

# Les bactéries de la rhizosphère freinent la croissance de l'agent du mildiou

Denise Bönisch, Lukas Hunziker et Laure Weiskopf

Agroscope, Institut des sciences en durabilité agronomique IDU, 8046 Zurich, Suisse

Renseignements: Laure Weiskopf, e-mail: laure.weiskopf@agroscope.admin.ch



Les bactéries isolées de la pomme de terre inhibent la croissance du mycélium de *Phytophthora infestans* (à gauche: témoin; à droite: inhibition de l'oomycète par la souche R47).

**En agriculture biologique, il est particulièrement important de protéger les plants de pommes de terre des maladies, car il est interdit d'utiliser des fongicides de synthèse. La présente étude a testé *in vitro* le potentiel inhibiteur des bactéries issues des plants de pommes de terre et de leur rhizosphère contre l'agent pathogène du mildiou. La moitié des bactéries testées a donné des résultats prometteurs.**

L'oomycète *Phytophthora infestans* est un des principaux agents pathogènes de la pomme de terre au monde. En Suisse, dans les cultures biologiques de pommes de terre, l'agent pathogène du mildiou est souvent combattu à l'aide de cuivre. Ce dernier est efficace contre *P. infestans*, mais l'enrichissement du cuivre dans le sol a des conséquences négatives sur les organismes qui y vivent (Kula et Guske 2003). C'est pour cette raison que l'emploi du cuivre doit être réduit autant que possible dans l'UE d'ici 2016 (UE 2009).

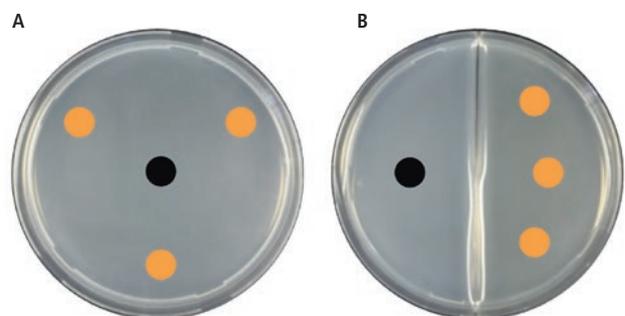
Les bactéries présentes naturellement dans le sol peuvent très bien convenir pour maîtriser les agents pathogènes: le produit déjà disponible sur le marché, du nom de Cerall® (Lantmännen, BioAgri, Suisse), est par exemple basé sur une souche de *Pseudomonas* et agit contre *Tilletia caries*, l'agent pathogène de la carie ordinaire des céréales. Une autre souche de *Pseudomonas* est commercialisée sous le nom de Proradix® (Sourcon Padena,

Tübingen, Allemagne) et est employée contre la galle argentée des pommes de terre. Jusqu'à présent, on ne connaît encore aucun antagoniste qui puisse réguler efficacement l'agent pathogène du mildiou. Cet article décrit l'isolement et la caractérisation de bactéries associées aux pommes de terre, ainsi que la capacité de ces souches à limiter *in vitro* la croissance de *P. infestans*, directement ou indirectement, en libérant des composés volatiles.

## Matériel et méthodes

### Isolement de l'oomycète et des bactéries

L'isolat polyspore de l'oomycète *P. infestans* utilisé pour les tests d'activité antagoniste a été obtenu en 2001. En octobre 2012, des souches de bactéries ont été isolées de la rhizosphère et de la phyllosphère de trois plants de pommes de terre infestés par *P. infestans* provenant du site de Reckenholz. Pour accroître la diversité cultivable, l'isolement a eu lieu sur différents milieux (Luria-Bertani, agar sélectif pour actinomycètes, malt-agar). Les bactéries qui se distinguaient morphologiquement les unes des autres dans un même échantillon ont été isolées et repiquées sur des boîtes de Pétri séparées. Au total, 137 souches de bactéries différentes ont été isolées. La majorité de ces souches ont été identifiées phylogénétiquement par séquençage de l'ARN ribosomique 16S ou du gène RpoD (Hunziker 2013).



