

**La fusariose vasculaire du palmier dattier (bayoud)  
II- Action inhibitrice des filtrats de culture de six  
microorganismes antagonistes isolés des  
sols de la palmeraie de Marrakech  
sur le développement *in vitro* de  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis***

My H. Sedra et My A. Maslouhy

Centre régional de la recherche agronomique, Laboratoire de phytopathologie,  
BP 533, Marrakech, Maroc

**Résumé**

Cette étude a évalué l'effet de filtrats de culture de neuf microorganismes sur la germination des spores et la croissance mycélienne *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Six des microorganismes utilisés sont des antagonistes isolés de sols résistants de la palmeraie de Marrakech : 4 isolats de *Pseudomonas* fluorescents, un champignon *Stachybotrys* sp. et un actinomycète non identifié. Les trois autres microorganismes sont des non antagonistes isolés de sols situés dans des foyers de maladie dans la vallée du Drâa. Les filtrats des trois microorganismes non antagonistes n'ont pas eu d'effet significatif sur la germination des spores ou sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. En présence des filtrats des six microorganismes antagonistes, le taux d'inhibition a varié selon les antagonistes de 26,6 % à 69 % pour la germination des spores et de 43,6 % à 80,7 %, pour la croissance mycélienne du parasite. L'intensité de l'action inhibitrice de ces filtrats pourrait être liée au pouvoir antagoniste des microorganismes et à la nature chimique des substances antibiotiques sécrétées.

**Mots-clés :** *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, antibiose, *Pseudomonas* fluorescents, *Stachybotrys* sp., actinomycète, résistance des sols aux maladies

**Abstract**

***Fusarium* wilt of date palm (bayoud). II- *In vitro* inhibitory activity of filtrates of six antagonistic microorganisms isolated from Marrakech date palm grove soils towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.**

This study evaluated the effect of filtrates from nine microorganisms on the *in vitro* germination and mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Six of the used microorganisms were antagonists isolated from Marrakech date palm grove soils : 4 isolates of *Pseudomonas* fluorescents, a fungus *Stachybotrys* sp. and an unidentified actinomycet. The other three microorganisms were non antagonistic, isolated from soils in the Drâa valley, area where the disease is common. The filtrates of the three non antagonistic

microorganisms had no significant effect on spore germination or mycelial growth. In the presence of filtrates from the six antagonistic microorganisms, inhibition rate varied with the antagonists from 26.6 % to 69 % for spore germination and from 43.6 % to 80.7 % for mycelial growth of the pathogen. The inhibitory action of these filtrates could be related to the antagonistic capacity of the microorganisms and to the chemical nature of antibiotic substances they produce.

**Key words :** *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, antibiosis, *Pseudomonas* fluorescents, *Stachybotris* sp., actinomycet, soil disease resistance

## ملخص

الغزال الوعائي لنخيل التمر (مرض البيوض). II. فعالية إفرازات ستة متعضيات دقيقة مضادة معزولة من تربة واحة مراكش على نمو الفطر المسبب لمرض البيوض

م.ح. سدرة و م.ع. المصلوحي

المركز الجهوي للبحث الزراعي، مختبر أمراض النبات، ص.ب. 533، مراكش، المغرب

أقيمت هذه الدراسة فعالية إفرازات تسعة متعضيات دقيقة على إنبات ونمو فطر الغزال الوعائي لنخيل التمر *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* في وسط مغد عقيم. ستة من هذه المتعضيات مضادة معزولة من تربة واحة مراكش المقاومة لمرض البيوض : 4 بكتيريا ايسودوموناس الفلورة، فطر واحد استكيبوتريس وأكتينوميست واحد. المتعضيات الدقيقة الثلاثة الأخرى هي غير مضادة وعزلت من تربة واحة درعة حيث ينتشر مرض البيوض. لم يكن لإفرازات المتعضيات الثلاثة غير المضادة أي تأثير لا على إنبات أو نمو الفطر المسبب لمرض البيوض. أما إفرازات المتعضيات الدقيقة المضادة الستة، فقد قلصت من إنبات الفطر بنسبة 26,6 إلى 69 % ومن نمو الفطر بنسبة 43,6 إلى 80,7 % بالمقارنة مع المتعضيات الدقيقة غير المضادة. قوة إفرازات المتعضيات الدقيقة المضادة على تقليص إنبات ونمو الفطر قد يرجع إلى قدرتها على تضاد الفطر وإلى تركيبها الكيماوي.

