

Type of the Paper (Original paper)

Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie

Lamia Lounaci *, Souad Athmani-Guemouri

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Alger, Algérie.

* Corresponding author: lounacilamia@yahoo.fr
Téléphone: +21321247913. Fax : +21321247217

Received: 13-05-2014 / Revised: 28-06-2014 / Accepted: 30-06-2014 DOI : <https://doi.org/10.5281/zenodo.438191>

Résumé: Les tests ont porté sur l'action de *P. polymyxa* SGK2 à l'égard de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides* et *M. nivale* agents de la fusariose du blé dur en Algérie.

La technique de confrontation directe en boîtes de Petri met en évidence une action inhibitrice caractérisée par un ralentissement de la croissance mycélienne. Après 7 jours d'incubation, un arrêt à distance des colonies du pathogène est observé. Nous étions également attachés à rechercher le (ou les) moyen utilisé par *P. polymyxa* SGK2 pour inhiber la croissance des mycètes tests. Cette capacité naturelle agit par la synthèse d'une (ou des) substance constitutive inhibitrice de la croissance des quatre champignons sur le milieu King B, d'une (ou des) substance inductible inhibitrice de la croissance du *F. culmorum* et *F. graminearum* sur le même milieu, et d'une (ou des) substance volatile inhibitrice de la croissance des quatre mycètes sur les milieux King B et PDA.

Mots clés: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, Fusariose, Lutte biologique, *M. nivale*, *P. polymyxa*, *Triticum durum*.

I- Introduction

Les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les agents responsables de la fusariose du blé présentent des inconvénients. La plupart d'entre eux sont toxiques pour les utilisateurs qui entrent en contact avec la substance de préservation. Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement. *Paenibacillus polymyxa* (syn. *Bacillus polymyxa* [1]) représente un certain intérêt car elle appartient au groupe des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) [2]. La promotion de la croissance peut s'établir par l'intermédiaire de mécanismes directs ou indirects. Les effets directs s'observent dans le cas où les métabolites produits par la bactérie inoculée stimulent la croissance de la plante indépendamment de la microflore rhizosphérique native [3]. Au contraire, un effet indirect s'exerce par un comportement compétitif voire antagoniste de la population introduite, vis-à-vis de populations délétères ou pathogènes [4,5]. En Algérie, la lutte chimique n'a pas permis de maîtriser l'évolution inquiétante des agents de la fusariose sur une culture de blé de plus en plus importante. Ce travail s'intéresse à la mesure de l'action *in vitro* de *P. polymyxa* SGK2 sur *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, et *M. nivale*, agents de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*), et de procéder à la recherche du moyen utilisé par cette souche bactérienne pour inhiber la croissance des mycètes tests.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Souches microbiennes

II.1.1. Matériel fongique

Les 4 champignons qui ont fait l'objet de l'étude ont été fournis par le laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.) d'El-Harrach (Alger, Algérie). Il s'agit de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, et *M. nivale* (Tab.1)

Tableau 1: Codes et origines des mycètes pathogènes

Isolat N°	Code	Origine	Année d'isolement	Espèce
1	FG04/08	Hd blé tendre ITGC (collet)	2008	<i>F. graminearum</i>
2	FC01/08	Vitron ITGC (collet)	2008	<i>F. culmorum</i>
3	FV01/07	Variété Latino INA blé tendre (épis)	2007	<i>F. verticillioides</i>
4	MN01/08	Vitron INA (collet)	2008	<i>M. nivale</i>

II.1.2. Origine de la rhizobactérie isolée

La souche de *P. polymyxa* SGK2 utilisée dans ce travail a été isolée de la rhizosphère du blé dur sur un sol de Tiaret, cultivé depuis plus de 100 ans par une méthode immuno-Enzymatique (immuno-piégeage) [6]. Elle avait été identifiée et sa diversité recherchée à l'aide de différentes méthodes: API (Analytical Profile Index), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et séquençage du gène de l'ARNr16S [7]. Cette souche bactérienne appartient au groupe ERIC-PCR 1 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction), elle fait partie du groupe de souches les plus adaptées à la rhizosphère du blé dur et elle est caractérisée par son pouvoir de dégradation du xyloglucane et sa capacité à entraver le développement *in vitro* de plusieurs mycètes phytopathogènes [8].

