

**AFPP – QUATRIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES EN PROTECTION DES CULTURES
LILLE – 8, 9 ET 10 MARS 2011**

**INFLUENCE DE L'AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE, *PYTHIUM OLIGANDRUM*, SUR LES
COMMUNAUTES MICROBIENNES COLONISANT UN SYSTEME DE CULTURE HORS-
SOL**

J VALLANCE^{1,2}, F DENIEL¹, G BARBIER¹ ET P REY²

¹Université Européenne de Bretagne / Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, 29280 Plouzané, France.

² UMR Santé Végétale 1065, INRA, ENITA de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, 33175 Gradignan, France.

Email : prey@bordeaux.inra.fr / Tél : 05 57 12 26 36

RÉSUMÉ

Après inoculation de l'agent de lutte biologique *Pythium oligandrum* dans la rhizosphère de plants de tomate cultivés en système hors-sol, son influence sur les communautés fongiques colonisant les solutions circulantes et les racines a été étudiée. Les résultats obtenus par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que les communautés colonisant ces deux niches écologiques étaient différentes et spécifiques à chacune d'elle. Des changements structurels importants ont été observés au cours de la saison culturale. Des archéobactéries ont également été détectées dans les effluents durant toute la saison culturale mais uniquement durant les mois d'automne (septembre et octobre) au niveau des racines. Ces évolutions temporelles sont intervenues indépendamment de l'inoculation et de la persistance de l'agent antagoniste *P. oligandrum*.

Mots-clés : agent antagoniste, populations microbiennes, rhizosphère, solutions circulantes, Single Strand Conformation Polymorphism

SUMMARY

The genetic structure and the dynamics of the fungal communities colonizing the root system and the various circulating solutions of a tomato hydroponic culture were investigated with regard to the inoculation of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* in the rhizosphere. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analyses revealed that the bacterial communities differed depending on the ecological niche and that their genetic structure evolved throughout the cropping season. Archaeobacteria were also detected in the effluents during the whole cultural season whereas they were only present during the autumn months (September and October) in the rhizosphere. These temporal evolutions took place independently from the inoculation and persistence of the antagonist agent *P. oligandrum*.

Key words: antagonist agent, microbial populations, recirculating solutions, rhizosphere, Single Strand Conformation Polymorphism

INTRODUCTION

Les études sur les microflores des systèmes hors-sol ont montré que les substrats, les solutions et les racines des plants cultivés étaient rapidement colonisés dès le début de la culture par des communautés microbiennes bien spécifiques. Ainsi Koohakan et ses collaborateurs (2004) ont démontré que dans quatre systèmes culturaux différents employant des substrats organiques et inorganiques ainsi que les techniques DFT (Deep Flow Technique) et NFT (Nutrient Film Technique), les racines étaient colonisées par un plus grand nombre de champignons et de bactéries que les effluents de serre. Les populations fongiques les plus importantes (dont *Fusarium* spp.) étaient détectées sur les racines des plants cultivés sur de la fibre de coco (substrat organique) tandis que la laine de roche (substrat inorganique) contenait les populations les plus faibles. Les *Pythium* spp. étaient les plus nombreux dans les solutions circulantes ainsi que sur les racines immergées en système NFT. Khalil et Alsanius (2001) ont aussi rapporté qu'en culture hors-sol de tomate, les populations bactériennes et les *Pseudomonas* fluorescents colonisaient préférentiellement les substrats de laine de roche plutôt que la tourbe alors qu'à l'inverse, les populations fongiques, d'actinomycètes et de *Trichoderma* spp. étaient plus denses dans les pains de tourbe comparés à ceux en laine de roche.

La plupart de ces études ont été réalisées à l'aide de méthodes nécessitant une étape de culture des micro-organismes sur des milieux spécifiques. Ces dernières années, des techniques basées sur l'utilisation de sources carbonées, l'analyse de profils d'acides gras phospholipidiques (PhosphoLipid Fatty Acid, PLFA) (Khalil et Alsanius, 2001), le profilage moléculaire (Postma et al., 2000), ont cependant permis d'élargir le champ des connaissances relatif à la diversité et la dynamique microbienne des systèmes hors-sol.