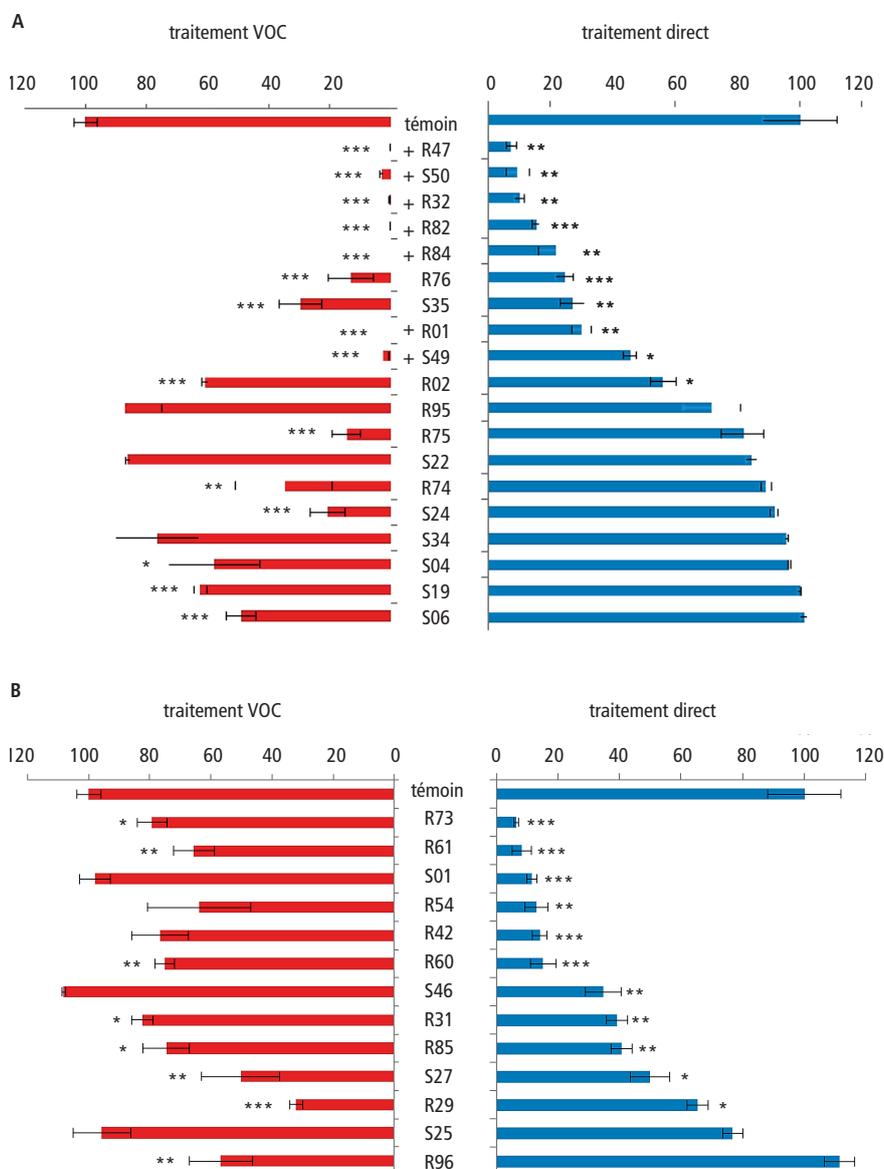
**Figure 1** | Représentation schématique des deux applications utilisées pour tester le potentiel inhibiteur des souches bactériennes sur la croissance de l'agent pathogène. Noir: morceau de mycélium de *Phytophthora infestans*; orange: gouttes de bactéries des isolats à tester.

