

## RÔLE DU 2,4 - DIACÉTYLPHLOROGLUCINOL DANS LA PROTECTION DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DU LIN PAR *Pseudomonas fluorescens* INOCULÉ SEUL OU EN ASSOCIATION AVEC *Fusarium oxysporum* NON PATHOGÈNE

K. MEKHTOUB INRA. Algérie, CRP Mahdi Boualem, B.P.70, BARAKI - Algérie.

### RÉSUMÉ

Ce travail nous a permis d'évaluer le rôle de l'antibiotique 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG) produit par une souche de *Pseudomonas fluorescens* inoculée seule ou en association avec *Fusarium oxysporum* non pathogène, en comparaison avec son mutant non producteur de DAPG, dans la protection de la fusariose vasculaire du lin. L'inoculation séparée des souches de *F.oxysporum* non pathogènes Fo47, Fo91015 et Fo91426 aux différentes densités  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/ml a assuré une protection contre la fusariose du lin. La protection assurée par l'inoculation seule de *P. fluorescens* Ps60 rif producteur de DAPG a été plus efficace comparée à celle assurée par le mutant Ps17-8D non producteur de DAPG. Par contre, l'association des *F. oxysporum* non pathogènes à Ps60 rif ou au mutant Ps17-8D a révélé une protection plus efficace que celle de chaque *F. oxysporum* appliqué seul. Mais, cette association des *F. oxysporum* à Ps60 rif ou au mutant Ps17-8D n'a pas présenté de différence de réduction de l'intensité de la maladie. Ces résultats suggèrent que la synthèse de l'antibiotique DAPG a eu un rôle moins important dans la protection contre la fusariose du lin. Cette protection assurée par l'association de ces deux agents antagonistes peut être associée la synergie d'autres modes d'action comme la compétition et l'induction de la résistance systémique.

**Mots clés :** Lutte biologique, 2,4 - Diacétylphloroglucinol, Fusariose vasculaire, Lin, Antagonisme microbien, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium oxysporum*.

### SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the role of 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG) produced by *Pseudomonas fluorescens* inoculated alone or in combination with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, in comparison with the nonproducing mutant of DAPG in the protection of the fusarium wilt of flax. The inoculation of the nonpathogenic strains of *F. oxysporum* Fo47, Fo91015 and Fo91426 at the various densities  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml alone ensured a protection against the fusarium wilt. The protection ensured by the single inoculation of *P. Ps60 rif* producing of DAPG was more effective than compared with that ensured by nonproducing the *Ps17-8D* mutant of DAPG. On the other hand, using strains of *Ps60 rif* or *Ps17-8D* mutant combined with the nonpathogenic strains of *F. oxysporum*, the biocontrol activity was always greater than provided by each antagonist alone. But, using strains of *F. oxysporum* with *Ps60 rif* or the *Ps17-8D* mutant was not present a difference in reduction of disease intensity. These results suggest that the synthesis of antibiotic DAPG had a less important role in protection against the fusarium wilt of the flax. This protection ensured by the association of these two antagonist agents could be explained by the synergy of the mechanisms such as the competition and the induction of systemic resistance.

**Key words :** Biological control, 2,4-Diacétylphloroglucinol, Fusarium wilt, Flax, Microbial antagonism, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium oxysporum*.

## INTRODUCTION

Parmi les microorganismes antagonistes des *Fusarium oxysporum* pathogènes, des *F. oxysporum* non pathogènes et des *Pseudomonas* spp. *fluorescens* isolés des sols résistants sont des candidats prometteurs comme agents de lutte biologique. L'application de ces microorganismes antagonistes seule ou en association dans des sols et substrats de cultures sensibles aux fusarioses vasculaires réduisent significativement la gravité de la maladie.

Dans ce contexte, la mise en évidence de sols naturellement moins réceptifs aux maladies d'origine tellurique, qualifiés de "résistants" suscite de nombreux travaux. Ces études ont montré que la résistance des sols aux fusarioses vasculaires est due à l'activité antagoniste de certains microorganismes qui interagissent avec l'agent pathogène et la plante hôte (LOUVET *et al.*, 1976).

Des études ont permis d'identifier certains microorganismes impliqués dans les mécanismes de résistance des sols afin de pouvoir sélectionner les plus efficaces et de les utiliser comme agents de lutte biologique. L'efficacité en lutte biologique de certaines souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. *fluorescens* et à l'espèce de *Fusarium oxysporum* a en particulier été démontrée par (ROUXEL *et al.*, 1979 ; SCHIER et BAKER, 1982 ; LARKIN *et al.*, 1998). Ainsi, Dans le mécanisme de résistance des sols aux fusarioses vasculaires, le rôle du *Fusarium oxysporum* non pathogène est associé à la compétition pour le carbone entre les souches pathogènes et non pathogènes de *F. oxysporum* (ALABOUVETTE *et al.*, 2001). Ainsi le développement saprophyte des *Fusarium* est significativement augmenté suite à des apports de glucose. Le niveau de fongistase et l'intensité pour la compétition trophique sont plus marqués dans les sols résistants que dans les

sols sensibles et ont été associés à la biomasse plus importante présente dans les sols résistants (LOUVET *et al.*, 1976 ; COUTEAUDIER et ALABOUVETTE, 1990). Sur ce fond de résistance générale associé à l'ensemble de la microflore s'exprime également la compétition trophique exercée par des populations particulières telles que les *F. oxysporum* non pathogènes qui présentent des exigences trophiques proche de celles des souches pathogènes (COOK et BAKER, 1983). Dans le sol résistant ces microorganismes n'agissent pas seuls, mais ils sont en interaction de telle sorte que Lemanceau et ALABOUVETTE (1991) ont pensé associer une souche de *F. oxysporum* non pathogène et une souche de *Pseudomonas* spp. *fluorescens* pour lutter contre la fusariose vasculaire.

Des travaux antérieurs ont montré que la protection des fusarioses vasculaires par une co-inoculation de souches de *F. oxysporum* non pathogènes et de *Pseudomonas* spp. *fluorescens* est plus efficace que l'inoculation individuelle de chaque microorganisme antagoniste séparément (PARK *et al.*, 1988 ; LEMANCEAU et ALABOUVETTE, 1991 ; LEMANCEAU, 1992 ; DUIFF *et al.*, 1999 ; DE BOER, 1999).