II.2. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Petri

Les milieux King B et PDA sont utilisés pour le test de confrontation *in vitro*. La bactérie est inoculée sous forme d'une strie rectiligne qui partage la boîte en deux parties égales. Deux disques, de 5 cm de diamètre, obtenus à l'emporte pièce, d'une culture de champignon sur gélose, sont déposés de part et d'autre de la strie à 1 cm du bord de la boîte. Les boîtes témoins ne sont pas ensemencées avec la bactérie. Les boîtes sont ensuite incubées à l'obscurité pendant 7 jours à 28°C. La durée d'incubation est prolongée pendant 30 jours afin de surveiller la stabilité des résultats obtenus dans ce test. Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test.

II.2.1. Calcul du pourcentage d'inhibition

Les mesures de la croissance mycélienne sont prises quotidiennement et le test s'achève lorsque l'une des colonies aura couvert l'ensemble de la boîte. Pour l'estimation de la croissance mycélienne, qui consiste à mesurer quotidiennement (toutes les 24 heures) le diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène à l'aide d'un pied à coulisse [9]. L'évaluation de l'inhibition exercée par *P. polymyxa* SGK2 est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante [10]:

$$I (\%) = 1 - (C_n / C_o) \times 100$$

où:

C_n : le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

C_o : le diamètre moyen des colonies témoins.

II.2.2. Recherche d'une substance active sur le développement des champignons

II.2.2.1. Recherche d'une substance constitutive

On répète l'expérience portant sur la confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Petri. Cependant, on dépose un disque de gélose prélevé à proximité de la bactérie [11].

II.2.2.2. Recherche d'une substance inductible

On utilise comme matériel de départ des milieux en boîtes de Petri ensemencés avec le champignon et la bactérie. Un disque gélosé provenant de ces boîtes est prélevé dans la zone d'inhibition (entre le champignon et la bactérie). Il est placé entre 2 disques gélosés supportant le champignon [11].

II.2.2.3. Recherche d'une compétition trophique entre le champignon et la bactérie sur les milieux PDA et King B:

On utilise une boîte ensemencée avec le champignon et la bactérie. Cette boîte doit traduire un antagonisme entre la bactérie et le champignon. L'élimination de la moitié de la strie centrale en enlevant la gélose et la bactérie permet les interprétations exposées sur la figure 1.

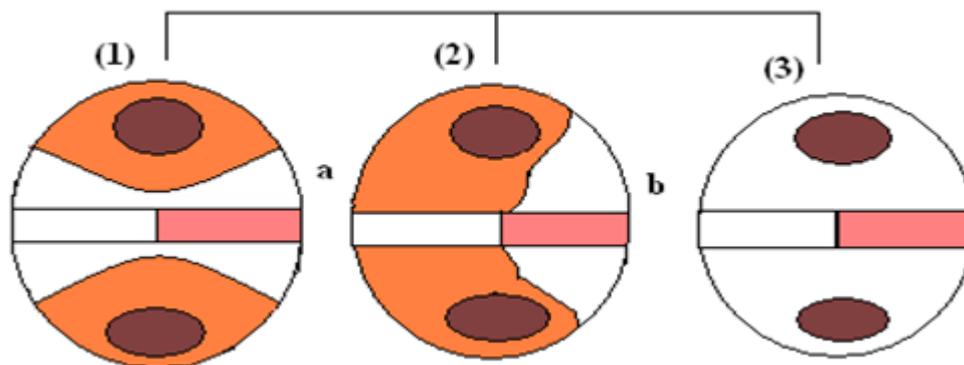


Figure 1: Lecture des résultats de la recherche d'une compétition trophique. Le champignon reprend sa croissance uniformément (1) du côté où la bactérie a été éliminée (2a) : pas d'inhibition trophique, par contre il y'a une inhibition trophique au niveau du compartiment (2b). Le champignon ne reprend pas sa croissance (3) : l'hypothèse de l'inhibition trophique reste possible.

II.2.2.4. Recherche d'une substance inhibitrice volatile sur les milieux PDA et King B par l'utilisation de boîtes de Petri compartimentées:

Le champignon et la bactérie sont ensemencés dans une boîte de Petri à trois compartiments. On ensemence le champignon dans l'un des compartiments et la bactérie dans les deux autres. Les boîtes témoins sont ensemencées avec le champignon uniquement. On observe si la présence de la bactérie entraîne un retard de croissance du champignon [11].

III. Résultats et Discussion

III.1. Test de confrontation *in vitro*

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène-Antagoniste). Après 7 jours d'incubation, une action inhibitrice exercée par la souche SGK2 vis-à-vis de la croissance mycélienne a été observée. Les pourcentages d'inhibition, calculés

pour les différentes confrontations sur les deux milieux de culture PDA et King B, sont indiqués dans le Tableau 2.

