

Lutte biologique antifongique : actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri

Nirina RAKOTOARIMANGA^{1*}, Jefferson ZANANIRINA^{1,2}, Daniel RAMAMONJISOA²
et Heriniaina RAMANANKIERANA^{1,2}

¹Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Centre National de Recherches sur l'Environnement (LME/CNRE), BP 1739, Fiadanana, Antananarivo, Madagascar

²Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie, Faculté des sciences, Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar

*Correspondance, courriel : manganir@yahoo.fr

Résumé

Un champignon phytopathogène du genre *Fusarium* F-02 est isolé de la tomate pourrie. L'isolat de ce champignon se révèle virulent pour les plantes de tomate, de concombre et de haricot. Testé *in vitro*, cet isolat inhibe significativement la germination et la croissance racinaire de ces trois plantes, et *in vivo*, le taux de mortalité des plantes contaminées par cet isolat est plus élevé par rapport à celui des plantes non contaminées. Parmi les 87 isolats d'actinomycètes provenant des sols rhizosphériques de plantes d'haricot, de tomate et de concombre, 24 sont antagonistes de F-02 et les pouvoirs inhibiteurs de ces isolats varient entre 14% et 60%. L'isolat d'actinomycète Ac66, isolé du sol rhizosphérique de la plante d'haricot a montré une inhibition élevée de 60,52%. Le traitement des graines de plantes à germer avec la solution de l'isolat Ac66 atténue significativement la virulence de F-02 *in vivo*.

Mots-clés : lutte biologique, actinomycètes, antagonistes, sol rhizosphérique, *Fusarium*.

Abstract

Fungal biocontrol : actinomycetes of rhizosphere soil antagonists of *Fusarium* isolated from rotten tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L., 1753)

A phytopathogenic fungus *Fusarium* F-02 is isolated from rotten tomato fruit. The isolate of this fungus proves virulent to the tomato, cucumber and bean plants. Tested *in vitro*, this isolate inhibits significantly the germination and the root growth of these three plants, and *in vivo*, the mortality rate of plants infected by this isolate was higher compared to non-infected plants. Among the 87 isolates of actinomycetes from the rhizosphere soil of bean, tomato and cucumber, 24 are antagonists of F-02. The F-02 growth inhibition varies between 14% and 60%. The inhibition of F-02 by the Actinomycetes isolates AC66 is 60.52%. The treatment of seeds with the solution of the isolate AC66 mitigates significantly the virulence of F-02 *in vivo*.

Keywords : biocontrol, actinomycetes, antagonists, rhizosphere soil, *Fusarium*.

1. Introduction

À Madagascar, chaque année, des animaux ravageurs, des plantes parasites, des insectes, des nématodes et des microorganismes phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) sont responsables de la perte d'environ 20% à 40% du rendement des cultures avant la récolte [1] et de 1% à 20% après la récolte [2]. Parmi les agents phytopathogènes qui causent beaucoup de dégâts aux cultures, les champignons responsables de la pourriture racinaire comme *Fusarium spp* s'avèrent plus dangereux par leur caractère ubiquiste et peuvent poser de gros problèmes en agriculture et en horticulture [3]. Les maladies causées par ces champignons sont difficiles à diagnostiquer et se répandent facilement, constituant ainsi l'origine d'une importante perte pour les cultivateurs. Dû à leurs facilités de dissémination et à leurs persurances dans le sol, la lutte contre ces maladies reste limitée à des mesures prophylactiques [4].

Durant les cinquante dernières années, la méthode la plus utilisée pour contrôler ces maladies est la fumigation du sol par des pesticides de synthèse comme le bromure de méthyle. Ce genre de produit chimique qui a un faible coût d'utilisation, est plus efficace par rapport à l'utilisation du fongicide traditionnel, surtout pour lutter contre les organismes phytopathogènes difficiles à atteindre. Les différents éléments de ces substances ont, pourtant, des conséquences néfastes sur l'environnement, dont entre autres, l'accumulation des résidus entraînant la pollution des sols [5], l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes [6] et le déséquilibre écologique dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème [7]. Tout récemment, il a été démontré que l'efficacité des fongicides de synthèse est assez sélective vis-à-vis de la nature des plantes cultivées et dépend largement des conditions de culture et ou d'application [8].

Au regard de ces inconvénients, l'utilisation ou l'exploitation de la microflore tellurique non pathogène en vue d'éliminer les ravageurs de cultures constitue une technologie émergente et écologiquement compatible tout en diminuant l'emploi de pesticides de synthèse. On parle ainsi de lutte biologique. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique 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. Parmi ces microorganismes, les actinomycètes sont les plus connus et classés parmi les plus actifs [9, 10]. En milieu naturel, la rhizosphère des plantes saines abrite des actinomycètes capables, de façon durable, d'assurer la défense de ces plantes contre les agents fongiques phytopathogènes. Les objectifs de ce travail sont d'isoler de *Fusarium* à partir d'une partie de plante malade et des actinomycètes antagonistes de *Fusarium*, à partir du sol rhizosphérique des plantes saines puis de montrer la potentialité de l'antagonisme des actinomycètes quant à la lutte contre *Fusarium* phytopathogène.