Peu d'études ont cependant porté sur la diversité et la dynamique des micro-organismes colonisant les différentes niches écologiques d'un système de culture hors-sol ainsi que sur leur comportement en présence d'un agent de lutte biologique avéré tel que *Pythium oligandrum*. Celui-ci est en effet capable de réduire les maladies d'origine tellurique causées par des pathogènes fongiques en activant les mécanismes de défense des plantes ou par antagonisme direct via le mycoparasitisme, la compétition nutritive et/ou la production d'antibiotiques (Le Floch et al., 2003, 2005; Rey et al., 2008; Vallance et al., 2009). Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a donc été de décrire et de comparer la structure génétique ainsi que la dynamique des populations fongiques et archéennes rhizosphériques et des solutions circulantes dans un système hors-sol ayant été inoculé avec *P. oligandrum*. A notre connaissance, il s'agit de la première étude prenant en compte ces communautés microbiennes dans toutes les composantes d'un système hydroponique (les racines et les différentes solutions nutritives). La densité des populations fongiques et archéennes a été estimée par PCR quantitative durant toute la saison culturale (d'avril à septembre). La structure et la dynamique de ces populations fongiques ont ensuite été analysées par SSCP durant la même période. La microflore véhiculée par ces différents types d'effluents a été comparée à celle colonisant les racines. Le but était d'acquérir des informations afin d'évaluer quelle influence ces microflores pouvait avoir l'une sur l'autre, et en particulier, si le recyclage avait favorisé l'installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère ou non.

MATERIEL ET MÉTHODE

CONDUITE EXPERIMENTALE

L'expérimentation a été réalisée dans deux compartiments indépendants d'une serre hors-sol mis à disposition par la station expérimentale du CATE (St Pol de Léon, France). Les plants de tomate utilisés provenaient de graines var. Durinta (Western Seed) ensemencées dans de la laine de roche avant que les jeunes plants ne soient transférés (le 27 janvier 2006) dans des pains de résidus de fibres de coco (Monagri), à raison de quatre plants par

pain (densité finale de 2.8 plants.m⁻²). Dans chacun des deux compartiments, deux rangées ont servi de témoin et deux autres, ont été inoculées avec un mélange de trois souches de *Pythium oligandrum* (Vallance *et al.*, 2009). Le recyclage des solutions nutritives dans les deux compartiments a été assuré par deux systèmes de biofiltration statiques identiques mais séparés pour chacune des deux modalités (témoin et inoculée).

ECHANTILLONNAGE ET EXTRACTIONS D'ADN

Les échantillons de racines et de solutions ont été collectés tous les 15 jours à partir du mois d'avril jusqu'au mois de septembre 2006. Les extractions d'ADN racinaire ont été réalisées à partir de 200mg de matière fraîche à l'aide du Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals) selon les instructions du fabricant. Pour chaque échantillons liquides : la solution nutritive (SN) alimentant les racines, les eaux drainées des racines (ED), les eaux recyclées (EF, en sortie du biofiltre) et l'eau d'apport (EC) servant à mélanger les engrais et l'eau biofiltrée avant redistribution aux racines, 200ml ont été filtrés sur des membranes d'acétate de cellulose (0.2 µm, Sartorius) avant extraction à l'aide du Fast DNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals) selon les instructions du fabricant.

PCR QUANTITATIVE

Les réactions de PCR quantitative ont été effectuées dans un thermocycleur MiniOpticon 2 (Bio-Rad, France) et les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Opticon Monitor version 3.1.32 (Bio-Rad, France). Le Tableau I décrit les amorces et sondes utilisés pour les différents systèmes d'amplification. Les différentes concentrations d'ADN obtenues dans les échantillons racinaires ont été normalisées par rapport à la quantité d'ADN de tomate détectée dans chaque échantillon. Les quantités d'ADN obtenues dans les échantillons de solutions ont été quant à elles normalisées par rapport à la quantité d'ADN total contenu dans ces différents échantillons.