Tableau. 2: Pourcentage d'inhibition de la croissance des quatre mycètes tests en présence de *P. polymyxa* SGK2 après 7 jours d'incubation à 28°C.

Milieux	Pourcentage d'inhibition (%)	
	King B	PDA
Champignons		
<i>F. verticillioides</i>	37,41	12,47
<i>F. culmorum</i>	58,73	0,97
<i>F. graminearum</i>	70,84	3,13
<i>M. nivale</i>	66,11	1,41

La souche *P. polymyxa* SGK2 inhibe le développement des champignons dans les proportions variant de 37,41 à 70,84% et de 0,97 à 12,47% respectivement sur le milieu King B et le milieu PDA. *F. graminearum* semble être le plus sensible sur le milieu King B avec un pourcentage d'inhibition de 70,84%, tandis que *F. verticillioides* semble le plus sensible sur le milieu PDA avec un pourcentage d'inhibition de 12,47%. On peut constater que la croissance de *F. graminearum*, *M. nivale* et *F. culmorum* est fortement inhibée par *P. polymyxa* SGK2 sur le milieu King B, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, alors que dans le milieu PDA, le pourcentage d'inhibition de ces trois champignons est inférieur à 4%, ceci laisse supposer que le mécanisme d'action de *P. polymyxa* SGK2 est différent sur les deux milieux de culture. Le fort pouvoir inhibiteur exercé par la souche SGK2 vis-à-vis du mycète cible sur le milieu King B carencé en fer peut être expliqué par un phénomène de compétition pour cet élément. L'inhibition des mycètes sur le milieu carencé en fer peut non seulement être due aux sidérophores, mais aussi à la production d'une substance antibiotique dépendante de la concentration en fer [12]. Mais le mécanisme le plus classique est que les souches sont capables de réduire la croissance de ces agents en synthétisant des sidérophores. Alternativement, la concurrence directe pour les aliments est un scénario possible. *P. polymyxa* SGK2 se développe plus rapidement par rapport aux mycètes en colonisant le milieu de culture et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition. Sur milieu PDA, l'inhibition de la croissance du *F. graminearum*, *F. culmorum* et *M. nivale* n'était pas bien marquée. Ceci s'expliquerait par la vitesse de croissance plus importante de ces mycètes sur ce milieu en comparaison avec celles développées sur le milieu King B.

III.2. Recherche du moyen utilisé par *P. polymyxa* SGK2 pour inhiber la croissance des mycètes tests

III.2.1. Recherche d'une substance constitutive inhibitrice de la croissance des champignons

La gélose prélevée à proximité de la bactérie est placée entre deux disques de gélose supportant le champignon. Cette expérience met en évidence une (ou des) substance produite par *P. polymyxa* SGK2 et active sur la croissance des mycètes tests sur le milieu King B. Des chercheurs sont attachés à déterminer le mode d'action de 03 *Bacillus* et 4 actinomycètes sur les champignons du bleuissement du bois. Ces bactéries n'agissent ni par la synthèse d'une substance volatile, ni par compétition trophique. L'antagonisme est lié à la production d'une ou de plusieurs substances inhibitrices constitutives qui diffusent dans le milieu de culture [10]. Dans le milieu PDA, le disque de gélose supposé contenir la substance inhibitrice, ne permet pas l'arrêt de la croissance des quatre mycètes. On peut supposer dans ce cas, que la rémanence de la substance est trop faible pour être mise en évidence. En effet, l'expérience dure 7 jours (délai nécessaire au recouvrement par le

champignon de la boîte témoin). Il est possible que la dégradation de la substance survienne bien avant la fin de l'expérience. La souche SGK2 semble inefficace sur le milieu PDA. Ce dernier est éliminé des expériences futures (recherche d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons et recherche d'une compétition trophique). Dans le cas positif, sur le milieu King B, on constate que la substance inhibitrice de la croissance des mycètes tests est toujours active 4 semaines après le début de l'expérience, ce qui confirme sa stabilité dans le temps.