2. Matériel et méthodes

2-1. Champignon phytopathogène (*Fusarium*)

2-1-1. Isolement

Le champignon phytopathogène est isolé directement à partir d'un fragment de fruit de tomate (*Solanum lycopersicum L., 1753*) pourri provenant de la récolte effectuée au champ de culture expérimentale du centre de recherche agricole, FOFIFA sis à Ambatobe, Antananarivo Madagascar. Le fragment d'un fruit présentant les symptômes d'une maladie fongique (pourriture et nécrose ou présence des hyphes observés sous loupe binoculaire) est immergé dans des boîtes de pétri contenant de l'eau distillée stérilisée (121°C, 20min à l'autoclave) puis incubé à la température ambiante.

Le développement des hyphes émis par le champignon est surveillé sous une loupe binoculaire toute les 24h, et ces hyphes sont repiqués dans des boîtes de pétri contenant de milieu de culture gélosé PDA (*Potato Dextrose Agar*) composé de : 20g de glucose ; 20g d'agar et 1L d'extrait de pomme de terre. La culture est incubée à 25°C pendant 5 jours. L'identification des isolats fongiques obtenus est effectuée en utilisant un schéma taxinomique basé sur les caractères morphologiques décrits par Burnett [11].

2-1-2. Test de virulence

La virulence de l'isolat de champignon phytopathogène identifié comme *Fusarium* est testée. Un test est effectué sur les graines de plantes de tomate, de concombre et de haricot et la virulence se manifeste par l'inhibition de la germination des graines et de la croissance racinaire des plantules issus des graines germées. Parallèlement, un autre test de virulence est réalisé sur les parties végétatives de ces trois plantes et la virulence se manifeste par le flétrissement et la mort des plants.

2-1-2-1. Virulence sur les graines des plantes

Une rondelle du champignon phytopathogène prélevée sur une culture âgée de 3 jours est placée au centre de boites de Pétri de 9 cm de diamètre contenant du milieu de culture PDA. Quinze graines de plante (tomate, concombre, ou haricot) stérilisées superficiellement avec de l'alcool éthylique à 95% sont repiquées à la périphérie de chaque boite [12]. Deux types de test ont été réalisés : test de contamination en pré-levée et test de contamination en post-levé. Dans le premier cas (pré-levée), la rondelle de champignon est déposée bien avant les graines et le champignon envahit tout le milieu de culture. Ainsi, les graines de plante sont déposées sur les filaments mycéliens. Dans le cas de contamination en post-levé, les implantations des graines et du champignon sur le milieu de culture se font en même temps. Les graines ont, ainsi, le temps de germer avant d'être atteintes par les filaments mycéliens du champignon. Dans les 2 cas, la même expérience est refaite en absence de la rondelle du champignon en guise de témoin et les cultures sont incubées à 30°C pendant sept jours. Dix répétitions sont réalisées pour chaque traitement. Le nombre de graines ayant germés est noté et le pourcentage de germination est ainsi calculé. Une graine germée est celle qui parvient à émettre une radicule. La virulence du champignon phytopathogène est estimée par le pourcentage d'inhibition de la germination selon l'*équation(1)* [12]:

$$PIG = [(PG_{T_e} - PG_{T_r}) / (PG_{T_e})] \times 100 \quad (1)$$

PG_{T_e} : pourcentage de germination des graines témoins

PG_{T_r} : pourcentage de germination des graines traitées

PIG : pourcentage d'inhibition de la germination

Après 7 jours, le pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire des plantules issues des graines germées est calculé par l'*équation(2)* [12] :

$$PICR = [(L_{T_e} - L_{T_r}) / (L_{T_e})] \times 100 \quad (2)$$

L_{T_e} : Accroissement moyen des racelles témoins sans traitement avec *Fusarium*.

L_{T_r} : Accroissement moyen des racelles traitées avec *Fusarium*.

PICR : Pourcentage d'Inhibition de la Croissance Racinaire

2-1-2-2. Virulence sur les parties végétatives des plantes

Des graines de tomate, de concombre, ou d'haricot sont désinfectées superficiellement à l'aide de l'hypochlorite de sodium dilué à 30%. Elles sont pré-germées dans des cuvettes remplies de sable stérilisé à l'autoclave sous la température de 121°C pendant une heure. Elles sont arrosées tous les deux jours avec de l'eau distillée stérilisée. Après 5 jours, les plantules sont repiquées dans des pots d'un litre contenant du sol sableux stérilisé. L'infection des plantules est réalisée en plaçant deux morceaux de 5 mm de diamètre de culture de *Fusarium*, au niveau de la racine ou au niveau du collet, juste après leur repiquage sur les pots [13,14]. L'inoculum de *Fusarium* est prélevé à partir du front des colonies de 3 jours poussant sur milieu PDA. Les plantules témoins sont traitées de la même manière avec des morceaux du milieu de culture PDA sans *Fusarium*. Les plantules sont réparties à raison de trois plantules par pot et six pots par traitement et par plante. Toutes les plantules sont arrosées tous les deux jours avec de l'eau distillée stérilisée. La virulence se manifeste par le flétrissement et la mort des jeunes plantes. Le taux de mortalité est évalué.