Tableau I : Amorces et sondes utilisées dans cette étude pour la PCR quantitative
Primers and probes used for the qPCR

Gène cible	Nom	Sequence 5' 3'	Amplicon (bp)
Tomate LAT52	up_Lat1	AGACCACGAGAACGATATTTGC	92
	lo_Lat2	TTCTTGCCTTTTTCATATCCAGACA	
	Lp	FAM - CTCTTTGCAGTCCTCCCTTGGGCT - BHQ1	
<i>P. oligandrum</i> ITS	up_F1	TGCTTCGTCGCAAGACT	124
	lo_146	CGTATTCGGAGTATAGTTCAGT	
	142_LNA*	FAM - <u>AGTCTGCGTCTA</u>TTT<u>GGA</u> - BHQ1	
Archées totales	Arch349F	GYGCASCAGKCGMGAAW	476
	Arch806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	
	Arch516F	FAM - TGYCAGCCGCCGCGGTA AAHACCVGC - TAMRA	

* Les bases soulignées correspondent à des nucléotides LNA (Locked Nucleic Acid) : un pont méthylène relie le 2'-O et le 4'-C du ribose. Ce pont réduit la flexibilité conformationnelle du sucre renforçant ainsi la stabilité de la liaison entre la sonde et sa séquence cible.

ANALYSE DES COMMUNAUTES FONGIQUES PAR SSCP

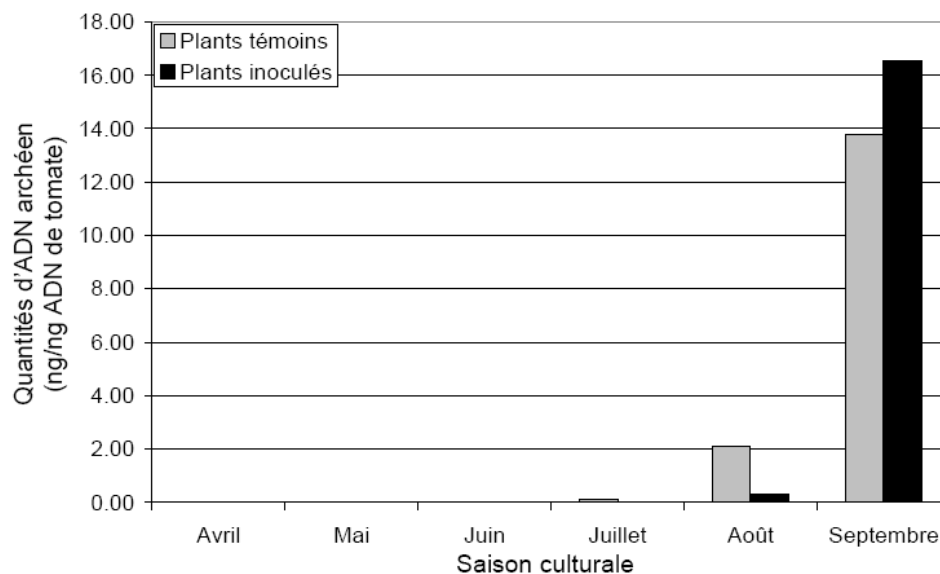
Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur PTC-200 (MJ-Research) dans un volume réactionnel de 25 µl à l'aide des amorces ITS1/ITS2 (White *et al.*, 1990). L'électrophorèse des produits d'amplification a été réalisée avec un séquenceur automatique ABI PRISM 310 (Applied Biosystem). Les conditions suivantes de migration ont été appliquées : 12kV et 32°C pendant 45 minutes. Les profils SSCP ainsi obtenus ont ensuite été alignés avec StatFingerprints avant d'être comparés par analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel StatBox (version 6.6 Pro, Grimmsoft).

RESULTATS

QUANTIFICATION DE L'ADN ARCHEEN RACINAIRE

La présence d'archées sur les racines des plants de tomate n'est détectée qu'à partir du mois de juillet mais en quantités très faibles et seulement dans la condition témoin. Les quantités sont assez faibles en juillet et août, avant d'augmenter de façon significative au mois de septembre (Figure 1).

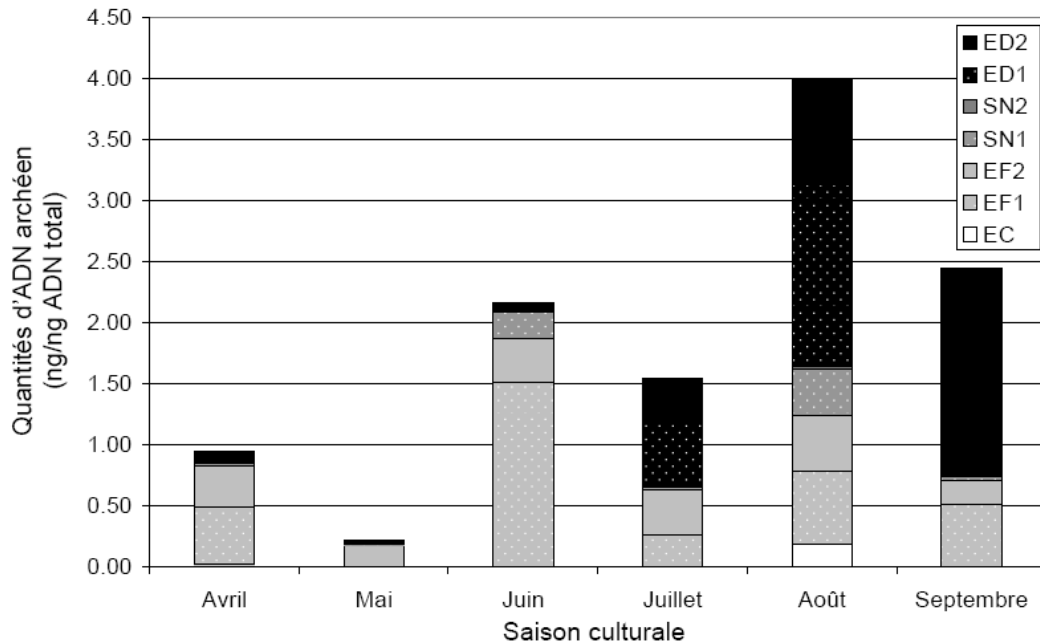
Figure 1 : Colonisation archéenne racinaire
Archaeal rhizospheric colonization



QUANTIFICATION DE L'ADN ARCHEEN DES SOLUTIONS CIRCULANTES

Les archées sont détectées dès le début de la culture dans les solutions circulantes et ce, essentiellement dans les eaux de filtration (en sortie des biofiltres après recyclage) (Figures 1 et 2). Les quantités détectées au cours de la culture sont très variables d'un mois à un autre ainsi qu'entre le circuit témoin (circuit 1) et le circuit inoculé (circuit 2).

Figure 2 : Colonisation archéenne des solutions circulantes
Archaeal rhizospheric of the circulating solutions