En 1991, LEMANCEAU et ALABOUVETTE ont testé 74 souches de *Pseudomonas* spp. *fluorescens* appliquées seules ou en association avec *F. oxysporum* non pathogène F<sub>o</sub>47 pour leur capacité à réduire l'intensité de la fusariose vasculaire du lin et de la tomate. Ils ont démontré que la souche de *P. fluorescens* C7 associée au *F. oxysporum* non pathogène F<sub>o</sub>47 donne une meilleure protection des fusarioses vasculaires du lin et de la tomate. (OLIVAIN *et al.*, 2004) ont confirmé que la protection assurée par souche de *Pseudomonas fluorescens* C7 appliquée en association avec la souche de *F. oxysporum* F<sub>o</sub>47 à différentes doses se révèle plus efficace que celle assurée par F<sub>o</sub>47 seule. LEMANCEAU *et al.*, (1993) ont attribué ce fond de protection à

une synergie entre la compétition pour le fer via la synthèse de pyoverdine (*Pseudomonas*) et la compétition pour le carbone déterminée par la souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47. En présence de pyoverdine, l'efficacité du métabolisme carboné du pathogène est réduite le rendant aussi plus sensible à la compétition pour le carbone déterminé par la souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47. La participation d'autres modes d'action incluant l'antibiose ne peut être exclue. Cependant l'antibiose dûe en particulier à l'antibiotique 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG) a aussi été détecté comme mode d'action antagoniste (DE LA FUENTE *et al.*, 2000).

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Préparation des inoculum

#### Inoculum de *F. oxysporum*

Chaque souche de *F. oxysporum* a été cultivée sur milieu PDA solide incliné. Des suspensions de conidies de 8 jours de culture ont été obtenues et utilisées pour ensemercer 1,5 litres de milieu de malt liquide. Après 5 jours d'incubation, les cultures ont été filtrées sur verre fritté. Les conidies ainsi obtenues remises en suspension ont subi plusieurs centrifugation (7 000 g, à 15 °C pendant 20 minutes) pour éliminer tout résidu de milieu de culture. Les culots ont été remis en suspension dans 80 ml d'eau permutée stérile. Un comptage sur cellule de Malassez a été réalisé pour déterminer la densité des suspensions de conidies.

#### Inoculum de *Pseudomonas fluorescens*

A partir des boîtes de Pétri de milieu King B supplémenté en rifampicine pour Ps60 rif et rifampicine-kanamicyne pour Ps17-8D ont été incubées pendant 48 heures à 28 °C (KING *et al.*, 1954).

Les bactéries ont été remises en suspension dans 10 ml d'eau stérile et lavées par plusieurs centrifugation (7000 g à 15 °C pendant 15 minutes) pour éliminer tout résidu de milieu de culture. Le culot a été remis en suspension dans 60 ml d'eau permutée stérile. Une lecture au spectrophotomètre de l'absorbance à 600 nm a permis d'estimer la densité des bactéries de la suspension par rapport à une courbe étalon.

### Matériel végétal et conditions de culture

La variété de lin (*Linum usitatissimum* L.) utilisée est Opaline. Le semis a été effectué sur des plaques alvéolées en plastique de 12 rangées de 8 alvéoles contenant 50 ml par alvéole de sol de Dijon désinfecté à la vapeur.

Les plaques ont été placées dans une chambre climatisée dont les conditions de culture ont été les suivantes : la température a été maintenue entre 15 °C et 17 °C pendant la levée et ensuite à 22 °C la nuit et de 25 °C le jour après l'éclaircissage. La photopériode L.D. 16 : 8. L'intensité lumineuse a été de 15 000 lux. L'arrosage a été effectué quotidiennement avec une solution nutritive.

### Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental appliqué est en bloc aléatoire complet avec 36 traitements. Les différents traitements ont été répartis au hasard par tirage au sort sur les plaques alvéolées. Chaque traitement comportait trois répétitions de 16 plantes soit 48 plantes. Les densités d'inoculum des souches de *F. oxysporum* non pathogènes Fo47, Fo91015 et Fo91426 ont été de  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC (unités formant colonies) par ml de sol et le *F. oxysporum* f.sp. *lini* Folin3 pathogène du lin a été inoculé à la dose de  $10^3$  UFC/ml de sol. Les *Pseudomonas fluorescens* ont été inoculés à la dose de  $10^7$  UFC/ml de sol. Pour tous les traitements, l'inoculum a toujours été apporté dans un volume final de 3 ml par alvéole.

## Notations

La notation a été réalisée deux fois par semaine dès l'apparition des symptômes. Les notations ont été effectuées du 21 jours (date d'apparition des premières plantes malades) au 42 jours après le semis.

## Analyses statistiques

La comparaison des traitements expérimentaux de l'essai de lutte biologique a été réalisée à l'aide du test AUDPC (Area Under the Disease progress Curve) utilisé en épidémiologie humaine et appliqué aux essais de lutte biologique (LEMANCEAU *et al.*, 2004). Ce test a permis de calculer la surface sous la courbe cumulative des mortalités en fonction du temps pour chaque traitement expérimental.

(1) AUDPC = somme [surfaces / (unités de temps\*événement)]

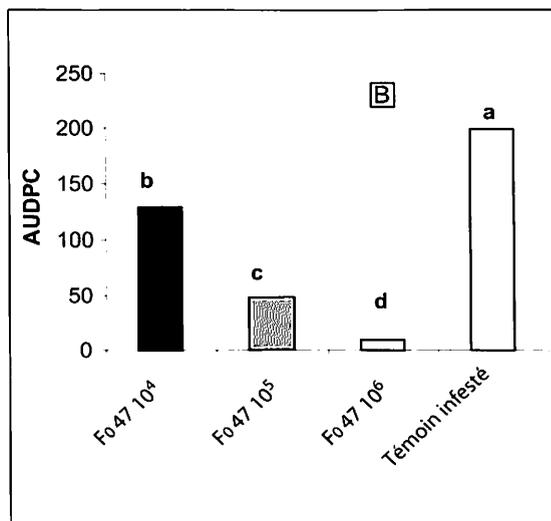
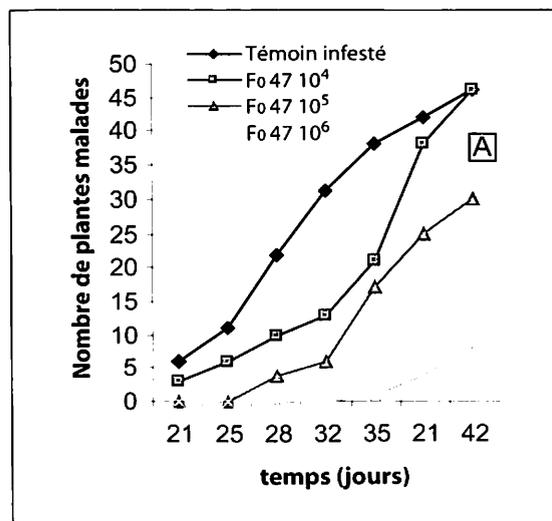
A partir des AUDPC calculées, une analyse de variance (ANOVA) et un test de comparaisons multiples des moyennes (STUDENT ; NEWMAN et KEULS) ont été réalisés ( $P \leq 5 p .100$ ), afin de déterminer les différences significatives.

