>Pc. carotovorum</i> PC1	++	++	+++	+++	++	+	–
<i>Pc. carotovorum</i> PC2	++	++	+++	+++	++	+	++

+++ , high inhibition, > 25 mm; ++, moderate inhibition, (15–25 mm); + low inhibition, (5–15 mm); –, no inhibition. SiG10, *Streptomyces iakyrus* G10; SxG33, *Streptomyces xantholiticus* G33; SaH12, *Streptomyces albidoflavus* H12; NaH14, *Nocardiopsis aegyptica* H14; SaJ13, *Streptomyces anulatus* J13; SaJ27, *Streptomyces ambofaciens* J27; NaS2, *N. aegyptica* S2.

*Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14 showed the highest antibacterial activity in vitro, inhibiting all bacterial strains tested with an inhibition diameter >25 mm. Moderate inhibition (15–25 mm) against all the pathogenic strains was observed for *Streptomyces iakyrus* G10, *Streptomyces xantholiticus* G33, and *Streptomyces anulatus* J13, except for *P. syringae* (low inhibition, 5–15 mm). For *Streptomyces ambofaciens*, J27 was observed with only low antagonist activity against *Pc. carotovorum* strains, while for *N. aegyptica* S2, moderate inhibitory activity was observed for one of the *Pc. carotovorum* strains (PC2) and *P. corrugata*.

#### 2.1.2. Cell-Free Supernatants Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Maximum Bactericidal Concentration (MBC)

*S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 cell-free supernatants (CFSs) were investigated for their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The MIC and MBC values of the CFSs singularly and in combination are shown in Table 2.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) percentages of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14 cell-free supernatants (singularly and in combination) against *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PC1 and PC2).

Pathogenic Bacteria	SaH12 CFS		NaH14 CFS		SaH12 + NaH14 CFS	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>P. syringae</i>	25.5	50.0	50.0	50.0	25.0	50.0
<i>P. corrugata</i>	25.5	50.0	50.0	50.0	25.0	50.0
<i>Pc. carotovorum</i> PC1	-	-	-	-	50.0	-
<i>Pc. carotovorum</i> PC2	0.8	0.8	0.8	1.6	0.8	0.8

In the table: SaH12, *Streptomyces albidoflavus* H12; NaH14, *Nocardiopsis aegyptica* H14; CFS, cell-free supernatants.

The CFS of *S. albidoflavus* H12 was active at small concentrations only against the strain PC2 *Pc. carotovorum* (0.2–0.8%) with bactericidal activity (same values for MIC and MBC). Against *P. syringae* and *P. corrugata*, the MIC of this CFS was 25%. At this concentration, the activity was only bacteriostatic; bactericidal activities were obtained with 50% CFS. The observed activity for CFS of *Nocardiopsis aegyptica* H14 was slightly lower, with MIC values of 1.6% against *Pc. carotovorum* PC2 and 50% against *P. syringae* and *P. corrugata*. Bacteriostatic and bactericidal activity were observed at these concentrations, respectively. The combination of CFSs of the two strains did not affect the inhibitory and bactericidal activities observed for H12 and inhibitory and bacteriostatic activity against PC1 (MBC > 50%) was recorded.

### 2.1.3. In Planta Biocontrol Activity

The growth parameters recorded in in planta experiments of tomato and carrot are shown in Table 3. Tomato and carrot plants treated with only actinomycetes consortium (CONS) showed increased survival and growth with respect to the control (CTL). The presence of pathogenic bacteria *P. syringae* and *P. corrugata* in tomato and *Pc. carotovorum* strains in carrot induced different negative effects on plants.

**Table 3.** In planta antibacterial activity of the consortium of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14 against *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas corrugata* in tomato and *Pectobacterium carotovorum* strains in carrot.

	Survival (%)	Leaves (n°)	Damage (Grade)	Root (cm)	Shoot (cm)	Chlorophyll (mg g FW <sup>-1</sup> )
Tomato						
CTL	85.90 <sup>b</sup>	3.40 <sup>c</sup>	-	2.30 <sup>c</sup>	7.04 <sup>c</sup>	0.94 <sup>b</sup>
CONS	98.80 <sup>a</sup>	5.30 <sup>a</sup>	-	3.99 <sup>a</sup>	11.09 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>
CONS + PS	64.70 <sup>c</sup>	4.80 <sup>ab</sup>	2.80 <sup>c</sup>	2.96 <sup>b</sup>	9.32 <sup>b</sup>	1.08 <sup>a</sup>
CONS + PC	87.00 <sup>b</sup>	4.60 <sup>b</sup>	3.50 <sup>b</sup>	2.79 <sup>b</sup>	8.89 <sup>b</sup>	1.00 <sup>b</sup>
PS	60.70 <sup>e</sup>	2.70 <sup>d</sup>	2.50 <sup>a</sup>	2.02 <sup>d</sup>	6.06 <sup>e</sup>	0.62 <sup>c</sup>
PC	50.40 <sup>d</sup>	2.20 <sup>d</sup>	4.70 <sup>c</sup>	1.25 <sup>c</sup>	4.15 <sup>d</sup>	0.62 <sup>c</sup>
LSD	1.24	0.63	0.47	0.37	0.88	0.06
Carrot						
CTL	88.00 <sup>B</sup>	2.00 <sup>B</sup>	-	1.79 <sup>B</sup>	2.60 <sup>D,E</sup>	0.89 <sup>C</sup>
CONS	98.60 <sup>A</sup>	3.70 <sup>A</sup>	-	3.35 <sup>A</sup>	4.90 <sup>A</sup>	1.10 <sup>A</sup>
CONS + PC1	86.80 <sup>B</sup>	2.00 <sup>B</sup>	2.50 <sup>B</sup>	3.08 <sup>A</sup>	4.27 <sup>B</sup>	1.08 <sup>A</sup>
CONS + PC2	40.80 <sup>C</sup>	2.00 <sup>B</sup>	2.50 <sup>B</sup>	3.07 <sup>A</sup>	3.78 <sup>C</sup>	0.99 <sup>B</sup>
PC1	40.20 <sup>C</sup>	2.00 <sup>B</sup>	4.80 <sup>A</sup>	1.40 <sup>B</sup>	2.65 <sup>D</sup>	0.61 <sup>D</sup>
PC2	27.40 <sup>D</sup>	2.00 <sup>B</sup>	4.50 <sup>A</sup>	1.63 <sup>B</sup>	2.16 <sup>E</sup>	0.61 <sup>D</sup>
LSD	1.40	0.18	0.37	0.40	0.48	0.07

In the table: CONS, consortium formed by *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14; CTL, control; PS, *Pseudomonas syringae*; PC, *Pseudomonas corrugata*; PC1, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain 1; PC2, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain 2; LSD, least significant difference. Results followed by the same case letter are not significantly different according to Fisher's LSD post-hoc test. Lowercase letters (a–d) refer to the comparison of tomato experimental conditions. Uppercase letters (A–E) refer to the comparison of carrot experimental conditions.



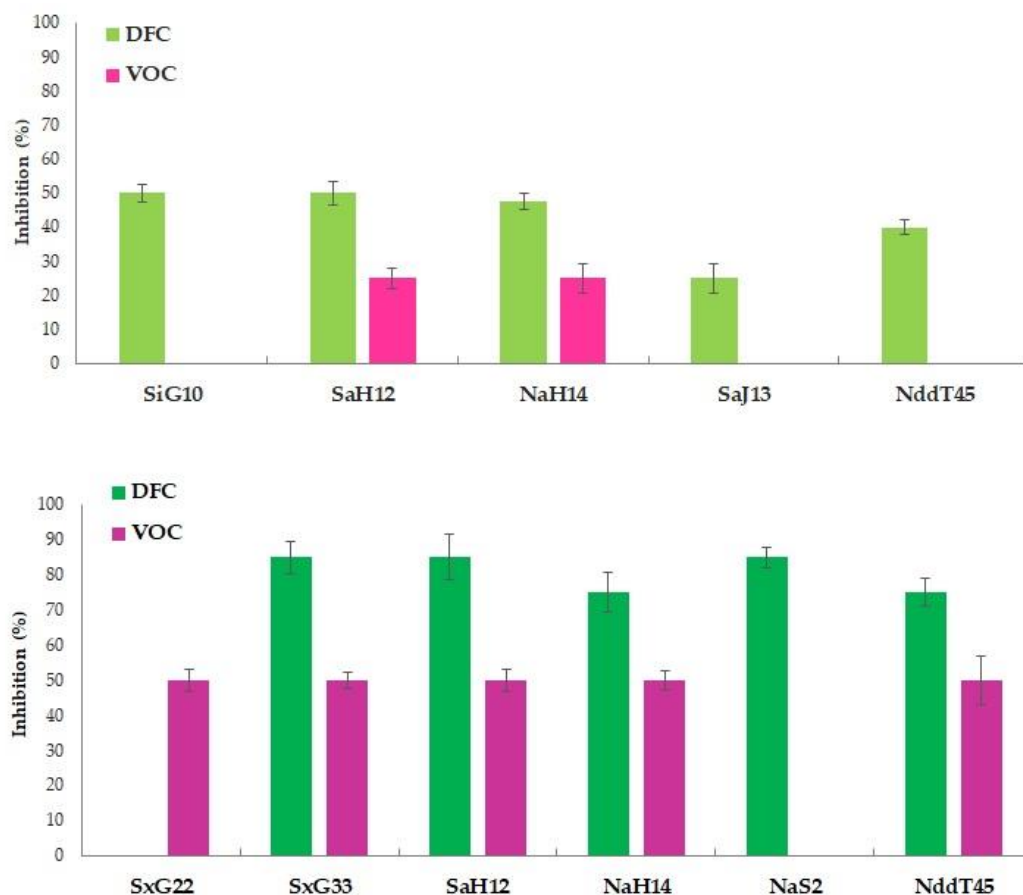
In tomato, in the presence of the pathogenic *P. syringae* (PS) infection alone, there was a decrease in survival in the number of leaves, in the length of root and shoot, and in the presence of damage on plants ( $p < 0.05$ ). The simultaneous presence of the actinomycetes consortium with the bacterial pathogen (CONS + PS) improved plant response toward pathogenic attack, decreasing the damage and improving plant development ( $p < 0.05$ ). *P. corrugata* (PC) pathogenesis affected survival and aerial parts of plants, damaging leaves and reducing shoot length and chlorophyll content compared to the control (CTL,  $p < 0.05$ ). The simultaneous presence of the actinomycetes consortium (CONS + PC) protected the plants from these negative effects, improving their survival and developmental status ( $p < 0.05$ ).