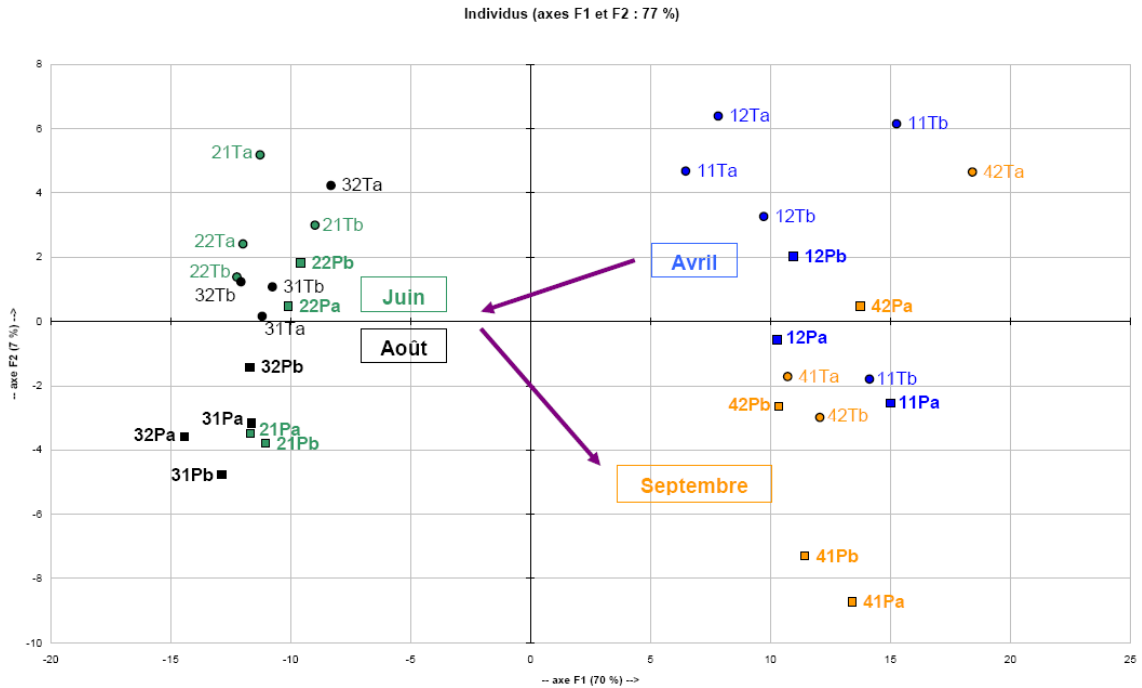
ANALYSES DES POPULATIONS FONGIQUES PAR SSCP

Analyses des populations fongiques de la rhizosphère

Sur le plan principal de la figure 3, l'axe F1 (70% de la variabilité totale) permet de mettre en évidence une évolution temporelle dans la structure génétique des populations fongiques. En effet, les individus sont distribués selon l'axe F1 en fonction de leur date de prélèvement : les échantillons prélevés aux mois d'avril et de septembre sont distribués sur les abscisses positives tandis que ceux prélevés aux mois de juin et d'août sont corrélés négativement. La distribution des individus sur le plan tend à montrer une séparation selon l'axe F2 (7% de la variabilité totale) des échantillons témoins de ceux inoculés avec *P. oligandrum*. Les échantillons témoins ont tendance à être corrélés positivement sur F2 tandis que les échantillons inoculés sont distribués sur les ordonnées négatives. Il n'y a en revanche aucune différence entre les échantillons des deux compartiments où ont été réalisées les expérimentations.

Figure 3 : ACP des populations fongiques de la rhizosphère en fonction de la région ITS1
PCA analysis of the rhizospheric fungal populations based on the ITS1 region

Chaque échantillon est codifié de la manière suivante : le premier chiffre correspond à la date de prélèvement (1 : 11/04/06 ; 2 : 06/06/06 ; 3 : 02/08/06 et 4 : 26/09/06) ; le deuxième chiffre, à la serre (serre 1 ou serre 2) ; la première lettre, au type d'échantillons (T=témoin et P=*P. oligandrum*) ; et la dernière lettre (a ou b), à la répétition. Les points représentent les échantillons témoins et les carrés, les échantillons inoculés (en gras).