**A:** application directe, **B:** application VOC (substances volatiles).

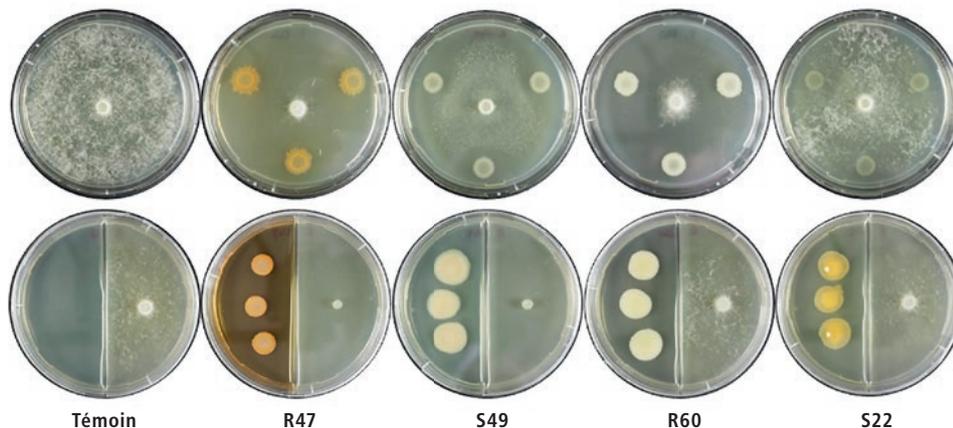
### Potentiel antagoniste des bactéries

Le potentiel antagoniste des souches a été évalué *in vitro* dans le cadre d'une première étude préalable contre trois agents pathogènes (*P. infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*). Ce screening a conduit à une sélection de 32 souches dont l'effet contre *Phytophthora* a été déterminé en deux approches différentes. Dans une approche directe, un morceau de mycélium de 5 mm de diamètre a été placé au centre d'une boîte de Petri avec trois gouttes contenant chacune 10 µl de culture bactérienne liquide disposées à intervalles réguliers (densité optique = 1) (fig. 1A). Une deuxième approche a permis de tester uniquement l'effet des substances vola-

tiles des bactéries (VOC = volatile organic compound). Pour ce faire, le mycélium de *Phytophthora* a été placé d'un côté d'une boîte de Petri divisée en deux. Trois gouttes contenant chacune 10 µl de culture bactérienne ont été déposées de l'autre côté de la boîte à l'aide d'une pipette (fig. 1B). *Phytophthora infestans* a toujours été cultivé sur de l'agar de seigle. Quant aux souches bactériennes, elles ont été cultivées soit sur de l'agar de seigle (approche directe, fig. 1A) soit sur le milieu Luria-Bertani (LB) (approche VOC, fig. 1B). Au bout de 14 jours, la surface de croissance de *P. infestans* a été mesurée par analyse d'image numérique (ImageJ) et comparée avec celle du témoin (sans bactéries). Les



**Figure 2 |** Croissance du mycélium de *Phytophthora infestans* 14 jours après l'inoculation par des souches de bactéries isolées. R indique les souches de bactéries isolées en provenance de la rhizosphère et S les souches de feuilles de pommes de terre (avec des barres d'erreurs standards). +: producteurs de cyanure, étoiles: différences significatives par rapport au témoin (T-Test, n = 3-4; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001). **A:** effet des *Pseudomonas* sur la croissance du mycélium (en pourcentage du témoin), **B:** effet des non-*Pseudomonas* sur la croissance du mycélium (en pourcentage du témoin).



**Figure 3** | Inhibition de la croissance du mycélium de *Phytophthora infestans* par différentes souches bactériennes. Les photos ont été prises 14 jours après l'inoculation. En haut, effet après traitement direct et en bas, effet après traitement VOC.

résultats sont présentés en pourcentages du témoin. Les différences significatives ont été déterminées à l'aide du test T de Student ( $n = 3-4$ ,  $P < 0,05$ ). Les mêmes boîtes ont été examinées au microscope pour savoir si les composés bactériens avaient causé une modification de la structure du mycélium.

## Résultats et discussion

### Potentiel inhibiteur des bactéries antagonistes

Les bactéries testées ont été classées en *Pseudomonas* et non-*Pseudomonas* (fig. 2A et B). Dans le premier groupe, neuf souches ont inhibé la croissance du mycélium de *P. infestans* (entre 8 % et 50 % de la croissance du témoin) en application directe et toutes ces souches ont également montré un très bon effet inhibiteur par l'émission de substances volatiles (entre 0 et 30 % de la croissance du témoin). Dix autres souches de *Pseudomonas* n'ont montré qu'un faible effet voire aucun effet inhibiteur sur la croissance (entre 56 % et 101 % de la croissance du témoin) en application directe. Parmi ces bactéries, quatre souches ont cependant inhibé jusqu'à 50 % de la croissance du mycélium grâce aux substances volatiles. Parmi les non-*Pseudomonas*, dix souches ont inhibé l'oomycète jusqu'à un pourcentage compris entre 7 % et 50 % de la croissance du témoin en traitement direct. Trois souches n'ont eu qu'un effet faiblement inhibiteur, voire aucun effet. Quant aux substances volatiles, les non-*Pseudomonas* n'ont eu qu'une faible influence, voire aucune influence, et seules deux souches ont inhibé la croissance jusqu'à 50 %.