2-2. Actinomycètes antagonistes de *Fusarium*

2-2-1. Isolement

Les actinomycètes sont isolés à partir des sols rhizosphériques des plantes de tomate, de concombre et de haricot saines. Le sol directement adhérent aux systèmes racinaires des plantes est collecté et séché à l'air libre puis tamisé avec un tamis à maille de 2mm de diamètre après un broyage avec un mortier. 5g du sol est dilué dans 45mL de sulfate de magnésium ($MgSO_4$; 0,1M) préalablement stérilisé à l'autoclave (121°C ; 20min). Après une agitation, une série de dilutions d'intervalle de 10 fois allant de 10^{-2} à 10^{-4} est préparée à partir de cette solution mère. Le milieu de culture gélosé Waksman [15] est ensemencé par les différentes dilutions et incubé à 28°C pendant une semaine. Toutes les colonies d'actinomycètes sont récupérées et purifiées par la nouvelle culture sur le même milieu de culture (Waksman).

2-2-2. Test d'antagonisme des actinomycètes

2-2-2-1. Test d'antagonisme in vitro

L'antagonisme des actinomycètes vis-à-vis de *Fusarium* se manifeste par l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* lorsqu'ils sont cultivés ensemble dans une même boîte de Pétri. Le test est mené sur un même milieu de culture en confrontant directement *Fusarium* avec actinomycète à la distance «d» l'un de l'autre et symétriquement par rapport au centre de la boîte de Pétri. Une colonie d'actinomycète est prélevée à l'aide d'une anse stérile et mise en culture sur milieu de culture PDA, en faisant des stries à peu près sur la moitié de la boîte de Pétri. Puis après 4 jours d'incubation à 30°C, une colonie de *Fusarium* est déposée à l'aide de transfert tube à la distance $d = 3$ cm de la culture d'isolat d'actinomycète et symétriquement par rapport au centre de la boîte de Pétri [4, 16]. Une autre culture de *Fusarium* sans actinomycète est effectuée pour servir de témoin négatif. L'incubation est réalisée à 30°C. Le test est arrêté lorsque les deux isolats en confrontation se rencontrent, ou bien quand le mycélium de *Fusarium* du témoin négatif atteint le bord de la boîte de Pétri (**Figure 1**). Des mesures diamétrales des colonies de *Fusarium* sont effectuées tous les deux jours selon deux directions perpendiculaires. L'antagonisme de l'actinomycète est évalué par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* selon l'équation (2) [17] :

$$PI = [(Mo - Mi) / (Mo)] \times 100 \quad (3)$$

PI (mm) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne *Fusarium*

Mo (mm) : Mesure de la croissance mycélienne normale de *Fusarium* représentant le rayon opposé à la colonie d'actinomycète (**Figure 1**).

Mi (mm) : Mesure de la croissance mycélienne de *Fusarium* influencée par la croissance d'actinomycète (**Figure 1**).

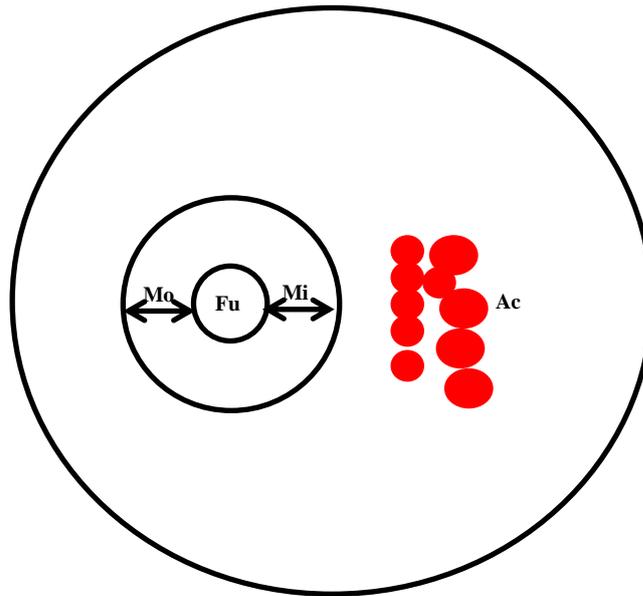


Figure 1 : Confrontation des cultures de *Fusarium* et d'actinomycète, mesures prises pour le calcul de taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* (Fu : colonie de *Fusarium* ; Ac : colonies d'actinomycète ; Mo et Mi : rayons de développement)

2-2-2-2. Test d'antagonisme *in vivo*

Ce test est mené sur des plantules de tomate, de concombre et de haricot développées sur des sols contaminés par *Fusarium*. Le sol sableux stérilisé est arrosé avec de l'inoculum de *Fusarium* à raison de 30mL par pot de volume de 500mL. L'inoculum est préparé à partir d'une suspension de mycélium et de spores de *Fusarium* d'une semaine de culture, sur boîte de Pétri contenant de milieu de culture PDA [18,19]. Pour la culture de *Fusarium* sur une boîte de Pétri 9cm de diamètre, 30mL d'eau distillée stérilisée est nécessaire pour préparer un inoculum de concentration finale 2.5×10^7 spores/mL. Les graines à germer sur les sols contaminés sont trempées pendant 30mn dans une solution d'actinomycète après être désinfectées superficiellement avec de l'alcool 50°. La solution d'actinomycète est constituée par la culture d'actinomycète sur un milieu liquide Waksman. La densité de la suspension est ajustée à 10^8 ufc/mL [20]. Les graines traitées sont cultivées sur des sols traités avec l'inoculum de *Fusarium* à raison de 5 graines par pot. Pour les témoins, les graines sont trempées dans le milieu liquide Waksman. 5 répétitions sont préparées pour chaque traitement.