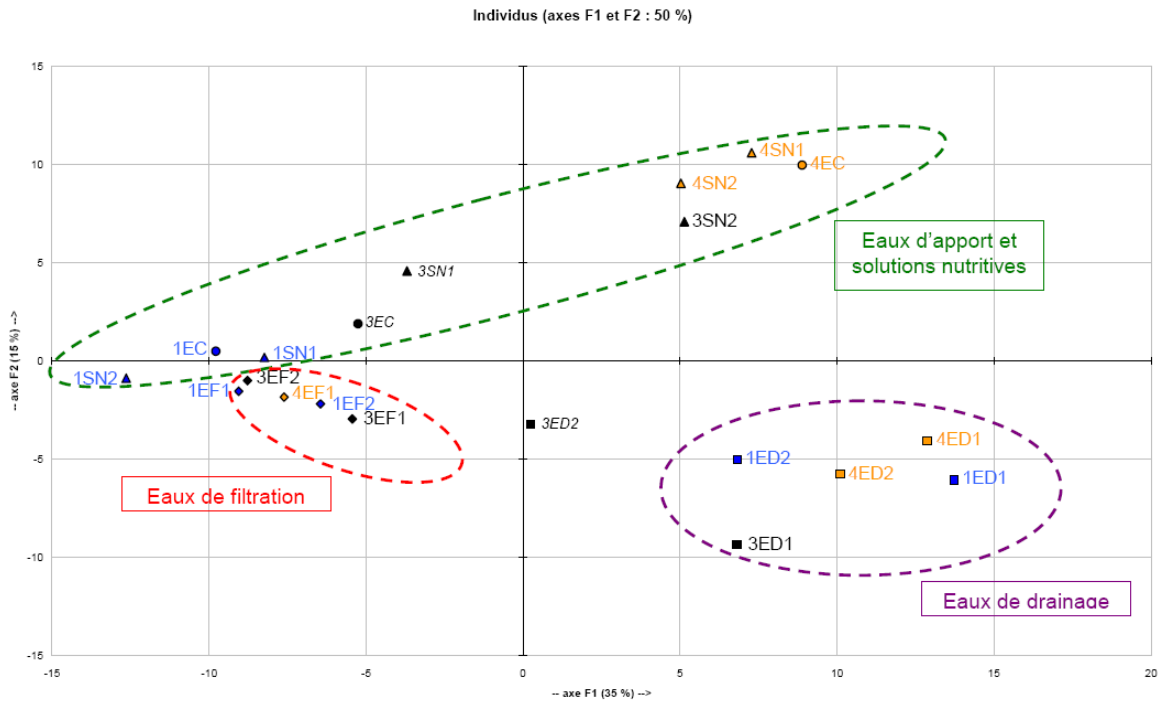


Analyses des populations fongiques des solutions circulantes

L'analyse en composante principale des solutions circulantes en fonction de la région ITS1 (Figure 4) tend à séparer les différents types de solutions : les eaux de drainage (ED) et les eaux de filtration (EF) sont séparées selon l'axe F1 (35% de la variabilité totale), sans qu'aucune évolution en fonction de la date de prélèvement ne soit visible. Les eaux d'apport (EC) et les solutions nutritives (SN) sont séparées des eaux de drainage (ED) et de filtration (EF) selon l'axe F2 (15% de la variabilité totale). Les solutions nutritives (SN) et les eaux d'apport (EC) évoluent sur l'axe F1 en fonction des dates de prélèvement. La dispersion des individus sur le plan ne montre aucune différence entre les échantillons provenant du circuit témoin de ceux provenant du circuit irriguant les plants inoculés.

Figure 4 : ACP des populations fongiques des solutions circulantes en fonction de la région ITS1
 PCA analysis of the fungal populations colonizing the circulating solutions based on the ITS1 region

Chaque échantillon est codifié de la manière suivante : le premier chiffre correspond à la date de prélèvement (1 : 11/04/06 ; 3 : 02/08/06 et 4 : 26/09/06) ; les lettres suivantes indiquent le type de solution (● EC : eau d'apport, ◆ EF : eau de filtration, ▲ SN : solution nutritive, ■ ED : eau de drainage) et le dernier chiffre désigne le type de circuit (1 pour le circuit irriguant les plants témoins et 2 pour le circuit irriguant les plants inoculés avec *P. oligandrum*).



DISCUSSION

Au niveau des racines des plants témoins et inoculés avec *P. oligandrum*, la présence d'archaebactéries n'a été détectée que très tard dans la saison culturale, d'abord en quantités relativement faibles à partir du mois d'août, puis à des niveaux particulièrement élevés au mois de septembre. Plusieurs auteurs ont mis en évidence que les racines de plants de maïs (Chelius et Triplett, 2001) et de tomate (Simon et al., 2000) cultivés en plein champ étaient colonisées par des archées appartenant au phylum des Crenarchaeota. Simon et al. (2000) ont détectées ces archées à des fréquences très importantes sur les racines sénescents par rapport aux jeunes racines. Dans cette expérimentation, bien que la présence d'archées sur les racines ne soit pas détectée avant la fin de la saison culturale, celles-ci sont présentes dès le début de la culture dans les solutions circulantes. Elles sont en fait détectées durant toute la saison culturale dans les solutions sortant des biofiltres (EF) mais uniquement en fin de saison dans les eaux de drainage (ED, après passage sur les racines). Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que les populations archéennes circulantes proviendraient de biofilms résiduels contenus dans la colonne de filtration. D'après les travaux réalisés par Simon et al. (2000), bien que les Crenarchaeota soient capables de coloniser les racines de jeunes plants de tomate, elles ne seraient pas de bonnes compétitrices contre les autres micro-organismes de la rhizosphère et auraient un taux de croissance assez lent. La présente expérimentation montre que les archées colonisent très fortement les racines au mois de septembre, période où une microflore bactérienne et fongique abondante et très diversifiée au niveau taxonomique est également présente dans la rhizosphère. Considérant ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que ces archées sont donc de bonnes compétitrices au niveau microbien et/ou qu'il ne s'agit pas de Crenarchaeota.

Les ACP des profils SSCP de la région ITS1 montrent que les structures génétiques des populations fongiques peuplant la rhizosphère et les solutions circulantes ont subi une évolution temporelle au cours de la saison culturale. En effet, elles ont évolué entre les mois d'avril et de juin / août avant de revenir en septembre à une structure relativement semblable à celle observée en début de la culture, et ce malgré une séparation des échantillons en fonction de l'inoculation de *P. oligandrum*. Pour les solutions analysées en fonction de la

région ITS1, seules les solutions nutritives (SN) couplées à l'eau d'apport (EC) du circuit ont évolué au cours du temps.

CONCLUSION

En conclusion, l'analyse quantitative des populations archéennes de la rhizosphère et des solutions circulantes a montré que ces écosystèmes pouvaient être colonisés par ce type de micro-organismes. Les analyses SSCP des communautés fongiques ont permis de démontrer que la rhizosphère et les solutions circulantes d'un système de culture hors-sol étaient colonisés par des populations différentes et spécifiques de chaque niche écologique. La structure génétique de ces communautés a évolué tout au long de la saison culturale et ce, indépendamment de l'inoculation et de la persistance de l'agent antagoniste *P. oligandrum* dans la rhizosphère.

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire (programme PATHORAC).

BIBLIOGRAPHIE

Chelius M.K., Triplett E.W, 2001 - The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41, 252-263.

Khalil S., Alsanous B., 2001 - Dynamics of the indigenous microflora inhabiting the root zone and the nutrient solution of tomato in a commercial closed greenhouse system. *Gartenbauwissenschaft*, 66, 188-198.

Koohakan P., Ikeda H., Jeanaksorn T., Tojo M., Kusakari S.I., Okada K., Sato S., 2004 - Evaluation of the indigenous microorganisms in soilless culture: occurrence and quantitative characteristics in the different growing systems. *Scientia Horticulturae*, 101, 179-188.

Le Floch G., Rey P., Déniel F., Benhamou N., Picard K., Tirilly Y., 2003 - Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agronomie*, 23, 1-6.

Le Floch G., Benhamou N., Salerno M.I., Tirilly Y., 2005 - Early events in the atypical interactions between tomato root and the biocontrol fungus, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1-11.

Postma J., Willemsen-de Klein M.J.E.I.M., van Elsas J.D., 2000 - Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. *Phytopathology*, 90, 125-133.

Rey P., Le Floch G., Benhamou N., Tirilly Y., 2008 - *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka E., Clément C. (eds.), Plant-microbe interactions, 43-57 pp.

Simon H.M., Dodsworth J.A., Goodman R.M., 2000 - Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology*, 2, 495-505.

Vallance J., Le Floch G., Déniel F., Barbier G., Lévesque C.A., Rey, P., 2009 - Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4790-4800.

White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J., 1990 - Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: PCR protocols: a guide to

methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.), New York, Academic Press, 315-322 pp.