Le fait que les *Pseudomonas* soient plus actifs que les non-*Pseudomonas* en application VOC tient sans doute à la production de cyanure. En effet, toutes les souches qui ont complètement bloqué la croissance du mycèle mycé-

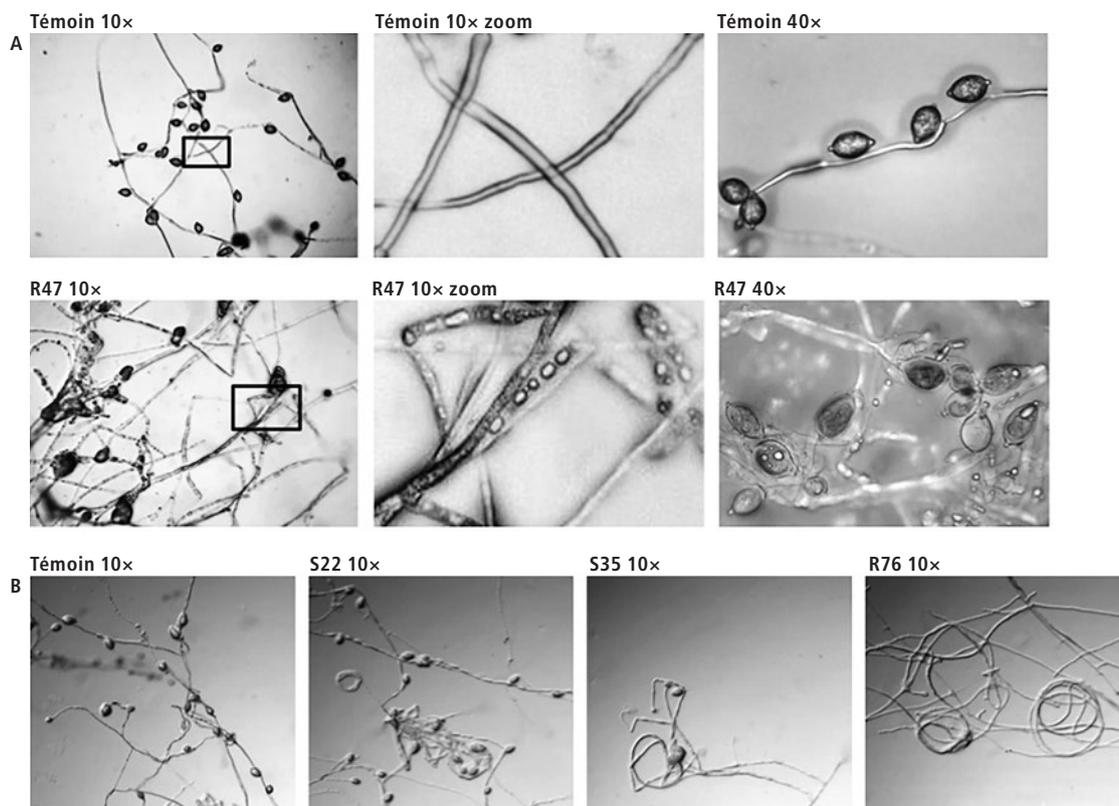
lium étaient cyanogènes (formaient du cyanure). Des bactéries non-cyanogènes avaient cependant elles aussi de très bons effets inhibiteurs, p. ex. les souches S35, R76, R73 ou R54. Des essais ultérieurs permettront de savoir quelles autres substances peuvent déclencher l'inhibition.