Les pots sont arrosés tous les deux jours avec une solution nutritive diluée composée par litre de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 129,8 g ; NH_4NO_3 : 16 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 49,2 g ; KNO_3 : 87 g ; KH_2PO_4 : 34 g ; HNO_3 : 22 g ; H_2SO_4 : 10,4 g ; Fe-EDTA (13%) : 6,45 g ; $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$: 1,69 g ; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1,15 g ; Borax : 1,9 g ; $\text{NaMoO}_4, \text{H}_2\text{O}$: 0,12 g ; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,18 g. Dès le 3^e jour de l'expérimentation jusqu'au 21^e jour, les plantes saines, les plantes qui flétrissent et les plantes mortes sont dénombrées. Puisque les symptômes de la maladie causée par l'isolat de *Fusarium* ne sont pas connus pour les plantes de l'expérimentation, les plantes qui ne présentent pas de flétrissement sont considérées comme saines. Ainsi, dans cette expérience, le degré de sévérité de la maladie ne peut pas être évalué. Les graines qui n'ont pas germées durant cette période sont exclues de la notation [21].

Le développement des plantes est évalué en mesurant les biomasses aériennes sèches des plantules. Pour cela, les parties aériennes sont séchées dans une étuve 65°C pendant une semaine puis pesées.

2-3. Analyses statistiques des données

Afin de comparer les différentes données des paramètres mesurés de chaque traitement, le test de comparaison de moyenne par paire de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05 est appliqué en utilisant le logiciel de statistique STATISTICA.

3. Résultats

3-1. Virulence de *Fusarium* isolé

Un isolat fongique présentant des caractères de *Fusarium* est obtenu. Etant donné que aucune identification plus poussée n'a pas été réalisée, cet isolat soit codé F-02. F-02 inhibe d'une manière significative la germination des graines de concombre, de haricot, et de tomate lorsque la contamination est réalisée en pré-levée (**Tableau 1**). L'inhibition est évaluée à 84,32% pour les graines de concombre, 84,61% pour celles de haricot et 88,88% pour celles de tomate (**Tableau 3**). De même, F-02 inhibe significativement la croissance des racinelles pour toutes les formes de contamination (en pré-levée et en post-levée) (**Tableau 2, Tableau 3**).

Tableau 1 : Taux de mortalité des graines contaminées par l'isolat de *Fusarium* F-02

| | Pourcentage des graines non germées | | |
|--|-------------------------------------|---------|--------|
| | Concombre | Haricot | Tomate |
| Graines Témoins non contaminés par F-02 | 10,66a* | 8a | 8a |
| Graines contaminées par F-02 en Pré-levée | 68b | 52b | 72b |
| Graines contaminées par F-02 en Post-levée | 16a | 20ab | 14,66a |

(*) : Les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05.

Tableau 2 : Croissance racinaire des plantules contaminées par l'isolat de *Fusarium* F-02

| | Longueur de racicelle (cm) | | |
|--|----------------------------|---------|--------|
| | Concombre | Haricot | Tomate |
| Graines Témoins non contaminés par F-02 | 5,26b* | 3,35b | 4,77b |
| Graines contaminées par F-02 en Pré-levée | 0,22a | 0,52a | 0,25a |
| Graines contaminées par F-02 en Post-levée | 2,06a | 0,95a | 2,32a |

(*) : les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05.

Tableau 3 : Virulence de l'isolat de *Fusarium F-02* évaluée par les inhibitions de la germination des graines et de la croissance racinaire

| | Taux d'inhibition | | | |
|-----------|---|------------|---------------------------------------|------------|
| | Inhibition de la germination de graines | | Inhibition de la croissance racinaire | |
| | Pré-levée | Post-levée | Pré-levée | Post-levée |
| Tomate | 88,88% | 45,42% | 94,75% | 51,36% |
| Concombre | 84,32% | 33,37% | 95,81 % | 60,83% |
| Haricot | 84,61% | 60% | 84,47% | 71,64% |

L'isolat de *Fusarium F-02* s'est montré virulent vis-à-vis du développement des jeunes plantes de tomate, d'haricot et de concombre pour les contaminations au niveau du collet et au niveau du système racinaire. La contamination au niveau du système racinaire entraîne l'apparition rapide du flétrissement des jeunes plantes par rapport à celle appliquée au niveau du collet. En effet, les jeunes plantes se flétrissent et sont mortes dès le 3^e jour de l'expérience lorsque la contamination est appliquée au niveau du système racinaire. Par contre, lorsque la contamination est appliquée au niveau du collet, le flétrissement est apparu au 7^e jour de l'expérience suivi de la mortalité au 14^e jour de l'expérience. Ainsi, le nombre de jeunes plantes mortes atteint plus de 80% des plantes contaminées pour les deux modes de contamination à la fin de l'expérience (*Figure 2; Figure3; Figure 4*).

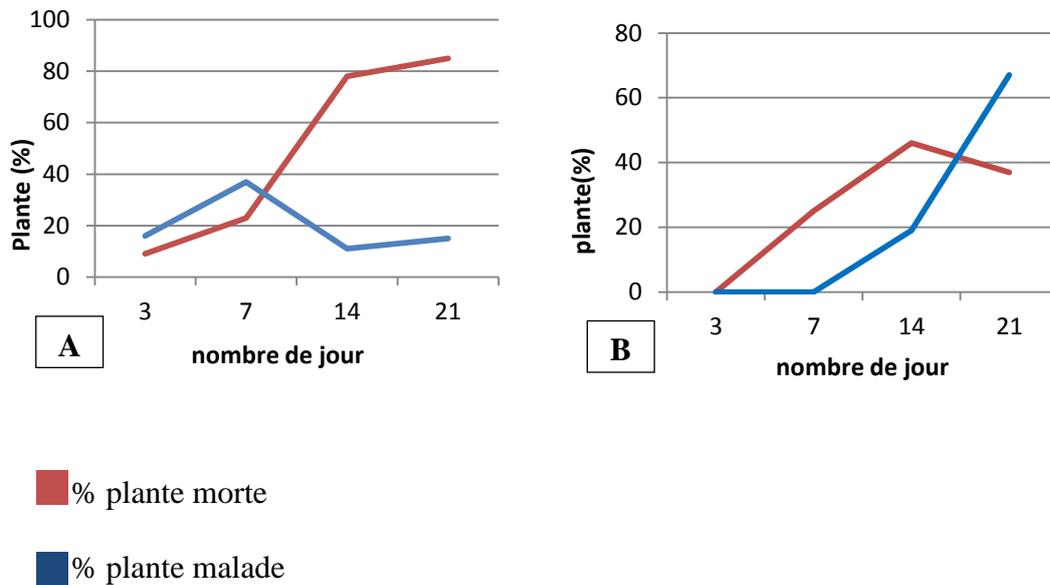


Figure 2 : Taux de jeunes plantes d'haricot malades et mortes après la contamination par l'isolat de *Fusarium F-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B)

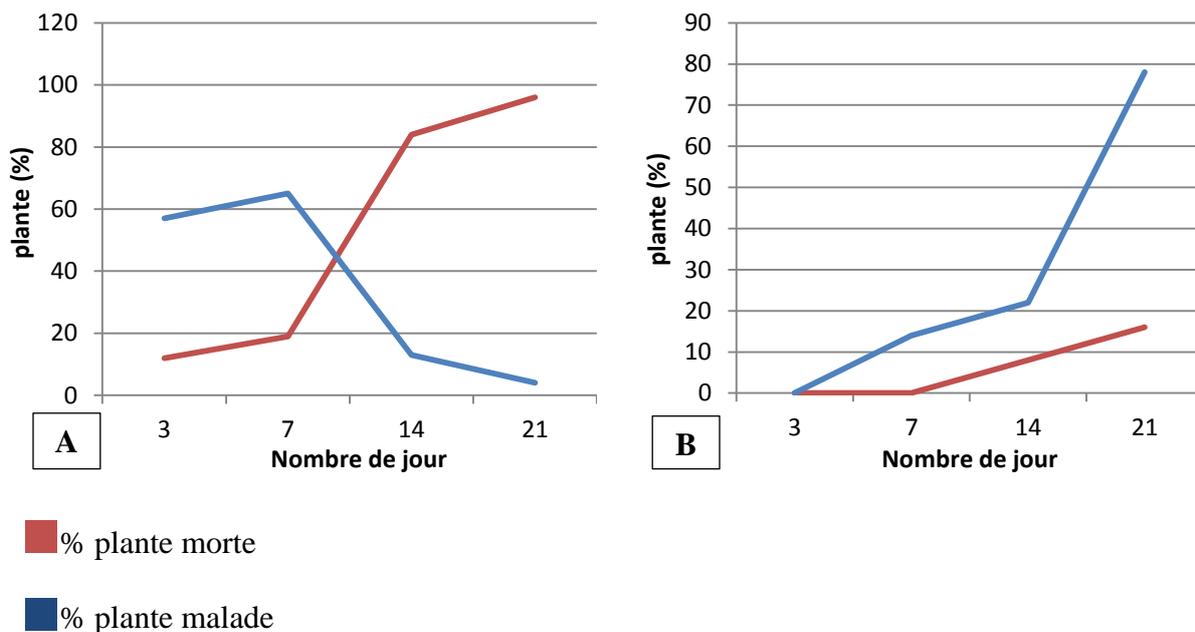


Figure 3 : Taux de jeunes plantes de tomate malades et mortes après la contamination par *F-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B)

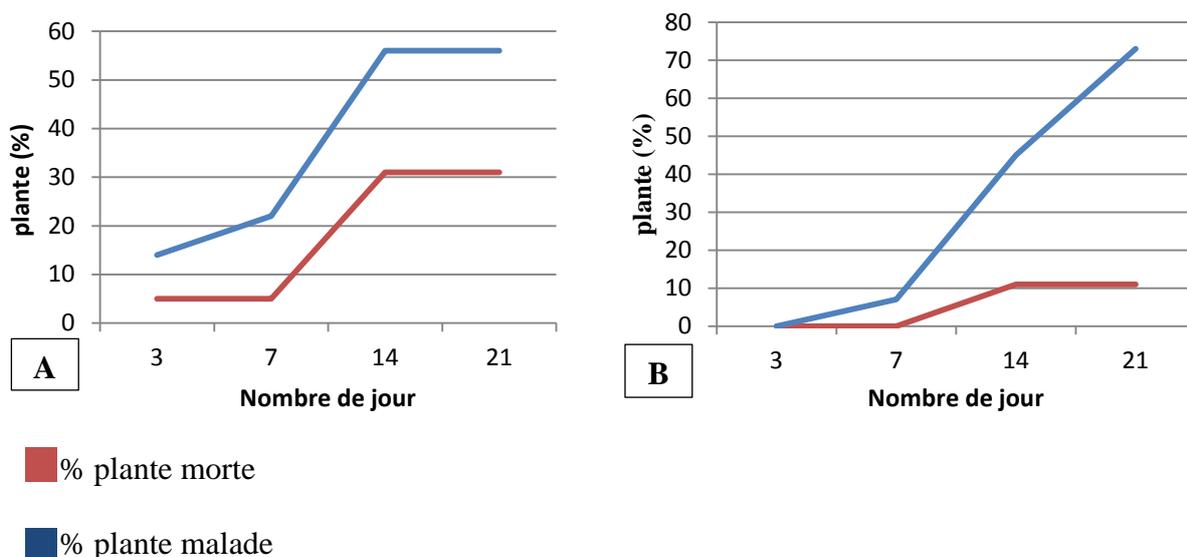


Figure 4 : Taux de jeunes plantes de concombre malades et mortes après la contamination par *F-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B)

3-2. Isolats d'actinomycètes antagonistes de l'isolat de *Fusarium* F-02

Quatre-vingt-sept (87) isolats d'actinomycètes sont obtenus dont 35 proviennent du sol rhizosphérique de tomate, 38 celui de haricot et 14 celui de concombre. Parmi ces 87 isolats, 24 s'avèrent antagonistes de l'isolat de *Fusarium* F-02 (**Tableau 4**). Les taux d'inhibition de la croissance radiale de *Fusarium* par ces actinomycètes antagonistes varient entre 14% et 60%. L'actinomycète codé Ac 66 isolé du sol rhizosphérique d'une plante de haricot présente le taux d'inhibition plus élevé avec 60,52% (**Tableau 4**). C'est avec cet isolat d'actinomycète que le test d'antagonisme *in vivo* est réalisé.

Tableau 4 : *Isolats d'actinomyète antagonistes de Fusarium F-02 (Mo: rayon de croissance normale de F-02 ; Mi: rayon de croissance de F-02 en contact avec l'isolat antagoniste)*

| Plantes (rhizosphères) | Isolats | 5 jours | | |
|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------------|
| | | Mo (mm) | Mi (mm) | Taux d'inhibition(%) |
| Tomate | Ac1 | 37 | 21 | 43,43 |
| | Ac2 | 38 | 20 | 47,36 |
| | Ac5 | 36 | 29 | 19,44 |
| | Ac7 | 37 | 18 | 51,35 |
| | Ac11 | 38 | 28 | 26,31 |
| | Ac15 | 38 | 29 | 23,68 |
| | Ac18 | 38 | 30 | 21,05 |
| | Ac19 | 37 | 31 | 16,21 |
| | Ac24 | 37 | 29 | 21,62 |
| | Ac28 | 35 | 30,5 | 12,85 |
| | Ac32 | 38 | 29,5 | 22,36 |
| Ac33 | 37 | 31,5 | 14,86 | |
| Haricot | Ac43 | 39 | 31,5 | 19,23 |
| | Ac46 | 39 | 28,5 | 26,92 |
| | Ac51 | 38 | 24 | 36,84 |
| | Ac63 | 38 | 30,5 | 19,73 |
| | Ac64 | 37 | 26,5 | 28,37 |
| | Ac66 | 3,8 | 1,5 | 60,52 |
| | Ac69 | 35 | 29 | 17,14 |
| | Ac72 | 38 | 26,5 | 30,26 |
| Ac73 | 38 | 29,5 | 22,36 | |
| Concombre | Ac76 | 35 | 27 | 22,85 |
| | Ac80 | 38 | 30,5 | 19,73 |
| | Ac84 | 38 | 27,5 | 27,63 |

3-3. Antagonisme de l'isolat d'actinomyète Ac66 vis-à-vis de l'isolat de *Fusarium* F-02 *in vivo*

Pour les trois espèces de plante (tomate, concombre, haricot), les jeunes plantes dont les graines n'ont pas été enrobées préalablement avec l'actinomyète Ac66 mais contaminées avec F-02 présentent un taux de mortalité significativement élevé (**Tableau 5**). En effet, 80% de jeunes plantes de tomate, 68% de jeunes plantes de concombre et 72% de jeunes plantes de haricot sont mortes. L'isolat d'actinomyète Ac66 ne présente pas d'inconvénients sur le développement de ces trois plantes car les résultats de test montrent que les taux de mortalités (**Tableau 5**) et les biomasses aériennes (**Tableau 6**) des plantes traitées avec Ac66 et ceux des plantes témoins non traitées ne présentent pas de différence significative.

Tableau 5 : Evaluation de l'antagonisme de l'isolat d'actinomycète Ac66 vis-à-vis de l'isolat de *Fusarium F-02* in vivo : taux de mortalités des plantules

| | Taux de mortalité (%) | | |
|------------------|-----------------------|-----------|---------|
| | Tomate | Concombre | Haricot |
| Témoin | 24b* | 16b | 20b |
| Ac66 | 12b | 8b | 8b |
| F-02 | 80a | 68a | 72a |
| Ac66+F-02 | 20b | 20b | 12b |

(*) : Les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05

Tableau 6 : Evaluation de l'antagonisme de l'isolat d'actinomycète Ac66 vis-à-vis de l'isolat de *Fusarium F-02* in vivo : biomasses aériennes des plantules

| | Biomasses aériennes (g) | | |
|------------------|-------------------------|-----------|---------|
| | Tomate | Concombre | Haricot |
| Témoin | 0,80b* | 0,82b | 0,87b |
| Ac66 | 0,99b | 1,02b | 1,14b |
| F-02 | 0,05a | 0,10a | 0,22a |
| Ac66+F-02 | 0,85b | 0,93b | 1,03b |

(*) : Les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05

4. Discussion

L'isolat de *Fusarium F-02* montre son pouvoir pathogène sur la tomate, le concombre et le haricot. Certes, cet isolat est isolé du fruit de tomate pourri, pourtant il peut contaminer les parties racinaires de la tomate, du concombre et du haricot. Les phytopathogènes du genre *Fusarium* est ubiquiste et peuvent causer des maladies à la large gamme des espèces de plantes hôtes [22, 23]. Certains auteurs ont montré que le pouvoir pathogène de *Fusarium* n'est pas stable et peut être irrécupérable après un passage sur un hôte [24-27]. Pourtant, d'autres auteurs ont montré le cas contraire [28-30]. Dans le cas de nos résultats, l'isolat de *Fusarium F-02* ne semble pas avoir perdu son pouvoir pathogène même en changeant d'hôte après culture sur un milieu gélosé. Comme notre expérimentation est réalisée avec la confrontation directe des actinomycètes antagonistes et *Fusarium* phytopathogène sur des milieux stérilisés, les résultats montrent clairement que leur cohabitation est impossible.

Les résultats obtenus n'ont pas élucidé les mécanismes par lesquels ces isolats d'actinomycètes ont pu inhiber le développement de *Fusarium* phytopathogène. Pourtant certains auteurs ont déjà illustré que l'inhibition de l'action de *Fusarium* est due à la production des antibiotiques par les antagonistes [9, 31-33] ou à la compétition vis-à-vis des éléments nutritifs [34] et que le développement en masse des antagonistes autour des graines constitue un barrage mécanique pour *Fusarium* [35, 36]. En effet, nos résultats montrent bien l'efficacité de l'antagonisme lorsque les graines sont enrobées préalablement par la solution des actinomycètes antagonistes.

5. Conclusion

Par ces résultats nous pouvons conclure que les champignons phytopathogènes du genre *Fusarium* responsables de la pourriture des fruits de tomate peuvent causer des maladies pour une large gamme d'espèces de plante vivrière. Des actinomycètes provenant de la rhizosphère peuvent inhiber efficacement le processus de contamination ainsi que la prolifération de ces champignons, en envahissant préalablement les graines à germer. Ce travail est une étape essentielle pour l'efficacité d'une technique de lutte biologique contre *Fusarium* phytopathogènes en exploitant le biofonctionnement des microorganismes du sol.

Références

- [1] - G. Riba et C. Silvy, « Combattre les ravageurs des cultures - Enjeux et perspectives ». *INRA Editions*, (1989).
- [2] - C.R. MILASOA et M. BART, « Risques, production agricole et pauvreté à Madagascar ». Conférence "agriculture et pauvreté". *Programme ILO*. (2003).
- [3] - T. ASHOKVARDHAN, A.B. RAJITHASRI, P. PRATHYUSHA and K. SATYAPRASAD, « Actinomycetes from *Capsicum annuum* L. Rhizosphers soil have the biocontrol potentiel against pathogenic fungi ». *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3 (4) (2014), 894 – 903
- [4] - N. BENHAMOU and I. CHET, "Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*". *Appl. Environ. Microbiol*, 63 (1997), 2095–2099.
- [5] - K. HIBAR, D.R. MEJDA et M. EL MAHJOUR, « Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. ». *J. Tropicultura*, 25 (3) (2007), 146-152
- [6] - T.C. REID, M.K. HAUSBECK and K. KIZILKAYA, "Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions". *Plant Dis*, 86 (2002), 493-498.
- [7] - N. BENHAMOU, C. GARAND and A. GOULET, "Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber". *Applied Environ. Microbiol*, 68 (2002), 4044-4060.
- [8] - cS. RIOUX, DENIS, V. ANNE et BARBARA, « Fongicides chez les céréales : résultats d'essais menés au Québec en 2009 et 2010 ». Journée INPACQ Grandes cultures et conservation des sols, Ottawa Canada, (2011).
- [9] - E.H. ZIEDAN, E.S. FARRAG, R.S. EL-MOHAMEDY, M.A.A. ALLA, " *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula". *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 43 (7) (2010), 634-646.
- [10] - G.M. MOHAN and M.A. SINGARA CHARYA, "Enzymatic activity of fresh water actinomycetes". *International Research Journal of Pharmacy*. (2012), 3-11.
- [11] - H.L. BERNETT, "Imperfect Fungi" (1958).
- [12] - A.E. DORRANCE, S.A. BERRY, P. BOWEN and P.E. LIPPS, "Characterization of *Pythium* spp. From three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity" *Plant Health Progress*. (2004). <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/pythium/>
- [13] - P. REY, N. BENHAMOU and Y. TIRILLY, "Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp." *Phytopathology*, 88 (1998), 234-244.