## RÉSULTATS

### 1. Protection par *F. oxysporum* seul

#### *F. oxysporum* Fo47

L'inoculation par Fo47 aux densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml a été traduite par une réduction significative de la gravité de la maladie comparée à celle du témoin infesté. Par contre, l'efficacité de la protection a varié selon la densité d'inoculum apportée. La protection la plus faible a été obtenue à la densité  $10^4$  UFC/ml et la plus élevée a été obtenue à la densité  $10^6$  UFC/ml (figure 1).



**Figure 1** : Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté ( $Fo47 10^3$  UFC/ml) et dans les traitements infestés ( $Fo47 10^3$  UFC/ml) protégés par Fo47 ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/ml). La figure A représente la cinétique de la gravité de la maladie, la figure B représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC)\*.

(\* ) Les traitements expérimentaux affectés de la même lettre ne sont pas significativement différents ( $p < 0,05$ ).

### *F. oxysporum* Fo91015

L'application de l'inoculum de Fo91015 à différentes densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml a montré une diminution significative de l'intensité de la maladie comparée à celle du témoin infesté. A la densité  $10^4$  UFC/ml et à la dose  $10^5$  UFC/ml, aucune différence significative de la gravité de la maladie n'a été observée. La protection la plus élevée a été obtenue à la densité  $10^6$  UFC/ml et elle est significativement différente de celle obtenue avec les deux autres densités (figure 2).

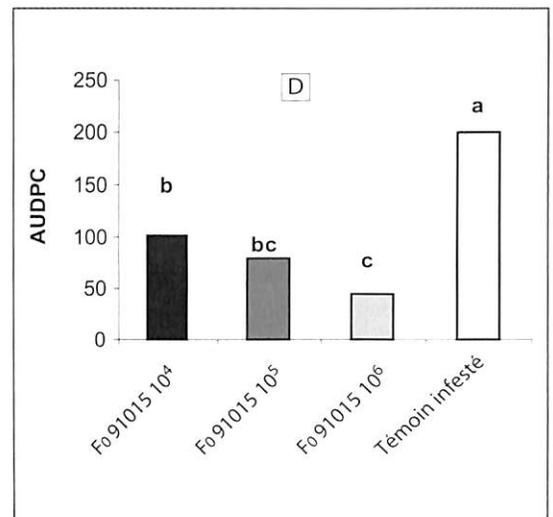
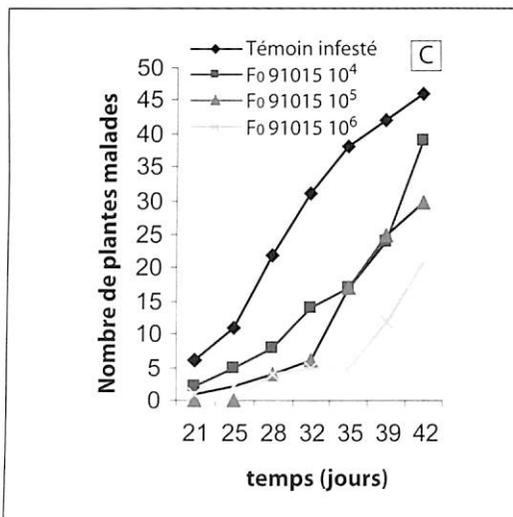
### *F. oxysporum* Fo91426

Pour la souche Fo91426, une réduction de la gravité de la maladie a également été observée aux différentes densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml comparée à celle du témoin infesté. Les résultats ont montré une différence significative de la réduction de l'intensité de la maladie entre les différents traitements. La protection la plus efficace a

été observée à la densité  $10^6$  UFC/ml et la moins élevée à la dose  $10^4$  UFC/ml (figure 3).

## 2. Protection par *P. fluorescens*

Une réduction de la fusariose vasculaire du lin la plus élevée a été observée chez la souche sauvage productrice de DAPG (Ps60 rif) appliquée à la densité  $10^7$  UFC/ml. Seule la souche Ps60 rif productrice de DAPG a assuré une protection contre la fusariose du lin. Les résultats ont montré une différence de protection significative assurée par P60 rif producteur de DAPG comparée à celle du mutant PS17-8D non producteur de DAPG et à celle du témoin infesté. Par contre, aucune réduction de l'intensité de la maladie n'a été observée pour le mutant Ps17-8D non producteur de DAPG à la densité  $10^7$  UFC/ml et le test statistique n'a révélé aucune différence significative de réduction de la gravité de la maladie comparée à celle du témoin infesté (figure 4).



**Figure 2** : Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté ( $FoIn310^3$ UFC/ml) et dans les traitements infestés ( $FoIn310^3$ UFC/ml) protégés par Fo91015 ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/ml). La figure C représente la cinétique de la gravité de la maladie, la figure D représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC).