In carrot, infection of plants with both *Pc. carotovorum* strains (PC1 and PC2) induced damage and lower survival and chlorophyll content than the control (CTL,  $p < 0.05$ ). Cotreatment with the actinomycetes consortium (CONS + PC1/PC2) reduced pathogenic negative effects, improving plant development compared to control in terms of root and shoots lengths and chlorophyll content ( $p < 0.05$ ).

## 2.2. Antifungal Activity

### 2.2.1. In Vitro Antifungal Activity of Selected Actinomycetes

The results of in vitro antifungal activity of actinomycetes with interesting inhibition percentages (>25%) are presented in Figure 1.

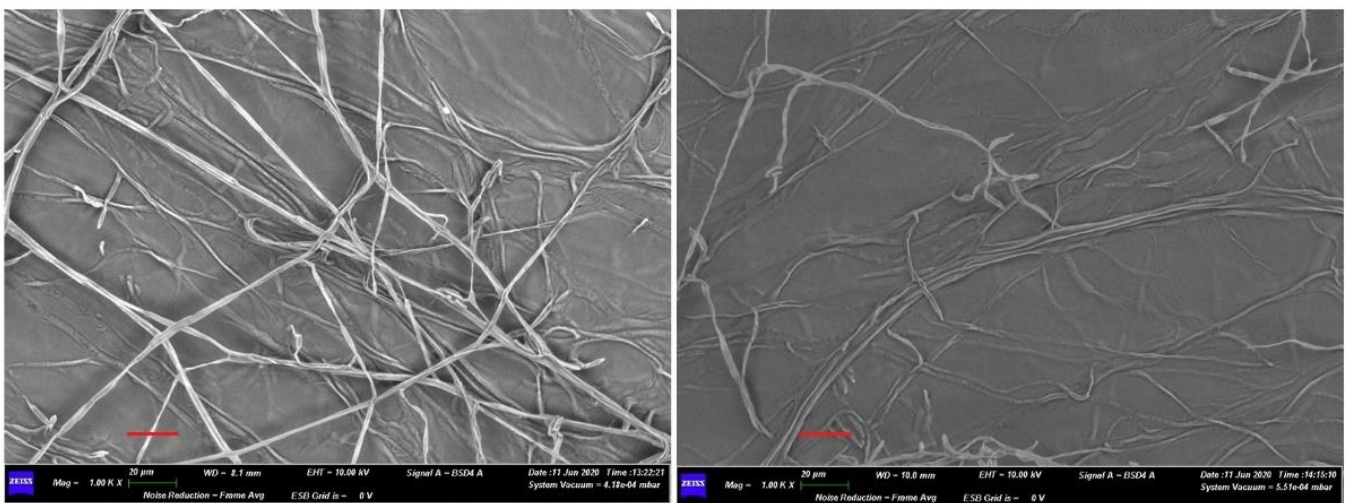


**Figure 1.** In vitro antifungal activity with diffusible compounds (DFCs) and volatile compounds VOCs of the selected actinomycetes strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (graph on the top) and *Rhizoctonia solani* (graph on the bottom). In the figure: SiG10, *Streptomyces iakyrus* G10; SaH12, *Streptomyces albidoflavus* H12; NaH14, *Nocardiopsis aegyptica* H14; SaJ13, *Streptomyces anulatus* J13; NddT45, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45; SxG22, *Streptomyces xantholiticus* G22; SxG33, *Streptomyces xantholiticus* G33; NaS2, *N. aegyptica* S2.

In vitro mycelium growth of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* was inhibited at ~50% by diffusible compounds of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14. For these two strains, the mycelial inhibition was also obtained from volatile compounds, with percentages of 25%. Among the other strains, an interesting inhibition was recorded for the diffusible compounds of *S. iakyrus* G10 (50%), *S. anulatus* J13 (25%), and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 (35%). The in vitro growth of the mycelium of *R. solani* was inhibited by a greater number of actinomycetes and with higher rates of inhibition. Mycelium inhibitions greater than 70% were recorded by diffusible compounds of *S. xantholiticus* G33, *S. albidoflavus* H12, *N. aegyptica* H14, *N. aegyptica* S2, and *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45. With the exception of *N. aegyptica* S2, the volatile compounds of all these strains, together with those of *S. xantholiticus* G22, were able to inhibit the growth of *R. solani* by 50%. Given the best performances, the antifungal abilities of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 were further investigated.

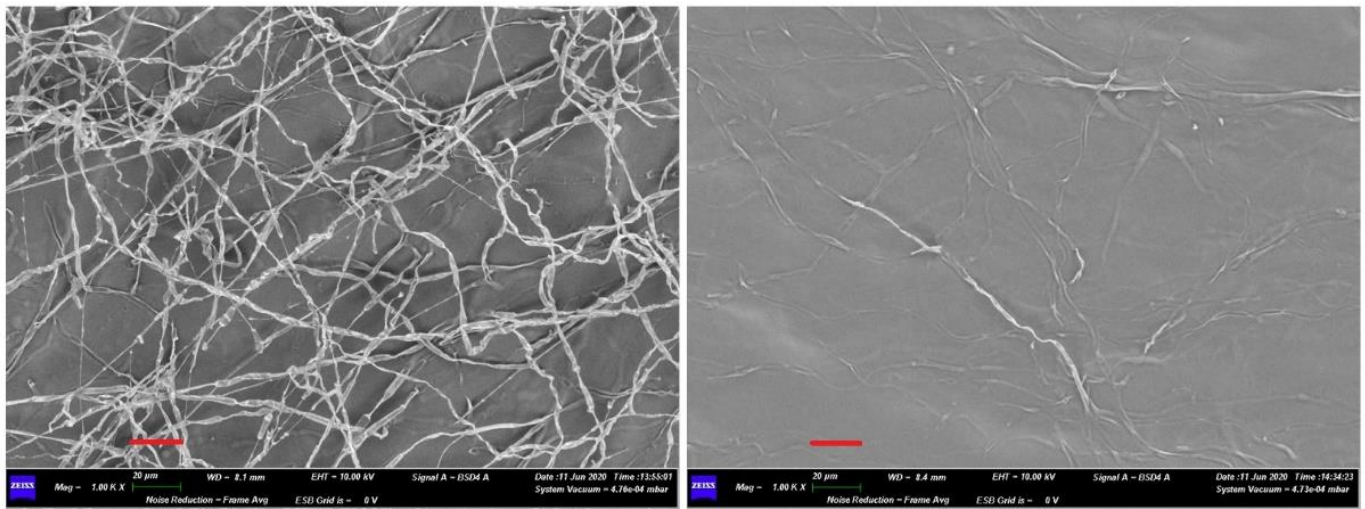
### 2.2.2. Actinomycetes Effects on the Hyphal Structure

The effects of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 on fungal mycelia were investigated by scanning electron microscopy (SEM). Micrographs of FORL and RHS mycelia in the absence and presence of actinomycetes are presented in Figures 2 and 3, respectively.



**Figure 2.** SEM micrographs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* hyphae in the absence (on the left) and in the presence (on the right) of actinomycetes. The panel on the left shows the normal branching of hyphae. In the right panel, thinner and more distorted hyphal structures can be seen, with many disaggregation points. Scale bars (in red) 20  $\mu$ m.

Micrographs of FORL and RHS mycelia grown without actinomycetes (left panels of Figures 2 and 3) showed branched and intertwined hyphae, with continuous structures. The presence of actinomycetes (right panels in Figures 2 and 3) induced morphological deterioration of the hyphae and a change in structures, which appear discontinuous and distorted.



**Figure 3.** SEM micrographs of *Rhizoctonia solani* hyphae in the absence (on the left) and in the presence (on the right) of actinomycetes. The panel on the left shows the normal hyphal structure and development. In the panel on the right, the inhibition of development by disruption of the hyphal structures can be observed. Scale bars (in red) 20  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.3. Cell-Free Supernatants Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

CFS of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 were assayed for MIC and MFC against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Rhizoctonia solani*. The results of CFS tested individually and in combination are presented in Table 4.

**Table 4.** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) percentages of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardioopsis aegyptica* H14 cell-free supernatants (singularly and in combination) against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

Pathogenic Bacteria	SaH12 CFS		NaH14 CFS		SaH12 + NaH14 CFS	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.8	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.8	0.8	0.2	0.4	0.4	0.4

In the table: SaH12, *Streptomyces albidoflavus* H12; NeH14, *Nocardioopsis aegyptica* H14; CFS, cell-free supernatants.

Active MICs against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ranged from 0.4 to 0.8%, with greater inhibition by CFS of *N. aegyptica* H14. All these concentrations had fungicidal properties (MIC = MFC). For *R. solani*, the MIC and MFC values of *N. aegyptica* H14 (0.2% and 0.4%) were lower than those of *S. albidoflavus* H12 (0.8%). However, for both fungal pathogens, when the CFSs of the two actinomycetes were pooled, fungicidal activities comparable to the lowest values observed for *N. aegyptica* H14 were observed (0.4%).

### 2.2.4. In Planta Biocontrol Activity

As found during the in planta antibacterial activity experiments (Table 5), the survival and growth of tomato and carrot plants treated with the actinomycetes consortium (CONS) alone were higher than the control (CTL). The presence of pathogenic bacteria *P. syringae* and *P. corrugata* in tomato and *Pc. carotovorum* strains in carrot induced several negative effects on plants.

**Table 5.** In planta antifungal activity of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14 consortium against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Rhizoctonia solani* in tomato and *R. solani* in carrot.

	Survival (%)	Leaves (n°)	Damage (Grade)	Root (cm)	Shoot (cm)	Chlorophyll (mg g FW <sup>-1</sup> )
Tomato						
CONS	98.40 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>	-	3.85 <sup>a</sup>	10.71 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>
CTL	86.40 <sup>b</sup>	3.60 <sup>b,c</sup>	-	2.98 <sup>c</sup>	7.71 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>
CONS + FORL	78.50 <sup>c</sup>	4.00 <sup>b</sup>	2.60 <sup>b</sup>	3.51 <sup>b</sup>	6.15 <sup>c</sup>	1.07 <sup>a</sup>
CONS + RHS	60.30 <sup>d</sup>	3.40 <sup>c</sup>	2.60 <sup>b</sup>	3.37 <sup>b</sup>	5.90 <sup>c</sup>	0.72 <sup>c</sup>
FORL	53.60 <sup>e</sup>	2.60 <sup>d</sup>	4.60 <sup>a</sup>	1.76 <sup>e</sup>	4.69 <sup>d</sup>	0.39 <sup>d</sup>
RHS	49.60 <sup>f</sup>	2.00 <sup>e</sup>	4.60 <sup>a</sup>	2.23 <sup>d</sup>	3.93 <sup>e</sup>	0.42 <sup>d</sup>
LSD	1.30	0.56	0.38	0.25	0.51	0.09
Carrot						
CONS	98.70 <sup>A</sup>	3.70 <sup>A</sup>	-	3.10 <sup>A</sup>	4.89 <sup>A</sup>	0.84 <sup>A</sup>
CTL	88.00 <sup>B</sup>	2.00 <sup>C</sup>	-	2.30 <sup>B</sup>	3.20 <sup>B</sup>	0.94 <sup>A</sup>
CONS + RHS	44.30 <sup>C</sup>	2.50 <sup>B</sup>	2.70 <sup>B</sup>	2.40 <sup>B</sup>	4.80 <sup>A</sup>	1.06 <sup>A</sup>
RHS	20.20 <sup>D</sup>	1.50 <sup>D</sup>	4.80 <sup>A</sup>	1.43 <sup>C</sup>	2.60 <sup>C</sup>	0.57 <sup>B</sup>
LSD	2.13	0.40	0.36	0.28	0.52	0.24

In the table: CONS, consortium formed by *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardiopsis aegyptica* H14; CTL, control; FORL, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*; RHS, *Rhizoctonia solani*; LSD, least significant difference. Results followed by the same case letter are not significantly different according to Fisher's LSD post-hoc test. Lowercase letters (a–e) refer to the comparison of tomato experimental conditions. Uppercase letters (A–D) refer to the comparison of carrot experimental conditions.

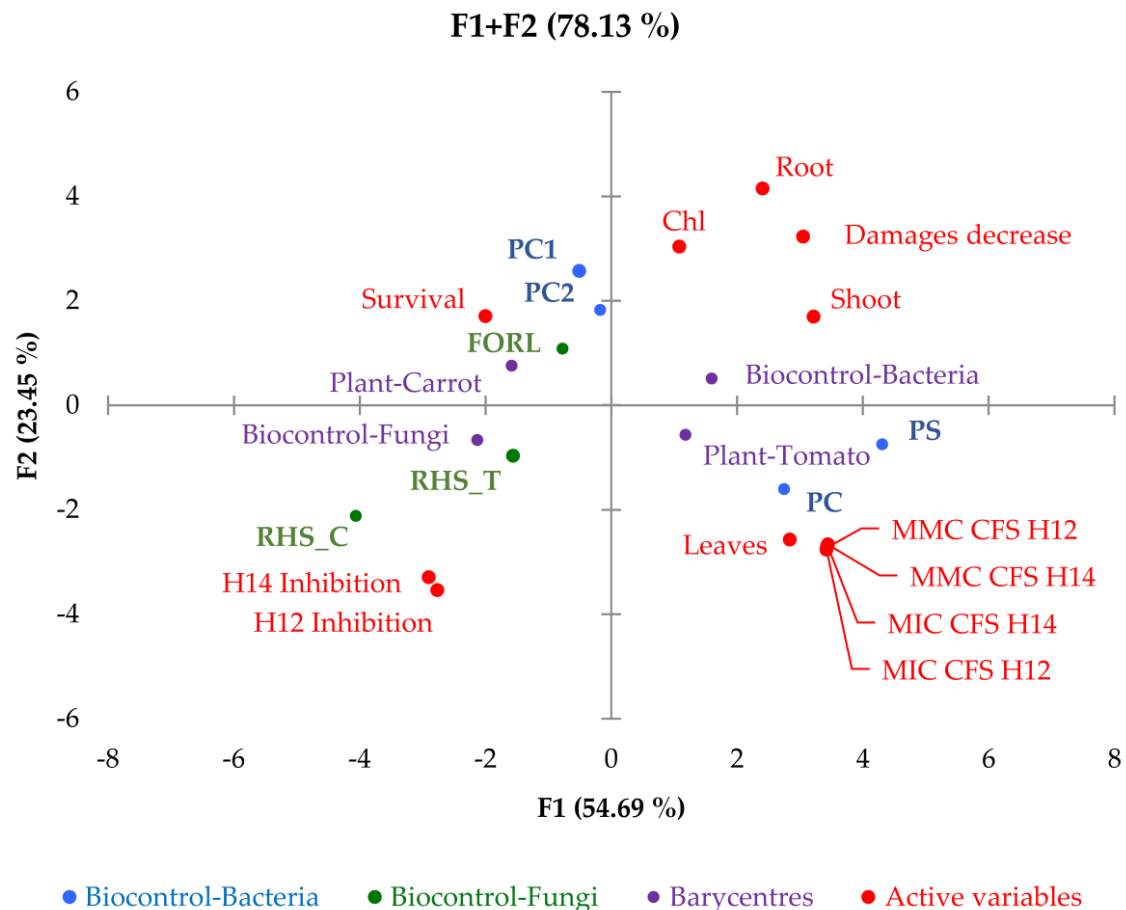
In tomato, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* infection (FORL) reduced survival, caused severe damage, and negatively affected plant shoot and root development. Cotreatment of plants with fungal infection and actinomycetes consortium (CONS + FORL) improved plant status, allowing normal growth and improving some development parameters. Compared to the control (CTL), plants with consortium inoculation and pathogenic infection (CONS + FORL) had lower survival and shoot length ( $p < 0.05$ ). Nonetheless, a similar number of leaves ( $p > 0.05$ ) and higher chlorophyll content and root length ( $p < 0.05$ ) were shown. A similar situation was observed for *R. solani*. The pathogenic attack of this fungus (RHS) reduced the survival and growth of plants. In the copresence of actinomycetes consortium (CONS + RHS), the pathogenesis was still evident. Compared to control, decreases in growth and development were observed ( $p < 0.05$ ). However, the attack was less offensive, and less damage and fewer negative effects on plant development than RHS were observed ( $p < 0.05$ ).

The *R. solani* pathogenesis on carrot (RHS) strongly reduced plant survival and all developmental parameters. The simultaneous presence of the actinomycetes consortium (CONS + RHS), even if not completely, significantly reduced the negative effects on survival; compared to the control, similar root length, amount of chlorophyll (CTL,  $p > 0.05$ ), and higher shoot length and number of leaves ( $p < 0.05$ ) were observed.

To investigate the contribution of the in vitro antimicrobial properties of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 on bacterial and fungal biocontrol in planta, the results were included in a single dataset and processed by a principal component analysis. The biplot is presented in Figure 4.

The first principal component (F1) accounted for a total variance of 55% and the second (F2) of 24%; the total variance explained by these two components was 78%. The biplot grouping, based on data correlations, showed a correlation of in planta fungal biocontrol of tomato and carrot with the in vitro inhibitory activities shown for *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14. Experimental conditions in planta of carrot bacterial pathogens were included in this grouping, together with an increased survival rate in plants treated with actinomycetes consortium and infected with pathogens, compared to plants with the sole infection. The other parameters in planta had the same correlations of bacterial biocontrol, with the exception of leaves number, which had similar correlations to in planta experimental conditions of tomato bacterial pathogens and to the in vitro inhibitory and microbicidal concentrations found for CFS *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14. These correlations underline that, at a statistical level, the differences in planta shown between

plants treated with actinomycetes consortium and infected with pathogens and plants with the sole infection can be ascribed to in vitro properties highlighted by different tests. The fungal biocontrol was more correlated (and thus ascribed) to the in vitro inhibitory activities shown for *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14. Bacterial biocontrol was more correlated/ascribed to the activity of the metabolites present in the CFS of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14.



**Figure 4.** Biplot (scores and loadings) obtained from the principal component analysis on a dataset of in vitro and in planta results (increase in the percentages in plants treated with the actinomycetes consortium and infected with pathogens compared to plants with the only infection). The tested plant and fungal or bacterial biocontrol were considered as supplementary categorical variables. In the Figure: PS, *Pseudomonas syringae*; PC, *Pseudomonas corrugata*, PC1/PC2, *Pectobacterium carotovorum* strain 1 and strain 2; FORL, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*; RHS, *Rhizoctonia solani*. Chl, chlorophyll; H12/H14 Inhibition, in vitro bacterial and fungal inhibition by *Streptomyces albidoflavus* H12/*Nocardioopsis aegyptica* H14; MIC CFS H12/H14, minimum inhibitory concentrations of CFS of *S. albidoflavus* H12/*N. aegyptica* H14; MMC CFS H12/H14, minimum microbicidal concentrations of CFS of *S. albidoflavus* H12/*N. aegyptica* H14.

### 3. Discussion

Diseases caused by pathogenic bacteria and fungi cause significant damage to crops, resulting in decreased yields and increased costs. To address this problem, farmers usually use synthetic chemicals, with major negative consequences for the environment and human health. The present work focused on the evaluation of several beneficial actinomycetes as biocontrol agents against bacterial and fungal pathogenic strains of tomato and carrot. Our approach made it possible to select a valid consortium useful for combating the selected pathogens. The in vitro assays and in planta experiments highlighted the suitability of the consortium formed by *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardioopsis aegyptica* H14 as a biocontrol agent. The consortium was able to control in planta bacterial and fungal

pathogenic attacks. The biocontrol activity could be ascribed to the different abilities of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14. This study also highlighted a contribution of the antibacterial and antifungal metabolites present in cell-free supernatants of both strains with bactericidal and fungicidal properties.

The antibacterial and antifungal activities are common traits found among actinomycetes strains [11,17–25]. The biocontrol properties of *Streptomyces* and *Nocardiopsis* genera are mainly related to the release of extracellular metabolites, siderophores, and enzymes, with a broad antimicrobial spectrum [25–27]. The genus *Streptomyces* is the major producer of antibiotics. It plays an important role in the suppression of plant diseases induced by bacterial pathogens and has a great diversity of genes for the production of biocontrol secondary metabolites [28,29].

The biocontrol of bacterial plant pathogens by *Streptomyces* has been reported in many studies [17,30,31]. Diffusible and volatile antibacterial metabolites have direct activity on pathogenic bacterial cells and on their *quorum sensing*, disrupting the gene expression regulation in response to cell-population density and biofilm formation [32]. The ability of *Streptomyces* to control plant diseases caused by fungal pathogens is widely described for *F. oxysporum* [20,33–37] and *R. solani* [7,38–43]. The diffusible and volatile compounds produced by *Streptomyces* also act against the polymeric compounds of fungal pathogens, such as chitin [44]. Cell-free supernatants produced by *Streptomyces* are a valid source of biocontrol metabolites against *F. oxysporum* and *R. solani* [45–49]. Recent work by Lyu and collaborators demonstrated that reveromycin A and B—polyketides compounds with strong antifungal activity—extracted from *Streptomyces* sp. 3–10 CFS inhibit several phytopathogenic fungi, including *R. solani* [50].

The genus *Nocardiopsis* produces a large variety of bioactive compounds, including antimicrobial agents and enzymes [51]. The biocontrol compounds described for this genus are pendolmycin, a strong antifungal agent, and griseusins, thiopeptides, and naphthospiroones, with antimicrobial power [51]. The activity against bacterial and fungal plant pathogens is less reported than in *Streptomyces*. However, metabolites of this genus have been reported to be effective antimicrobial and antifungal agents [52]. The recent work by Sabu and collaborators described a good biocontrol attitude of a *Nocardiopsis* sp. isolate, with broad antibacterial, antibiofilm, and antiphytopathogenic activity [53]. The CFS compounds of a halophilic *Nocardiopsis gilva* isolate have been reported to contain a novel p-terphenyl 1 compound with in vitro inhibitory activities against *Fusarium* spp. [54].

The in planta biocontrol was tested by combining the most efficient isolates; this strategy was in line with literature evidence supporting the use of microbial consortia for the control of microbial phytopathogens [8,55–58]. The efficacy of in planta biocontrol shown by the consortium of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* H14 can be ascribed not only to the activities mentioned above, but also to other indirect mechanisms. Once associated with plant rhizosphere and tissues, actinomycetes counteract microbial phytopathogens by promoting plant growth and development through the solubilization of phosphates, indoleacetic acid, hydrogen cyanide, and ammonia production [59]. Actinomycetes also induce systemic resistance [60], promoting a faster and stronger response of plants to pathogenic attacks [61].

#### 4. Materials and Methods

The following fourteen strains of actinomycetes, previously isolated and characterized [62], were used in this study:

- *Nocardiopsis aegyptica* H14 (MG597543).
- *Nocardiopsis aegyptica* S2 (MG597572).
- *Nocardiopsis alba* J21 (MG597576).
- *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* D14 (MG597514).
- *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* T45 (MG597502).
- *Streptomyces albidoflavus* H12 (MG597552).
- *Streptomyces ambofaciens* J27 (MG597599).

- *Streptomyces anulatus* J13 (MG597579).
- *Streptomyces iakyrus* G10 (MG597593).
- *Streptomyces thinghirensis* K23 (MG597560).
- *Streptomyces thinghirensis* J4 (MG597590).
- *Streptomyces xantholiticus* K12 (MG597545).
- *Streptomyces xantholiticus* G22 (MG597582).
- *Streptomyces xantholiticus* G33 (MG597585).

Cultures of the strains were grown on International *Streptomyces* Project No. 2 (ISP2) medium at 30 °C for 7 d.

#### 4.1. Antibacterial Activity

The fourteen isolates listed above were screened for in vitro biocontrol activity against pathogenic bacterial strains by the dual-culture method. Cell-free supernatants of the most effective strains (MIC up to 0.8%) were combined and assayed by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal activity (MBC) on 96-well plates. Broth cultures of the most effective strains were also combined in a consortium and tested for in planta biocontrol effectiveness under greenhouse experiments. Phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PS) and *Pseudomonas corrugata* pv. *tomato* (PC)—from tomato—and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains PC1 and PC2—from carrot—were provided by Prof. Giuliano Bonanomi of the Dept. of Agriculture, University of Naples Federico II (Italy).

##### 4.1.1. In Vitro Antibacterial Activity of Selected Actinomycetes

The in vitro antibacterial activity was evaluated by cocultivation of bacterial pathogenic strains with agar plugs of actinomycetes. A 100 µL volume of nutrient broth (NB) cultures of pathogenic strains, grown overnight at 37° under 150 rpm with constant shaking, was spread on the plate of ISP2/NA (nutrient agar) dishes (Ø 90 mm dishes, 50% ISP2 and 50% NA). Agar plugs of 5 d old selected actinomycetes strains grown on ISP2 solid medium were placed on streaked ISP2/NA plates, and dishes were incubated at 37 °C for 24 h. The inhibition zones formed around the agar plugs after cultivation were measured with a ruler.

##### 4.1.2. Cell-Free Supernatants Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

*Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardioopsis aegyptica* H14 cell-free supernatants (CFSs) were investigated for antibacterial activity following the CLSI guidelines [63]. CFSs were obtained from broth cultures of ISP2 strains grown at 30 °C for 7 d with constant agitation (150 rpm). Cultures were centrifuged at 10,000 g for 10 min and filtered through a 0.22 µm bacteriological filter. CFSs were tested singularly and in combination (50:50). Round-bottom 96-well plates and nutrient broth (NB) medium were used for the test, and the readings were carried out spectrophotometrically, after incubation at 37 °C for 24 h, by resazurin (Alamar blue) addition [64]. For each CFS, the minimum inhibitory concentration (MIC) was identified in the well without growth containing the lower CFS concentration. Minimum bactericidal concentration (MBC) was estimated by plating 100 µL of the wells in which there was no growth on NB medium. After incubation of the plates at 37 °C for 24 h, the corresponding concentration of CFS was considered bactericidal in the absence of colonies, while it was considered bacteriostatic in the presence of colonies.

##### 4.1.3. In Planta Antibacterial Activity

The consortium's in planta antimicrobial activity was evaluated on tomato, against PS and PC strains, and on carrot, against PC1 and PC2. The experimental conditions were arranged as follows:

- CTL: control, untreated plants.
- CONS: plants inoculated only with actinomycetes.

- CONS + PS/PC/PC1/PC2: plants treated with actinomycetes and infected with a bacterial pathogen.
- PS/PC/PC1/PC2: plants infected only with a bacterial pathogen.

Plant seeds were treated with  $10^8$  spore  $\text{mL}^{-1}$  from the actinomycetes consortium (equal amounts of *S. albidoflavus* H12 and *N. aegyptica* broth cultures) and allowed to dry overnight at room temperature. Each experimental condition comprised 25 pots with two seeds per pot (6/7 diameter) filled with common soil (pH = 8.2, electrical conductivity = 1 ds/m, total porosity = 81% (v/v)). Infections were realized after plant germination, using bacterial suspensions of  $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The experiments were carried out under natural light and environmental temperature until the symptoms of the disease manifested. Induced protection was evaluated by estimating plant survival, number of leaves, shoot and root lengths, degree of damage, and chlorophyll content [2].

#### 4.2. Antifungal Activity

The fourteen actinomycetes were screened for in vitro biocontrol activity against two fungal pathogens of tomato and carrot, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (provided by Prof. Giuliano Bonanomi of the Dept. of Agriculture, University of Naples Federico II, Italy). The in vitro biocontrol activity against fungal strains was assessed by dual culture, studying the inhibitory activities of diffusible (classic Petri dishes) and volatile (biplate Petri dishes) compounds. The inhibition zones of the most active strains were also studied by SEM. The cell-free supernatants of the most effective strains were combined and assayed by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC). Broth cultures of the most effective strains were also combined in a consortium and tested for efficacy in planta biocontrol.

##### 4.2.1. In Vitro Antifungal Activity of Selected Actinomycetes (Diffusible and Volatile Compounds)

The in vitro antagonistic activity was evaluated by cocultivation of fungal pathogens with actinomycetes strains. Inhibition of diffusible compounds was estimated by ISP2/potato dextrose agar (PDA) plates (50:50) using classic Petri dishes. Volatile compounds were estimated using biplate Petri dishes containing ISP2 for actinomycetes and PDA for fungi. Actinomycetes and fungi were transferred to plates using agar plugs ( $\varnothing$  5 mm) obtained from 5 d cultures. For both plate types of fungi, positive controls were prepared without the addition of plugs. Dishes were incubated at 28 °C until the mycelium covered the entire plate of the positive fungi control (5–7 d). Each trial was repeated 3 times, and the inhibition percentages were calculated as follows:

$$I\% = \frac{(\text{mm growth control} - \text{mm growth dual culture})}{\text{mm growth control}} \times 100$$

##### 4.2.2. Actinomycetes Effects on the Hyphal Structure

The effects of actinomycetes strains on *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and *R. solani* (RHS) were investigated by scanning electron microscopy (SEM), using a Gemini SEM 500 SEM (Zeiss, Oberkochen, Germany). Small pieces of agar from the actinomycete/fungus interaction zone and the fungus growth control were taken and mounted on adhesive tape. Freshly collected samples were observed using a specific stage for Peltier technology, with a working temperature of  $-1$  °C. Micrographs acquisition was performed with a working distance of 8.1 mm, an acceleration voltage of 10 kV, and using a backscattered electrons detector (BSD4 signal).

##### 4.2.3. Cell-Free Supernatants Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

*Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardioopsis aegyptica* H14 cell-free supernatants (CFSs) were also investigated for antifungal activity following the CLSI guidelines [64].



The CFSs were obtained as described in Section 4.1.2. CFSs were tested singularly and in combination (50:50) using 96-well round-bottom plates and PDB medium. The readings were performed spectrophotometrically, after incubation at 28 °C for 5 d, by adding resazurin (Alamar blue, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [64]. For each CFS, the minimum inhibitory concentration (MIC) was identified in the well without growth containing the lower CFS concentration. The minimum fungicidal concentration (MFC) was estimated by plating 100 µL of the wells in which there was no growth on PDA medium. After incubation of the plates at 28 °C for 5 d, the corresponding concentration of CFS was considered fungicidal in the absence of spore germination, while it was considered fungistatic in the presence of growth.

#### 4.2.4. In Planta Antifungal Activity

The consortium's in planta antifungal activity was evaluated on tomato against FORL and RHS and on carrot against RHS. The experimental conditions were arranged as follows:

- CTL: control, untreated plants.
- CONS: plants inoculated only with actinomycetes.
- CONS + FORL/RHS: plants treated with actinomycetes and infected with a fungal pathogen.
- FORL/RHS: plants infected only with a fungal pathogen.

Treatment of seeds with actinomycetes was carried out as described in Section 4.1.3. Fungal infections were carried out by inoculating the plants with the fungal spore/mycelial suspensions as previously described [2]. Twenty-five pots with two seeds per pot (6/7 diameter) were arranged for each experimental condition. The pots were filled with common soil, and the experiments were carried out under natural light and environmental temperature. Once symptoms of the disease manifested, plant survival, number of leaves, shoot and root lengths, degree of damage, and chlorophyll content were estimated [2].

#### 4.3. Statistical Analyses

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), utilizing Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc test to compare the mean values to a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). The principal component analysis (PCA) algorithm was used to decompose the dataset of in vitro and in planta results (increase the percentages in plants treated with actinomycetes consortium and infected with pathogens respect to plants with only infection). The plant tested and fungal or bacterial biocontrol were considered as supplementary categorical variables (columns). In Figure 4: Ps, *Pseudomonas syringae*; Pc, *Pseudomonas corrugata*, PC1/PC2, *Pectobacterium carotovorum* strain 1 and strain 2; FORL, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*; RHS, *Rhizoctonia solani*. All statistical analyses were carried out using XLSTAT 2014 software (Addinsoft, Paris, France).

## 5. Conclusions

Currently, agriculture is largely dependent on agrochemicals, with a negative impact on ecosystems. Alternatives are needed such as the use of bioagents to fight plant diseases. In this study, several methods were used to determine the antagonistic activity of actinomycetes isolates against various pathogenic fungi and bacteria. The results obtained showed the in vitro power to inhibit pathogenic strains with the dual-culture method and with cell-free supernatants. The results demonstrated good in vitro potential against both bacterial and fungal pathogens. The most effective strains, *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardioopsis aegyptica* H14, were further investigated and grouped in a consortium for testing in in planta experiments. In general, for both carrot and tomato plants, treatment with the bacterial consortium counteracted microbial infections, improving growth and development.

The results of this work are encouraging. These strains have shown good biofertilization and salt stress control properties in previous studies. More in-depth studies are needed on the characterization of secondary metabolites, on plant association, and on the

formulation of consortia. The suitability of applying these strains against other pathogens and in the open fields also requires further research. However, our results underline the possible role of these actinomycetes as biocontrol agents in the sustainable management of tomato and carrot crops.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.D.G. and M.K.; methodology, C.E.; software, M.P.; validation, M.P., C.E. and M.D.G.; formal analysis, R.D. and B.F.; investigation, R.D. and B.F.; data curation, R.D.; writing—original draft preparation, R.D.; writing—review and editing, M.P. and M.D.G.; visualization, R.D. and B.F.; supervision, M.P.; project administration, M.P. and M.D.G.; funding acquisition, M.D.G. and M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We wish to thank Lorenzo Arrizza for the support in the scanning electron microscope analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Que, F.; Hou, X.-L.; Wang, G.-L.; Xu, Z.-S.; Tan, G.-F.; Li, T.; Wang, Y.-H.; Khadr, A.; Xiong, A.-S. Advances in Research on the Carrot, an Important Root Vegetable in the Apiaceae Family. *Hortic. Res.* **2019**, *6*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pellegrini, M.; Ercole, C.; Di Zio, C.; Matteucci, F.; Pace, L.; Del Gallo, M. In Vitro and in Planta Antagonistic Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Consortium against Soilborne Plant Pathogens of *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, fnaa099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Goudjal, Y.; Zamoum, M.; Sabaou, N.; Mathieu, F.; Zitouni, A. Potential of Endophytic *Streptomyces* Spp. for Biocontrol of *Fusarium* Root Rot Disease and Growth Promotion of Tomato Seedlings. *Biocontrol Sci. Technol.* **2016**, *26*, 1691–1705. [[CrossRef](#)]
4. Rashad, Y.M.; Al-Askar, A.A.; Ghoneem, K.M.; Saber, W.I.; Hafez, E.E. Chitinolytic *Streptomyces griseorubens* E44G Enhances the Biocontrol Efficacy against *Fusarium* Wilt Disease of Tomato. *Phytoparasitica* **2017**, *45*, 227–237. [[CrossRef](#)]
5. Goode, M.J.; Sasser, M. Prevention—the Key to Controlling Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato. *Plant Dis.* **1980**, *64*, 831–834. [[CrossRef](#)]
6. Zhang, W.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Fan, X.; Ye, T.; Mishra, S.; Bhatt, P.; Zhang, L.; Chen, S. Quorum Quenching in a Novel Acinetobacter Sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1100. [[CrossRef](#)]
7. Goudjal, Y.; Toumatia, O.; Yekkour, A.; Sabaou, N.; Mathieu, F.; Zitouni, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off and Promotion of Tomato Plant Growth by Endophytic Actinomycetes Isolated from Native Plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 59–65. [[CrossRef](#)]
8. Debasis, M.; Ganeshamurthy, A.N.; Komal, S.; Radha, T.K.; Rupa, T.R. Plant Growth Promotion and Biocontrol Activity of Some Typical Harsh Environment Rhizo-Microbes and Their Effects on *Amaranthus cruentus* Plants. *Res. J. Biotechnol. Vol* **2020**, *15*, 1.
9. Berendsen, R.L.; Pieterse, C.M.; Bakker, P.A. The Rhizosphere Microbiome and Plant Health. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 478–486. [[CrossRef](#)]
10. Cao, P.; Liu, C.; Sun, P.; Fu, X.; Wang, S.; Wu, F.; Wang, X. An Endophytic *Streptomyces* Sp. Strain DHV3-2 from Diseased Root as a Potential Biocontrol Agent against *Verticillium dahliae* and Growth Elicitor in Tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Antonie Van Leeuwenhoek* **2016**, *109*, 1573–1582. [[CrossRef](#)]
11. Marimuthu, S.; Karthic, C.; Mostafa, A.A.; Al-Enazi, N.M.; Abdel-Raouf, N.; Sholkamy, E.N. Antifungal Activity of *Streptomyces* Sp. SLR03 against Tea Fungal Plant Pathogen *Pestalotiopsis theae*. *J. King Saud Univ. Sci.* **2020**, *32*, 3258–3264. [[CrossRef](#)]
12. Chaurasia, A.; Meena, B.R.; Tripathi, A.N.; Pandey, K.K.; Rai, A.B.; Singh, B. Actinomycetes: An Unexplored Microorganisms for Plant Growth Promotion and Biocontrol in Vegetable Crops. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vurukonda, S.S.K.P.; Giovanardi, D.; Stefani, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* Spp. as Endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 952. [[CrossRef](#)]
14. Doumbou, C.L.; Hamby Salove, M.K.; Crawford, D.L.; Beaulieu, C. Actinomycetes, Promising Tools to Control Plant Diseases and to Promote Plant Growth. *Phytoprotection* **2001**, *82*, 85–102. [[CrossRef](#)]
15. Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Smati, M.; Del Gallo, M.; Kitouni, M. Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability* **2020**, *12*, 4617. [[CrossRef](#)]

16. Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Rossi, M.; Forni, C.; Smati, M.; Del Gallo, M.; Kitouni, M. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on Triticum Durum of Actinomycetes Isolates under Salt Stress Conditions. *Soil Syst.* **2021**, *5*, 26. [[CrossRef](#)]
17. Dede, A.; Güven, K.; Şahin, N. Isolation, Plant Growth-Promoting Traits, Antagonistic Effects on Clinical and Plant Pathogenic Organisms and Identification of Actinomycetes from Olive Rhizosphere. *Microb. Pathog.* **2020**, *143*, 104134.
18. Glöckner, F.O.; Zaichikov, E.; Belkova, N.; Denissova, L.; Pernthaler, J.; Pernthaler, A.; Amann, R. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 5053–5065. [[CrossRef](#)]
19. Abd-Allah, E.F. Streptomyces Plicatus as a Model Biocontrol Agent. *Folia Microbiol.* **2001**, *46*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Anitha, A.; Rabeeth, M. Control of Fusarium Wilt of Tomato by Bioformulation of Streptomyces griseus in Green House Condition. *Afr. J. Basic Appl. Sci.* **2009**, *1*, 9–14.
21. Kim, H.-R.; Song, H.-G. Antifungal Activity of Streptomyces costaricanus HR391 against Some Plant-Pathogenic Fungi. *Korean J. Microbiol.* **2016**, *52*, 437–443. [[CrossRef](#)]
22. Kim, Y.J.; Kim, J.; Rho, J.-Y. Antifungal Activities of Streptomyces blastmyceticus Strain 12-6 Against Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology* **2019**, *47*, 329–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ningthoujam, S.; Sanasam, S.; Tamreihao, K.; Nimaich, S. Antagonistic Activities of Local Actinomycete Isolates against Rice Fungal Pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2009**, *3*, 737–742.
24. Song, L.; Jiang, N.; Wei, S.; Lan, Z.; Pan, L. Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against Colletotrichum dematium of Sarcandra glabra. *Mycobiology* **2020**, *48*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tlemsani, M.; Fortas, Z.; Dib, S.; Bellahcen, M. In Vitro Antagonism between Actinomycete Isolates and Fusarium oxysporum f. sp. ciceri: The Causative Agent of Chickpea Vascular Wilt. *South Asian J. Exp. Biol.* **2020**, *10*, 255–267. [[CrossRef](#)]
26. Errakhi, R.; Bouteau, F.; Lebrihi, A.; Barakate, M. 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.* **2007**, *23*, 1503–1509. [[CrossRef](#)]
27. Jayasinghe, B.D.; Parkinson, D. Actinomycetes as Antagonists of Litter Decomposer Fungi. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *38*, 109–118. [[CrossRef](#)]
28. Benhadj, M.; Metrouh, R.; Menasria, T.; Gacemi-Kirane, D.; Slim, F.Z.; Ranque, S. Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Wetland-Derived Streptomyces Sp. ActiF450. *EXCLI J.* **2020**, *19*, 360.
29. Wang, M.; Xue, J.; Ma, J.; Feng, X.; Ying, H.; Xu, H. Streptomyces Lydicus M01 Regulates Soil Microbial Community and Alleviates Foliar Disease Caused by Alternaria alternata on Cucumbers. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 942. [[CrossRef](#)]
30. Oskay, A.M.; Üsame, T.; Cem, A. Antibacterial Activity of Some Actinomycetes Isolated from Farming Soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* **2004**, *3*, 441–446.
31. Zhao, J.; Han, L.; Yu, M.; Cao, P.; Li, D.; Guo, X.; Liu, Y.; Wang, X.; Xiang, W. Characterization of Streptomyces sporangiiformans sp. nov., a Novel Soil Actinomycete with Antibacterial Activity against Ralstonia solanacearum. *Microorganisms* **2019**, *7*, 360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pacios-Michelena, S.; Aguilar González, C.N.; Alvarez-Perez, O.B.; Rodriguez-Herrera, R.; Chávez-González, M.; Arredondo Valdés, R.; Ascacio Valdés, J.A.; Govea Salas, M.; Ilyina, A. Application of Streptomyces Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, 310. [[CrossRef](#)]
33. Getha, K.; Vikineswary, S. Antagonistic Effects of Streptomyces violaceusniger Strain G10 on Fusarium oxysporum f. sp. cubense Race 4: Indirect Evidence for the Role of Antibiosis in the Antagonistic Process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 303–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lu, D.; Ma, Z.; Xu, X.; Yu, X. Isolation and Identification of Biocontrol Agent Streptomyces Rimosus M527 against Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum. *J. Basic Microbiol.* **2016**, *56*, 929–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Manasa, M.; Yashoda, K.; Pallavi, S.; Vivek, M.N.; Onkarappa, R.; Kekuda, T.R.P. Biocontrol Potential of Streptomyces Species against Fusarium oxysporum f. sp. zingiberi (Causal Agent of Rhizome Rot of Ginger). *J. Adv. Sci. Res.* **2013**, *4*, 1–3.
36. Saengnak, V.; Chaisiri, C.; Nalumpang, S. Antagonistic Streptomyces Species Can Protect Chili Plants against Wilt Disease Caused by Fusarium. *J. Agric. Technol.* **2013**, *9*, 1895–1908.
37. Wei, Y.; Zhao, Y.; Zhou, D.; Qi, D.; Li, K.; Tang, W.; Chen, Y.; Jing, T.; Zang, X.; Xie, J. A Newly Isolated Streptomyces Sp. YYS-7 With a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1712. [[CrossRef](#)]
38. Cao, L.; Qiu, Z.; You, J.; Tan, H.; Zhou, S. Isolation and Characterization of Endophytic Streptomyces Strains from Surface-Sterilized Tomato (Lycopersicon esculentum) Roots. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *39*, 425–430. [[CrossRef](#)]
39. Khair, A. In Vitro Antifungal Activity of Streptomyces Spororaveus RDS28 against Some Phytopathogenic Fungi. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 2835–2842.
40. Patil, H.J.; Srivastava, A.K.; Singh, D.P.; Chaudhari, B.L.; Arora, D.K. Actinomycetes Mediated Biochemical Responses in Tomato (Solanum lycopersicum) Enhances Bioprotection against Rhizoctonia solani. *Crop Prot.* **2011**, *30*, 1269–1273. [[CrossRef](#)]
41. Patil, H.J.; Srivastava, A.K.; Kumar, S.; Chaudhari, B.L.; Arora, D.K. Selective Isolation, Evaluation and Characterization of Antagonistic Actinomycetes against Rhizoctonia solani. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 2163–2170. [[CrossRef](#)]

42. Singh, S.P.; Gupta, R.; Gaur, R.; Srivastava, A.K. Antagonistic Actinomycetes Mediated Resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **2017**, *87*, 789–798. [[CrossRef](#)]
43. Yandigeri, M.S.; Malviya, N.; Solanki, M.K.; Shrivastava, P.; Sivakumar, G. Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 Isolated from Chilika Lake, India Enhances Plant Growth and Biocontrol Efficacy through Chitin Supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 1217–1225. [[CrossRef](#)]
44. Soltanzadeh, M.; Soltani Nejad, M.; Shahidi Bonjar, G.H. Application of Soil-Borne Actinomycetes for Biological Control against *Fusarium* Wilt of Chickpea (*Cicer Arietinum*) Caused by *Fusarium solani* fsp *pisii*. *J. Phytopathol.* **2016**, *164*, 967–978. [[CrossRef](#)]
45. Pellegrini, M.; Pagnani, G.; Bernardi, M.; Mattedi, A.; Spera, D.M.; Gallo, M.D. Cell-Free Supernatants of Plant Growth-Promoting Bacteria: A Review of Their Use as Biostimulant and Microbial Biocontrol Agents in Sustainable Agriculture. *Sustainability* **2020**, *12*, 9917. [[CrossRef](#)]
46. Gu, L.; Zhang, K.; Zhang, N.; Li, X.; Liu, Z. Control of the Rubber Anthracnose Fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Using Culture Filtrate Extract from *Streptomyces deccanensis* QY-3. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 1573–1585. [[CrossRef](#)]
47. Faheem, M.; Raza, W.; Zhong, W.; Nan, Z.; Shen, Q.; Xu, Y. Evaluation of the Biocontrol Potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol. Control* **2015**, *81*, 101–110. [[CrossRef](#)]
48. Li, Y.; Guo, Q.; He, F.; Li, Y.; Xue, Q.; Lai, H. Biocontrol of Root Diseases and Growth Promotion of the Tuberous Plant *Aconitum carmichaelii* Induced by Actinomycetes Are Related to Shifts in the Rhizosphere Microbiota. *Microb. Ecol.* **2020**, *79*, 134–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Alekhya, G.; Gopalakrishnan, S. Characterization of Antagonistic *Streptomyces* as Potential Biocontrol Agent against Fungal Pathogens of Chickpea and Sorghum. *Philipp. Agric. Sci.* **2014**, *97*, 191–198.
50. Lyu, A.; Liu, H.; Che, H.; Yang, L.; Zhang, J.; Wu, M.; Chen, W.; Li, G. Reveromycins A and B from *Streptomyces* sp. 3–10: Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi In Vitro and in a Strawberry Food Model System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 550. [[CrossRef](#)]
51. Bennur, T.; Kumar, A.R.; Zinjarde, S.; Javdekar, V. *Nocardiosis* Species: Incidence, Ecological Roles and Adaptations. *Microbiol. Res.* **2015**, *174*, 33–47. [[CrossRef](#)]
52. Intra, B.; Mungsuntisuk, I.; Nihira, T.; Igarashi, Y.; Panbangred, W. Identification of Actinomycetes from Plant Rhizospheric Soils with Inhibitory Activity against *Colletotrichum* spp., the Causative Agent of Anthracnose Disease. *BMC Res. Notes* **2011**, *4*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sabu, R.; Soumya, K.R.; Radhakrishnan, E.K. Endophytic *Nocardiosis* sp. from Zingiber Officinale with Both Antiphytopathogenic Mechanisms and Antibiofilm Activity against Clinical Isolates. *3 Biotech* **2017**, *7*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tian, S.-Z.; Pu, X.; Luo, G.; Zhao, L.-X.; Xu, L.-H.; Li, W.-J.; Luo, Y. Isolation and Characterization of New P-Terphenyls with Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities from Halophilic Actinomycete *Nocardiosis gilva* YIM 90087. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3006–3012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bora, L.C.; Lohit, K.; Kuldeep, T.; Parveen, K.; Joli, D.; Rinku, S. Yield Enhancement and Bacterial Wilt Suppression in Bhut Jolokia (*Capsicum Assamicum*) Using Consortia of Microbial Antagonists. *Biopestic. Int.* **2016**, *12*, 165–171.
56. El\_Komy, M.H.; Hassouna, M.G.; Abou-Taleb, E.M.; Al-Sarar, A.S.; Abobakr, Y. A Mixture of *Azotobacter*, *Azospirillum*, and *Klebsiella* Strains Improves Root-Rot Disease Complex Management and Promotes Growth in Sunflowers in Calcareous Soil. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *156*, 713–726. [[CrossRef](#)]
57. Saikia, K.; Bora, L.C. Exploring Actinomycetes and Endophytes of Rice Ecosystem for Induction of Disease Resistance against Bacterial Blight of Rice. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *159*, 1–13. [[CrossRef](#)]
58. Verma, P.P.; Shelake, R.M.; Sharma, P.; Kim, J.-Y.; Das, S.; Kaur, M. Microbes in Crop Production: Formulation and Application. In *Microbial Diversity, Interventions and Scope*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 51–73.
59. Hata, E.M.; Sijam, K.; Ahmad, Z.A.M.; Yusof, M.T.; Azman, N.A. In Vitro Antimicrobial Assay of Actinomycetes in Rice Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and as Potential Plant Growth Promoter. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2015**, *58*, 821–832. [[CrossRef](#)]
60. El-Shatoury, S.A.; Ameen, F.; Moussa, H.; Wahid, O.A.; Dewedar, A.; AlNadhari, S. Biocontrol of Chocolate Spot Disease (*Botrytis cinerea*) in Faba Bean Using Endophytic Actinomycetes *Streptomyces*: A Field Study to Compare Application Techniques. *PeerJ* **2020**, *8*, e8582. [[CrossRef](#)]
61. Pieterse, C.M.J.; Zamioudis, C.; Berendsen, R.L.; Weller, D.M.; Van Wees, S.C.M.; Bakker, P.A.H.M. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 347–375. [[CrossRef](#)]
62. Smati, M.; Kitouni, M. Diversity of Actinobacteria in the Marshes of Ezzemoul and Djendli in Northeastern Algeria. *Eur. J. Ecol.* **2019**, *5*, 41–53. [[CrossRef](#)]
63. Wayne, P.A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Inf. Suppl.* **2011**, *31*, 100–121.
64. Teh, C.H.; Nazni, W.A.; Norazah, A.; Lee, H.L. Determination of Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Larval Extract of Fly via Resazurin-Based Turbidometric Assay. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# Biocontrol Activity of Actinomycetes Strains against Fungal and Bacterial Pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L.: In Vitro and In Planta Antagonistic Activity <sup>†</sup>

Rihab Djebaili <sup>1,2,\*</sup>, Marika Pellegrini <sup>2</sup>, Matteo Bernardi <sup>2</sup>, Maria Smati <sup>1</sup>, Mahmoud Kitouni <sup>1</sup> and Maddalena Del Gallo <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiological Engineering and Applications, University of Brothers Mentouri, Constantine 1, Chaâbat Erssas Campus, Ain El Bey Road, Constantine 25000, Algeria; mariasmati87@gmail.com (M.S.); mahmoudkitouni@yahoo.fr (M.K.)

<sup>2</sup> Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, Coppito, 67010 L'Aquila, Italy; marika.pellegrini@guest.univaq.it (M.P.); matteo.bernardi1@graduate.univaq.it (M.B.); maddalena.delgallo@univaq.it (M.D.G.)

\* Correspondence: djebaili.rihab@umc.edu.dz; Tel.: +39-086-243-3246

<sup>†</sup> Presented at the 1st International Electronic Conference on Plant Science, 1–15 December 2020; Available online: <https://iecps2020.sciforum.net/>.

Published: 2 December 2020

**Abstract:** Plants are affected by various biotic and abiotic stresses due to climate change. Tomato and carrots are important crops that are attacked by various pathogens. Fourteen plant growth promoting bacteria (PGPB) belonging to the genera *Streptomyces* sp. and *Nocardopsis* sp. were selected for the biocontrol of several common fungal and bacterial pathogen. Antifungal activity was assessed against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and *Rhizoctonia solani* (RHS). Antibacterial activity was evaluated against *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *In vitro* antifungal and antibacterial antagonistic activities were evaluated by dual culture method. Fungal-bacterial interaction areas were analysed by scanning electron microscopy (SEM). Cell-free culture filtrates (CF) from strains showing good biocontrol potential, were produced and investigated for their *in vitro* antifungal and antibacterial activity. Two most effective strains were also combined in consortium and utilized for *in planta* pre-emergence biocontrol assays on both *S. lycopersicum* and *D. carota*. For each pathogenic strain, four experimental conditions were compared: CNT (no bacterial inoculation/no infection), PGPB (with bacteria/no infection), PGPB+INF (with bacteria/and infection), INF (with infection/no bacteria). The PGPB strains *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardopsis aegyptica* H14 showed good *in vitro* antifungal (inhibition > 50%) and antibacterial (inhibition halo > 10 mm) activity. The SEM micrographs showed deterioration of fungal filaments and modification of hyphal structures. The CFs of both strains were also able to inhibit FORL and RHS in *in vitro* growth (minimum inhibitory concentration of 0.2–0.8%). *In planta* biocontrol assessments showed that, the consortium was effective in reducing the infection effects of both fungal and bacterial pathogens. Dual onsortium allowed normal plant development compared to the control. These results confirm the usefulness of actinomycetes strains as a bio-control agent and can therefore be an alternative to chemicals used in agriculture.

**Keywords:** PGPB; actinomycetes; bio-control activity; fungal pathogens; pathogenic bacteria; SEM; culture filtrates; tomato; carrot

## 1. Introduction

Plants are affected by various biotic and abiotic stresses due to climate change. Areas affected by temperature increase are more susceptible to pathogens attack [1]. The use of microorganisms in agriculture is a sustainable strategy to control phytopathogens. These bacteria can improve plant health and growth, providing a long-term protection [2,3]. Several rhizospheric microorganisms act as biostimulants, and show antagonistic properties against several pathogens [4]. Among them, actinomycetes have the ability to produce a wide range of secondary metabolites (e.g. antibiotics and extracellular enzymes) [5], that inhibit the growth of several fungal and bacterial pathogens [6]. Moreover, biocontrol activity is obtained through the induction of systemic resistance [5]. The present study is aimed at evaluating the biocontrol capability of actinomycetes isolates against several fungal and bacterial pathogens of *Solanum lycopersicum* and *Daucus carota*. *In vitro* antifungal and antibacterial antagonistic activities were evaluated by dual culture method. Fungal-PGPB interaction areas were also analysed by scanning electron microscopy (SEM). From strains with good biocontrol potential, cell-free supernatant (CFS) were produced and investigated for their *in vitro* antifungal and antibacterial activity. The most effective strains were also combined in consortium and utilized for the seed treatment for *in planta* pre-emergence biocontrol assays on both *S. lycopersicum* and *D. carota*. For each pathogenic strain, four experimental conditions were compared: CNT (without PGPB/infection), PGPB (with PGPB/no infection), PGPB+INF (with PGPB/infection), INF (with infection/no PGPB). The induced protection was assessed by estimation of plant survival, morpho-biochemical parameters, damages and chlorophyll contents.

## 2. Experiments

*In vitro* antagonistic activity by diffusible and volatile compounds was carried out by dual culture method on PDA culture medium using fourteen actinomycetes strains of the genus *Streptomyces* sp, and *Nocardopsis* sp. The fungal pathogens tested were *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), and *Rhizoctonia solani* (RHS). The morphological deterioration of PGPB-fungus interaction areas were analyzed by SEM microscopy. The pathogenic bacteria tested were: *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. The inhibition percentages of fungi were calculated after incubation until the complete growth of the control plate [7]. The bacterial inhibition halos were assessed after 48 hours. Cell-free supernatant (CFS) of *Streptomyces albidoflavus* H12 and *Nocardopsis aegyptica* H14, which showed good *in vitro* biocontrol, were investigated for Minimal Inhibitory Concentration (MIC), and for Minimum Bactericidal Concentration (MBC) as described by CLSI guidelines [8]. Using polystyrene microplate, 100  $\mu$ L of media were introduced in each well, then 100 $\mu$ L of CFS of single strains, and consortium were inserted in the first wells and the dilutions were maintained. Finally, the fungi and test-bacteria were inoculated.

*In planta* antagonistic activity of H12 and H14 consortium—the most actives strains against the different tested pathogens - was assessed on *S. lycopersicum*, and *D. carota* against the abovementioned pathogens in pre-emergence [7]. The experiment was organized as follows: (i) CNT (without PGPB/infection), PGPB (with PGPB/no infection), PGPB+INF (with PGPB/infection), INF (with infection/no PGPB). Each experimental unit was realized in 25 pots with two seeds per pot under natural light conditions until the disease's symptoms showed up. The induced protection was assessed by estimation of plant survival, morpho-biochemical parameters, damages and chlorophyll contents. The plants were analyzed for the morpho-physiological characters; damages, and total chlorophyll contents [7].

## 3. Results

Almost all 14 strains (64%) showed good *in vitro* antagonistic activity by producing diffusible and volatiles compounds against fungal pathogens (inhibition percentage up to 85%). Most of the

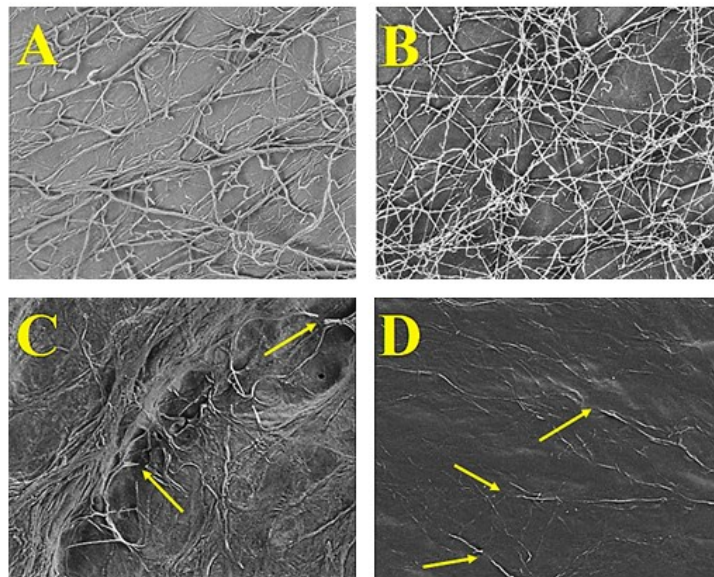
tested strains (70%) exhibit at least one activity against pathogenic bacteria (inhibition halo up to 25mm) (Table 1).

**Table 1.** *In vitro* antagonism assay of actinomycetes strains against fungal and pathogenic bacteria (n = 3).

Pathogenic strains	D14	G10	G22	G33	H12	H14	J4	J13	J21	J27	K12	K23	S2	T45
FORL	-	++	-	-	++	++	-	+	-	-	-	-	-	++
RHS	++	-	++	++	++	++	-	+	-	-	-	-	++	++
<i>P. corrugate</i>	-	++	-	++	++	++	-	++		-	-	-	++	-
<i>P. carotovorum</i>	-	++	-	++	+	-	-	++		+	-	-	-	-

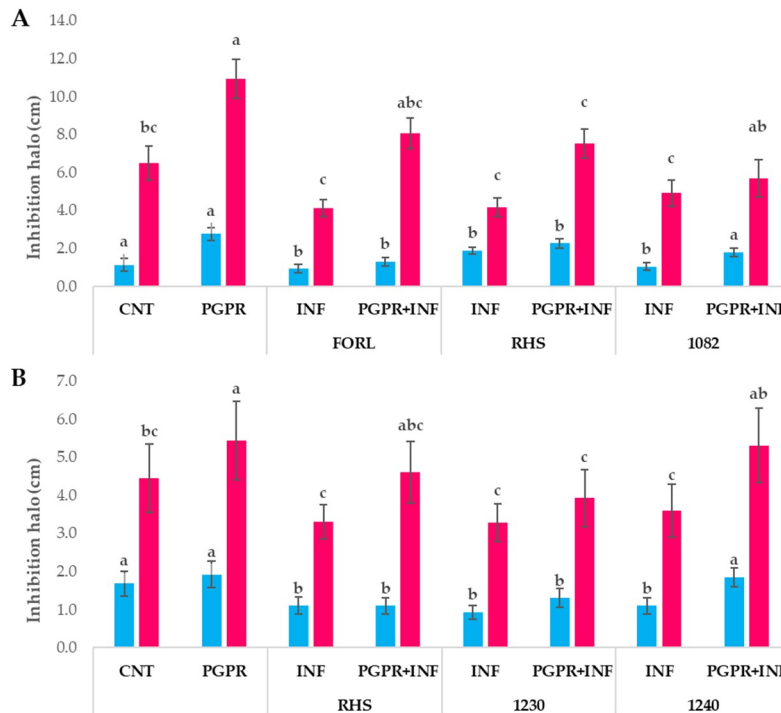
+, moderate inhibition; ++, high inhibition; -, no inhibition.

In Figure 1 are shown the SEM micrographs that highlight the comparison of the structures of fungal hyphae in the presence and in the absence of PGPB. Micrographs of FORL (1A) and RHS (1B) control show normal and continuous fungal structures. While, the micrographs of FORL-PGPB (1C) and RHS-PGPB (1D) interactions areas show clear morphological deterioration of hyphae, that appear sparse and discontinuous. *S. albidoflavus* H12, and *N. aegyptica* H14 strains also showed good antibacterial activity against *Pseudomonas corrugate*, and *Pectobacterium carotovorum* (inhibition halos > 10mm). The CFSs of combined strains were effective to inhibit growth of both FORL and RHS fungi (MBC up to 0.8 %) and most of the bacterial pathogen growth.



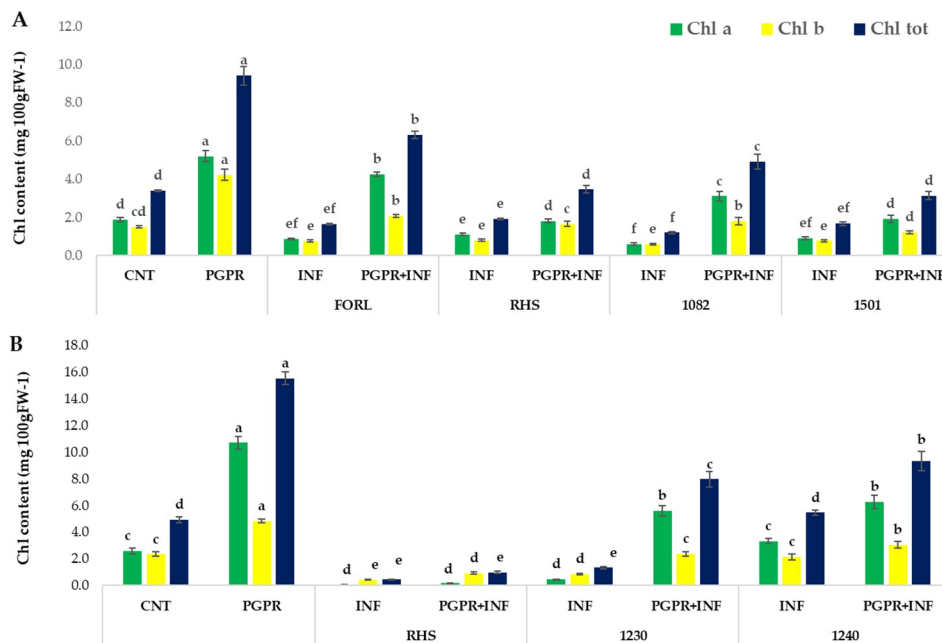
**Figure 1.** SEM micrographs of FORL and RHS hyphae. The panels show the fungal hyphal branching following a normal growth in FORL and RHS control plates (A, B, respectively). In the presence of H12 and H14 consortium, the hyphal structures change in the interaction zones of both FORL and RHS with the PGPB (C, D, respectively).

Concerning the *in planta* experiment, the inoculation with the consortium (PGPB) improved development and growth of both tomato and carrot plants compared to the control (better germination rates, morpho-physiological characters, and chlorophyll content) (Figure 2,3).



**Figure 2.** Shoot and root lengths (cm) of *S. lycopersicum* (A), and *D. carota* (B). Results followed by the same case letter not differed significantly according to Tukey's HSD post-hoc test ( $p > 0.05$ ). In the Figure: 1082, *P. syringae*; 1501, *P. corrugata*; 1230, *P. syringae* pv. *actinidiae*; 1240 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Infection decreased germination rates, growth parameters, and total chlorophyll content, and caused leaves damages with extension up to > 20mm in uninoculated plants (INF). Treatment with the consortium improved germination in infected plants (PGPB + INF) up to 15–54% for tomato, and up to 30–100% for carrots. The presence of PGPB also alleviated infection symptoms; PGPB + INF plants showed less damages, and better chlorophyll content than the control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Chlorophyll a (chl a), chlorophyll b (chl b), and total chlorophyll (chl tot) content of tomato (A), and carrots (B) fresh leaves. Results followed by same case letter are not significantly different



according to Tukey's HSD posthoc test ( $p > 0.05$ ). In the Figure: 1082, *P. syringae*; 1501, *P. corrugata*; 1230, *P. syringae* pv. *actinidiae*; 1240 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

#### 4. Discussion

The different abilities to promote plant-growth by actinomycetes strains, such as nutrient solubilization, nitrogen fixation, and phytohormones production act indirectly in the control of plant diseases [5]. The use of combined bacteria is a strategy for plants protection against pathogens attack [7]. Actinobacteria are well known for their ability to produce various bioactive compounds [9]. They are biological agents for their antagonistic activities and plants protection against several soil borne pathogens [10]. The bio-control activity of actinomycetes is linked to antibiosis, lysis mechanisms, and host defenses induction [5]. The actinomycetes strains investigated in this study also have different plant growth-promoting traits [11]. These bacteria enhance plant physiological status and offer an additional advantage to their use as biological control agents for sustainable agriculture.

#### 5. Conclusion

Nowadays, bacterial and fungal plant diseases are controlled almost exclusively by agrochemicals. These chemical products entail serious consequences for human's and ecosystems' health. The use of biocontrol agents should be encouraged to counteract this problem. Our findings show that actinomycetes could be considered a valid biocontrol agents. Further experiments are needed to determine their effectiveness on other plants, against other pathogens and under different cultivation conditions. However, these preliminary results underline that actinomycetes, and in particular *Streptomyces* and *Nocardiopsis* genera, can be biological alternatives for plants disease management.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.D., M.P., MDG; methodology, M.S., M.K.; formal analysis, R.D. and M.B.; investigation, R.D. and M.P.; resources, M.K. and M.D.G.; data curation, R.D. and M.P.; writing—original draft preparation, R.D. and M.P.; writing—review and editing, M.D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript..

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Nawaz, R.; Abbasi, N.A.; Hafiz, I.A.; Khalid, A. Increasing level of abiotic and biotic stress on Kinnow fruit quality at different ecological zones in climate change scenario. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *171*, 103936, doi:10.1016/j.envexpbot.2019.103936.
2. Fernando, W.G.D.; Ramarathnam, R.; Krishnamoorthy, A.S.; Savchuk, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 955–964, doi:10.1016/j.soilbio.2004.10.021.
3. Orio, A.G.A.; Brücher, E.; Ducasse, D.A. A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2016**, *144*, 217–223, doi:10.1007/s10658-015-0762-0.
4. Chauhan, A.K.; Maheshwari, D.K.; Kim, K.; Bajpai, V.K. Termitarium-inhabiting *Bacillus* endophyticus TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 colonizing *Curcuma longa* L.: isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting activities. *Can. J. Microbiol.* **2016**, *62*, 880–892, doi:10.1139/cjm-2016-0249.
5. Hata, E.M.; Sijam, K.; Ahmad, Z.A.M.; Yusof, M.T.; Azman, N.A. *In vitro* Antimicrobial Assay of Actinomycetes in Rice Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and as Potential Plant Growth Promoter. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2015**, *58*, 821–832, doi:10.1590/S1516-89132015060263.

6. Hasegawa, S.; Meguro, A.; Shimizu, M.; Nishimura, T.; Kunoh, H. Endophytic Actinomycetes and Their Interactions with Host Plants. *Actinomycetologica* **2006**, *20*, 72–81, doi:10.3209/saj.20.72.
7. Pellegrini, M.; Ercole, C.; Di Zio, C.; Matteucci, F.; Pace, L.; Del Gallo, M. In vitro and in planta antagonistic effects of plant growth-promoting rhizobacteria consortium against soilborne plant pathogens of *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, 099, doi:10.1093/femsle/fnaa099.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-First Informational Supplement*; CLSI: Wayne, PA, USA, 2011; Vol. 31; ISBN 1562387421.
9. Ansari, W.A.; Krishna, R.; Zeyad, M.T.; Singh, S.; Yadav, A. Endophytic Actinomycetes-Mediated Modulation of Defense and Systemic Resistance Confers Host Plant Fitness Under Biotic Stress Conditions. In *Microbial Versatility in Varied Environments*; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp. 167–180.
10. Vurukonda, S.S.K.P.; Giovanardi, D.; Stefani, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 952, doi:10.3390/ijms19040952.
11. Djebaili, R.; Pellegrini, M.; Smati, M.; Del Gallo, M.; Kitouni, M. Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability* **2020**, *12*, 4617, doi:10.3390/su12114617.



© 2020 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Thème**

Criblage des souches d'actinobactéries pour leurs pouvoirs PGPR :  
Essais *in vitro* et *in planta* sur *Solanumlycopersicum* L.,  
*Triticumdurum* et *Daucus carota* L.

**Résumé**

Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) sont une stratégie alternative valable pour une agriculture durable. Parmi les PGPB, les actinomycètes ont récemment attiré une attention croissante pour leur capacité à atténuer les stress et à améliorer la productivité agricole. Le but de cette étude était de sélectionner les souches d'actinomycètes en fonction de leurs traits favorisant la croissance des plantes et d'étudier leurs capacités d'association racinaire et leurs effets biostimulants sans et avec stress salin. Les souches ont été étudiées pour leur capacité de solubilisation du phosphate, la production d'acide indole-3-acétique, d'acide cyanhydrique et d'ammoniac, et plusieurs activités enzymatiques. Les associations bactéries-racine ont été étudiées par microscope électronique à balayage (MEB), et une expérience en serre a été réalisée pour évaluer les effets de l'inoculation sur *Solanumlycopersium* L. De même ces souches ont été testées pour leur capacité d'halotolérance *in vitro* par plusieurs tests PGPB avec différentes concentrations de sel (c.-à-d. 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 et 1,5 M NaCl) et par une expérience en serre sur *Triticumdurum*. La présence d'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase a également été étudiée. Parmi soixante actinomycètes, quatorze souches présentaient des caractéristiques favorisant la croissance des plantes. Les quatorze souches ont solubilisé le phosphate, produit de l'ammoniac et montré plusieurs activités enzymatiques à des taux différents. Le microscope électronique à balayage a révélé que les souches ont des bonnes capacités d'association racinaire et de colonisation des plantes *in vitro*. L'inoculation *in planta* par des souches d'actinomycètes a influencé positivement les paramètres de croissance des plantes de tomate. Les essais *in vitro* ont montré des traits PGP importants de ces souches sous différentes concentrations de sel. La plupart des souches (86 %) avaient une activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase avec des quantités importantes d'acide cétobutyrique. Dans l'expérience en serre, l'inoculation avec des souches d'actinomycètes a amélioré les paramètres morpho-biochimiques des plants de blé dur qui ont enregistré une teneur significativement plus élevée en chlorophylle et en proline que ceux des témoins non inoculés à la fois dans des conditions normales et stressées. Les résultats obtenus mettent en évidence l'efficacité des souches d'actinomycètes halotolérantes en tant qu'agent biofertilisant pour la gestion des maladies des plantes et pour l'atténuation des effets négatifs du stress salin chez les plantes.

**Mots clés :** PGPB ; actinomycètes; solubilisation du phosphate; acide indole-3-acétique; acide cyanhydrique; biofertilisant; ACC désaminase; blé dur; stress salin; halotolérance ; SEM ; filtrats de culture; tomate; carotte

**Membres du jury :**

Président :	BENHIZIA Yacine	Professeur UFMC 1
Directeur de thèse :	KITOUNI Mahmoud	Professeur UFMC 1
CoDirecteur de thèse :	DEL GALLO Maddalena	Professeur U. Aquila Italie
Examineur :	BOUDEMAGH Allaou-Eddine	Professeur UFMC 1
Examineur :	GRAMA Borhane Samir	MCA U. Oum El Bouaghi