**الكلمات المفتاحية :** فطر الغزال الوعائي لنخيل التمر، تضاد حيوي، بكتيريا ايسودوموناس فلورية، استكيبوتريس، أكتينوميست، مقاومة

## Introduction

Le bayoud est une fusariose vasculaire du palmier dattier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. C'est la maladie la plus grave du palmier dattier au Maroc où des dégâts considérables ont été enregistrés (Pereau-Leroy 1958; Djerbi 1988).

Cependant, si la majorité des palmeraies marocaines sont atteintes par le bayoud, certaines en sont indemnes. C'est le cas notamment de la palmeraie de Marrakech (Sedra 1985). L'absence du bayoud dans la palmeraie de Marrakech peut être due à des phénomènes de résistance des sols aux fusarioses vasculaires. Ces phénomènes ont été décrits dans plusieurs pays (Stotzky et Martin 1963; Smith et Snyder 1971; Louvet *et al.* 1976; Sher et Baker 1982; Schneider 1984; Tamietti et Alabouvette 1986; Simeoni *et al.* 1987). Plusieurs auteurs ont montré l'importance de l'activité antibiotique des bactéries dans la limitation de la gravité des maladies d'origine tellurique (Howell et Stipanovic 1979; 1980; Papavizas et Lumsden 1980. Sneh *et al.* 1984; Weller et Cook 1986).

Les sols de la palmeraie de Marrakech se caractérisent par l'abondance de la flore bactérienne et actinomycétale. Sedra et Rouxel (1989) ont démontré que le niveau de réceptivité d'un sol de la palmeraie de Marrakech à la fusariose du lin est tout à fait comparable à celui de sols connus comme résistants aux fusarioses vasculaires (Sedra et Rouxel 1989; Sedra 1990; 1993; Sedra *et al.* 1994).

La recherche de microorganismes antagonistes dans les sols résistants de palmeraie a permis d'isoler six antagonistes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Sedra et Maslouhy 1994). La présente étude vise l'appréciation de l'action antibiotique *in vitro* de filtrats de culture de ces six microorganismes antagonistes sur la germination des spores et la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

## Matériel et Méthodes

### Isolement et purification des microorganismes

Six microorganismes antagonistes ont été isolés au niveau de la rhizosphère des palmiers, dans trois sols de la palmeraie de Marrakech indemnes de bayoud. Ces microorganismes sont composés de 4 isolats de bactéries antagonistes appartenant au groupe *Pseudomonas* fluorescents, d'un champignon *Stachybotrys* sp. et un actinomycète non identifié. Trois microorganismes non antagonistes utilisés comme témoins ont été isolés à partir de 3 sols situés dans des foyers de maladie dans la vallée du Drâa. Ces microorganismes non antagonistes n'ont pu être identifiés (tableau 1).

**Tableau 1.** Microorganismes antagonistes ou non au *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* étudiés

Souches antagonistes	Souches non antagonistes
<i>Pseudomonas</i> fluorescents :	Bactérie BNA
M-B1, M-B2, M-B3 et M-B4	Champignon CNA
<i>Stachybotrys</i> sp. : M-C1	Actinomycètes ANA
Actinomycète : M-A1	

## Appréciation *in vitro* de l'activité des filtrats de culture

### Préparation des filtrats de culture

Les différents microorganismes ont été cultivés séparément sur un milieu liquide à base d'extrait de pomme de terre (250 g/l) et de glucose (20 g/l). Les cultures sont agitées (75 tr/mn) pendant une semaine à 22-27 °C et ensuite filtrées sous vide sur papier millipore stérile ( $\text{\O} = 0,2 \mu\text{m}$ ). Le filtrat récupéré est conservé à froid à 4 °C dans des folioles fermées hermétiquement.

### Action des filtrats de culture sur la germination des spores du parasite

Quatre ml de chaque filtrat sont incorporés dans 12 ml de milieu gélosé à base d'extrait de pomme de terre et de glucose (PDA). Chaque boîte de Petri estensemencée par étalement d'un ml d'eau stérile contenant en moyenne 50 spores (essentiellement des microconidies) du parasite. Les boîtes témoins reçoivent soit des filtrats de microorganismes non antagonistes, soit de l'eau distillée stérile. Les 10 boîtes utilisées par microorganisme sont incubées à 25 °C à l'étuve pendant 24h; puis elles sont mises pendant 3 jours sous éclairage fluorescent continu. Les notations sont effectuées par comptage des spores germées et développées en supposant que chaque spore donne naissance à une colonie.

### Action du filtrat sur la croissance mycélienne du parasite

L'incorporation du filtrat est réalisée comme décrit précédemment. Dix pastilles ( $\text{\O} = 4 \text{ mm}$ ) prélevées à la périphérie d'une culture du parasite âgée de 5 jours sont placées individuellement dans des boîtes de Petri contenant le filtrat. Les cultures sont incubées à 25 °C. La croissance mycélienne du parasite est évaluée par la mesure du diamètre moyen des colonies, tous les 2 jours pendant 8 jours.

Un pourcentage moyen d'inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne du parasite a été calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{valeur (t)} - \text{valeur (m)}}{\text{Valeur (t)}} \times 100$$

t = culture témoin de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sans filtrat  
m = microorganisme antagoniste ou non

Pour les quatre bactéries *Pseudomonas*, une sécrétion de pigments fluorescents a été réalisée sur le milieu King.

## Résultats

L'incorporation du filtrat des antagonistes dans le milieu de culture provoque une inhibition significative de la germination des spores du parasite par rapport aux témoins (tableau 2). Le pourcentage moyen d'inhibition a varié de 69 % (M-B1) à (26,6 %) (M-A1). Le pourcentage moyen de germination dans le cas du témoin culture sans filtrat a été de 98,6 %.

Une réduction de la croissance mycélienne du parasite sous l'effet des filtrats des antagonistes a été aussi observée (tableau 2). Au 8e jour de culture, le pourcentage moyen d'inhibition a varié de 80,7 % (M-B1) à 43,6 % (M-A1).

Le diamètre moyen de la colonie du parasite a varié de 14 mm (M-B1) à 41 mm (M-A1) contre 72 mm à 72,8 mm pour les témoins.

La sécrétion de pigments fluorescents sur le milieu King a permis de répartir nos 4 bactéries en 2 groupes : un premier groupe (M-B2 et M-B3) sécrétant une pigmentation intense et un second groupe (M-B1 et M-B4) produisant peu de pigmentation.

**Tableau 2.** Pourcentage moyen d'inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* en présence des filtrats de culture de six microorganismes antagonistes et de trois microorganismes non antagonistes

Souches	Germination	Croissance mycélienne
<b>Antagonistes :</b>		
- Pseudomonas fluorescents		
M-B1	69,0	80,7
M-B2	43,2	75,2
M-B3	59,2	77,6
M-B4	29,0	55,5
- Stachybotrys sp. M-C1	47,6	62,2
- Actinomycète M-A1	26,6	43,6
<b>Non antagonistes :</b>		
Bactérie (BNA)	1,1	3,3
Champignon (CNA)	3,2	3,3
Actinomycète (ANA)	5,4	0,0

## Discussion

Dans cette étude, les filtrats de culture des microorganismes antagonistes ont eu une action inhibitrice sur la germination des spores et sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des travaux précédents au Maroc (Maslouhy 1989; Sedra 1993) et dans d'autres pays (Howell et Stipanovic 1979; Sher et Baker 1982; Digat 1983; Olivier et Guillaumes 1983; Lemanceau *et al.* 1988; Loper *et al.* 1988; Park *et al.* 1988). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle ces antagonistes sécrètent des substances antibiotiques. Ces dernières agissent sur le parasite par une lyse du mycélium et des phialides; ceci est à l'origine du phénomène d'aplatissement des colonies observé face aux antagonistes (Sedra et Maslouhy 1994). Elles ont, en outre, un effet fongistatique vis-à-vis de certaines formes spéciales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Sedra et Besri 1990; Sedra et Bah 1993).

L'action inhibitrice sur la germination des spores et sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* a varié selon les antagonistes. Ces différences d'intensité du pouvoir inhibiteur des antagonistes pourraient être liées à la nature et la quantité des substances antibiotiques sécrétées. Mishagi *et*

al. (1982) ont établi une corrélation entre la quantité de pigments fluorescents et le pouvoir antagoniste des *Pseudomonas*. Plusieurs types de pigments fluorescents sont mentionnés dans la littérature : la pyoverdine (Turfreiher 1942), la fluorescine (King *et al.* 1948), la pseudobactine (Kloepper *et al.* 1980). Howell et Stipanovic (1979; 1980) ont montré qu'une même souche de *Pseudomonas* peut produire deux antibiotiques : la pyoluterocine et la pyrrolnitrine. Lindberg (1981) a aussi isolé la troplone. La plupart de ces substances sont des antibiotiques léthaux pour les champignons pathogènes. Dans notre étude, l'action inhibitrice était corrélée à l'intensité de pigmentation. Nos résultats vont dans le sens de ceux de Digat (1983) établissant un lien entre faible fluorescence et forte activité antagoniste.

Il reste à identifier nos souches bactériennes et actinomycétales et déterminer leur degré de parenté systématique, ainsi qu'à identifier la nature chimique des substances antibiotiques mises en jeu dans le phénomène d'antibiose vis-à-vis du parasite. La mise en évidence et l'identification de tels composés *in vitro* sont relativement simples, mais est par contre compliquée *in situ* en raison de leur faible concentration (Dommergues et Mangenot 1970; Mangenot et Diem 1979).

## Remerciements

Nous remercions Dr. Djerbi M. (Ex-Coordinateur du Projet PNUD/FAO Rab/88/024) pour ses conseils précieux, Dr. Rouxel F. (INRA Le Rheu, France) et Pr. Besri (IAV Hassan II, Maroc) pour leurs suggestions enrichissantes.

## Références bibliographiques

- Digat B. (1983). Modes d'action et effets des rhizobactéries promotrices de la croissance et du développement des plantes. In « Les antagonismes microbiens. Modes d'action et applications à la lutte biologique contre les maladies des plantes ». 24e Coll. Soc. Fr. Phytopathol. Bordeaux, 26-28 mai 1983. 360 pages.
- Djerbi M. (1988). Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le bayoud. FAO projet Rab/84/018. Alger. 127 pages.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie, Editeurs. 796 pages.
- Howell C.R. et Stipanovic R.D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the *Bacterium*. *Phytopathology* **69** : 480-482.
- Howell C.R. et Stipanovic R.D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluteorin. *Phytopathology* **70** : 712-715.
- King C.R., Campbell J.R. et Eagles B.A. (1948). Mineral requirement for fluorescein production by *Pseudomonas*. *Can. J. Res.* **26** : 514-519.
- Kloepper J.W., Leong J., Tetntze M. et Schroth M.N. (1980). *Pseudomonas siderophore* : a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* **4** : 327-330.

Lemanceau P., Alabouvette C. et Couteaudier Y. (1988). Recherche sur la résistance des sols aux maladies. XIV- Modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou du glucose. *Agronomie* **8** : 155-162.

Lindberg G.D. (1981). An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease* **65** : 680-683.

Loper J.E. (1988). Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* **78** : 166-172.

Louvier J., Rouxel F. et Alabouvette C. (1976). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. I- Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phytopathol.* **8** : 425-436.

Mangenot F. et Diem H.G. (1979). Fundamentals of biological control. In "Ecology of rot pathogens". Krupa, S.V. et Dommergues Y.R., Editeurs. p. 207-265.

Mishagi I.J., Stowell L.J., Grogan R.G. et Spearman L.C. (1982). Fungistatic activity of water soluble fluorescent pigment of fluorescent *Pseudomonas*. *Phytopathology* **72** : 33-36.

Olivier J.M. et Guillaumes J. (1983). Propriétés antagonistes de *Pseudomonas fluorescens*. 315-326. In « Les antagonistes microbiens ». Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. Bordeaux, Mai 1983, colloque de l'INRA, 1983, 360 pp.

Papavizas B.C. et Lumsden R.D. (1980). Biological control of soil-borne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18** : 389-413.

Park C.S., Paulitz R.C. et Baker R. (1988). Biocontrol of *Fusarium*-wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **78** : 190-194.

Pereau-Leroy P. (1958). Le palmier dattier au Maroc. Ministère de l'agriculture. Institut. Franc. Rech. Outre-mer, Paris. 142 pages.

Scher F.M. et 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.

Schneider R.W. (1984). Effects of non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the linweaver-burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* **74** : 646-653.

Sedra My H. (1985). Potentiel infectieux et réceptivité de quelques sols de palmeraie à la fusariose vasculaire du palmier dattier (bayoud) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Kill. et Maire). Malençon. Thèse 3e cycle agronomie (IAV H II, Rabat, Maroc).

Sedra My H. (1990). Receptivity of some Moroccan palm grove soils to *Fusarium* wilts. 8th Congress of the Mediterr. Phytopathol. Union. 28 October - 3 November 1990. Agadir, Morocco. p 521.

Sedra My H. (1993). Lutte contre le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Sélection des cultivars et clones de qualité, résistants et réceptivité des sols de palmeraies à la maladie. Thèse de Doctorat es-sciences. Faculté des sciences, Université Cadi Ayad, Marrakech. 142p.

Sedra My H. et Rouxel F. (1989). Résistance des sols aux maladies. Mise en évidence de la résistance d'un sol de la palmeraie de Marrakech aux fusarioses vasculaires. *Al Awamia* **66** : 35-54.

Sedra My H. et Besri M. (1990). Behaviour of some pathogen *Fusarium oxysporum* and study of the dynamic and the saprophytic colonization of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* in different soils of moroccan palm grove. 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. 28 October - 3 November 1990. Agadir, Morocco. p 523.

Sedra My H. et Bah N., (1993). Développement saprophytique du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* dans différents sols de palmeraies et activité antagoniste de quelques microorganismes sur son comportement. *Al Awamia* **82** : 53-70.

Sedra My H. et Maslouhy My A. (1994). Fusariose vasculaire du palmier dattier. I. Isolement des microorganismes antagonistes envers du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolés à partir des sols résistants de la palmeraie de Marrakech. *Al Awamia* **86** : 3-20.

Sedra My H., Besri M. et Rouxel F. (1994). Caractérisation des niveaux de réceptivité des sols de palmeraie marocaine aux fusarioses vasculaires, en particulier le bayoud. *Phytopath. medit.* **33** : 27-35.

Siomeoni L.A., Lindsay W.L. et Baker R. (1987). Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. *Phytopathology* **77** : 1057-1061.

Smith N. et Snyder W.C. (1971). Relationship of inoculum density and soil types to severity of *Fusarium* wilt of sweet potato. *Phytopathology* **61** : 1049-1051.

Sneh B., Dupler M., Elard Y. et Baker R. (1984). Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soil. *Phytopathology* **74** : 1115-1124.

Stotzky G. et Martin R.T. (1963). Soil mineralogy in relation to the spread of *Fusarium* wilt of banana in Central America. *Plant soil* **18** : 317-338.

Tamietty G. et Alabouvette C. (1986). Résistance des sols aux maladies. XIII-Rôle des *Fusarium oxysporum* non pathogènes dans les mécanismes de résistance d'un sol de Noirmoutier aux fusarioses vasculaires. *Agronomie* **6** : 541-548.

Turfreijer A. (1942). Pyverdinen de grene fluorescende kelurstoffen van *Pseudomonas fluorescens*. *British abstract* **16** : 16578.

Weller D.M. et Cook R.J. (1986). Suppression of root diseases of wheat by fluorescent *Pseudomonas* and mechanisms of action, 99-107. In « Iron, siderophores, and plant disease ». Vol. **117**. 351 p. T.R. Swinburne, Ed. (Nato Asiseries A).