III.2.2. Recherche d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons

Certaines bactéries produisent des métabolites de façon constante, c'est à dire indépendamment du milieu dans lequel elles se trouvent, d'autres par contre ne les produisent qu'en présence d'un inducteur. Dans le cas qui nous intéresse, l'inducteur pourrait être une substance produite par le champignon. L'expérience réalisée, ne permet pas la synthèse de ces substances inductibles si elles existent puisque le disque de gélose est prélevé d'une boîte de Petri ne contenant que la bactérie. C'est pourquoi nous avons réalisé une seconde expérience où le disque gélosé est prélevé d'une boîte de Petri dans laquelle sont cultivés à la fois la bactérie et le champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans le Tableau 3. Le disque gélosé supposé contenir la substance inhibitrice prélevé dans la zone d'inhibition (entre le champignon et la bactérie) est placé entre deux disques gélosés supportant le champignon, a permis d'entraver uniquement la croissance de *F. culmorum* et *F. graminearum*. Ces deux mycètes ont une influence sur la production d'antifongiques. Nous avons remarqué aussi que l'inhibition de la croissance des mycètes tests était plus importante en présence de *P. polymyxa* SGK2.

Tableau.3: Mise en évidence d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons.

Milieux	King B
Champignons	
<i>F. verticillioides</i>	-
<i>F. culmorum</i>	+
<i>F. graminearum</i>	+
<i>M. nivale</i>	-

- : Le champignon entre en contact avec le disque de gélose

+: Zone d'inhibition entre le champignon et le disque de gélose

III.2.3. Recherche d'une compétition trophique

Lorsque la moitié de la strie bactérienne est éliminée du milieu de culture, le champignon poursuit sa croissance de façon homogène, qu'il y ait, ou qu'il n'y ait plus la bactérie. Cette expérience montre que la croissance du champignon est ralentie, mais toujours possible (Figure.2). L'inhibition de la croissance n'est pas due à une compétition trophique, ou bien la substance inhibitrice n'est pas stable.

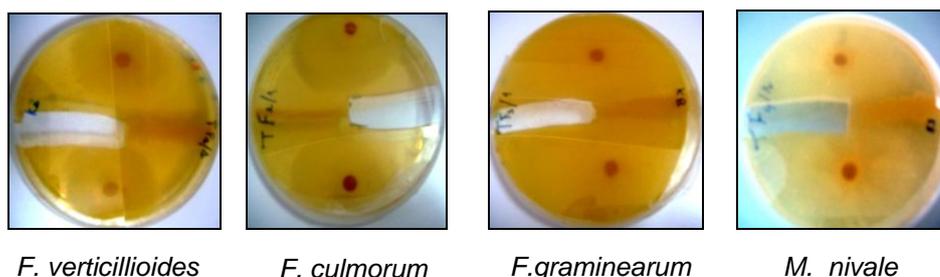


Figure.2: Recherche d'une compétition trophique sur le milieu King B, après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité.

III.2.4. Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance des champignons

Le compartimentage évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon. On empêche ainsi la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans les figures 3 et 4. Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et la souche *P. polymyxa* SGK2, cette dernière a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des mycètes agressifs. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de l'antagoniste à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement des agents pathogènes.

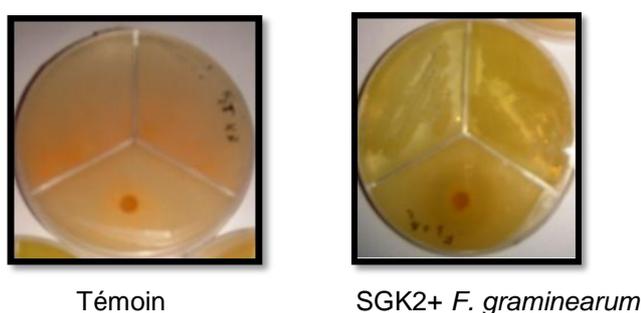


Figure.3: Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance du *F.graminearum* sur le milieu King B après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité (Utilisation de boîtes de Petri compartimentées).

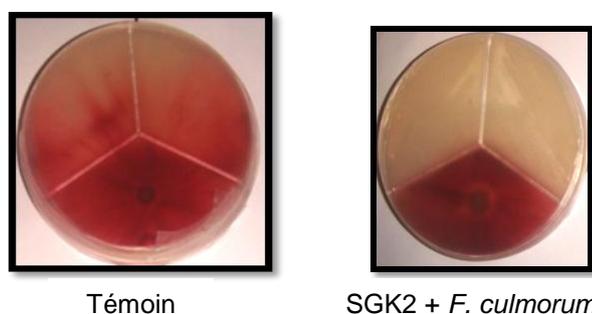


Figure. 4: Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance du *F. culmorum* sur le milieu PDA après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité (Utilisation de boîtes de Petri compartimentées).

