

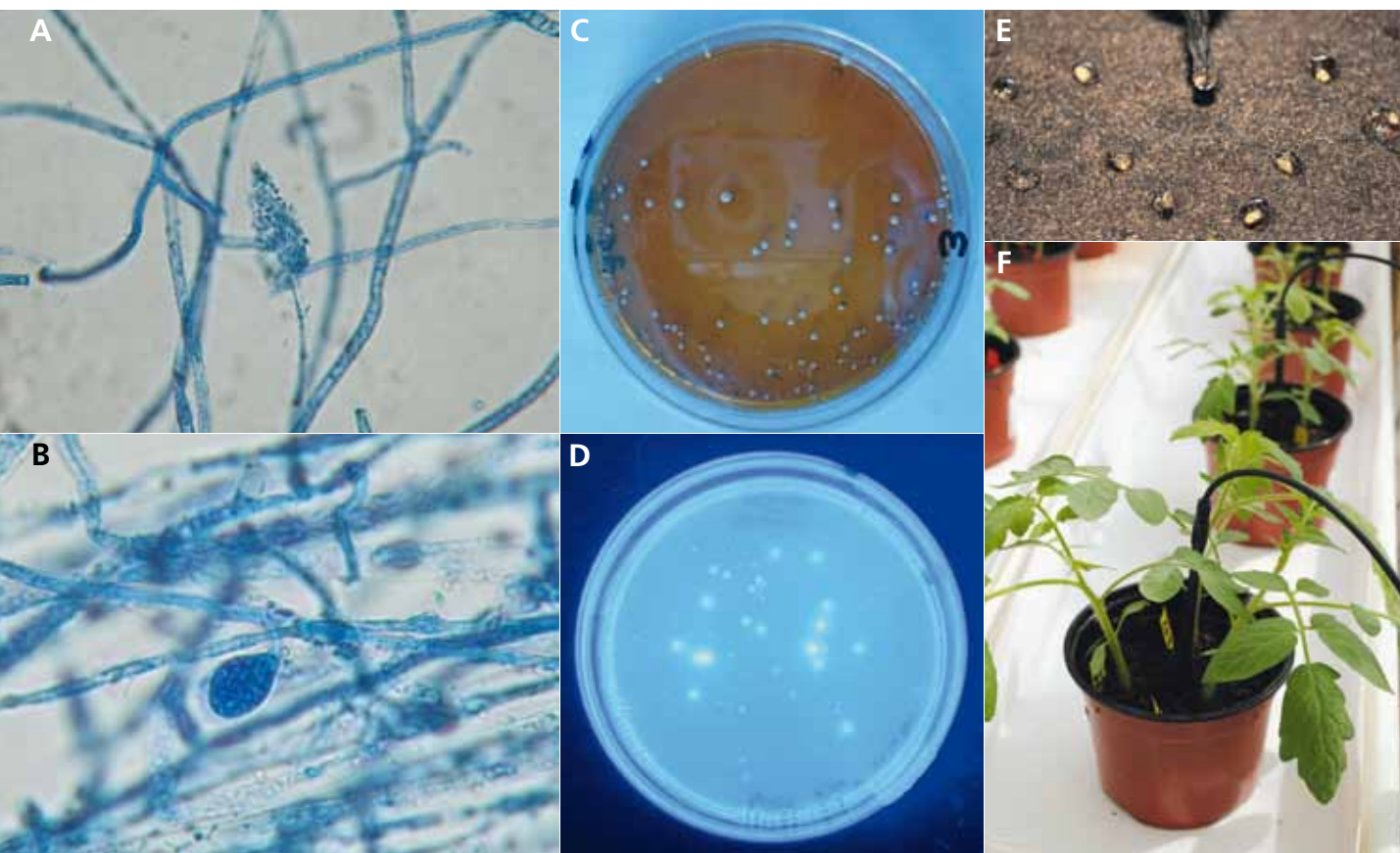
Souche de *Lactobacillus* utilisée comme agent de lutte biologique contre *Pythium ultimum* sur tomate

Cédric CAMPS¹, Vincent MICHEL¹, Chloé MARTINEZ¹ et Matthias Peter LUTZ²

¹Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW)

²Université des sciences appliquées de Zurich (ZHAW)

Renseignements: Cédric Camps, e-mail: cedric.camps@acw.admin.ch, tél. +41 27 345 35 50, www.agroscope.ch



A et B: le champignon pathogène *Pythium* sp. C: le lactobacille LAB-WT2 testé comme antagoniste. D: la bactérie antagoniste *Pseudomonas fluorescens* PF-CHA0. E: enrobage des semences. F: plant de tomate de l'essai.

Introduction

Le champignon *Pythium ultimum* est à l'origine de nombreux dégâts dans les cultures maraîchères et ornementales (Lafontaine *et al.* 2007). Sa présence peut entraîner la mort du jeune plant ou un affaiblissement chronique de la plante induisant des pertes de rendement. Devant l'ampleur des dégâts, de nombreuses études scientifiques sont consacrées à ce pathogène. En 2010, Lévesque *et al.* publient le génome de *P. ultimum* dans le but de mieux élucider son mode d'action infectieux. Ils établissent que ce champignon se distingue

des autres Oomycètes en particulier par sa production de protéines impliquées dans sa pathogénicité vis-à-vis des plantes. Cependant, aujourd'hui encore, le mode d'action de *P. ultimum* n'est pas entièrement explicité.

La biomasse et l'activité microbienne du sol constituent des atouts pour lutter contre les maladies du sol telles que celle causée par *P. ultimum* (Welbaum *et al.* 2004). Au sein de cette vie microbienne, les bactéries associées aux plantes résident dans la rhizosphère et la phyllosphère. Dans cet environnement complexe, elles sont sujettes à la compétition, à l'antagonisme, au parasitisme et/ou à la prédation d'autres organismes du

sol (champignons, bactéries, virus, nématodes et protozoaires). Lorsque les bactéries ont un effet de contrôle, c'est-à-dire une activité antagoniste, sur le développement d'un pathogène, on parle d'agent de lutte biologique (*Biological Control Agent* BCA). Les modes d'action des BCA les plus répandus sont la compétition pour les ressources au sein d'une niche écologique ou d'un substrat, la production d'inhibiteurs allélochimiques et l'induction d'une résistance systémique de la plante hôte à un large spectre de pathogènes et/ou aux stress abiotiques (Bloemberg *et al.* 2001; Haas *et al.* 2000).

Le but de ce projet était de valoriser des bactéries issues de la rhizosphère suisse comme agents de lutte potentiels contre le pourridié pythien. Il s'est concentré en particulier sur une souche sauvage de *Lactobacillus* issue de sols suisses dans la lutte contre *P. ultimum* en culture de tomate.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le cultivar de tomate CLN 2777B, issu de la banque de semences du «World Vegetable Center» (www.avrdc.org) situé à Taïwan, a été choisi sur la base de tests préliminaires (Madelin *et al.* 2009).

Agent pathogène *P. ultimum*

L'agent pathogène *P. ultimum* a été fourni par l'Université des sciences appliquées de Zurich (ZHAW). L'Oomycète est cultivé sur milieu solide malt agar (MA) et multiplié selon Dhingra et Sinclair (1995) durant 48 h à température ambiante. Après multiplication en boîte de Pétri, *P. ultimum* est cultivé sur millet (millet jaune Bio Naturaplan).

Souches bactériennes

Sélection et culture

Environ 300 isolats bactériens de type lactobacilles (LAB) ont été récoltés dans des échantillons de sols de diverses régions de Suisse. L'ensemble de ces isolats a ensuite été testé *in vitro* afin de mesurer leur activité antagoniste vis-à-vis de *P. ultimum* (Lutz *et al.* 2011). La souche LAB-WT2 (Wild-type 2) issue de cette sélection a été utilisée pour les essais.

Afin d'évaluer l'efficacité de LAB-WT2, un deuxième type de bactérie a été utilisé: *Pseudomonas fluorescens*, souche CHA0 (PF-CHA0), dont les propriétés antagonistes à l'égard de *P. ultimum* sont reconnues (Haas et Défago 2005).

LAB-WT2 est cultivée sur milieu MRS gélosé (Broth, De Man, Rogosa and Sharpe-Agar) et PF-CHA0 sur milieu KBA (King's B Agar) également gélosé (32 °C, 48 h).

Résumé Une souche de *Lactobacillus* (LAB-WT2) issue de sols suisses a été testée pour ses propriétés antagonistes vis-à-vis du champignon pathogène *Pythium ultimum* sur tomate. Son efficacité a été comparée à celle de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (PF-CHA0) dont la capacité à lutter contre *P. ultimum* est reconnue. Les résultats montrent que PF-CHA0 permet de réduire l'apparition des symptômes de la maladie de 90 % et LAB-WT2 de 70 %. Des essais ultérieurs permettront de vérifier l'efficacité antagoniste de LAB-WT2 sur des souches de *Pythium* présentes dans des sols maraîchers suisses.