- [14] - G.A. FORBES and P. DAVET, "Characterization and pathogenicity on seedlings of *Pythium* species isolated from soybean roots in the Toulouse area". *Agronomie*, 10 (1990), 825-830
- [15] - S.A. WAKSMAN, "The Actinomycetes: their nature, occurrence, activities, and importance". *Chron. Botan. Company, Waltham, MA, USA*. (1961).
- [16] - I. CHET, "Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments". In "*Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*", eds. D. Hornby, (1990), pp.15-25. CAB International, Oxon, England.
- [17] - H.A. IDRIS, N. LABUSCHAGNE, N. KORSTEN, « Screening rhizobacteria for biological control of fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia ». *Biol. Control*, 40 (1) (2007), 97 – 106.
- [18] - S.F. HWANG, P. CHAKRAVARTY and D. PREVOST, "Effects of *Rhizobia*, Metalaxyl and VA Mycorrhizal fungi on growth nitrogen fixation and development of *Pythium* root rot of sainfoin". *Plant Disease*, 77 (1993), 1093 – 1098.
- [19] - C.R. HOWELL, "Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp.". *Phytopathology*. 92 (2002), 177-180.
- [20] - B.G. LOU, P.R. HARVEY, R.O. WARREN, B.X. ZHANG and M.H. RYDER, "Biological control of damping-off caused by ridomil-resistant *Pythium*". Proceedings of 5th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Auburn University, Cordora, Argentina. (2000).
- [21] - O. BESNARD et P. DAVET, Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrice de la croissance des plantes. *Agronomie*, 13 (1993), 413-421.
- [22] - P. RAMACHANDRAN, A.S. SUMMANWAR, and S.P. LAL, "Cowpea top. Necrosis—caused by *Fusarium equiseti*(Corda) Sacc.". *Current Science* 51(1982), 475—477.
- [23] - B.D. Nelson, and J.M. Hansen, "Reaction of soybean cultivars to isolates of *Fusarium solani* from the Red River Valley". *Plant Disease* 81(1997), 664—668.
- [24] - G.M. ARMSTRONG, J.D. MAC LACHLAN and R. WEINLILING, "Variation in pathogenicity and cultural characteristics of the cotton wilt organism, *Fusarium vasinfectum*". *Phytopathology*. 30(1940), 515-520.
- [25] - D. BOUHOT, "Some aspects of the pathogenic potential in formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* on *Cucurbitaceae*". In: "*Fusarium. Diseases, biology, and taxonomy*, (P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN and R.J. COOK, editors)". The Pennsylvania State University Press, (1981), 318-326
- [26] - J. C. FOLLIN et E. LAVILLE, Variations chez le *Fusarium oxysporum* f. *cubense* (agent causal de la maladie de Panama du bananier). *Fruits*, 21(1966), 261-268.
- [27] - C. BOOTH, "The genus *Fusarium*. Kew. Commonwealth Mycological Institute". (1971).
- [28] - K. ASSIGBETSE, « Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Sn. et H., agent de la fusariose du cotonnier ». Thèse de doctorat, Université de Montpellier II. (1993).
- [29] - C. M. MESSIAEN and R. CASSINI, "Taxonomy of *Fusarium*". In: "*Fusarium. Diseases, biology and taxonomy* (P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN and R.J. COOK, editors)". The Pennsylvania State University Press, (1981), 427-445.
- [30] - J. HENNI, C. BOISSON et J.P. GEIGER, « Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ». *Phytopath. mediterr.*, 33 (1994), 51-58.
- [31] - HAAS, and C. KEEL, "Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease". *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41 (2003), 117-153.
- [32] - L.S. THOMASHOW and D.M. WELLER, "Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*". *J. Bacteriol.*, 170(1988), 3499-3508.

- [33] - C. R. HOWELL and R. D. STIPANOVIC, "Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium". *Phytopathology*, 69 (1979), 480-482.
- [34] - M. ONGENA, P. JACQUES, Y. TOURE, J. DESTAIN, A. JABRANE and P. THONART "Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 69(1) (2005b), 29-38.
- [35] - M.E.Q. REYES, K.G. ROHRBACH and R.E. PAULL, "Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit". *Postharvest Biol. Technol*, 33(2) (2004), 193-203.
- [36] - S. PIANO, V. NEYROTTI, Q. MIGHELI and M.L. GULLINO, "Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple". *Postharvest Biol. Technol*, 11(3) (1997), 131-140.