

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTEGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

CAPACITÉS PROTECTRICES DES PSEUDOMONAS AUTOCHTONES

S. MEZAACHE-AICHOURE^{(1)*}, N. HAICHOURE⁽¹⁾, A. GUECHI⁽¹⁾ et M. M. ZERROUG⁽¹⁾

⁽¹⁾ LMA ,Département de Microbiologie, Faculté SNV, UFASétif 1, Algérie,
*mezaache@univ-setif.dz;mezaic2002@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Des micro-organismes de différentes origines phylogénétiques sont capables d'inhiber de nombreux agents pathogènes. Pour l'élimination de ces agents pathogènes, ces micro-organismes déploient plusieurs stratégies. Ils agissent en partie par la sécrétion de substances anti-microbiennes ayant une activité antifongique ou antibactérienne. Afin de démontrer la capacité des isolats de *Pseudomonas* à protéger les tubercules de *Fusarium solani* sp. agent de la pourriture sèche pendant le stockage, des tests de bactérisation ont été effectués par immersion des tubercules dans des suspensions successives de spores fongiques et bactériennes. Les résultats ont démontré la capacité de ces bactéries à protéger les tubercules pendant le stockage. D'autre part, chez les plantes traitées une bioprotection induite *in situ* envers *Fusarium oxysporum* sp. a été observée après huit semaines. En effet, une inhibition significative de la maladie a été observée chez celles-ci avec les isolats 2 et 5, pour lesquels les taux d'infection ont atteint respectivement 12,6 et 19,3%, et des symptômes atténués par rapport au contrôle positif.

Mots-clés : *Pseudomonas*, bio-protection, bactérisation, champignon phytopathogène.

ABSTRACT

PROTECTION CAPABILITIES OF INDIGENOUS PSEUDOMONADS

Several microorganisms of different phylogenetic origins are able to inhibit different pathogens. The microorganisms responsible for this inhibition act by more than one mechanism for the removal of pathogens. They act in part by the secretion of antimicrobial substances having an antifungal or an antibacterial activity. To demonstrate the ability of *Pseudomonas* isolates to protect the tubers from dry rot during storage, bacterization tests were performed by immersion of tubers in successive suspensions of fungal and bacterial spores. Results showed the ability of these bacteria to protect tubers during storage. On the other hand, Plants bacterization induced bio protection of plants *in situ* towards *Fusarium oxysporum* sp. After eight weeks, significant inhibition of disease was observed in bacterized plants with isolates 2 and 5, for which infection rates remained very low, 12.6 and 19.3% respectively, with attenuated symptoms compared to the positive control.

Keywords: *Pseudomonas*, bio-protection, bacterization, pathogenic fungi.

INTRODUCTION

L'idée que des rhizobactéries peuvent être utilisées pour lutter contre des phytopathogènes d'origine tellurique vient en partie des études effectuées sur les sols suppressifs (Mazzola, 2002). Certains facteurs comme le pH, la proportion d'argile et de matière organique peuvent influencer la suppression, mais cette dernière est généralement directement liée à la communauté microbienne. Cook *et al.* (1995) ont postulé que les plantes auraient développé une autre stratégie que la résistance pour se défendre contre les agents pathogènes telluriques. Cette stratégie implique la capacité de ces plantes au maintien et à la stimulation sélective de populations de microorganismes de la rhizosphère et du sol qui seraient des antagonistes de leurs pathogènes.

Le présent travail a porté sur l'étude lors de l'entreposage et *in situ* du pouvoir protecteur de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes issues de la rhizosphère de la pomme de terre après inoculation concomitante avec des champignons telluriques phytopathogènes responsables respectivement de la pourriture sèche (*Fusarium solani* sp.) et du flétrissement fusarien (*Fusarium oxysporum* sp.). En effet, ces rhizobactéries ont révélé un pouvoir antagoniste notoire *in vitro* à l'encontre de nombreuses souches fongiques phytopathogènes appartenant à différents phylums (Mezaache, 2012 ; Mezaache-Aichour et al, 2012b). Les résultats *in vitro* ne sont pas présentés dans le présent travail.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les bactéries antagonistes utilisées dans cette étude sont des *Pseudomonas fluorescens* spp. précédemment isolés et identifiés par Mezaache-Aichour *et al* (2012a). Les souches fongiques pathogènes (*Fusarium oxysporum* sp. et *Fusarium solani* sp.) proviennent de la collection du LMA (UFA Sétif 1).

TESTS D'ENROBAGE DES TUBERCULES

Pour démontrer la capacité des isolats de *Pseudomonas* à protéger les tubercules de la pourriture sèche lors de l'entreposage, des essais de bactérisation après inoculation du pathogène inspirés des travaux d'El banna *et al.* (1984) ont été effectués. Les tubercules utilisés sont désinfectés selon la méthode décrite par Kim *et al.* (1992) et ensuite traités par immersion dans des suspensions de spores (*Fusarium solani* sp.) et bactériennes (P₂, P₅, P₁₀ et P₁₂; Mezaache-Aichour et al, 2012a), respectivement 10⁴ spores et 10⁸ cellules /ml. A cet effet deux lots en plus du témoin non traité ont été préparés en vue d'être entreposés à 4°C pendant 75 jours (sauf pour les 6 derniers jours où ils seront incubés à température ambiante ; El-banna *et al.*, 1984). Dans le 1^{er} lot les tubercules sont enrobés par immersion dans des suspensions bactériennes, séchés et emballés dans des sacs en plastique. Alors que ceux du second lot sont d'abord enrobés par immersion dans des suspensions bactériennes, séchés ensuite enrobés par des suspensions de spores fongiques, séchés et emballés dans des sacs en plastique.

TESTS D'ANTAGONISME *IN SITU*

Dans des études antérieures, les isolats bactériens testés ont montré une activité antagoniste importante *in vitro* vis-à-vis des champignons telluriques phytopathogènes (Mezaache, 2012 ; Mezaache-Aichour et al, 2012b). Pour prouver leurs efficacité, des tests d'antagonisme *in situ* (en terreau stérile et non stérile et en conditions contrôlées) ont été effectués en vue de repérer des souches de *Pseudomonas fluorescens* efficaces contre les attaques précoces d'un des pathogènes étudiés, après traitement des tubercules.

Dans le premier lot : les tubercules sont traités uniquement par immersion dans 9 ml de suspension bactérienne ; alors que dans le second lot : les tubercules sont traités par immersion dans 9 ml de suspension bactérienne (P₂, P₅, P₁₀ et P₁₂; 10⁸ cellule/ml) additionnés d'1 ml de suspension de spores (10⁴ spores/ml) de *Fusarium oxysporum* sp. avant d'être plantés dans un sol stérile ou non. Un troisième lot témoin est constitué de tubercules traités par 1 ml de suspension de spores (10⁴

spores/ml) de *Fusarium oxysporum* sp. uniquement (Yigal *et al.*, 1985). Le test est effectué en triplicata.

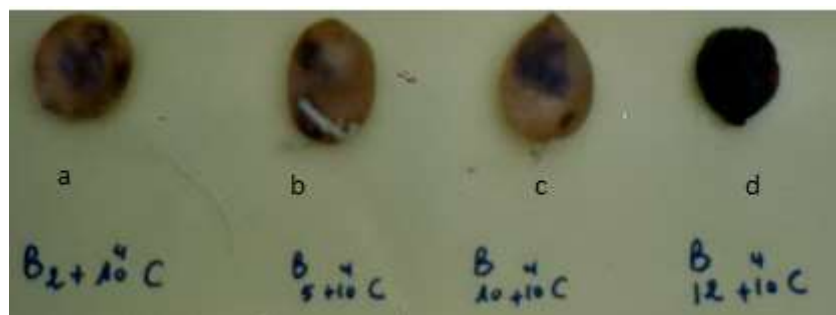
La culture des plants est réalisée au laboratoire sous une température d'environ 23°C et une photopériode de 12h. Les plants sont irrigués régulièrement avec de l'eau stérilisée. La croissance de ces plants a été suivie pendant huit semaines. L'indice de maladie (I %) est déterminé comme suit : (Total des plants malades/Total des plants observés) x 100. La détermination de cet indice a été effectuée selon la symptomatologie de la fusariose (flétrissement fusarien). L'échelle adoptée est typique à la maladie (mais aussi appliquée pour les bactéries phytopathogènes). *0 : pas de symptômes. *1 : léger flétrissement. *2 : flétrissement unilatéral avec nécroses foliaires. *3 : flétrissement généralisé *4 : mort du plant.

RESULTATS

ENROBAGE DES TUBERCULES

Le traitement des tubercules par immersion successive dans les suspensions bactériennes et de spores fongiques de *Fusarium solani* sp. a montré la capacité de ces dernières à protéger les tubercules pendant l'entreposage. En effet, des pourritures et des nécroses occasionnées par *Fusarium solani* sp. ont été observées. La figure 1 montre cette protection des nécroses (fig.1a) et également des pourritures (fig.1d). La protection observées est décroissante selon les Bactéries ou Pseudomonas suivantes $P_2 > P_5 > P_{10}$, par contre l'isolat P_{12} n'a eu aucune activité protectrice à l'encontre de ce champignon pathogène.

Figure 1 : Pouvoir protecteur des isolats de *Pseudomonas* spp ($B_{2,5,10}$ et $12 + 10^4 C = Pseudomonas$ (2, 5, 10 et 12) + Suspension fongique de *F. solani* sp.)
Protective capacity of *Pseudomonas* spp. isolates ($B_{2,5,10}$ and $12 + 10^4 C = Pseudomonas$ (2, 5, 10 and 12) + fungal suspension of *F. solani* sp.)



ANTAGONISME IN SITU

Sol non stérile

La symptomatologie observée après deux semaines de l'inoculation du pathogène et dans un sol non stérilisé, a montré que les plants inoculés par *Fusarium oxysporum* sp. avaient développé des nécroses foliaires en plus du flétrissement. L'évolution de l'infection a été très rapide chez les plants non bactérisés. Alors que les taux d'infection sont significativement moindres (entre 0 et 10 %) chez les plants bactérisés respectivement avec les isolats de *Pseudomonas* 2 et 5. L'évolution de la maladie a été ensuite rapide pour les plants bactérisés avec les isolats 10 et 12, pour atteindre un niveau de symptomatologie 4 (flétrissement et mort du plant) au bout de la cinquième semaine ; de même que pour le témoin positif. Par contre, pour les plants bactérisés avec les isolats 2 et 5, une stabilité des symptômes a été observée à partir de la 3^{ème} semaine (Tableau I).

Sol stérile

Dans le sol stérile par contre, parmi les plants bactérisés le taux d'infection a été le plus marqué avec l'isolat 12 ; où l'on a observé un flétrissement (en plus du témoin positif dont le plant a atteint le niveau 4 après deux semaines d'inoculation ; Tableau I).

Tableau I : Symptômes développés après 5 semaines de traitement
Symptoms which were developed 5 weeks after the application

Semaine / Dvpt maladie		T	Ps2	Ps5	Ps10	Ps12	<i>F.oxysporum</i> sp.	C+Ps2	C+Ps5	C+Ps10	C+Ps12
1 ^{ère}	sn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ss	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
2 ^{ème}	sn	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Ss	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
3 ^{ème}	sn	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	Ss	-	-	-	+	+	++	+	+	+	+
4 ^{ème}	sn	-	-	-	-	-		-	-	-	+
	Ss	-	-	-	+	+		+	+	+	+
5 ^{ème}	sn	-	-	-	+	+		-	-	+	+
	Ss	-	-	-	++	++		+	+	+++	+++

-- Absence de symptômes ; ± flétrissement des feuilles ; ++ flétrissement du plant ; +++ flétrissement et mort du plant ; les cases vides indiquent que le plant est mort ; sn et ss : sol stérile et sol non stérile respectivement ; Ps2,5.... : *Pseudomonas* spp. ; C : champignon (*Fusarium oxysporum* sp.)

DISCUSSION

L'application de microorganismes bénéfiques aux graines de carottes peut contrôler les maladies telluriques dues à *Alternaria* spp. (Jensen *et al.*, 2001 et 2004). Bennett et Whipps (2008), ont rapporté l'efficacité de l'application par enrobage de microorganismes bénéfiques (tel *P. chlororaphis* MA342 ou *P. CHA0*) aux bulbes d'oignons et aux graines de carottes durant l'emmagasinage précédant la plantation, qui protégeaient celles-ci des pathogènes telluriques.

La bactérisation des plants de pomme de terre a induit une bio protection des plants *in situ*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* spp. vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* spp.. Aliye *et al.* (2008) ont rapporté l'activité antagoniste de *P. fluorescens* PF9 et de *P. fluorescens* PF20 *in vivo* (sous serre), dans un sol stérile. En effet, ces bactéries sont à l'origine de la réduction du flétrissement, de l'augmentation de la biomasse des plants de pomme de terre (hauteur et poids sec), et de la suppression significative de la croissance du pathogène et de ses perturbations. L'augmentation de la hauteur des plants ainsi que celle du poids sec survient aussi bien en présence qu'en absence du pathogène.

La plupart des *Pseudomonas fluorescens* spp. dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques comme les phénazines (Haas et Défago, 2005). En effet, l'isolat 2 produit des phénazines (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012). Ces derniers sont des oxydo-réducteurs de pointe agissant vis-à-vis du pathogène *F. oxysporum* par l'accumulation de radicaux d'oxygène toxiques (Mavrodi *et al.*, 2006). Le rôle attribué à ces antibiotiques dans le biocontrôle des pathogènes telluriques, vient de la corrélation de leurs production et de l'inhibition des pathogènes *in vitro*, et de la suppression de la maladie *in vivo*. Appliqués après purification aux graines (Howel et Stipanovic, 1979 ; 1980), ou aux fruits (Janisiewicz

et Roitman, 1988), ces antibiotiques sont à l'origine de la suppression de la maladie (Keel *et al.*, 1992).

CONCLUSION

D'une manière générale, l'isolat de *Pseudomonas* P₂ est le plus actif, ses performances peuvent être corrélées à son pouvoir métabolique, notamment secondaire (données antérieures). Les isolats considérés présentent un profil de synthèse de métabolites secondaires qui les prédisposent à une utilisation comme biopesticide.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour son soutien financier dans le cadre des programmes de recherche "CNEPRU N° F01220100022 et PNR 1 / u19 / 332".

BIBLIOGRAPHIE

Aliye N., Fininsa C. and Hiskias Y., 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Bio. Contr.* 47: 282-288.

Bennett, A.J. and Whipps, J.M., 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during durum priming. *Biolog. Control*, 44: 349-361.

Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D.K., Mazzola, M., Bangera, G. and Kim, D.S., 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 4197-4201.

El-Banna, A.A., Scott, P.M., Lau, P.Y., Sakuma, T., Platt, H.W. and Campbell, V., 1984. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in Potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1169-1171.

Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319.

Howell, C. R. and Stipanovich, R. D., 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.* 69: 480-482.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 70: 712-715.

Janisiewicz, W.J. and Roitman, J., 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* 78: 1697-1700.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Madsen, M. and Jensen, D.F., 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seed borne *Alternaria* spp. *Phytopathol.* 94: 551-560.

Jensen, B., Poulsen, F.V., Knudsen, I.M.B. and Jensen, D.F., 2001. Combining microbial seed treatment with priming of carrot seeds for control of seed borne *Alternaria* spp. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC WPRS Bull.* 24: 197–201.

Keel, C., U. Schinder, M. Maurhofer, C. Voissard, J. Laville, P. Burger, P. Wirthner, Haas, D. and Défago, G., 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 4-13.

Kim, S.I., Shim, J.O., Shin, H.S., Choi, H.J. and Lee, M.W., 1992. Suppressive mechanism of soil borne disease development and its practical application. *Korean Mycol.* 20: 337-346.

Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W., Thomashow, L.S. and Mentel, M., 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 417–445.

Mazzola, M., 2002 Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 557–564.

Mezaache-Aichour S, Guechi A, Nicklin J, Drider D, Prevost H, Strange RN. Isolation, identification and antimicrobial activity of pseudomonads isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *J Plant Pathol.* 2012; 94 (1): 89-98.

Mezaache-Aichour S., Sayah N., Zerroug M.M. and Guechi A. 2012. The antagonism effect of bacteria isolated from potato cultivated soil. 64th International symposium on crop protection. Faculty of Bioscience Engineering Ghent University, Belgium May 22th 2012.

Yigal, E. and Ralph, B., 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* 75(9): 1035-1059.