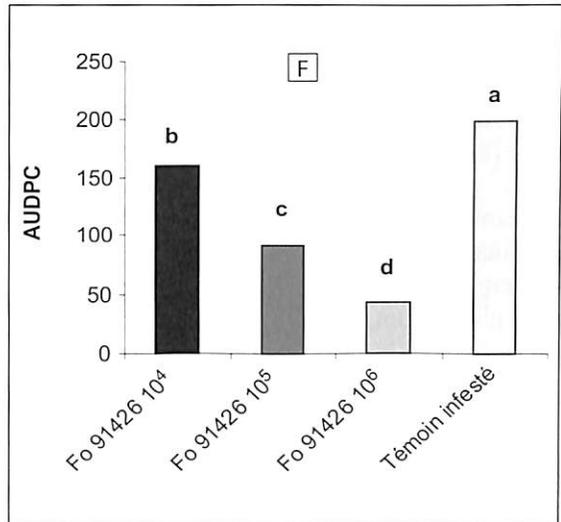
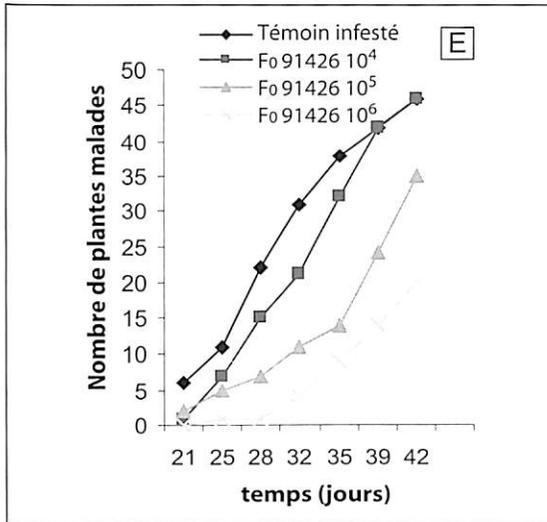


Figure 3 : Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) et dans les traitements infestés (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) protégés par Fo91426 (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> UFC/ml). La figure E représente la cinétique de la gravité de la maladie, la figure F représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC).

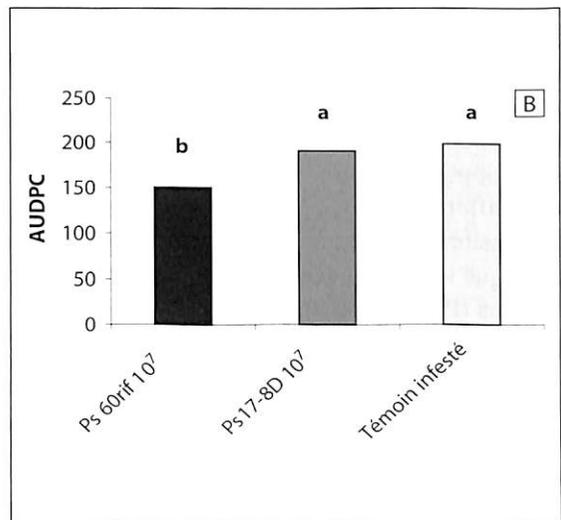
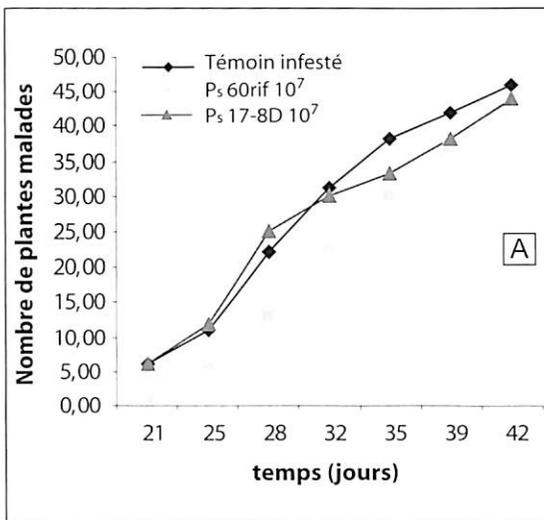


Figure 4 : Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) et dans les traitements infestés (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) protégés par Ps60 rif ou Ps 17-8D (10<sup>7</sup> UFC/ml). La figure A représente la cinétique de la gravité de la maladie, la figure B représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC).

### 3. Protection par l'association des *F. oxysporum* et *P. fluorescens*

#### Association *F. oxysporum* Fo47 et *P. fluorescens* (Ps60 rif, Ps17-8D)

L'inoculation de Fo47 seul ou associé à Ps60 rif producteur de DAPG ou à Ps 17-8D non producteur de DAPG appliqué à différentes densités d'inoculum  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml a montré une réduction significative de l'intensité de fusariose vasculaire du lin. L'association de Ps60 rif ou de Ps 17-8D à la souche Fo47 inoculé à la densité  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml n'a montré aucune différence de réduction de maladie significative comparée à celle obtenue par Fo47 inoculé seul. Par contre, la protection la plus efficace a été assurée par l'inoculation de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 seul appliqué à la densité  $10^6$  UFC/ml. La réduction de la gravité de la maladie obtenue par l'association de Ps60 rif ou Ps17-8D à la souche Fo47 inoculée à la densité  $10^4$  UFC/ml de sol a montré une différence significative comparée à celle obtenue par Fo47 inoculé seul. A cette même densité, la protection la moins efficace a été obtenue par Fo47 appliquée seule. A la densité  $10^6$  UFC/ml, une différence significative de la réduction de l'intensité de la maladie a été obtenue par Fo47 appliqué seul ou en association avec les *P. fluorescens* (Ps60 rif ou Ps17-8D) comparée à celle obtenue par cette souche inoculée seule ou en association aux *P. fluorescens* à la densité  $10^4$  UFC/ml (figure 5).

