

## Rôle des isoflavonoïdes dans les mécanismes de défense du pois chiche infecté par *Rhizoctoniasolani* AG3 et prétraité par des isolats de *Rhizobium*



**IABC** 2015  
International  
TUNISIA

I. HEMISSI<sup>\*</sup>, N. ABDI<sup>1</sup>, M. BOURAOUI<sup>1</sup>, B. SIFT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie

\* Auteur correspondant: imen.hemissi@yahoo.fr

**Abstract-Abstract:** The intensive agriculture and the excessive use of fertilizer and pesticides are pollutant. The substitution to the symbiotic microorganisms allows durability of the production and the preservation of environment. The aim of this work is to study the antagonistic activity of two *Rhizobium* strains against *Rhizoctonia solani* which causes root and collar rot on chickpea. The effect of the inoculation by *Rhizobium* on the interaction of the *Rhizoctoniasolani*- chickpea has been studied. *Rhizobia* significantly reduced the sensitivity of chickpea to *R. solani* in vitro and under greenhouse. The study of the mode of action of antagonist strains revealed their ability to solubilize the phosphorus and produce volatile substances that are involved in the inhibition of growth of the pathogen and the promotion of plant growth. The study of the interaction chickpea-*Rhizoctoniasolani* / rhizobia showed that the bacterial treatment induces the activation of defense mechanisms of the plant with an increase in the synthesis of defense enzymes and the polyphényloxydases polyphénylammonia lyase an accumulation of phenolic compound. The analysis of these compounds by HPLC revealed the induction of two compounds of isoflavonoïque kind namely formononetin and bichanine A and which are involved in the defense mechanisms of plants. The results showed that the two strains of *Rhizobium* are able to significantly induce the accumulation of soluble phenols and constituent isoflavonoïdes which have a proven antifungal effect in vitro. The synthesis of these compounds is stimulated by the presence of rhizobia that contribute to the induction of resistance mechanisms in chickpea against parasitism of *Rhizoctoniasolani*.

**Keywords:** *Rhizobium*, *Rhizoctonia solani*, chickpea, biological control.

**Résumé -** L'agriculture intensive et l'utilisation excessive des pesticides sont onéreuses et polluantes. Le recours à l'agriculture à faible intrants par le biais de l'utilisation des microorganismes symbiotiques permet la durabilité de la production et la préservation de l'environnement. Cette étude a porté sur l'activité antagoniste de deux isolats de rhizobia vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* agent causal de la pourriture racinaire du pois chiche. L'effet de l'inoculation par deux souches rhizobiales sur l'interaction du *Rhizoctonia solani*-pois chiche a été étudié. Les rhizobia ont réduit significativement le degré de sensibilité du pois chiche au *R. solani* in vitro et sous serre. L'étude du mode d'action des souches antagonistes a révélé leur capacité à solubiliser le phosphore et à produire des substances volatiles qui sont impliquées dans l'inhibition de la croissance du pathogène et de la promotion de la croissance de la plante. L'étude de l'interaction pois chiche-*Rhizoctonia solani*-rhizobia, a montré que le traitement bactérien induit l'activation des mécanismes de défense de la plante avec une augmentation de la synthèse des enzymes de défenses les polyphényloxydases et de la polyphénylammonia lyase et une accumulation des composées phénoliques. L'analyse de ces composés par HPLC a révélé l'induction d'un composé de nature isoflavonoïque à savoir le formononetin qui est impliquée dans les mécanismes de défense de la plantes. Les résultats ont montré que les deux souches de *Rhizobium* sont capables d'induire significativement l'accumulation des phénols solubles et des isoflavonoïdes constitutifs qui possèdent un effet antifongique prouvé *in vitro*. La synthèse de ces composés est stimulée par la présence des rhizobia qui contribuent à l'induction des mécanismes de résistance chez le pois chiche contre le parasitisme de *R. solani*.

**Mots clés:** rhizobia, lutte biologique, *Rhizoctoniasolani*, pois chiche.



## 1. Introduction

La pourriture racinaire constitue l'une des maladies fongiques les plus destructives chez le pois chiche, elle est due à un champignon d'origine tellurique appelé *Rhizoctoniasolani* dont le téléforme est *Thanatéphorus cucumeris* (Nasroui, 2006). Ce phytopathogène attaque aussi bien les jeunes plantules, résultant en des fentes de semis, que les plantes adultes, se présentant sous la forme d'une pourriture des racines et un chancre de collet (Aboellil et al. 2011). Cet agent pathogène est difficile à lutter par les pratiques culturales et la lutte chimique reste la méthode la plus utilisée. Cependant, la lutte biologique est une alternative écologique qui nécessite l'effort d'investigation. Elle offre un moyen de lutte très approprié sur le plan économique et environnemental et peut être inclus facilement dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée. Plusieurs études ont révélé que la résistance induite, à travers l'accumulation de composés phénoliques et de phytoalexines, ainsi que l'activation des peroxydases, des polyphénoloxydases enzymes clés des voies des phénylpropanoïdes et des isoflavonoïdes, peuvent jouer un rôle crucial dans la lutte biologique et la résistance du pois chiche vis-à-vis des attaques pathogéniques (Hemissi et al. 2013 ; Chérif et al. 2007 ; Arfaoui et al. 2006). A titre d'exemple, des études récentes ont révélé que le prétraitement des plantules de pois chiche avec des isolats sélectionnés de *Rhizobium* avant l'inoculation par le pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* a conduit à une augmentation significative des niveaux des composés phénoliques totaux et des isoflavonoïdes constitutifs, formononetin et biochanine A (Arfaoui et al. 2005, 2006). Récemment, les travaux de Hemissi et al. (2013) ont montré que le prétraitement bactérien par des isolats de *Rhizobium* a induit l'expression des enzymes de défense comme les peroxydases et les polyphénoloxydases chez les plantes de pois chiche infectées par *R. solani* (Hemissi et al. 2013). De même, l'accumulation rapide des isoflavones constitutifs le biochanin A et le formononetin constitue le système le plus étudié dans les mécanismes de défense de la plante (Barz et Mackenbrock, 1994). Notre objectif est de déterminer l'effet du prétraitement bactérien sur la synthèse des composés phénoliques et du composé isoflavonoïque, le formononetin ainsi que le degré d'implication de ce composé dans les mécanismes de défense du pois chiche.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Les semences de pois chiche variété Béjal (INRAT 93-1) ont été fournies par le laboratoire des Sciences et Techniques Agronomiques de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie.

### 2.2. Microorganismes

L'isolat de *Rhizoctonia solani* AG3 et deux isolats de *Rhizobium* Pch Azm et Pch S, ont été sélectionnés, pour l'étude des mécanismes biochimiques induits chez les plantes de pois chiche.

### 2.3. Bactérisation et inoculation fongique des plantes

L'antagoniste bactérien issu d'une culture jeune (24 h) a été repiqué dans du milieu YEM liquide. Les cultures ont été incubées sous agitation, à 28°C pendant 72 h. La culture bactérienne obtenue a été ajustée à  $10^8$  cellules/ml ( $DO_{620}=0.8$  à  $0.9$ ). Les graines pré germées ont été trempées dans la culture bactérienne pendant 4 h. Les semences témoins ont été trempées dans de l'eau distillée stérile. Par la suite, les plantules ont été semées dans des bacs contenant du sable stérile. Les plantules ont été maintenues dans une chambre de culture à 25°C, avec une photopériode de 14 h et une humidité relative de 80 à 90% pendant 3 jours. Les traitements réalisés sont Témoin (T.), inoculation par *R. solani* (T<sub>+</sub>), inoculation par Pch Az et infestation par *R. solani* et inoculation par Pch S et infestation par *R. solani*. Les prélèvements des racines pour l'analyse enzymatique ont été réalisés au cours de 5 semaines après inoculation fongique (7, 14, 21, 28, 35 j). A chaque prélèvement les racines de 6 plantes témoins ou inoculées ont été rincées à l'eau courante puis plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

### 2.4. Prélèvement, extraction et dosage des composés phénoliques totaux

Le prélèvement des racines pour l'analyse phénolique a été réalisé sur une période de 35 jours après inoculation des plantes de pois chiche par le pathogène. Le matériel végétal (0.5 g MF) est broyé à froid dans 5 ml de MeOH (80%) (Mabrouk et al. 2010). Le mélange est ensuite centrifugé à 10000

rpm pendant 10 min, le surnageant est récupéré et conservé 4°C. Le culot est repris dans 250 µl de MeOH (80%), agité pendant 3 min puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min. L'opération est répétée 3 fois et les surnageants obtenus sont ensuite rassemblés. La fraction obtenue constitue alors l'extrait hydroalcoolique. Le dosage des phénols totaux par le réactif de Folin Ciocalteu est basé sur les propriétés réductrices de la fonction phénolique. Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des phénols et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium. A 50 µl de l'extrait phénolique, sont ajoutés 2.2 ml d'eau distillé et 250 µl de réactif de Folin. Après 3 min d'agitation, 500 µl de carbonate de sodium à 20%, ont été ajoutés. Ensuite, les tubes ont été bien agités et incubés à une température de 40°C pendant 30 min, avant la lecture de la densité optique à 760 nm. Les teneurs en phénols sont exprimés en milligrammes équivalent catéchine par g de matière fraîche. Les résultats représentent une moyenne de trois analyses.

### **2.5. Analyse quantitative et qualitative des composés phénoliques par HPLC**

Les analyses par HPLC sont effectuées par un appareil de type Varian ProStar muni d'un détecteur à barrettes de diodes ProStar 330, d'un détecteur à fluorescence ProStar 363, de logiciels Star pour le traitement des données et d'une pompe gradient ternaire ProStar 230/240. L'analyse des composés phénoliques dans les extraits racinaires de pois chiche a été réalisée par l'injection de 20 µl de chaque extrait. La séparation des composés phénoliques est réalisée à l'aide d'une colonne C18 en phase inverse en utilisant un gradient (5 à 95%) d'acétonitrile dans une solution K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM acidifiée à pH = 2 avec l'acide chlorhydrique, élué à un débit de 1 ml / min. Les composés phénoliques sont détectés à 280 nm et sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre UV avec les standards disponibles. La quantification de ces composés phénoliques est basée sur la comparaison de l'aire des pics avec celles des standards internes et externes et les résultats sont exprimés en µg de composés étudiés par g de MF.

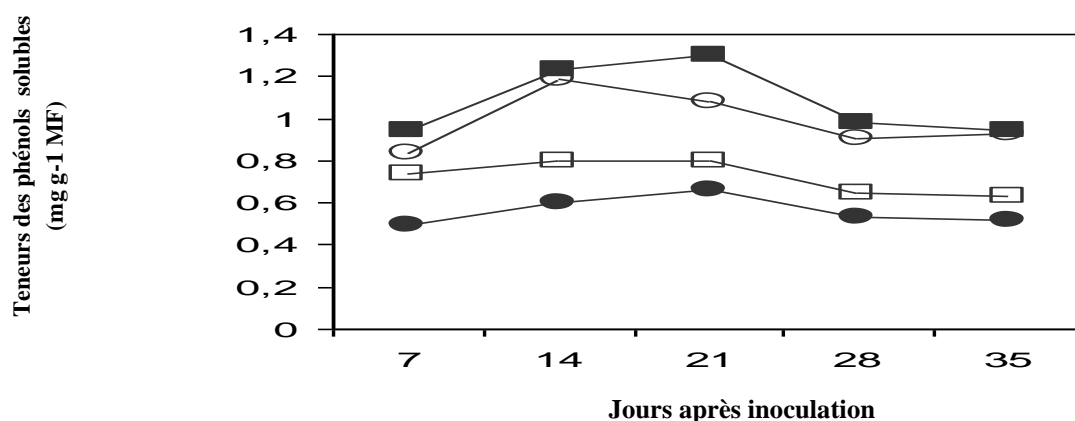
### **2.6. Analyses Statistiques**

Un logiciel de Statistique (SPSS, 11) est utilisé pour effectuer les analyses statistiques de mesures réalisées dans les essais d'évaluation de l'efficacité du couple symbiote rhizobia- Haricot. L'analyse de variance et la déviation standard des moyennes sont utilisées pour déterminer la signification ( $P \leq 0,05$ ) des différences dans l'efficacité symbiotique.

## **3. Résultats et discussion**

### **3.1. Evolution des teneurs en composés phénoliques**

L'analyse statistique des teneurs enregistrées en composés phénoliques a révélé une variation entre les traitements par les antagonistes bactériens par rapport au témoin infecté par *R. solani*. L'analyse des extraits phénoliques chez les plantes saines âgées de 35 jours a montré que le contenu des phénols totaux solubles est de l'ordre de 0,515 mg/g MF. Ces quantités sont très peu modifiées par l'infestation par *R. solani*. Le prétraitement des racines des plantules de pois chiche par les isolats de *Rhizobium* avant l'inoculation par le champignon, a induit une augmentation des teneurs des composés phénoliques (Figure 1). En effet, ces teneurs ont variés selon l'isolat bactérien utilisé. Les quantités des composés phénoliques des racines des plantes âgées de 21 jours ont été de 1,30 mg/g (MF) et de 1,08 mg/g (MF), respectivement pour les antagonistes Pch Az et Pch S. Cette étude montre une augmentation des teneurs en composés phénoliques au niveau des racines de pois chiche, infectées par *R. solani* et prétraités par les isolats de *Rhizobium*. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs travaux montrant l'implication des composés phénoliques dans plusieurs mécanismes de défenses des plantes (Mishra et al. 2006 ; Mabrouk et al. 2007). Arfaoui et al. (2005), ont montré que le prétraitement des plantules de pois chiche avec des isolats sélectionnés de *Rhizobium* avant l'inoculation par le pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* a conduit à une augmentation significative des niveaux des composés phénoliques totaux.



**Figure 1** : Evolution de la teneur en phénols solubles dans les racines du pois chiche suite à l'inoculation par les souches de *Rhizobium* et à l'infection par *R. solani*. Les taux de phénols solubles sont mesurés à 7, 14, 21, 28 et 35 jours après l'inoculation. Les plantes de pois chiche saines et non inoculées sont utilisées comme témoin (●), pois chiche infesté par *R. solani* (□), pois chiche infesté par *R. solani* et inoculé par des rhizobiums (■, souche Pch S et ○, souche Pch Az).

### 3.2. Analyse des composés phénoliques par HPLC

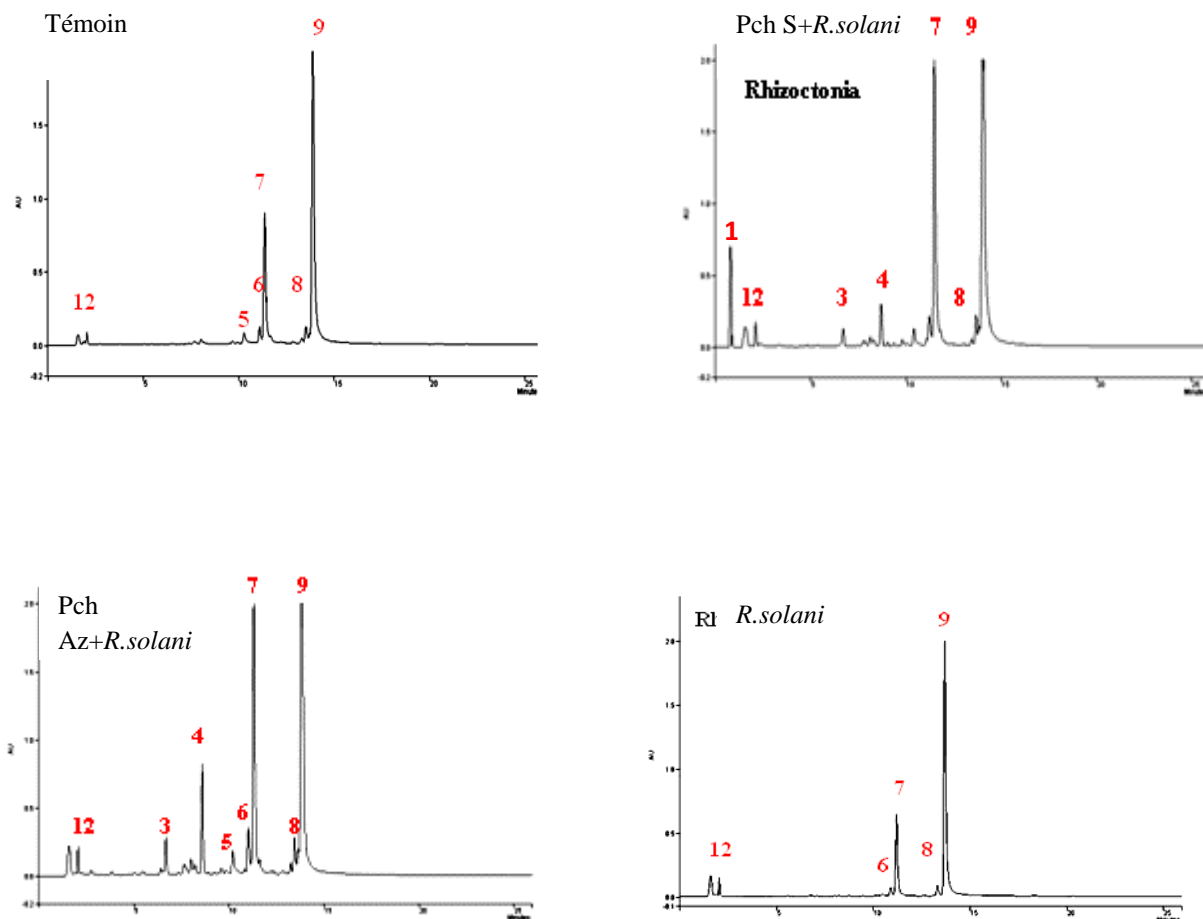
Le but de ce travail a été de caractériser les principaux composés phénoliques induits chez les racines du pois chiche prétraitées par des souches de *Rhizobium* et infestés par *R. solani*. La figure 2 représente les profils phénoliques des extraits racinaires du cultivar Béjal. L'utilisation des substances de références ont permis d'identifier le composé (7) comme étant le formononetin. D'autres composés ont pu être identifiés, comme ceux correspondant aux pics 1, 2 et 4, qui correspondent respectivement aux acide gallique, acide ferrulique et acide para-coumarique. Les analyses HPLC ont montré une différence entre les profils chromatographiques des composés phénoliques des plantes saines et des plantes inoculées par les rhizobies. Les plantes saines accumulent essentiellement l'acide gallique ( $20\mu\text{g g}^{-1}$  MF), les autres composés étant présents sous formes de traces (Fig. 2). L'infection par *R. solani* ne change pas le profil des composés phénoliques. En contre partie, l'inoculation des plantes de pois chiche par la souche de *Rhizobium* Pch Az induit l'accumulation spécifique de quatre acides phénoliques, l'acide gallique, l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide férulique, et du flavonoïde formononetin (Figure 2).

### 3.3. Effet de l'inoculation par les rhizobies sur l'accumulation du formononetin

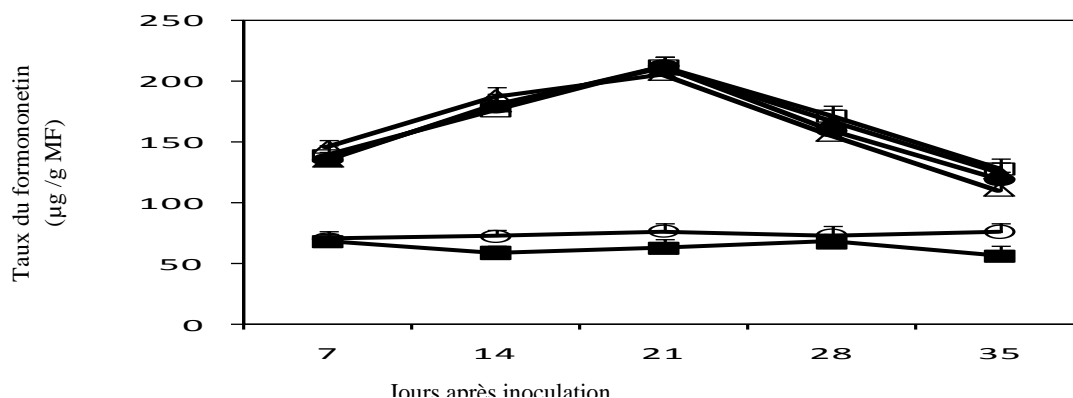
La technique HPLC présente l'avantage de détecter les composés à l'état de trace mais également leur quantification. La figure 3 présente la cinétique d'accumulation du taux du Formononetin au niveau des racines des plantes de pois chiche. Une augmentation progressive a été observée pour le taux de ce composé, avec un pic vers le 21<sup>ème</sup> jour après inoculation par la souche Pch Azm (Figure 3). Une chute du taux de ce composé est par contre visible après la troisième semaine de culture, les teneurs demeurant néanmoins supérieures à celles des plantes témoins. Chez le pois chiche, les composés phénoliques sont constitués d'isoflavanones (homofeirin et le cierin), de ptérocarpanes (la medicarpin et le maackian) et d'isoflavones (la biochanine A et le formononetin) (Chérif et al. 2007). Ces composés s'accumulent au niveau des racines et des tiges en réponse aux différentes infections fongiques et leurs taux augmentent significativement chez les plantes pré-inoculée avec les microorganismes antagonistes. Ils ont un caractère antifongique stimulant la résistance du pois chiche contre plusieurs champignons phytopathogènes. En effet, l'accumulation des composés phénoliques et les phytoalexines est considéré comme le majeur mécanisme de défense observé et caractérisé chez le pois chiche (Barz et Mackenbrock, 1994). L'objectif de cette étude est d'identifier les composés dont l'accumulation induite par certaines souches de *Rhizobium* chez le pois chiche inhibe la croissance mycélienne du *R. solani*. Les résultats ont montré que le prétraitement des racines des plantules du pois chiche par des isolats de *Rhizobium* avant l'inoculation fongique a entraîné une augmentation de la synthèse des composés phénoliques totales, ainsi que celle de l'isoflavonoïde constitutif le formononetin. Cette augmentation a été la plus importante en présence de la souche Pch Az, qui s'est

montrée précédemment comme l'isolat le plus efficace dans la réduction du développement de la maladie de la pourriture racinaire (Hemissi et al. 2011).

On a suggéré que l'inoculation de pois chiche par la souche Pch Az stimule la sécrétion des molécules inhibitrices dans les racines de pois chiche. Cette hypothèse repose sur les données rapportées par plusieurs chercheurs qui ont montré une accumulation des composés phénoliques dans les racines des plantes hôtes lors de l'interaction rhizobium-légumineuse (Peters et Verma 1990). D'une part ces composés sont connus comme activateurs d'expression des gènes de nodulation des rhizobiums (Pieterse, 2002), d'autre part ils sont attribués à l'immunisation des plantes contre les pathogènes (Jourdan et al. 2008). Cette étude montre une corrélation positive entre l'accumulation des composés phénoliques et la suppression de la maladie. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs travaux attribuant plusieurs rôles importants aux phénols pour le contrôle des phytopathogènes (Rabie 1998 ; Elbadry et al. 2006). Parmi ces rôles, on cite la modification structurale des cellules au niveau des racines (lignification, subérisation) aboutissant à la formation des barrières physiques contre l'invasion du pathogène. Dans ce contexte, il serait intéressant de réaliser des études supplémentaires pour identifier les changements structuraux au niveau des racines de pois chiche suite à l'inoculation par les rhizobiums.



**Figure 2 :** Profils chromatographiques (Colonne RP-C18) mode gradient 5-95 acetonitrile / tampon phosphate 100 mM à pH 2.54. (1) acide gallique, (2) acide férulique, (3) acide cinnamique, (4) acide coumarique, et (7) formononetin. Le reste des composés ne sont pas identifiés.



**Figure 3 :** Effet des souches de *Rhizobium* Pch Az et Pch S sur l'accumulation du formononetin dans les racines du pois chiche. Les valeurs sont les moyennes de cinq répétitions  $\pm$  intervalles de Confiance. Les Taux de le formononetin sont mesurés à 7, 14, 21, 28 et 35 jours après inoculation du pois chiche avec les souches *Rhizobium* et infestation par *R. solani*. Pois chiche seul (○), pois chiche inoculé avec Pch Az (●), pois chiche inoculé avec Pch S (□), pois chiche infesté par *R. solani* (■), pois chiche infesté par *R. solani* et inoculé avec Pch Az (▲) et pois chiche infesté par *R. solani* et inoculé avec Pch S (▲).

#### 4. Conclusion

Les résultats montrent que la souche de *Rhizobium* Pch Az est capable d'induire l'accumulation des phénols solubles ainsi que celle des isoflavonoïdes constitutifs au niveau des plantes de pois chiche infectées par *R. solani*. La synthèse de ces composés est stimulée par la présence de *Rhizobium* qui contribue à l'induction des mécanismes de résistance chez le pois chiche contre la pourriture racinaire du pois chiche. En effet, les rhizobies constituent des bons antagonistes, qui font appel à différents mécanismes d'antagonisme telles que la compétition, l'antibiose, l'induction des mécanismes de défense de la plante et viennent renforcer l'idée de la possibilité d'intégration de ces agents antagonistes efficaces dans le cadre d'un programme de lutte intégrée faisant appel à différentes approches culturales, physique, génétique et biologique, ayant comme principal objectif la réduction de l'usage des pesticides et leurs effets néfastes sur l'homme et l'environnement.

#### 5. Références

- Aboellil AH et Mohammed N M (2011) Effect of some chemicals on growth, melanogenesis, pathogenicity and metabolic activities of *Rhizoctonia solani*. J. Yeast Fungal Res. 2(10): 143 – 152.
- Arfaoui A, Sifi B, El Hassni M, El Hadrami I, Boudabbous A et Chérif M (2005) Biochemical analysis of chickpea protection against *Fusarium* wilt afforded by two *Rhizobium* isolates. Plant Pathol J 4: 35–42.
- Arfaoui A, Sifi B, Boudabbous A, El Hadrami I et Chérif M (2006) Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, the causal agent of *Fusarium* wilt of chickpea. Plant pathol 88: 67–75.
- Barz W et Mackenbrock U (1994) Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavonones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38: 199-211.
- Benhamou N, Nicole M (1999) Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol Biochem* 37:703–719.
- Chérif M, Arfaoui A et Rhaïem A (2007) Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. Tunis J Plant Prot 2: 7-22.
- Elbadry M, Taha RM, EldougDoug KA et Gamal Eldin H (2006) Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. J Plant Dis Protect 113: 247–251.
- Hemissi I, Mabrouk Y, Abdi N, Bouraoui M, Saidi M et Sifi B (2011) Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani*. Afr. J. Microbiol. Res 5 (24): 4080-4090.
- Hemissi I, Mabrouk Y, Abdi N, Saidi M and Sifi B (2013) The potential of *Rhizobium* strains for biological control of *Orobanche foetida*. Afr. Jour Biotech 12 (12): 1371-1377.
- Jourdan E , Ongena M, Thonart P (2008) Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 12(4), 437-449.

- Mabrouk Y, Simier P, Arfaoui A, Sifi B, Delavault P, Zourgui L, Belhadj O (2007)** Induction of phenolic compounds in pea (*Pisum sativum* L.) inoculated by *Rhizobium leguminosarum* and infected with *Orobanche crenata*. J. Phytopathol. 155:728–734.
- Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S (2006)** Rhizobium mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). Current Microbiology 52:383–389.
- Nasroui B (2006)** Les champignons parasites des plantes cultivées : Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Centre de publication Universitaire, 2006. ISBN : 987-9973-302-1.
- Peters N K et Verma D P S (1990) **Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant–microbe interactions.** MPMI 3: 4-8.
- Pieterse CMJ (2002)** Signalling in rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol 4, 535-544.
- Rabie GH (1998)** Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycopathologia* 141:159–166.
- Yassine Mabrouk ,Sonia Mejri , Imen Hemissi , Philippe Simier , Philippe Delavault , Mouldi Saidi and Omrane Belhadj (2010)** Bioprotection mechanisms of pea plant by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata* . African Journal of Microbiology Research. 23: 2570-2575.