De même, des chercheurs ont mis en évidence la production d'une substance volatile par la souche *P. polymyxa* E681. En effet, Les résultats ont démontré pour la première fois que cette souche produit un mélange volatil qui peut améliorer la croissance des plantes et susciter une résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* en l'absence de contact physique avec les plantes [13].

IV. Conclusion et perspectives

Cette étude a montré l'effet nettement antagoniste de *P. polymyxa* SGK2 vis -à- vis de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, et *M. nivale*, agents responsables de la fusariose du blé en Algérie. En effet, les essais de confrontations entre ces mycètes et *P. polymyxa* SGK2, que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien à distance, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes testés. Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre les pathogènes et l'agent antagoniste, une réduction du diamètre des colonies des mycètes est observée par rapport au témoin non traité. Cela prouve qu'en plus de son pouvoir de produire une (ou des) substance constitutive, une (ou des) substance inductible, il est donc préférable d'appliquer celle-ci afin qu'elle assure une sécrétion continue. *P. polymyxa* SGK2 peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène. En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial d'utiliser la souche *P. polymyxa* SGK2 en tant qu'agent de lutte biologique contre la fusariose du blé.

V. Références bibliographiques:

- [1] Ash C., Priest F.G and Collins M.D. Molecular identification of RNAr group 3 *Bacillus* using PCR prob test. Proposal for the creation of new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64 (1993) 253-260.
- [2] Selim S., Neger J., Govaert C., Gianinazzi S. and Van Tuinen D. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus polymyxa* sp. Strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 6501-6507.
- [3] Timmusk S., Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology, Uppsala, Acta Universitatis Upsaliensis* 908 (2003) 40.
- [4] Lorentz R.H., Artico S'da Silveira B.A., Einsfeld A. and Corcao G. Evaluation of antimicrobial activity environment in *Paenibacillus* spp. *Syrains* isolated from natural , *Letter in Appl. Microbiol.* 43(5) (2006) 541-547.
- [5] Rasa W., Shen Q. Growth , Fe (3+) Reductase Activity, and Siderophores production by *Paenibacillus Polymyxa* SQR -21 Under Differential Iron Conditions. *Rev. Current Microbiology*, Edit. Springer New York. ISSN (2010) 8651.
- [6] Guemouri, S. Isolement et caractérisation des souches de *Bacillus polymyxa* isolées de différents sols algériens, Thèse. Magister. U.S.T.H.B., Alger (1992) 111.
- [7] Guemouri-Athmani, S.; Berge, O.; Bourrain, M.; Mavingui, P.; Thiéry, J.M.; Bhatnagar, T.; Heulin, T. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian Soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36 (2000)149-159.
- [8] Athmani-Guemouri S. Adaptation des populations de *Paenibacillus polymyxa* aux racines de blé dur cultivé sur des sols algériens. Thèse Doctorat, USTHB, Alger (2006) 189 pp.
- [9] Benkada Y.M., Bendahmane B.S. et Saiah F. Essai de lutte biologique *in vitro* par l'utilisation de *Trichoderma* sp. A l'égard de *Ascochyta Pinodella* agent de l'antracnose du pois (*Pisum Sativum* L.). articl. Faculté des sciences de l'ingénieur, Université Abdelhamid Ibn Badis. Mustaganem Algérie (2010).

- [10] Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie, *OEPP/EPPO Bull.* 26 (1996) 697–705.
- [11] Bezert G., Chappe P., Mourey A. and Loubinoux B. Action de *Bacillus* et d'actinomycètes sur les champignons du bleuissement du bois. Articl. LERMAB, Equipe Chimie Organique-Microbio. Univ. Henri Poincaré Nancy I, France 6 (1996) 174-190.
- [12] Tomashow L.S. and Weller D.M. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant Soil.* 129 (1990) 93-99.
- [13] Lee B., Farag M.A., Park H.B., Kloepper J.W., Lee S.H. et Ryu C.M. Résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* par une longue chaîne bactérienne volatile émise par *Paenibacillus polymyxa* dans *Arabidopsis thaliana*. Les progrès récents en engrais biologiques et fongicides biologiques (PGPR) pour une agriculture durable. Actes du 3^{ème} Conférence asiatique sur la croissance des plantes-Promouvoir Rhizobacteria (PGPR) et d'autres agents microbiens, Manille, Philippines, 21-24 (2012) 462-468.

Please cite this Article as:

Lamia Lounaci, Souad Athmani-Guemouri, Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie, **Algerian J. Nat. Products, 2:2 (2014) 35-42.**

www.ajnp.webs.com

www.univ-bejaia.dz/ajnp

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved