

IDENTIFICATION DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTS ET APPLICATION DE LEURS LYOPHILISATS POUR LE BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DE LA TOMATE

BENOUSSAID Nacéra*¹, BENCHABANE Messaoud¹ et THONART Philippe²

1. Laboratoire de Protection et valorisation des ressources biologiques (LPVRB) – Faculté SNV – Université de Blida 1, Algérie.
2. Walloon Center for Industrial Biology (CWBI), Bio-Industry Unit, Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés, 2-5030 Gembloux; Belgium.

Reçu le 16/02/2018, Révisé le 19/04/2018, Accepté le 29/05/2018

Résumé

Description du sujet : Identification métabolique et moléculaire de souches de *Pseudomonas* fluorescents et application des formes lyophilisées dans le contrôle biologique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*.

Objectifs. Confirmation de l'identification des souches rhizobactériennes sélectionnées, la production d'inoculum lyophilisé et tester leur efficacité dans le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate

Méthodes : 15 souches ayant montré leur efficacité en tant qu'agents de lutte biologique ont fait l'objet d'une identification classique (morphologie, tests physiologiques, biochimiques et Biolog), d'une analyse de l'ARNr 16S et d'un séquençage. Des préparations bactériennes lyophilisées ont été testées *in vitro* et *in situ* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

Résultats : L'identification phénotypique et génotypique a montré que l'espèce dominante est *P. fluorescens* (50%), en plus de la présence de *P. putida*. Des activités antagonistes importantes, allant de 22.08 % à 54.16 %, ont été enregistrées sur les trois milieux de culture testés (KB, PDA et le mixte KB - PDA). La fusariose vasculaire s'est sensiblement réduite (63%), suite à l'application des lyophilisats bactériens, par rapport aux témoins positifs malades.

Conclusion : Les inoculum lyophilisés présentent une stabilité biologique ayant permis de conserver les potentialités antagonistes des souches sélectionnées.

Mots clés : *Pseudomonas* fluorescents; Identification; Lyophilisats; Biocontrôle; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*.

IDENTIFICATION OF FLUORESCENT *PSEUDOMONAS* STRAINS AND APPLICATION OF THEIR FREEZE-DRIED IN BIOCONTROL OF TOMATO FUSARIUM VASCULAR WILT

Abstract

Description of the subject: Metabolic and molecular identification of fluorescent *Pseudomonas* strains and application of lyophilised forms in the biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*

Objective: Confirmation of the identification of the selected rhizobacterial strains, the production of freeze-dried inoculum and test their effectiveness in the biocontrol of tomato fusarium vascular wilt.

Methods: 15 strains that have demonstrated efficacy as biological control agents have been classically identified (morphology, physiological, biochemical and Biolog tests), 16S rRNA analysis and sequencing. Lyophilized bacterial preparations were tested *in vitro* and *in situ* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

Results: Phenotypic and genotypic identification showed that the dominant species is *P. fluorescens* (50%), in addition to the presence of *P. putida*. Significant antagonistic activities, ranging from 22.08 % to 54.16 %, were recorded on the three culture media tested (KB, PDA and the mixed KB - PDA). Vascular fusarium wilt was significantly reduced (63%), following the application of bacterial lyophilisates, compared to the sick positive controls.

Conclusion: The freeze-dried inocula have a biological stability, which has made it possible to preserve the antagonistic potentialities of the selected strains.

Keywords: *Pseudomonas* fluorescents; Identification; freeze-dried inocula; biocontrol; *Fusarium. oxysporum* f.sp. *lycopercisi*.

* Auteur correspondant : Benoussaid Nacera, E-mail : nacerabenoussaid@yahoo.fr

INTRODUCTION

La fusariose vasculaire de la tomate est l'une des maladies les plus dévastatrices sur cette culture à travers le monde. L'agent causal, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, est un champignon tellurique doté d'une spécificité stricte d'hôtes, capable d'envahir l'ensemble du système vasculaire provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par mourir [1]. Bien que certaines pratiques culturales soient recommandées, il n'existe aucun traitement chimique efficace pour les plantes infectées et aucune méthode ne permettent de lutter efficacement contre cette maladie. La gestion de cette maladie par des fongicides cause de graves problèmes environnementaux et ils sont également toxiques pour les organismes non ciblés [2, 3]. L'élimination de ces agents pathogènes n'est pas aisée, car leur pouvoir saprophyte et leur aptitude à coloniser les plantes non hôtes leur permettent de survivre même dans les conditions défavorables, ainsi ils sont capables de persister dans le sol infesté pendant plusieurs années en absence de la plante [4].

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes, en tant que biopesticides et/ou biofertilisants, est une technologie émergente et écologiquement compatible, considérée comme alternative prometteuse aux pesticides et engrais de synthèse [5]. En effet, des études ont été menées sur les rhizobactéries (PGPR), connus par leur forte colonisation des rhizosphères des plantes [6], exhibent des potentialités avérées en termes de phytostimulation et de bioprotection des plantes, par le biais d'un large éventail de mécanismes d'action [7, 8]. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents microbiens est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal.

Une grande part des recherches réalisée sur les rhizobactéries souligne l'importance et le potentiel du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents [9]. En effet, au cours des deux dernières décennies, des études ont signalé des augmentations significatives dans la croissance et le rendement des cultures en réponse à l'inoculation avec quelques souches de

Pseudomonas spp. fluorescents [10, 11].

Même si leur utilisation en pratiques agricoles reste limitée, des formulations à base de souches de ces rhizobactéries ont été mises sur le marché international des biopesticides en dépit des difficultés agronomiques et commerciales. De plus le stockage et la conservation de ces inoculums sont souvent délicats [12]. La lyophilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents sous forme de poudre rend plus économique sa conservation, son transport et sa commercialisation [13]. Cette méthode, qui nécessite une congélation, exige des changements assez agressifs en température lors de la conception des formulations microbiennes. Dans certains cas, elle occasionne des altérations cellulaires (peroxydation des acides gras) et génétiques (modification des protéines). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules [14].

Le contexte de ce présent travail est de confirmer l'identification de souches de *Pseudomonas* fluorescents par des méthodes classiques (morphologie, tests biochimiques) et moléculaires. Les souches ainsi sélectionnées doivent subir des procédés de lyophilisation pour obtenir des préparations bactériennes applicables directement. Les expérimentations de ces formulations, en qualité de biopesticide, seront vérifiées dans le biocontrôle de l'agent de la fusariose vasculaire de la tomate. Dans ce sens, notre travail a été orienté pour mettre en évidence l'efficacité et la stabilité des préparations après formulation et stockage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Bactéries antagonistes

Sur la base de leurs caractéristiques métaboliques et de leur potentiel de lutte biologique, 15 souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir de sols rhizosphériques de différentes palmeraies et d'arbres fruitiers du sud algérien ont été utilisées dans ce travail. La sélection est en fonction de leur origine et de leur capacité à produire des métabolites impliqués dans le biocontrôle, à savoir les pyoverdines (pvd), l'acide cyanhydrique (HCN) et les phénazines (phz) (Tableau 1).

Tableau 1 : Origine et caractéristiques des souches de *Pseudomonas* fluorescents

Souches	Code BCCM*/ LMG	Plantes hôtes	Origine	Caractéristiques		
				Pvd	HCN	Phz
BB6	ID14047	Palmier dattier	Bechar (Beni Abbas)	+	+	+
BB10	ID14048	Palmier dattier	Bechar (Beni Abbas)	+	+	-
BT3	ID14053	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
BT7	ID14054	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
BS4	ID14050	Palmier dattier	Bechar (Taghit)	+	+	-
F8	ID14041	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F20	ID14043	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F21	ID14055	Palmier dattier	Ouargla	+	+	+
F23	ID14044	Palmier dattier	Ouargla	+	+	-
F19	ID14042	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
F27	ID14045	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
F48	ID14046	Tomate	Ghardaïa	+	+	-
PI9	ID14051	Poirier	Ghardaïa	+	+	+
PI11	ID14052	Poirier	Ghardaïa	+	+	-
GP4	ID14049	Pommier	Ghardaïa	+	+	-

Pvd : Pyoverdines, HCN : Acide cyanhydrique, Phz : phénazines

*BCCM/ ILMG: Bacteria Collection Laboratorium Voor Microbiologie Universiteit Gent K. Lledeganckstraat 35 B-9000 Gent - Belgium Bccm.

2. Agent pathogène

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (FOL, MUCL 43876) fourni par la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgique a été utilisé pour les essais d'antagonismes. La suspension fongique a été préparée en cultivant FOL sur PDA (Potato Dextrose Agar) [15] et incubée à 25 °C pendant 7 jours. Le mycélium a été raclé et remis en suspension dans un milieu nutritif liquide et cultivé à 25 °C. La suspension finale a été étalonnée avec du MgSO₄ 10 mM stérile à une concentration de 10⁶ conidies / ml [16]. La pureté a été vérifiée avec des cultures monosporales sur PDA. Les suspensions conidiennes ont été préparées avec des disques de culture fongiques (âgées de huit jours, incubées à 28 °C) et inondées avec 2 ml d'eau distillée stérile. La culture est ainsi raclée et mise en suspension dans 48 ml d'eau distillée stérile. Les suspensions de microconidies obtenues ont été filtrées à travers six couches de gazes stériles, pour séparer le mycélium des conidies, et ajustées par un hématimètre à 10⁶ microconidies / ml [17].

3. Caractérisation et identification des bactéries

En plus de l'identification basée sur le système BIOLOG (BCCM/LMG GENT Belgique),

un séquençage partiel de l'ADNr 16S a été réalisé pour les souches F8 (ID14041), F19 (ID14042), F20 (ID14043), F23 (ID14044), F27 (ID14045), BB6 (ID14047), BS4 (ID14050), PI11 (ID14052) et BT7 (14054). La pureté des cultures bactériennes a été vérifiée sur milieu TSA à 28 °C (BBL 11768).

3.1. BIOLOG, empreinte phénotypique

Une plaque de microtitration (BIOLOG GENIII) a été utilisée pour déterminer les caractéristiques de chaque bactérie à oxyder 71 sources de carbone et à tester sa sensibilité vis-à-vis de 23 substances chimiques. Les résultats ont été interprétés selon les instructions du fabricant (Biolog Inc., Californie USA). Après inoculation, les cultures ont été cultivées pendant 24 heures à 33 °C sur de l'agar Biolog Universal Growth additionné de sang (BUG + B). Une analyse de clusters sur les résultats a été réalisée en utilisant le coefficient de Bray-Curis et UPGMA en utilisant le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique).

3.2. Séquençage de l'ADNr 16S et étude phylogénétique

L'ADN a été préparé selon le protocole de Niemann et al. [18]. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces suivantes :

Nom (a) Séquence synonymique (5' → 3')
Position (b)

16F27 pA AGA GTT TGA TCC TGG
CTC AG 8-27
16R1522 pH AAG GAG GTG ATC CAG
CCG CA 1541-1522

(a) F : amorce directe / R: amorce inverse

(b) Position d'hybridation faisant référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

L'ADNr 16S amplifié par PCR a été purifié en utilisant le kit de nettoyage PCR NucleoFast® 96 (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit de séquençage Cycle BigDye® et purifiées avec le kit de purification BigDye® X TerminatorT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le séquençage a été effectué en utilisant l'analyseur génétique ABI Prism® 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les amorces directes et inverses suivantes ont été utilisées pour obtenir un chevauchement partiel des séquences, assurant des données assemblées très fiables :

- Pour 1D14041 à 1D14045: gamma, * gamma, BKL1

- Pour 1D14047, 1D14050, 1D14052 et 1D14054: gamma, * gamma, BKL1, 3

Nom (a) Séquence synonymique (5' → 3')
Position (b)

16F358 * Gamma CTC CTA CGG GAG GCA
GCA GT 339-358
16R339 Gamma ACT GCT GCC TCC CGT
AGG AG 358-339
16R519 BKL1 GTA TTA GCC CGG CTG
CTG GCA 536-516
16R1093 3 GTT GCG CTC GTT GCG GGA
CT 1112-1093

(a) F : amorce directe / R: amorce inverse

(b) Position d'hybridation faisant référence à la numérotation des séquences du gène de l'ARNr 16S de *E. coli*.

L'assemblage des séquences a été réalisé en utilisant le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique). Une matrice de similarité a été créée en utilisant le même logiciel par calcul d'homologie avec une pénalité de gap de 0% et après élimination des bases inconnues.

L'analyse phylogénétique a été réalisée après inclusion de la séquence consensus dans un alignement de petites séquences de sous-unités ribosomiques collectées à partir de la bibliothèque de séquences nucléotidiques internationale EMBL (European Molecular Biology Laboratory, www.embl.org). Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode phénétique NJ (neighbour-joining).

4. Formulation

Quatre souches, productrices de quelques métabolites secondaires impliqués dans leurs activités antagonistes, ont fait l'objet d'une formulation au niveau du Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité de Bio-Industrie, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique. La procédure de formulation a été réalisée sous la direction du Professeur Philippe Thonart, pour l'obtention de préparations bactériennes lyophilisées à des fins de conservation et de stockage. Les lyophilisats obtenus ont été scellés sous vide dans des sachets en aluminium (250 g) et stockés pendant trois années à 4 °C.

5. Activités antagonistes *in vitro*

Le test d'antagonisme *in vitro* a été effectué avec les 4 souches bactériennes de *Pseudomonas fluorescent* lyophilisées vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Le pouvoir antagoniste a été testé sur trois milieux différents : PDA (favorable au développement des champignons), KB (favorable aux *Pseudomonas*) et le milieu mixte PDA-KB (1: 1 v / v). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent *et al.* [19]. Les souches bactériennes, âgées de 24 h, sont étalées en ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri le milieu gélosé. Vingt-quatre heures plus tard et à l'opposé, un disque fongique de 6 mm (âgé de 5 jours) est déposé au centre de la boîte. L'ensemble est incubé à de 28 °C pendant sept à dix jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes du champignon pathogène, en présence des souches de *Pseudomonas* comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante [20] : % d'inhibition = $(R_{\text{témoin}} - R_{\text{test}}) / R_{\text{témoin}} \times 100$. $R_{\text{témoin}}$: distance radicale maximale de la croissance du champignon, R_{test} : distance radicale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

6. Essai d'Antagonisme *in situ*

L'étude *in situ*, de l'impact de la lyophilisation et du stockage sur la stabilité des propriétés antagonistes, a été expérimentée avec trois souches (BB6, BB10 et F21) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (Fol). Les semences de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Saint Pierre) ont été désinfectées avec l'hypochlorite de sodium à 2° pendant 10 mn, suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérile et séchées sur papier filtre stérile. Les graines prégermées ont été transférées dans des pots en plastiques sur un substrat stérilisé (2/3 de tourbe et 1/3 de sol). L'arrosage a été effectué chaque jour avec de l'eau stérile. Au stade 2 à 3 feuilles, les plantules ont été inoculées par des suspensions bactériennes (10^8 UFC/ml). L'inoculation des plantules avec la suspension fongique (10^6 conidies/ml) a été effectuée 48 h après la bactérisation à raison de 2 ml par pot. Les témoins négatifs et positifs ont été traités, respectivement, par l'eau distillée stérile et uniquement par la suspension conidienne de Fol [21].

Le dispositif expérimental adopté est en trois blocs aléatoires complets sous serre en verre (25 – 28 °C). Chaque bloc est composé de onze traitements : plants inoculés respectivement avec les souches lyophilisées BB6, BB10, F21 avec et sans cryoprotecteur en interaction avec Fol; des plants inoculés avec les mêmes souches non lyophilisées (fraichement cultivées 24h) en interaction avec Fol; des plants inoculés uniquement avec la suspension conidienne de Fol et des plants inoculés par l'eau distillée stérile. Chaque traitement est représenté par dix plants par bloc, soit 30 plants par traitement.

Un suivi quotidien des symptômes a débuté 24 h après l'application de la suspension fongique, pendant une période de 60 jours. Le suivi de la progression de la maladie s'est basé sur l'échelle symptomatologique adaptée à la fusariose des plantes herbacées [21]: (0) aucun symptôme, (1) jaunissement unilatéral, (2) jaunissement généralisé, (3) décoloration unilatérale et/ou longitudinale,

(4) flétrissement généralisé, (5) mortalité. L'évolution de la maladie a été estimée par l'incidence de la maladie (taux d'infection) et l'indice de McKinney (gravité) [22, 23].

6.1. Taux d'infection

Le taux d'infection exprime le pourcentage des plants malades (n), par rapport au nombre total des plants (N) examinés [23]. Taux d'infection (%) = $(\sum n / N) \times 100$

6.2. Indice de McKinney (Sévérité)

La sévérité de la fusariose vasculaire a été évaluée par le calcul de l'indice de McKinney [22]. Indice de McKinney (%) = $[\sum (f.v) / N.X] \times 100$, f : classe de l'infection, v : nombre des plants par chaque classe, N : nombre totale des plants observés, X : valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation (5).

7. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de logiciel SYS STAT version 13 (2009). Tous les paramètres analysés ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA). Dans les cas où la différence est significative, les moyennes obtenues sont comparés et classées avec le test de Newman-Keuls au risque d'erreur $\alpha = 0,05$ [24].

RÉSULTATS

1. Caractérisation et identification

1.1. BIOLOG, empreinte phénotypique

Les résultats du test de microtitration (BIOLOG GENII) montrent que les souches ID14054, ID14055, ID14053, ID14043, ID14044, ID14046 et ID14050 sont affiliés à *Pseudomonas fluorescens* biotype C. La souche ID14048 est identifiée comme étant *Pseudomonas fluorescens*, mais sans biotypage. Les souches ID14041, D14047 et ID14042 ont été identifiées comme étant *Pseudomonas mendocina*. La souche ID14051 a été identifiée comme *Pseudomona* sp. La souche ID14045 n'a pas été affiliée au genre *Pseudomonas* (Fig. 1).

L'évolution des taux d'infection chez les plants bactérisés, en présence du pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, débutent à partir du 25^{ème}, accusant ainsi un retard de trois jours par rapport aux témoins malades. Après cette période, l'ensemble des traitements a

montré une progression rapide pour atteindre leurs maximums respectifs au 32^{ème} jour suivant les opérations des inoculations (85,71 % et 95,24 %). Une stabilité relative, selon les traitements, a été notée à partir du 32^{ème} jour jusqu'au dernier jour de la suivie (Fig. 3).

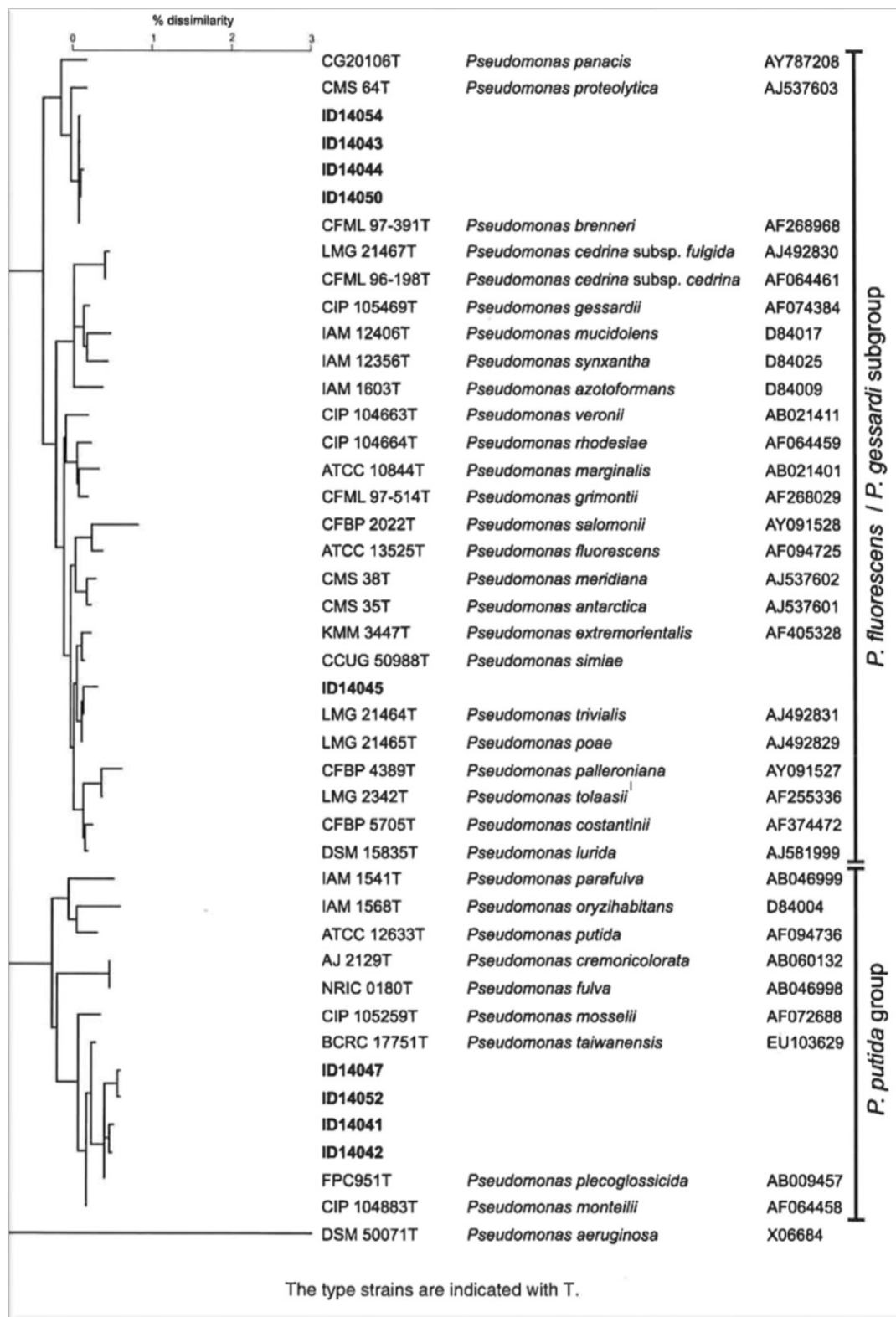


Figure 2: Arbre phylogénétique (ARNr 16S) des espèces validées avec des similarités $\geq 97\%$

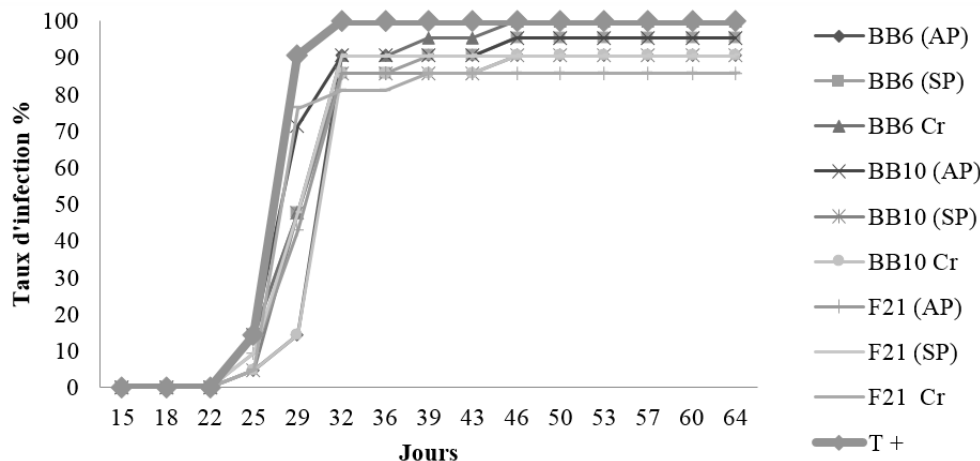


Figure 3 : Evolution des taux d'infection (%)

AP : lyophilisé Avec agent Protecteur, SP : Lyophilisé Sans agent Protecteur, Cr : non lyophilisé

3.2. Sévérité

La figure 4, présente l'évolution de la sévérité (indices de Mckinney) pendant la période d'étude. Les résultats montrent que la sévérité de la fusariose reste faible chez les plants bactérisés par rapport au témoin positif, dès l'apparition de la maladie (25^{ème} jour). Une évolution très faible de la sévérité de l'infection chez les plants bactérisés par rapport au témoin positif a été observée entre les 25^{ème} et 39^{ème} jours après inoculation. Entre les 39^{ème} et 46^{ème} jours, une évolution plus ou moins rapide a été observée chez tous les plants bactérisés, mais qui reste faible par rapport au témoin. Une stabilité remarquable des taux de sévérité a été notée chez tous les traitements bactérisés, avec des taux finaux ne dépassant pas 38 % par rapport au témoin (91%).

Nous signalons, à travers nos résultats, une variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* lyophilisés avec et sans protecteurs par rapport aux souches non lyophilisées. Les taux d'infection enregistrés à la fin de notre expérimentation (95,24%) notés chez les plants bactérisés et les indices de Mckinney demeurent par contre faibles, avec un maximum de 38%.

La comparaison entre le taux infection et la sévérité de la maladie (Indice de Mckinney), permet de constater que malgré la progression de la maladie, ces souches antagonistes jouent un grand rôle dans la réduction du degré des symptômes allons jusqu' à 63% chez tous les plants bactérisés par rapport aux témoins positifs où la totalité des plants inoculés sont flétris totalement (mortalité) (Fig. 4).

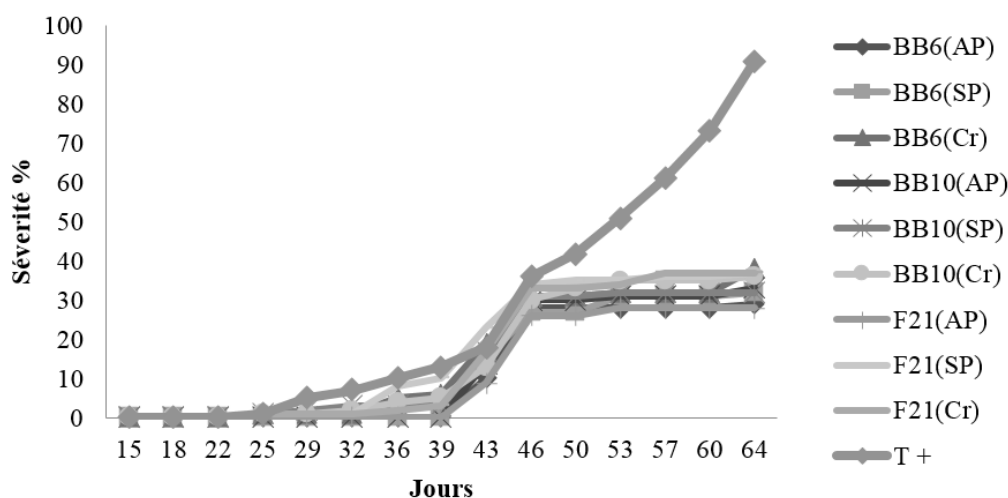


Figure 4: Evolution des indices de Mckinney (%)

AP : lyophilisé Avec agent Protecteur, SP : Lyophilisé Sans agent Protecteur, Cr : non lyophilisé

DISCUSSION

L'utilisation de micro-organismes bénéfiques comme biopesticides, pour réduire les maladies sur diverses plantes d'intérêt agronomique, est considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses dans les pratiques de gestion des cultures. Dans la présente étude, nous avons évalué l'efficacité, *in vivo et in planta*, de souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre *F. oxysporum* f.sp *lycopersic*.

Les isolements réalisés à partir de sols rhizosphériques, du palmier dattier et d'arbres fruitiers du sud algérien, ont permis de constater la richesse de ce biotope en activité microbienne. Bien que ces rhizobactéries sont ubiquitaires et d'une adaptation relativement facile, ce constat témoigne de la disponibilité de conditions pouvant déterminer des niches écologiques microbiennes. L'hétérogénéité rencontrée dans ces isolements bactériens dénote que la classification des *Pseudomonas* spp. fluorescents reste toujours sujette à beaucoup de divergences. Dans notre étude nous avons noté l'absence d'une concordance entre l'identification taxonomique et les classes phénotypiques. Des constats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux [28] qui soulignent les limites des méthodes phénotypiques dans la classification des *Pseudomonas* fluorescents.

Malgré la différence dans la composition chimique du milieu et son influence sur la synthèse des métabolites, qui peuvent avoir une fonction majeure dans l'effet d'inhibition; les trois milieux de culture utilisés ont permis de révéler des activités antagonistes chez les quatre souches bactériennes testées. Nous avons noté que le milieu KB favorisait la synthèse de sidérophores, contrairement aux milieux PD et PD + KB. L'inhibition de la croissance mycelienne observée sur ces deux milieux suggèrent que l'inhibition observée n'était pas due à l'action des sidérophores, mais que d'autres mécanismes ont été développés par les bactéries, contrairement à l'inhibition observée sur les milieux KB, qui peut être corrélée avec la présence des sidérophores.

Il a déjà été démontré que l'action antagoniste de ces mêmes souches ne semblait pas spécifique à l'agent pathogène mais dépendait plutôt du milieu de culture. Dans certains cas, une efficacité à large spectre a été observée,

agissant en même temps sur plusieurs isolats fongiques de différents genres (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* et *Pythium*) [21]. La variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* dans les milieux testés suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le contrôle biologique [7]. En plus du déterminisme plurifactoriel de l'antagonisme, nos résultats soulignent la possibilité d'une large et non spécifique efficacité contre l'isolat de *F. oxysporum* (Fol). Ces souches rhizobactériennes sont caractérisées par des potentialités variables, en termes de production de métabolites impliqués dans le biocontrôle comme la synthèse de siderophores, de phénazines et de HCN.

Dans l'ensemble, les rhizobactéries les plus actives sont F21, PI9 et BB10 et en dernière position BB6 et leurs activités antagonistes peuvent être corrélées avec leur métabolisme, notamment leurs métabolites secondaires (phénazines). Cependant, l'origine rhizosphérique des souches bactériennes ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans leurs activités antagonistes *in vitro* [25].

Malgré l'apparition et l'évolution de l'infection chez tous les traitements étudiés, les situations de bactérisation ont influencé positivement le développement des plants de tomate en réduisant la maladie avec des degrés appréciables. Les plants bactérisés montrent une tolérance à la fusariose vasculaire, se manifestant par un ralentissement de la cinétique de la maladie par rapport aux témoins positifs, qui sont caractérisés par une progression assez rapide et vigoureuse. Chez les plants bactérisés avec les deux souches F21 et BB6, lyophilisées avec cryoprotecteur, la maladie a enregistré une forte réduction, respectivement, de 63% et 62%. La réduction de la sévérité de la maladie causée au cours de notre essai peut s'expliquer par plusieurs mécanismes de bioprotection. Il apparaît clairement que ces mécanismes responsables des effets de certaines souches de *Pseudomonas* reposent sur leurs activités antagonistes par la production des métabolites secondaires à l'encontre des agents phytopathogènes. Il a été déjà confirmé que ces trois souches de *Pseudomonas* (BB6, BB10 et F21) produisent des sidérophores, de l'acide cyanhydrique, des phosphatases, des Phénazines et d'autres enzymes de dégradations de parois cellulaire chez les champignons (protéases, chitinases, cellulases, et pectinases) [17].

Les PGPR antagonistes des champignons phytopathogènes, agissent principalement par la production de métabolites antimicrobiens mais aussi par la compétition pour les niches nutritionnelles rhizosphérique et la stimulation des défenses de l'hôte (résistance systémique induite) [26]. D'autres mécanismes interviennent directement dans la promotion de la croissance des plantes et modulent l'activité bactérienne dans ses activités de bioprotection [27]. La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizobactéries bénéfiques, ce qui réduit l'espace nécessaire à la croissance du pathogène [6]. Ces caractéristiques expliquent leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines [28]. La colonisation des tissus de la plante joue un rôle primordial dans le biocontrôle [29]. Il a été rapporté que l'application préalable d'un agent biologique inducteur (*Pseudomonas* fluorescents) déclenche ou active les mécanismes de défense latents des plantes, en réponse à l'infection avec les pathogènes [30, 31].

L'utilisation des souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées avec ou sans cryoprotection dans le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate a donné presque les mêmes résultats qu'avec les souches fraîchement cultivées. A travers nos résultats, nous considérerons que la lyophilisation est une technique préconisée dans le cas des *Pseudomonas* fluorescents vue que c'est une conception appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées, établie pour préserver les microorganismes en gardant leurs viabilités et efficacités avec l'avantage de stabilisation de l'état du matériel biologique séché, pour des éventualités de conservation et de stockage aux températures ambiantes, pour de longues périodes, ajoutant les facilités de transport et de manipulation. Pour que la lyophilisation soit prioritaire et recommandé aux souches de *Pseudomonas* fluorescents, par rapport aux autres traitements physiques préexistants, il est suggéré d'assurer une cryoprotection adéquate avant le processus de lyophilisation.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que les souches de *Pseudomonas*, lyophilisées ou non avec ou sans agents protecteurs, présentent des potentialités d'utilisation en tant qu'agents de lutte biologique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, agent causal du flétrissement vasculaire de la tomate. Dans notre travail comparativement à d'autres biotopes, il a été constaté une diversité taxonomique (spécifique et intraspécifique) et des aptitudes métaboliques particulières dans le groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents et particulièrement chez les espèces types *P. fluorescens* et *P. putida*. Les données *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'hypothèse que l'antagonisme microbien demeure le principal mécanisme dans le contrôle biologique des maladies. L'effet positif des *Pseudomonas* en générale et spécifiquement lyophilisées en bioprotection est nettement supérieur dans la réduction de la sévérité que la réduction du taux d'infection, indiquant que le biocontrôle rend la plante tolérante à la maladie en réduisant fortement l'évolution et en retardant l'apparition des symptômes.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1]. **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. & Candresse T. (2009).** *Les maladies de la tomate : Identifier, connaître, maîtriser.* Editions Quae, Paris, 690 p.
- [2]. **Bounoua M.D. (2008).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahlia* sur l'olivier. Thèse Doctorat, Université d'Essenia, Oran. 202 p.
- [3]. **Ramaiah A.K., Garampalli & Kumar H. (2015).** In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 22–27.
- [4]. **Snissi A., Ezzouhri B., Rossi D., et Lairini K. (2006).** Contrôle biologique de la fusariose de la tomate causée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. (ERVBM) Biochimie, Université Abdelmalek Essaadi. Tanger. Maroc. *Substances Naturelles et Environnement*. 352-356.

- [5]. Mahanty M., Bhattacharjee S., Goswami M., Bhattacharyya M., Das B., Ghosh A. and Tribedi P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research* 4: 3315–3335
- [6]. Suty L. (2010). La lutte biologique : Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage. Editions Quae, Paris, 328 p.
- [7]. Thomashow L.S. and Weller D.M. (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var tritici*. *J Bacteriol* 170: 3499-3508.
- [8]. Sivasakthi S., Usharani G. and Saranraj P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research* 25: 1265-1277.
- [9]. Cipriano M. A. P. and Freitas S. S. (2018). Effect of *Pseudomonas putida* on chrysanthemum growth under greenhouse and field conditions. *African Journal of Agricultural Research*. 13(6): 302-310
- [10]. Taguet F., Boisset B.C., Heyraud B.A, Buon L.B. and Kaci Y. (2015). Characterization and structure of the polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* strain TF7 isolated from an arid region of Algeria. *C. R. Biologies* .338:335–342
- [11]. Turatto M.F., Dourado F.S., Zilli, J.E. and Botelho, G.R. (2018). Control potential of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp. Using fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Brazilian journal of microbiology*. 49: 54–58
- [12]. Digat B. (1994). Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : le cas des *Pseudomonas*. *C.R.Acad. Agric. fr.* 80 : 125-140. .
- [13]. Mputu Kanyinda J.N., Tshimenga K. and Noki, P. (2015). Accelerated oxidation test of freeze-dried *pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains. *The Asia Journal of Applied Microbiology*. 2(2): 18-26.
- [14]. Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Destain J., Fauconnier M.L., Lognay G. and Thonart, P. (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*: 1-9.
- [15]. Johnston A. & Booth C. (1983). *Plant Pathologist's Pocketbook*. 2nd Ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 120p.
- [16]. De Lapeyre B.L., Chillet M. and Chilin-Charles Y. (2008). Measurement of fungicide efficacy on post-harvest diseases: wound anthracnose, quiescent anthracnose, crown rot. *Fruits*, 63: 303–306.
- [17]. Toua D., Benchabane M., Bensaid F. & Bakour R. (2013). Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (48): 5449-5458.
- [18]. Niemann S., Puehler A., Tichy H.-V., Simon R. et Selbitschka W. (1997). Evaluation du pouvoir de résolution de trois méthodes différentes d'empreintes génétiques pour discriminer les isolats d'une population naturelle de *Rhizobium meliloti*. *Applied Microbiology* 82: 477-484).
- [19]. Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P. and Weller D.M. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2928–2934.
- [20]. Gao G., Yin D., Chen Y., Xia F., Yang J., Li Q. and Wang W. (2012). Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil fungal Community in Cucumber Rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos.* 7 : 15-26.
- [21]. Benchabane M. (2005). Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents, Thèse de Doctorat d'Etat, FSB-UTHB, Alger, 235p.
- [22]. McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195–218.
- [23]. Manikandan R., Saravanakumar D., Rajendran L., Raguchander T. and Samiyappan R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biological Control*, 54: 83–89.
- [24]. McDonald, J.H. (2009). *Handbook of biological statistics*. 2nd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. 320p.
- [25]. Figueroa L.A.M., Cordero R.J.D., Martinez A.J.C., Meyer M.L., Lizarraga S.G.D., Gastelum R.F., Castro M.C. and Maldonado, M.I.E. (2016). *Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of Fusarium erticillioides*. Springer Plus journal, 12 p.

- [26]. **VanLoon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119 : 243-254.
- [27]. **Hofte M. and Altier N. (2010).** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161:464-4
- [28]. **Bossis E., Lemanceau P., Latour X. and Gardan L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie.* 20: 51-63.
- [29]. **Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C. and Ben J.J. (2000).** Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1340-1345.
- [30]. **Ramamoorthy V., Raguchander T. and Samiyappan R. (2002).** Induction of defense-related proteins in tomato root treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and soil*, 239 (1): 55-68
- [31]. **Leeman M., Van Pelt J.A., Hendrickx M.J., Scheffer R.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers B. (1995).** Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85 : 1301-1305.