Préparation de l'inoculum bactérien et enrobage des graines de tomate

15 ml de NaCl 0,9 % sont déposés sur une boîte de Pétri contenant la culture bactérienne. À l'aide d'une anse de verre stérile, l'ensemble des colonies de la boîte de Pétri est récupéré et mis dans un béccher préalablement stérilisé. La solution mère est ajustée afin d'obtenir une concentration de 10⁸ cfu.

Les graines de tomate sont enrobées manuellement avec une solution de CMC (Carboxyméthylcellulose NatriumSalz, Aktivgehalt) 2 % (p/v) mélangée à l'inoculum bactérien concentré à 10⁸ cfu. La dernière étape de l'enrobage consiste à déposer une couche externe de tourbe tamisée et stérilisée.

Infection avec *Pythium ultimum*

Les plants de tomates sont infectés trois semaines après le semis. Les plantes sont repotées dans un substrat (Brill-Typical 3, NE 12580) mélangé au millet inoculé avec *P. ultimum*. La dose infectieuse de 20 g de millet inoculé pour 1 l de substrat a été déterminée lors d'une étape préalable de la mise au point méthodologique.

Evaluation de l'effet BCA

Le calcul de l'incidence et de la réduction de l'incidence de la maladie est réalisé d'après Song *et al.* (2004), sur la base d'une échelle de notation de symptômes à cinq valeurs: 0 (plante saine), 1 (feuilles jaunes sans flétrissement de la plante), 2 (feuilles vertes avec flétrissement de la plante), 3 (feuilles jaunes avec flétrissement de la plante) et 4 (plante morte). Sur la base de ces nota-

tions, l'incidence de la maladie (IM) et la réduction de l'incidence de la maladie (RIM) ont été calculées selon les équations indiquées ci-dessous.

$$IM (\%) = \left[\frac{(\sum \text{Valeurs} * N_{pi})}{(V_{pe} * N_{tp})} \right] * 100$$

Avec: \sum Valeurs = somme des valeurs de l'échelle de notation des symptômes. N_{pi} = nombre de plants infectés. V_{pe} = valeur la plus élevée de l'échelle de notation de symptômes. N_{tp} = nombre total de plants.

$$RIM (\%) = \left[\frac{(IM_{ti} - IM_{pt})}{(IM_{ti})} \right] * 100$$

Avec IM_{ti} = incidence de la maladie du témoin inoculé et IM_{pt} = incidence de la maladie des plants traités.

S'ajoutent au calcul du RIM la mesure de la longueur de tige, la masse fraîche, le nombre de feuilles et la surface foliaire (LI-3100 AREA METER) des plantules de tomates.

Procédure expérimentale

Ces travaux ont été réalisés en deux temps: un test préliminaire a permis de déterminer le niveau d'infestation par *P. ultimum* sur notre cultivar de tomate (CLN 2777B). Dans un deuxième temps, l'effet antagoniste potentiel de LAB-WT2 a été étudié. Les deux essais ont été effectués en serre avec des consignes de températures comprises entre 18 °C et 22 °C.

Détermination du dosage de *P. ultimum* sur CLN 2777B

Cinq niveaux d'infestation ont été testés: 0, 20, 40, 80 et 160g/l. L'objectif de l'essai était de déterminer le dosage optimal de l'agent infectieux permettant un développement progressif des symptômes sur des plantules de tomates élevées dans nos conditions de culture. Deux semaines après l'infestation, la longueur de la tige, le poids frais, le nombre de feuilles, la surface foliaire et les feuilles jaunies des plants de tomates ont été mesurés. Pour les feuilles jaunies, la proportion de feuilles totalement jaunes, jaunissantes et totalement vertes a été mesurée pour chaque niveau d'infestation.

Effet BCA potentiel de LAB-WT2 et PF-CHA0

Six variantes ont été testées: 1) témoin, 2) témoin + *P. ultimum*, 3) PF-CHA0, 4) PF-CHA0 + *P. ultimum*, 5) LAB-WT2, 6) LAB-WT2 + *P. ultimum*.

Pour chacune des variantes, huit pots contenant chacun cinq plantules de tomates ont été utilisés, soit un total de quarante plantes par variante. Un suivi de l'apparition des symptômes sur les plantules a été réalisé et l'effet antagoniste des deux BCA (LAB-WT2 et PF-CHA0) évalué.

Statistiques

Les résultats ont été analysés par ANOVA et un test de comparaison des moyennes de Tukey à un niveau de signification de 5 % (XLStat 2010).

Résultats et discussion

Niveau d'infestation par *P. ultimum* sur CLN 2777B

Trois semaines après l'infection par *P. ultimum*, les résultats montrent que, dès 20g/l, le développement de la plante est significativement pénalisé. La hauteur des plantules est significativement inférieure de 40 % par rapport au témoin (fig.1A). Le niveau d'infestation maximal, 160g/l, a induit une réduction de 67 % de la hauteur des plantules. La masse fraîche a été réduite de plus de 72 % dès 20g/l d'inoculum et de plus de 90 % avec 80g/l (fig.1B). L'effet de *P. ultimum* sur le nombre moyen de feuilles et la surface foliaire est significatif dès 20g/l, puis l'effet est de nouveau significatif avec la dose maximale de 160g/l (fig. 1C et 1D). Une plantule infestée avec 20g/l possède en moyenne 38 % de feuilles en moins et sa surface foliaire est réduite d'environ 80 %.

L'issue de ce pré-test montre qu'une dose d'infestation de l'ordre de 20g/l suffit pour avoir un effet significatif et visible sur les plantules. C'est donc avec cette dose d'infestation que les expériences suivantes ont été menées.

Effet BCA potentiel de LAB-WT2

L'inoculation des plantules de tomates avec PF-CHA0 a permis une diminution des symptômes de la maladie de 92 % dans un premier essai et de 87 % dans un deuxième (fig. 2). L'inoculation des plantules avec la souche LAB-WT2 a aussi permis une réduction de la maladie. Dans un premier essai, la réduction était de 92 % et de 47 % dans le second (fig. 2).

L'utilisation de PF-CHA0 dans ces essais constitue une référence, puisque son efficacité comme agent de lutte biologique est éprouvée dans de nombreuses publications scientifiques (Werra *et al.* 2009). Nos résultats confirment l'efficacité de cette bactérie. Néanmoins, son utilisation comme bio-fongicide potentiel pose plusieurs problèmes, en particulier son mode d'action pour lutter contre les pathogènes du sol: PF-CHA0 produit des molécules de type antibiotique comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) et la pyolutéorine (PLT) pour limiter le développement des pathogènes (Maurhofer *et al.* 1994). Un effet indirect de PF-CHA0 est la production d'acide gluconique permettant la solubilisation des phosphates inorganiques, qui favorisent la croissance et la santé de la plante. Cette action

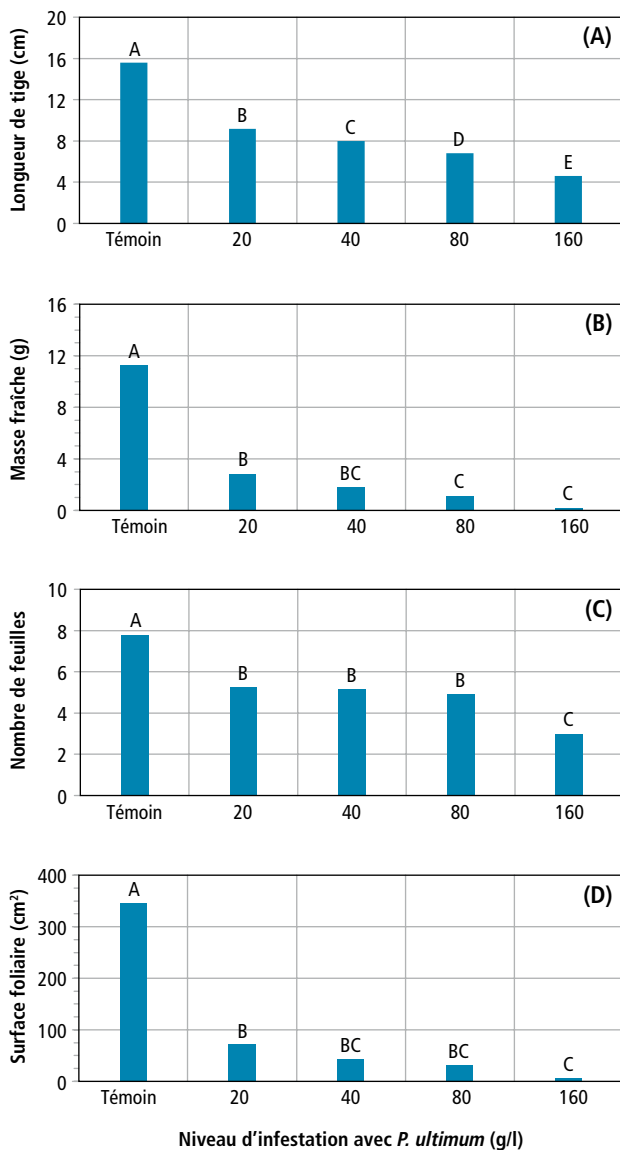


Figure 1 | Mesure de la longueur des tiges (A), de la masse fraîche (B), du nombre de feuilles (C) et de la surface foliaire (D) des plantules de tomates en fonction du niveau d'infection par *P. ultimum*. (ANOVA et test de Tukey, $p \leq 0,05$).

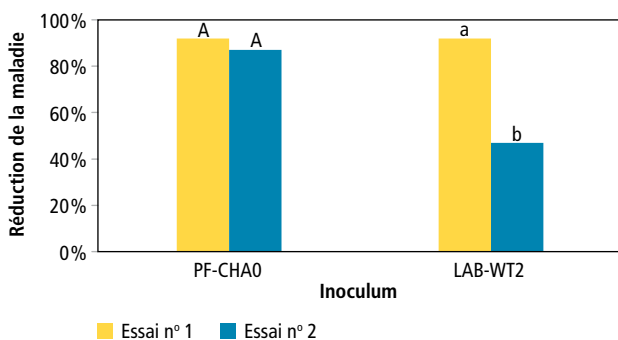


Figure 2 | Réduction de l'incidence de la maladie (RIM) en fonction de l'inoculum: PF-CHA0 ou LAB-WT2. (ANOVA et test de Tukey, $p \leq 0,05$).

indirecte peut être qualifiée de «*plant growth promoting rhizobacteria*» (PGPR). Cependant, la synthèse de molécules antibiotiques est un frein certain à son utilisation comme bio-fongicide. Des études ont aussi mis en évidence que PF-CHA0 pouvait induire une réaction de type ISR (*induced systemic resistance*) chez le tabac et arabidopsis (Maurhofer *et al.* 1994; 1998; Lavicoli *et al.* 2003).

La souche LAB-WT2 est moins efficace que PF-CHA0 mais demeure intéressante (70 %) (fig. 2). En l'état actuel des connaissances, cette bactérie n'utiliserait pas de molécules antibiotiques dans sa lutte contre les pathogènes fongiques. Son mode d'action supposé reposerait essentiellement sur l'acidification du milieu par la synthèse d'acide lactique et éventuellement d'acide propionique. Trias *et al.* (2008) ont montré l'effet antagoniste d'un isolat de lactobacilles issu de fruits et légumes frais (496 LAB) contre divers champignons (*Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Erwinia carotovora*, etc.).

D'autres travaux doivent être menés afin de mieux comprendre le mode d'action de LAB-WT2 dans la lutte contre les pathogènes du sol et de s'assurer de son innocuité vis-à-vis de la microfaune de la rhizosphère.

Enfin, l'efficacité de LAB-WT2 doit également être testée contre des souches de *Pythium* présents dans la production maraîchère suisse, en utilisant notamment des isolats provenant de cultures de concombres et de tomates.

Conclusions

- La bactérie *Pseudomonas fluorescens* PF-CHA0 a permis de réduire les symptômes dus au champignon pathogène *Pythium ultimum* de 89,5 % en moyenne de deux essais, sur des plantules de tomates inoculées. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature.
- Avec le lactobacille LAB-WT2, la réduction des symptômes de la maladie a été de l'ordre de 70 %. L'utilisation de cette bactérie comme agent de lutte biologique est donc prometteuse.
- De nouveaux tests seront menés contre des souches de *Pythium* issues de productions maraîchères suisses, en particulier *P. aphanidermatum*.
- L'efficacité de LAB-WT2 doit être testée sur d'autres végétaux, dont le concombre. ■

Summary

Strain of lactobacilli used as biocontrol agent against *Pythium ultimum* on tomato

The antagonist property of a *Lactobacillus* strain (WT2-LAB) against *P. ultimum* was tested on tomato. The antagonist potential of LAB-WT2 was compared to that of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (PF-CHA0) whose ability to fight against *P. ultimum* is recognized. The results show a reduction of plant disease of 90 % with PF-CHA0 while 70 % of reduction were obtained with LAB-WT2. Other tests will be conducted to evaluate the antagonist potential of LAB-WT2 against others *Pythium* strains present in Swiss agriculture.

Key words: LAB-WT2, PF-CHA0, biocontrol, damping-off.

Zusammenfassung

Lactobacillus-Stamm (LAB-WT2) untersucht auf seine antagonistischen Eigenschaften gegen *Pythium ultimum* auf Tomaten

Die Wirksamkeit des LAB-WT2 wurde mit derjenigen des *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0 (PF-CHA0) verglichen. Dieses Bakterium, welches eine nachgewiesene Wirkung gegen *P. ultimum* hat, reduzierte das Auftreten von Krankheitssymptomen um 90 %. Mit LAB-WT2 wurde eine Reduktion von 70 % erreicht. Weitere Versuche zur Abklärung der Wirksamkeit von LAB-WT2 gegen die im schweizerischen Gemüsebau vorkommenden *Pythium*-Stämme werden durchgeführt werden.

Riassunto

Prova di uno ceppo di lattobacilli come agente di lotta biologica contro *Pythium ultimum* su pomodoro

Un ceppo di *Lactobacillus* (LAB-WT2), estratto da suoli svizzeri, è stato testato per le sue proprietà antagoniste nei confronti di *Pythium ultimum* su pomodoro. La sua efficacia è stata confrontata con quella del battere *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (PF-CHA0) la cui capacità di lottare contro *P. ultimum* è riconosciuta. I risultati mostrano che PF-CHA0 permette di ridurre l'apparizione dei sintomi della malattia del 90 % mentre LAB-WT2 riduce del 70 %. Sono previste altre prove per verificare l'efficacia antagonista di LAB-WT2 su ceppi di *Pythium* presenti nei suoli orticoli svizzeri.

Bibliographie

- Bloemberg G. V. & Lugtenberg B. J. J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 343–350.
- Dhingra O. D. & Sinclair J. B., 1995. Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton, FL, USA, *CRS Press* **2**, 31–37.
- Haas D. & Défago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 307–319.
- Haas D., Blumer C. & Keel C., 2000. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 290–297.
- Lafontaine P., Richard G. & Martinez S., 2007. Projet n° PSIH06-2-608: Evaluation du Ranman 4005C (cyazofamide) pour le contrôle de *Pythium* sp., dans la culture de transplants de concombre. Bibliothèque et archives nationales du Québec. <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs1764154> [septembre 2012].
- Lévesque A., Brouwer H., Cano L., Hamilton J. P., Holt C., Huitema E., Raffaele S., Robideau G. P., Thines M., Win J., Zerillo M. M., Beakes G. W., Boore J. L., Busam D., Dumas B., Ferreira S., Fuerstenberg S. I., Gachon C. M. M., Gaulin E., Govers F., Grenville-Briggs L., Horner N., Hostetler J., Jiang R. H. Y., Johnson J., Krajaeun T., Lin H., Meijer H. J. G., Moore B., Morris P., Phuntmart V., Pui D., Shetty J., Stajich J. E., Tripathy S., Wawra S., West P. V., Whitty B. R., Coutinho P. M., Henrissat B., Martin F., Thomas P. D., Tyler B. M., De Vries R. P., Kamoun S., Yandell M., Tisserat N. & Buell C. R., 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Gen. Biol.* **11**:R73. <http://genomebiology.com/2010/11/7/R73>
- Lutz M. P., Michel V. & Camps C., 2011. A novel strain of a lactic acid bacterium as GPR and biocontrol agent in tomato. 6th IOBC Working Group Meeting on Multitrophic Interactions in Soil, 2011.
- Lavicoli A., Boutet E., Buchala A. & Mettraux J. P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 851–858.
- Madelin C., Camps C., Michel V. & Lutz M., 2009. Effet d'un nouvel agent bactérien sur le développement de plantules de tomates et leur sensibilité à *Pythium*. Journées d'automne de la SSP. 4 sept. 2009, Genève.
- Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Métraux J. P. & Défago G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to Tobacco Necrosis Virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 – influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84** (2), 139–146.
- Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D. & Défago G., 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **88** (7), 678–684.
- Song W. T., Zhou L. G., Yang C. Z., Cao X. D., Zhang L. Q. & Liu X. L., 2004. Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection* **23** (3), 243–247.
- Trias R., Baneras L., Montesinos E. & Badosa E., 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int. Microbiol.* **11**, 231–236.
- Welbaum G., Sturz A. V., Dong Z. & Nowak J., 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 175–193.
- Werra P., Péchy-Tarr M., Keel C. & Maurhofer M., 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Env. Microb.* **75** (12), 4162–4174.