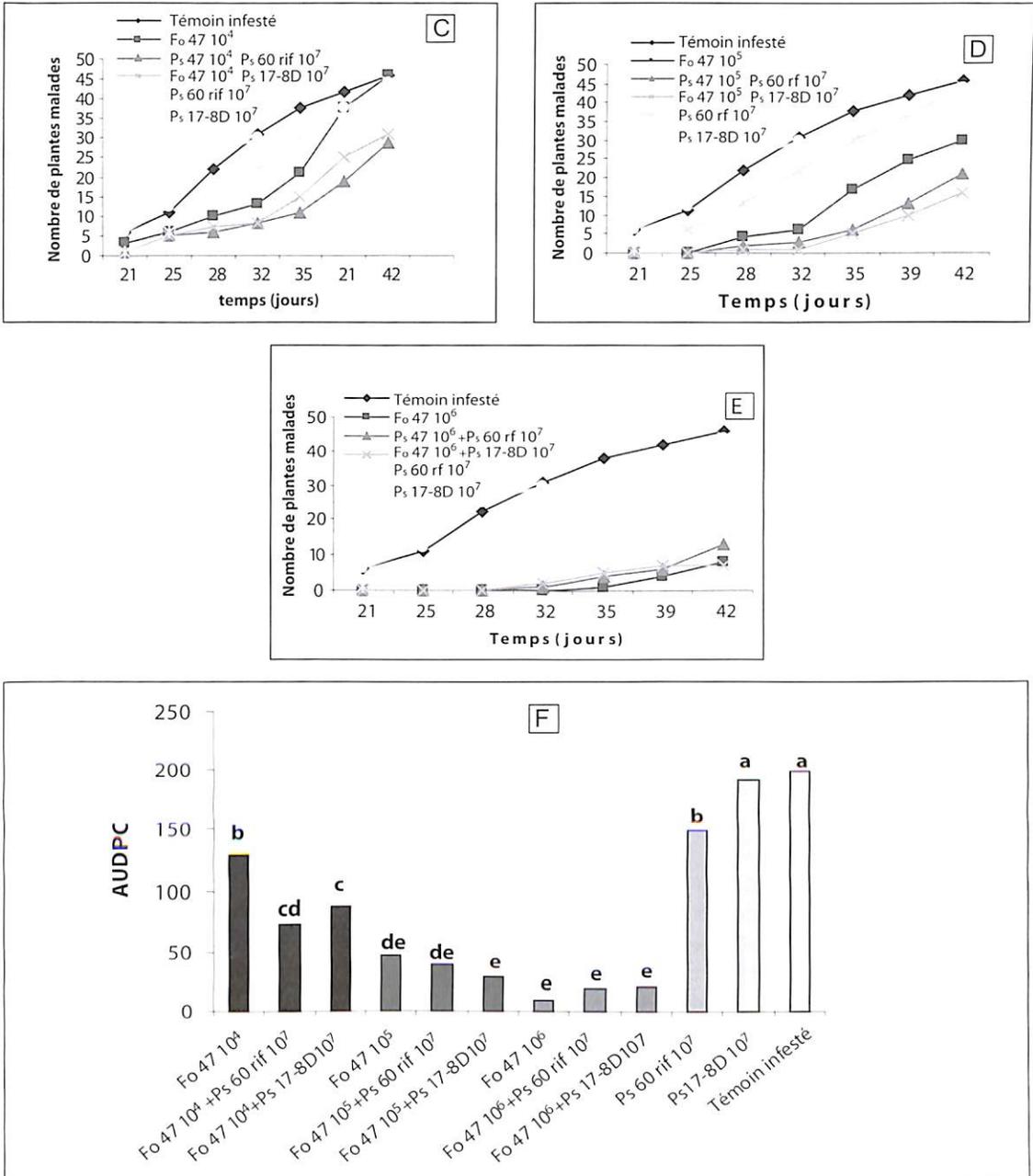
#### Association *F. oxysporum* Fo91015 et *P. fluorescens* (Ps60 rif, Ps17-8D)

Une réduction significative de l'intensité de la maladie a été observée pour le *F. oxysporum* Fo91015 seul ou associé à *P. fluorescens* Ps60 rif productrice de DAPG ou au mutant Ps17-8D non producteur de DAPG appliqué aux densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml comparée à celle du

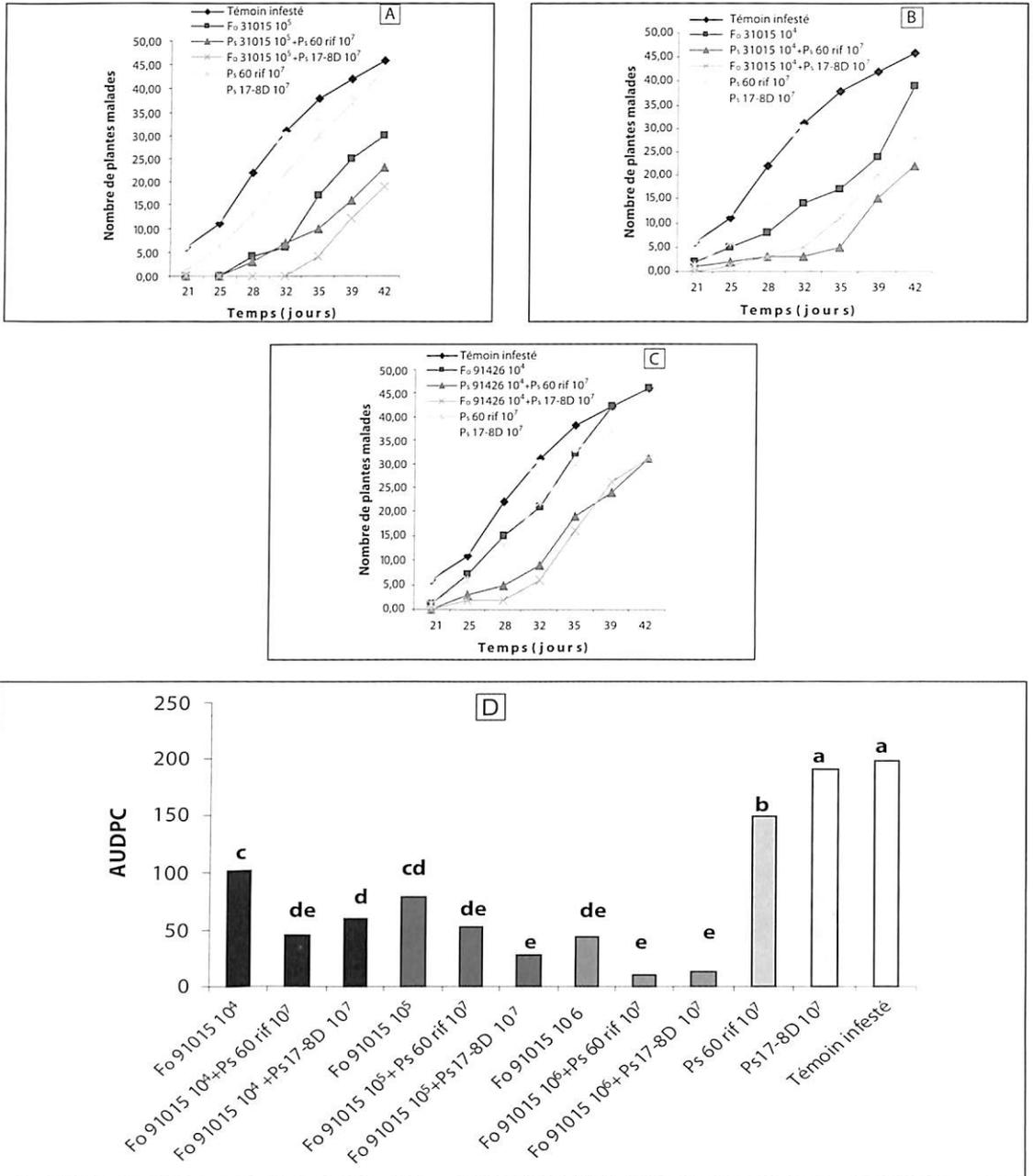
témoin infesté. La protection assurée par l'inoculation de Fo91015 associée à la souche sauvage Ps60 rif productrice de DAPG n'a pas montré de différence significative comparée à celle de Fo91015 associé au mutant Ps17-8D non producteur de DAPG quelle que soit la densité d'inoculum appliquée. Une différence significative de réduction de la gravité de la maladie a été observée lorsque la souche Fo91015 a été inoculée en association avec *P. fluorescens* Ps60 rif ou à Ps17-8D à la densité  $10^4$  UFC/ml comparée à celle de Fo91015 appliqué seul. Par contre, à la densité  $10^5$  UFC/ml, une différence significative de la protection assurée par l'association de Fo91015 au mutant Ps17-8D non producteur de DAPG a été observé comparé à celle assurée par Fo91015 inoculé seul. A la densité  $10^6$  UFC/ml, la protection assurée par Fo91015 associé à Ps60 rif ou à Ps17-8D n'a pas montré de différence significative comparée à celle obtenue par Fo91015 inoculé seul. La protection la plus élevée assurée par l'association des *P. fluorescens* P60 rif ou Ps17-8D au *F. oxysporum* non pathogène Fo91015 a été observée à la densité  $10^6$  UFC/ml (figure 6).

#### Association *F. oxysporum* Fo91426 et *P. fluorescens* (Ps60 rif, Ps17-8D)

Une réduction significative de l'intensité de la maladie a été observée également pour le *F. oxysporum* Fo91426 seul ou associé à *P. fluorescens* Ps60 rif productrice de DAPG ou au mutant Ps17-8D non producteur de DAPG appliqué aux densités d'inoculum  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml comparée à celle du témoin infesté. La protection assurée par l'inoculation de Fo91426 associée à la souche sauvage Ps60 rif productrice de DAPG n'a pas montré de différence significative comparée à celle de Fo91426 associé au mutant Ps17-8D non producteur de DAPG quelle que soit la densité d'inoculum appliquée. A la densité  $10^4$  et  $10^5$  UFC/ml, Une différence significative de réduction de la gravité de la maladie



**Figure 5 :** Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) et dans les traitements infestés (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) protégés par Fo47 inoculé seul ou associé(10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>,10<sup>6</sup> UFC/ml) à Ps60 rif ou à Ps 17-8D (10<sup>7</sup> UFC/ml). Les figures C,D,E représentent les cinétiques de la gravité de la maladie, la figure F représente l'aire sous la courbe des mortalités eumulées au cours du temps (AUDPC).



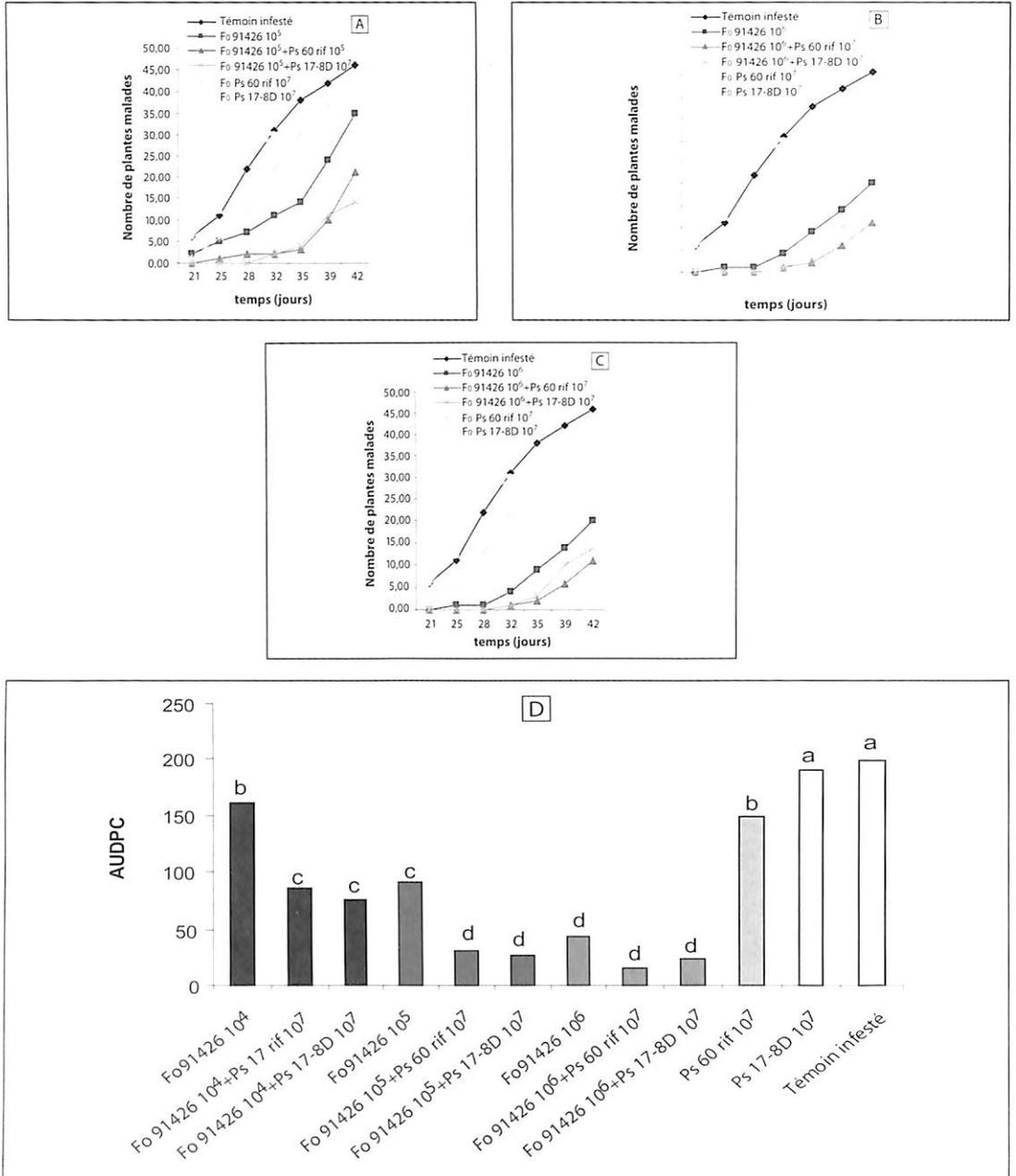
**Figure 6 :** Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) et dans les traitements infestés (Foln310<sup>3</sup>UFC/ml) protégés par Fo91015 inoculé seul ou associé (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> UFC/ml) à Ps60 rif ou à Ps 17-8D (10<sup>7</sup>UFC/ml). Les figures A, B, C représentent les cinétiques de la gravité de la maladie, la figure D représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC).

a été observée lorsque la souche Fo91426 a été inoculée en association aux *P. fluorescens* Ps60 rif ou à Ps17-8D à la densité  $10^4$  UFC/ml comparée à celle de Fo91426 appliqué seul. Par contre, La protection assurée par *F. oxysporum* non pathogène Fo91426 seul ou associé au *P. fluorescens* P60 rif ou au mutant Ps17-8D au inoculé à la densité  $10^6$  UFC/ml n'a pas montré de différence significative (figure 7).

## DISCUSSION

L'inoculation séparée des souches de *Fusarium oxysporum* non pathogènes Fo47, Fo91015 et Fo91426 à différentes densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml, a réduit significativement l'intensité de la fusariose vasculaire du lin. L'effet dose a été plus significatif pour les souches Fo47 et Fo91426 que pour la souche Fo91015. La meilleure protection a été assurée par toutes les souches de *Fusarium oxysporum* non pathogènes à la densité  $10^6$  UFC/ml. Par contre, la réduction de la gravité de la fusariose vasculaire du lin a été plus élevée pour la souche de *F. oxysporum* Fo47 comparée à celle des autres souches Fo91015 et Fo91426 à la même densité  $10^6$  UFC/ml. La meilleure protection a été obtenue quand la densité de l'inoculum de Fo47 était de  $10^6$  UFC/ml. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs travaux (LEMANCEAU *et al.*, 1993 ; ALABOUVETTE *et al.*, 1993 ; OLIVAIN *et al.*, 2004). L'inoculation par les souches de *Pseudomonas spp. fluorescens* a toujours été réalisée dans les expériences à la densité  $10^7$  UFC/ml de sol (LEMANCEAU et ALABOUVETTE, 1991). Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation de *P. fluorescens* Ps60 rif producteur de DAPG à la densité  $10^7$  UFC/ml a réduit significativement l'intensité de la fusariose vasculaire du lin, alors que celle-ci n'a pas été réduite par l'introduction de Ps17-8D non producteur de DAPG à la même densité  $10^7$  UFC/ml. Il apparaît que la réduction de la fusariose du lin a été liée à la production de DAPG

par la souche *P. fluorescens* P60 rif. Ces résultats sont similaires à ceux de (RAAIJMAKERS et WELLER, 1998 et DE LA FUENTE *et al.*, 2000) démontrés sur d'autres souches de *Pseudomonas spp. fluorescens*. L'introduction de chaque *Pseudomonas spp. fluorescens* associé à chaque *Fusarium oxysporum* non pathogène a assuré une protection plus efficace que celle assurée par chaque microorganisme antagoniste introduit séparément lors de l'essai biologique. Ainsi l'association des souches de *F. oxysporum* non pathogènes Fo47, Fo91015 et Fo91426 à différentes densités  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml aux souches de *P. fluorescens* Ps60 rif producteur de DAPG ou Ps17-8D non producteur de DAPG à la densité  $10^7$  UFC/ml a révélé une meilleure réduction de l'intensité de la fusariose du lin. Ces résultats sont en corrélation avec d'autres travaux (LEMANCEAU, 1988 ; FUCHS et DEFAGO, 1990 ; LEMANCEAU et ALABOUVETTE, 1991, LEMANCEAU *et al.*, 1992). Les résultats ont montré que la protection contre la fusariose du lin a été meilleure pour la combinaison de la souche Fo91015 à la densité  $10^4$  UFC/ml aux *P. fluorescens* PS60 rif ou Ps 17-8D que celle assurée par Fo47 et Fo91426 à la même densité. Mais à la densité  $10^5$  et  $10^6$  UFC/ml, la souche Fo47 associée à Ps60 rif ou Ps17-8D a réduit plus efficacement l'intensité de la fusariose de lin que les autres *F. oxysporum* associée à Ps60 rif ou à Ps17-8D. La majorité des études menées jusqu'à aujourd'hui ont été basées sur les interactions antagonistes du *F. oxysporum* Fo47 comme souche modèle avec différentes souches de *Pseudomonas spp. fluorescens* (LEMANCEAU et ALABOUVETTE, 1991 ; DUIJFF *et al.*, 1999 ; OLIVAIN *et al.*, 2004). Les résultats obtenus par l'association des différentes souches Fo47, Fo91015 et Fo91426 à *Pseudomonas spp. fluorescens* sont en corrélation avec les résultats obtenus par ces auteurs, particulièrement avec la souche Fo47. Les *P. fluorescens* P60 rif producteur de DAPG et Ps17-8D non producteur de DAPG combinés aux différentes souches de



**Figure 7 :** Comparaison de la gravité de la fusariose vasculaire du lin dans le témoin infesté ( $Foln310^3UFC/ml$ ) et dans les traitements infestés ( $Foln310^3UFC/ml$ ) protégés par Fo91426 inoculé seul ou associé ( $10^4, 10^5, 10^6 UFC/ml$ ) à Ps60 rif ou à Ps 17-8D ( $10^7 UFC/ml$ ). Les figures A,B,C représentent les cinétiques de la gravité de la maladie, la figure D représente l'aire sous la courbe des mortalités cumulées au cours du temps (AUDPC).

*F. oxysporum* non pathogènes F<sub>o</sub>47, F<sub>o</sub>91015 et F<sub>o</sub>91426 aux différentes densités 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> UFC/ml ont réduit efficacement l'intensité de la fusariose du lin et n'ont pas présenté de différences significatives de protection contre l'agent pathogène. Par ailleurs, les résultats ont montré que la souche sauvage Ps60 rif inoculée seule a induit une réduction de la maladie, alors que son mutant n'a eu aucun effet. Ce qui explique que la protection contre la fusariose du lin n'a pas été liée seulement à la synthèse de l'antibiotique DAPG produit par la souche de *P. fluorescens* Ps60 rif associée aux *F. oxysporum* non pathogènes. L'antibiotique DAPG produit par la souche sauvage a joué un rôle non déterminant dans la protection contre la fusariose vasculaire du lin. Lorsque les *Pseudomonas* spp. *fluorescens* ont été en association avec les *F. oxysporum* non pathogènes F<sub>o</sub>47, F<sub>o</sub>91015 et F<sub>o</sub>91426, une synergie de divers mécanismes a été sans doute impliquée dans la protection. Ces résultats sont en corrélation avec ceux de plusieurs auteurs. L'effet bénéfique de la souche *P. putida* WCS358 combinée à F<sub>o</sub>47 a été du à la production de pseudobactine (sidérophore) qui a réduit la concentration en fer dans la rhizosphère de la plante et a rendu la compétition pour le carbone plus difficile entre le *F. oxysporum* pathogène et non pathogène (LEMANCEAU et ALABOUVETTE, 1993). DUFFY *et al.*, (1999) ont montré que la capacité de la souche WCS 417 était capable d'induire une résistance chez le lin. Aussi (OLIVAIN *et al.*, 2004) ont suggéré que la réduction de l'intensité de la fusariose est peut être du par l'activité antagoniste de la souche *F. oxysporum* qui a agit fortement à travers le mécanisme de compétition et par celle de la souche *P. fluorescens* C7 agissant à travers l'induction d'une résistance systémique.

## CONCLUSION

L'inoculation séparée des souches de *F. oxysporum* non pathogènes F<sub>o</sub>47, F<sub>o</sub>91015 et F<sub>o</sub>91426 a assuré une protection contre la fusariose du lin selon les densités appliquées. La protection assurée par l'inoculation seule de *P. fluorescens* Ps60 rif producteur de DAPG a été plus efficace comparée à celle assurée par le mutant Ps17-8D non producteur de DAPG. Cette protection a été peut être liée à la synthèse de l'antibiotique de DAPG (antibiose). Par contre, l'association de Ps60 rif ou du mutant Ps17-8D aux *F. oxysporum* non pathogènes a réduit considérablement la fusariose vasculaire du lin comparée à chaque microorganisme inoculé séparément. Cette protection était assurée à la dose 10<sup>6</sup> UFC/g. Mais la réduction de la maladie par l'association de Ps60 rif producteur de DAPG aux *F. oxysporum* non pathogènes a été égale à celle associée au mutant Ps17-8D. Ces résultats suggèrent que la réduction de la fusariose du lin induite par l'association de ces deux microorganismes n'a pas été liée seulement au rôle de l'antibiotique qui n'a pas été déterminant. Cette protection biologique a été peut-être dû à une synergie de divers mécanismes (compétition et induction de la résistance systémique) nécessaire à une meilleure expression de leur antagonisme dans la protection contre la fusariose vasculaire du lin.

### Références bibliographiques

- ALABOUVETTE C., EDEL V., LEMANCEAU P., OLIVAIN C., RECORBET G., STEIBERG C., 2001. Diversity and interactions among strains of *Fusarium oxysporum* : Application to biological control. CAB international 2001. biotic Interaction in plant pathogen Association (Eds M.J. and N.J. Spence), pp. 131-157.
- COOK R.J., BAKER K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopathol. Scoc., St Paul MN, USA, 539 p.
- COUTEAUDIER Y., ALABOUVETTE C., 1990. Quantitative comparison coparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation with carbon utilization. FEMS Microbiology Ecology 74, 261-268.
- DE BOER M., VAN DER SLUIS I., VAN LOON L. C., BAKKER P.A.H.M., 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains to enhance suppression of *fusarium* wilts of radisch. European Journal of Plant Pathology. 105, 201-210.
- DE LA FUENTE L., BAISA N., BAGNASCO P., QUAGLIOTTO L., THOMASHOW L., ARIAS A., 2000. Antibiotic production by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. Proceedings of the 5th international PGPR Workshop.
- DUBIF B.J., RECORBET G., BAKKER P.H.M., LOPER J.E., LEMENCEAU P., 1999. Microbial antagonism of the root level is involved in the suppression of *fusarium* wilt by the combination of non pthogenic *Fusarium oxysporum* F<sub>0</sub>47 and *Pseudomonas putida* WCS358. Phytopathology, 89, 1073-1079.
- KING E.O., WARD M.K., RANEY D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med. 44, 301-307.
- LARKIN, R.P., FRAVEL D.R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Dis. 82,1022-1063.
- LEMANCEAU P., 1992. Effets bénéfiques des Rihzobactéries sur las plantes exemple des *Pseudomonas* spp. *fluorescens*. Agronomie 12, 413-437.
- LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C., 1991. Biological control of *fusarium* diseases by *fluorescens* *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. Crop protection. 10, 279-286.
- LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C., 1993. Suppression of *fusarium*- wilt by *fluorescens* *Pseudomonas* : mechanisms and application. Biocontrol Science and Technology. 3, 219-234.
- LEMANCEAU P., BAKKER P.A.H.M., DE KOGEL W.J., ALABOUVETTE C., SCHIPPERS B., 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *fusarium* wilt of carnations by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F<sub>0</sub>47. Appl Environ Microbiol. 58, 2978- 2982.
- LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE C., COURNOYER B., LAURENT F., GIANINAZZI S., GOLOTTE A., HARTMANN A., MAZURIER S., SARNIGUET A., STEINBERG C., 2004. Microflore des sols : Intérêts et dangers pour les plantes, les animaux et l'homme. In Sols et Environnement. Paris : Dunod. in press.

LOUVET J., ROUXEL F., ALABOUVETTE C., 1976. Recherche sur la résistance des sols aux maladies. I - Mise en évidence de la nature micro-biologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. Ann. Phytopathology. 8, 425-436.

OLIVAIN C., ALABOUVETTE C., STEINBERG C., 2004. Production of mixed inoculum of *Fusarium oxysporum* F<sub>047</sub> and *Pseudomonas fluorescens* C7 to control fusarium diseases. Biocontrol Science and Technology, Vol, N°3, 227-238.

PARK, C.S., PAILITZ T.C., BAKER R., 1988. Biocontrol of *fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 78, 190-194.

RAAIJMAKERS J.M., WELLER D.M., 1998. Natural plant protection by 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in Take-all decline soils. Mol plant Microb Int. 11, 144-152.

ROUXEL F., ALABOUVETTE C., LOUVET J., 1979. Recherche sur la résistance des sols aux maladies. IV. Mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. Ann. Phytopathol., 11, 199-207.

SCHER F.M., BAKER R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *fusarium* wilt pathogens. Phytopathology. 72, 1567-1573.