

Contrôle Biologique de la Fusariose de la Tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

A. Snissi, L. Ezzouhri, B. D. Rossi. H & K. Lairini

Equipe de la Recherche sur la Valorisation Biotechnologiques des Micro-organismes (ERVBM)
Université Abdelmalek Essaadi - Faculté des Sciences et Techniques - B.P 416. Tanger
Email: snissiahmed@yahoo.fr & khalidlairini@yahoo.com

Résumé

La fusariose de la tomate est une maladie vasculaire causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Ces derniers sont des champignons telluriques dotés d'une spécificité stricte d'hôtes. Ils sont capables d'envahir l'ensemble du système vasculaire de la plante provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui fini par mourir. La lutte chimique est le moyen le plus couramment utilisé pour le contrôle de cette maladie, nonobstant, les résultats obtenus à moyen et à long terme témoignent l'efficacité limitée de ce moyen de lutte. A l'heure actuelle comme la lutte biologique contre la fusariose de la tomate, basée sur l'utilisation des bactéries

Pseudomonas fluorescents, fait l'objet de plusieurs études.

Nos premiers essais de lutte contre les agents de la fusariose par l'utilisation de *Pseudomonas* fluorescent ont montré que :

- Parmi les 71 isolats de *Pseudomonas* testés la souche PfRTH2 était inhibitrice de la croissance de F.O.L. et F.O.R.L *in vitro*.
- Les isolats PfRTBA4, PfSD13 présentent une meilleure protection contre F.O.R.L *in vivo*.
- Les trois isolats; PfRTH2, PfRTBA1 et PfRT21, se sont distingués par leur pouvoir inhibiteur de la croissance de F.O.L *in vitro*, mais étaient moyennement protecteur contre F.O.L *in vivo*. Leur pouvoir protecteur, pourrait, en effet, être amélioré en augmentant la concentration de l'inoculum bactérien dans le milieu de croissance de la plante.

Mots clés : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici*, *Pseudomonas* fluorescents, fusariose, Contrôle Biologique.

Introduction

La culture de la tomate a connu au Maroc, durant les dernières décennies un développement considérable avec unesuperficie de 4700 hectares, la production de 446.000 tonnes (MADRP, 2004). Cette primeur connaît cependant, de sérieux problèmes qui sont à l'origine de pertes à gagner considérables. La fusariose de la tomate, causées par les agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (F.O.L) et *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici* (F.O.R.L) est connue parmi les maladies les plus dévastatrices de cette culture à travers le monde. (Diter Haas et Geneviève Déflago, 2005). L'élimination de ces agents pathogènes n'est pas aisée, car leur pouvoir saprophyte et leur aptitude à coloniser les plantes non hôtes lui permettent de survivre à des conditions défavorables, ainsi ils sont capables de persister dans le sol infesté pendant plus de 10 ans en absence de la plante de la tomate.

Différentes méthodes ont été utilisées pour lutter contre la fusariose de la tomate. La lutte chimique est le moyen de lutte le plus couramment utilisé pour le

contrôle de ces agents pathogènes. Cependant, leur phytotoxicité, leur faible durée de persistance d'action ainsi que leur effet néfaste sur toutes les composantes de l'environnement rend ce moyen de lutte en recours obligé en absence d'autres moyens de lutte efficaces. Les techniques de lutte biologique *via* l'utilisation des bactéries PGPR «plant growth-promoting rhizobactéria» peut être une alternative pour le contrôle de ces agents pathogènes.

Le genre *Pseudomonas* a fait l'objet de nombreuses recherches comme antagoniste en vue d'une éventuelle utilisation comme agent de contrôle biologique de certaines maladies phytopathogènes (David M. Weller et al.,2002).

L'objectif de la présente étude, est la recherche de *Pseudomonas* fluorescents efficaces dans la lutte contre la fusariose de la tomate causées par F.O.L et F.O.R.L Pour ce faire, ce travail a visé :

- L'isolement de *Pseudomonas* fluorescents à partir du sol et des racines de plante de la tomate et d'autres plantes.

- Les souches de *Pseudomonas* isolées ont été par la suite testées *in vitro* et *in vivo* pour leur pouvoir inhibiteur de F.O.L et F.O.R.L.
- Les isolats d'intérêt feront l'objet d'une étude détaillée et plus approfondie de leur potentiel protecteur de la plante de la tomate contre la fusariose.

Matériel et Méthodes

1. Préparation de la suspension sporale des champignons.

La souche 42-87 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (F.O.L) et la souche 77r de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. (F.O.R.L) ont été utilisées. Celles-ci sont maintenues par conservation des microconidies produites en milieu liquide (PDB). La croissance des champignons a lieu en milieu liquide (3-5 jours), sous agitation orbitale à 120 rpm à 28°C, le mycélium produit est récupéré moyennant la filtration du milieu de culture à travers un filtre de nylon (Monodur, diamètre des pores 10 µm) puis séché et conservé à -20°C. Le filtrat est centrifugé à 10.000xg, les microconidies récupérées, sont resuspendues dans le glycérol à 30% (v/v) et gardées à -20°C jusqu'à utilisation (Lairini et al., 1996).

2. Recherche des *Pseudomonas* fluorescents.

2. 1. Isolement des *Pseudomonas* adhérentes aux racines et au sol.

Les échantillons de sols et de plantes utilisés dans cette étude pour isoler les *Pseudomonas* fluorescents ont été collectés au Printemps 2004 et l'été 2005.

Les racines intactes des plantes échantillonnées sont tout d'abord débarrassées de l'excès du sol adhérent, puis sont transférées dans un erlenmeyer contenant 100ml d'eau distillée stérile, la suspension microbienne adhérente aux racines est alors récupérée après agitation à 120 rpm pendant 30min (Rangarajan et al., 2001). Les différents micro-organismes constituant la suspension microbienne sont par la suite séparés sur milieu solide.

Le milieu de culture utilisé est Laura broth (LB) additionné du sarkosyl à raison de 1.2g/l et du triméthoprime à raison de 20mg/l afin d'inhiber certains microorganismes estimés non intéressants. La visualisation des colonies se fait sous la lumière UV. Les colonies émettant de la fluorescence sont repiquées plusieurs fois afin de les purifier puis sur milieu LB à 4°C ou stocké dans le glycérol à -20°C jusqu'à utilisation.

3. Mise en évidence de l'inhibition *in vitro* de F.O.L et F.O.R.L par les *Pseudomonas* fluorescents isolés.

3. 1. Préparation des cultures bactériennes à partir des isolats de *Pseudomonas* fluorescents identifiés.

Des cultures bactériennes de 12 heures sont préparées pour les différents isolats de *Pseudomonas* fluorescents. La procédure consiste à isoler une colonie fluorescente et à l'inoculer dans 10 ml de milieu LB liquide. La multiplication bactérienne est réalisée durant 24 heures sous agitation à 120 rpm à 30 °C.

3. 3. Test *in vitro*.

Afin de mettre en évidence l'effet inhibiteur de *Pseudomonas* sur F.O.L et F.O.R.L nous avons mis en croissance les deux micro-organismes sur le milieu LB, *Pseudomonas* avec F.O.L et *Pseudomonas* avec F.O.R.L. Le dispositif utilisé est représenté dans la figure 2. (Courtade, 1997).

4. Mise en évidence de l'inhibition *in vivo* de F.O.L et de F.O.R.L par les *Pseudomonas* fluorescents identifiés.

Cette étape consiste à sélectionner parmi les souches identifiées et purifiées celles qui présentent un effet protecteur de la plante de tomate contre les champignons *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (F.O.L) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (F.O.R.L).

Le sol utilisé a subi une série de stérilisation pendant une heure à 120°C, puis laissé à température ambiante pendant 24h. Les graines de tomate utilisées sont de la variété Campbell 33. La désinfection des graines se fait par l'utilisation d'hypochlorite de calcium à 5% ; ces graines sont semées et laissées pendant 15 jours dans la chambre de culture à une température de 25°C avec 60-80% d'humidité et une photopériode de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Les plantules ayant des tailles identiques sont choisies pour l'expérience.

4. 4. Test de pathogénicité *in vivo*.

Au stade deux vraies feuilles, les jeunes plantules sont transférées dans des pots en plastique contenant du sol préalablement stérilisé. Après implantation, les jeunes plantules sont inoculées avec les différentes cultures de *Pseudomonas* en phase de croissance exponentielle ; deux heures plus tard l'inoculum mycélien est ajouté. La densité mycélienne utilisée est de 2.10⁶ conidies/ml. Les contrôles consistent en des plantes saines non infectées, des plantes infectées avec le champignon et des plantes infectées avec le champignon en présence, de la souche *Pseudomonas* de référence. Les 71 isolats sont testés avec les deux champignons. L'incubation se fait dans une chambre de culture dont la température est de 25°C, avec 60-80% d'humidité et une photopériode contrôlée. Chaque trois jours les plantules sont irriguées et les résultats sont notés. (Alabouvette C. et al., 2001)

Résultats et discussion

71 isolats de *Pseudomonas* fluorescents ont été identifiés, 50 provenant des plantes de tomate, dont 35 à partir des racines et 15 à partir du sol. 21 autres souches ont été isolées à partir de plantes autres que la plante de la tomate dont, 12 à partir des racines et 9 à partir du sol.

L'étude de l'inhibition de la croissance *in vitro* de F.O.L par les différents isolats de *Pseudomonas* fluorescents a permis l'identification de trois isolats, PfRTBA1, PfRTH2 et PfRT21, aux pouvoirs inhibiteurs significativement élevés, 47.62%, 46.03% et 41.27% respectivement. Les résultats obtenus pour les trois isolats sont comparables à ceux observés pour l'isolat de référence CHAO (42.86%), Ces isolats ont montré également un potentiel de protection très élevé de la plante de la tomate *in vivo*. L'isolat PfRTH6 a montré une inhibition moyenne de 12.7% et les isolats PfRTBA4, PfRTBA6, PfRT23 et PfST13 ont permis des taux d'inhibition variant entre 4.76% et 6.35%. Ces isolats ont été observés, également, potentiellement protecteurs de la plante de tomate *in vivo* contre la fusariose. En effet dans aucun cas un flétrissement total de la plante a été observé (Figure 1).

L'étude de l'inhibition de la croissance *in vitro* de F.O.R.L par les différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées a mis en évidence l'effet inhibiteur de l'isolat PfRH2 sur F.O.R.L. Cet isolat a réussi, en effet, un taux d'inhibition de 46% nettement supérieur à celui exhibé par la souche CHAO (38%). Ce *Pseudomonas* fluorescent a également démontré un bon potentiel protecteur de la plante de la tomate *in vivo*. Les isolats PfRTBA1, PfRTBA4, PfRTBA6, PfRTH6 et PfRT21 ont montré des taux d'inhibition faibles de l'ordre de 3% mais probablement d'intérêt dans la protection de la plante de la tomate contre la

fusariose comme l'a démontré l'étude *in vivo* (Figure 2).

Deux souches, PfRTBA4, PfSD13 se sont révélées capables de protéger la plante de la tomate contre F.O.R.L *in vivo*, en comparaison avec le témoin F.O.R.L seul avec la plante de la tomate (figure 3 et 4). Les autres isolats, bien que n'ayant pas réussi une protection totale de la plante de la tomate, ont retardé de façon significative l'apparition des symptômes de la fusariose vasculaire.

Cependant, les mécanismes qui régissent les interactions plante- bactérie – champignon sont complexes. Plusieurs axes de recherche relatifs à ce domaine font l'objet d'investigations. Certaines portent sur les mécanismes d'action des bactéries qui conduisent à une stimulation de la croissance des plantes, ou de composés solubilisant les phosphates (Kucey et al. 1989). D'autres concernant l'action antagoniste sur les agents pathogènes par la production de sidérophores (Leong, 1986) ou de composés à action antifongique (Thomashow et al. 1990).

Pour confirmer la reproductivité des résultats nous avons jugé intéressant de faire des tests confirmatifs pour les résultats précédemment obtenus. Dans cette étude, 16 souches de *Pseudomonas* fluorescents ont été testées, ces souches ont réussi à retarder considérablement l'apparition de la maladie et ont limité la progression de l'agent pathogène au niveau des racines et de la tige. Certaines d'entre elles se sont révélées simulatrices de la croissance de la plante.

Ce travail a permis de sélectionner des souches qui offrent une bonne protection des plantules, qui présentent des tolérances à de faibles taux d'humidités (6%), *in vivo*. Et qui présentent une bonne tolérance aux stress biotiques et abiotiques étudiés. (Figure 3, 4).

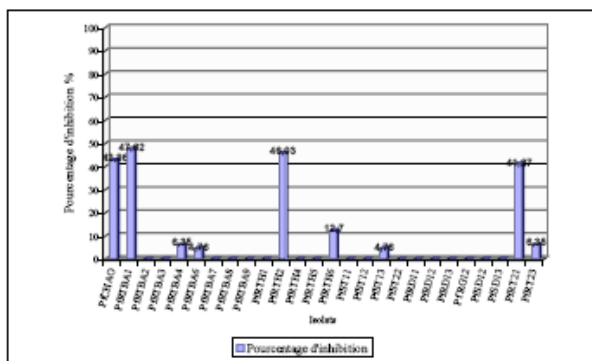


Figure 1 : Pourcentage d'inhibition de F.O.L par les différents isolats de Pseudomonas

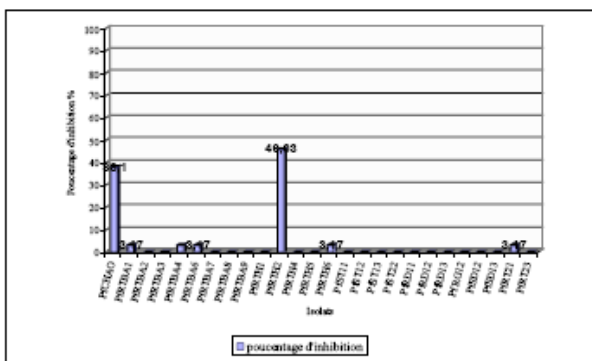


Figure 2 : Pourcentage d'inhibition de F.O.R.L par les différents isolats de Pseudomonas

Conclusion

Le présent travail a visé l'isolement, l'identification et l'utilisation de souches de *Pseudomonas* fluorescents locales dans le contrôle biologique de

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici*, agents responsables de la fusariose vasculaire de la plante de la tomate. Aussi on a réussi à identifier des isolats

d'intérêt. La poursuite de l'étude sur ces souches est nécessaire pour confirmer d'une part les résultats obtenus et d'autre part étudier leur efficacité potentielle sous différentes conditions du milieu et mettre au clair les mécanisme cellulaires et moléculaires d'interaction *Pseudomonas* - plante - pathogène impliqués dans la protection.



Figure 3: Des plantes de tomate infectées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercisi* et en présence de PfSD13 montrant une protection.



Figure 4 : Flétrissement des plantes de tomate après infection par *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercisi*

Nos premiers essais de lutte contre les agents de la fusariose par l'utilisation de *Pseudomonas* fluorescent ont montré que:

- Parmi les 71 isolats de *Pseudomonas* testés la souche PfRTH2 était inhibitrice de la croissance de F.O.L. et F.O.R.L *in vitro*.
- Les isolats PfRTBA4, PfSD13 présentent une meilleure protection contre F.O.R.L *in vivo*.
- Les trois isolats, PfRTH2, PfRTBA1 et PfRT21, ce sont distingués par leur pouvoir inhibiteur de la

croissance de F.O.L *in vitro*, mais étaient moyennement protecteurs contre F.O.L *in vivo*.

Leur pouvoir protecteur, pourrait, en effet, être amélioré en augmentant la concentration de l'inoculum bactérien dans le milieu de croissance de la plante.

La concentration de l'inoculum bactérien utilisée, la composition du milieu, la présence du fer, la nature et la concentration de la source de carbone et d'azote sont autant de facteurs qui peuvent influencer de façon significative le rôle protecteur des *Pseudomonas* contre les agents de la fusariose vasculaire de la tomate.

Bibliographie

1. Becker, J.O, Cook, R.J. (1988). Role of siderophore on suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent *Pseudomonas*. *Phytopathology* 78,778, 782.
2. Alabouvette C, Edel E, Lemanceau P, Olivain C, Recorbet G, Steinberg C. 2001. Diversity and interactions among strains of *Fusarium oxysporum*: Application to biological control. In: Jeger MJ, Spence NJ, eds. Biotic interactions in plant pathogen associations. Wallingford, UK : CAB International, 131-158.
3. Courtade, A. (1997). Etude des interactions plante/microorganismes dans le modèle maïs – *Pseudomonas fluorescens* M.3.1.-*Fusarium Roseum*. Thèse de doctorat de l'Institut National de Polytechnique de Lorraine, Spécialité "Sciences Agronomiques"
4. David M. Weller, Jos M. Raaijmakers, Brain B. McSpadden Gardener, Linda S. Thomashow (2002). Microbial Populations Responsible for specific soil suppressiveness plant pathogens. *Annu.Rev. Phytopathol.* 40 :309-48.
5. Dieter Haas et Geneviève Déflago. (2005) . Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Review Microbiology.* 10:1038- 1129.
6. Lairini, K., Pérez-Espinoza, A., Pineda, M., Ruiz-Rubio, M. (1996). Purification and Characterisation of Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1604-1609.
7. Oubella, A., Oujlouq. K. (1999). Effet des microorganismes bénéfique sur la croissance de la tomate. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, option «Horticulture» Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.
8. Rangarajan, S., Saleena, L.M., Nair, S. (2002). Diversity of *Pseudomonas* spp. Isolated from Rice Rhizosphere populations grown along a salinity gradient. *Microb Ecol* 43: 280-289.

9. Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F., Pierson, III L.S. (1990). Production of antibiotic phenazine-1- carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizospheres of wheat. *Appl Environ Microbiol* 56 : 908-912.