Il est intéressant de constater que les souches bactériennes avaient un effet inhibiteur différent sur le mycélium de *P. infestans* en fonction du type de traitement. La souche *Pseudomonas* R47 p. ex. inhibait parfaitement le champignon aussi bien en application directe qu'en application VOC (fig. 3), tandis que la souche S49 n'affichait un très bon effet inhibiteur qu'en application VOC et la souche R60 qu'en traitement direct. Au contraire, la souche S22 agissait faiblement avec les deux traitements. Ces résultats montrent à quel point l'oomycète réagit de manière sensible aux différentes substances, qu'elles proviennent ou non de la même bactérie, et qu'elles soient sous forme gazeuse ou qu'elles puissent se répandre à travers le milieu.

Les souches comme les *Pseudomonas* R47, S50, R32, R82 et R84, qui ont de bons effets quel que soit le type de traitement, sont intéressantes et pourraient servir d'antagonistes contre le mildiou de la pomme de terre.

### Les bactéries modifient la structure du mycélium

Des modifications de la structure du mycélium et des sporanges ont pu être observées suite à l'action des substances libérées par les bactéries dans le milieu de culture ou dans la phase gazeuse. La figure 4A montre le mycélium de *P. infestans* lors du traitement direct. Contrairement au témoin, on peut distinguer des structures vacuolaires dans les hyphes de l'oomycète inhibé par la souche R47. Ces structures pourraient empêcher le transport de substances dans les hyphes et par conséquent la croissance du mycèle. Par rapport au témoin, les spo-



**Figure 4** | Modification de la structure du *Phytophthora infestans* en cas de A, traitement direct et de B, traitement VOC. Les photos du traitement direct ont été prises trois semaines après, celles du traitement VOC six semaines après. A) témoin en haut, souche R47 en bas. B) De gauche à droite: témoin, souches S22, S35 et R76, par ordre croissant selon leur potentiel inhibiteur.

ranges étaient en partie remplis d'alvéoles vacuolaires, et les zoospores des sporanges semblaient désagrégées. La germination de *P. infestans* pourrait tout à fait être perturbée par ces altérations.

La figure 4B représente l'effet des volatiles de différentes souches bactériennes sur le mycélium de *P. infestans*. La souche S22 n'avait qu'un très faible effet inhibiteur sur la croissance: mis à part quelques rares hyphes circulaires, le mycélium était très semblable à celui du témoin. La souche S35 à effet inhibiteur moyen (croissance du mycèle réduite à 35 % du témoin) avait une plus grande influence sur la structure du mycèle. On a en effet observé nettement plus d'hyphes circulaires et moins de sporanges. Avec la souche R76 à effet inhibiteur marqué, les structures circulaires étaient encore plus développées et aucun sporange n'a été trouvé. Par conséquent, l'intensité d'inhibition de la croissance semble être liée à des altérations visibles de la structure des hyphes ainsi qu'à la réduction du nombre des sporanges. Ces effets sur la formation de sporanges sont intéressants pour la maîtrise de l'agent pathogène, car les sporanges et les zoospores qu'ils contiennent jouent un rôle essentiel dans la propagation de l'épidémie.

## Conclusions

- Sur les 32 souches de bactéries testées, environ la moitié était en mesure d'inhiber la croissance du mycélium de *P. infestans* jusqu'à 50 % (traitements direct et VOC).
- Le traitement à base de souches bactériennes actives inhibait non seulement la croissance du mycélium, mais avait également une influence sur la formation de sporanges.
- Le potentiel inhibiteur de ces souches est actuellement testé dans le cadre d'essais en serre. ■

## Bibliographie

- Hunziker L., 2013. Bacteria as biocontrol agents of *Phytophthora infestans*: Evaluating the putative role of volatile organic compounds in late blight control. Travail de master, Université de Zurich.
- Kula C. & Guske S., 2003. Auswirkungen von Kupfer auf Bodenorganismen bei langjähriger Anwendung. In: Alternativen zur Anwendung von Kupfer als Pflanzenschutzmittel. 7. Fachgespräch am 6. Juni 2002 in Berlin-Dahlem. Berichte aus der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Heft 118, 11–16.
- UE, 2009. Journal officiel de l'Union européenne. Directive 2009/37/CE de la commission du 23 avril 2009 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil.