

Influence du pH et de la température sur l'aptitude de *Trichoderma spp.* à inhiber in vitro la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae*

Ouazzani Touhami A.¹, Mouria A.¹, Douira A.¹, Benkirane R.¹, Mlaiki A.², El Yachoui M.³

¹ Laboratoire de botanique, Faculté des sciences de Kénitra, Maroc

² Département de protection des végétaux, INRAT, Tunisie

³ Laboratoire de microbiologie, Faculté des sciences de Kénitra, Maroc

Résumé

L'aptitude de certains Trichoderma sp. à inhiber in vitro la croissance mycélienne de Pyricularia oryzae a été examinée à 4 températures (15 °C, 23 °C, 28 °C et 32 °C) et à 4 pH (4,5 ; 6 ; 6,9 et 8). Les pH 4,5 et 6 et la température 28 °C sont les valeurs optimales auxquelles les antagonistes étudiés sont les plus efficaces.

Mots clés : *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma*, pH, température, antagonisme

Abstract: *In vitro* effect of pH and temperature on the ability of *Trichoderma spp.* to reduce the growth of *Pyricularia oryzae*

The ability of Trichoderma sp. to inhibit the mycelial growth of Pyricularia oryzae has been studied at four pH values (4,5 ; 6 ; 6,9 et 8) and four temperatures (15; 23; 28 et 32). All antagonists tested were more efficient at 28 °C and pH 4,5 and pH 6.

Key words: *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma sp.*, pH, temperature, antagonism

ملخص : تأثير الحموضة و الحرارة على قدرة الطريكوديرما على منع نمو بيريكيلاريا أوريذا في

الوسط الصناعي

1. وزاني توهامي 1، 1. مورية 1، ع. ادوية 1، ر. بن كيران 1، 1. مالكي 2 و م. يشيوي 3

1 : كلية العلوم، القنيطرة، المغرب

2 : المعهد الوطني للبحث الزراعي، تونس

3 : كلية العلوم، القنيطرة، المغرب

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة قدرة بعض الفطريات المضادة من أجناس الطريكوديرما على كبح ومنع الفطر الطفيلي (البيريكيلاريا أريذا) في أربع مستويات حرارية (15, 23, 28, 32 °C) وأربع مستويات حمضية (6, 5, 4, 9, 6 و 8). توضح النتائج المحصل عليها أن المستويين الحمضيين 4 و 6 والمستوى الحراري 28 °C يكونان وسطا بيئيا أمثل لحيوية و نشاط الفطريات المضادة.

الكلمات المفتاحية : بيريكيلاريا أوريذا، طريكوديرما، حموضة، حرارة، مضادة

Introduction

La lutte biologique utilise un ou plusieurs processus naturels (antibiose, parasitisme, compétition) qui sont influencés par divers facteurs environnementaux aussi bien biotiques qu'abiotiques. Ces facteurs limitent les interactions entre les agents phytopathogènes et leurs antagonistes. Ils provoquent au moins un contrôle acceptable de la maladie, ou des réductions des populations pathogènes (Cook et Baker 1983).

Les facteurs abiotiques inhérents au sol sur lequel croît la plante hôte agissent de façon indirecte en octroyant à cette dernière une relative aptitude à la résistance ou à la sensibilité à l'égard d'un pathogène. Certains de ces facteurs peuvent être corrigés : amendement, fumure, aération. Ceux relatifs à l'atmosphère dans laquelle se développe la partie aérienne de la plante agissent directement sur le développement des pathogènes et des antagonistes : Température, humidité relative, pH, pesticides...etc.

L'inhibition in vitro de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes par des micro-organismes antagonistes apparaît nettement dépendante de la température et du pH de confrontation. Ainsi, à pH 4.4 et aux températures 14 °C, 25 °C et 30 °C, le taux d'inhibition de l'*Helminthosporium turcicum* Pass., parasite du maïs, par *Trichoderma harzianum*, est respectivement de l'ordre de 66 %, 91 % et 63 % (Mickala-Doukaga et al. 1978). Dans le même contexte, pour une température donnée et pour un pH qui passe de 4.1 à 7, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne d'*H. turcicum* par *Trichoderma viride* baisse de 57 % à 12 %.

Dans cette étude, nous exposons, en fonction de la température et du pH, les résultats concernant le comportement in vitro de *Pyricularia oryzae*, pathogène du riz, vis-à-vis de 3 espèces de *Trichoderma* (3 souches de *Trichoderma viride*, 2 souches de *T. harzianum* et 1 souche de

T. orsan. La température favorable pour la croissance mycélienne de *P. oryzae* est de l'ordre de 28 °C et le pH qui permet une croissance optimale est de l'ordre de 7 (Benkirane 1995).

Matériel et méthodes

L'isolat Fk1 de *P. oryzae* étudié a été obtenu à partir d'une lésion foliaire d'une plante malade du riz (variété Kenz). Cet isolat est très pathogène sur le riz (El Oirdi *et al.* 1995).

Six souches de *Trichoderma* ont été utilisées pour tester leur capacité antagoniste vis-à-vis de *P. oryzae*. *T. viride* 1, *T. viride* 2 et *T. harzianum* 20 sont fournis par le laboratoire de Cryptogamie-Bactériologie de l'Inra (Tunisie). *T. viride* 3 provient du mycothèque du laboratoire de Botanique, Université Ibn Tofail, Kénitra (Maroc). *T. harzianum* et *T. orsan* sont fournis par le laboratoire de Biochimie et de Pathologie végétale, Université Pierre et Marie Curie (France).

La technique de confrontation consiste à placer des disques de 5 mm de diamètre, constitués par les inoculum du pathogène et de l'antagoniste, à 40 mm environ de distance l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte de Pétri, contenant 20 ml de milieu Misato Hara (20 g d'amidon, 2 g d'extrait de levure, 15g d'agar et 1000 ml d'eau distillée). Les cultures sont incubées à l'obscurité, à une température de 28 °C. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène par les antagonistes est évalué en pourcentage selon la méthode suivante :

$$I = \frac{DP - DPA}{DP} \times 100$$

Où DP est la croissance diamétrale du pathogène seul et DPA est la croissance diamétrale du pathogène en présence de l'antagoniste

Les pH souhaités (4,5 ; 6 ; 6,9 et 8) étant obtenus en ajustant par addition aux milieux du HCl à 1 % pour obtenir les pH acides et de NaOH à 1 % pour l'obtention de ceux basiques. Les boîtes sont incubées à l'obscurité et à 28 °C.

De même, pour étudier l'effet de la température on incube, à l'obscurité, les boîtes de Pétri à différentes températures (15 °C, 23 °C, 28 °C et 32 °C) et au pH du milieu Misato-Hara qui est de l'ordre de 6,9.

Chaque combinaison fait l'objet de cinq répétitions. Les résultats sont analysés statistiquement selon le test L.S.D (Least significant difference)

Résultats

Le tableau 1 montre que les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *P. oryzae* par un antagoniste donné varient en fonction de la température testée.

L'analyse des résultats permet de séparer les antagonistes étudiés en deux groupes. *T. viride 2*, *T. viride 1*, *T. harzianum 20* et *T. harzianum* inhibent totalement la croissance du pathogène à 28 °C. *T. viride 1*, *T. harzianum 20* et *T. harzianum* manifestent également un pouvoir d'inhibition important vis-à-vis de la croissance mycélienne de *P. oryzae* aux 4 températures testées (le niveau minimum d'inhibition est de l'ordre de 69 % pour *T. viride 1* à 15 °C).

Pour *T. viride 2*, l'inhibition de la croissance mycélienne est moyenne à 15 °C et 32 °C (56 et 55 %), mais elle est de l'ordre de 80 % à 23 °C.

T. orsan et *T. viride 3* présentent une activité nettement meilleure à 15 °C, 23 °C et 28 °C qu'à 32 °C, température à laquelle l'inhibition est de 39,3 % pour *T. orsan* et 42,2 % pour *T. viride 3*. Aux trois premières températures indiquées, les inhibitions notées varient entre 81,5 % et 93,5 % pour *T. orsan* et entre 94 % et 100 % pour *T. viride 3*.

Les résultats du tableau 2 montrent que *T. viride 2* inhibe à 100 % la croissance de *P. oryzae* à tous les pH testés.

Avec les antagonistes *T. viride 1*, *T. harzianum 20*, *T. viride 3* et *T. harzianum*, l'inhibition de la croissance mycélienne de *P. oryzae* est élevée à tous les pH (les pourcentages d'inhibition varient entre 89,5 % pour *T. viride 3* à pH 8 et 100 % pour *T. viride 1* et *T. harzianum 20* à pH 6). En général, le pH 6 reste le plus favorable à l'expression antagoniste de ces germes. Pour *T. orsan*, l'efficacité maximale de 90 % est obtenue pour les pH 4,5 et 6. A pH quasi neutre (6,9) et basique (8), l'inhibition n'est que de 73 % et 52 %.

Tableau 1. Effet de la température d'incubation sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae* par les espèces antagonistes

Antagonistes	Température (°C)			
	15	23	28	32
<i>T. viride 2</i>	56,5 d	79,2 d	100 a	55,06 bc
<i>T. viride 1</i>	70,75 c	95,72 bc	100 a	68,97 b
<i>T. harzianum 20</i>	81,75 b	98,01 b	100 a	90,52 a
<i>T. viride 3</i>	100 a	100 a	94,13 b	44,25 c
<i>T. orsan</i>	88,5 b	93,54 c	89,37 b	39,37 c
<i>T. harzianum</i>	69,25 c	97,35 b	99,48 a	68,67 b

Sur la même colonne, deux résultats ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %, s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

Tableau 2. Effet du pH sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae* par les espèces antagonistes

Antagonistes	pH			
	4,5	6	6,9	8
<i>T. viride 2</i>	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>T. viride 1</i>	90,87 c	100 a	94,01 b	95,36 b
<i>T. harzianum 20</i>	91,92 c	100 a	93,21 b	94,79 b
<i>T. viride 3</i>	92,27 c	94,13 b	91,38 b	89,51 c
<i>T. orsan</i>	90,26 c	89,4 b	73,35 c	51,78 d
<i>T. harzianum</i>	95,7 b	99,49 a	96,16 b	96,05 b

Sur la même colonne, deux résultats ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %, s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

Conclusion

L'inhibition in vitro de la croissance mycélienne de *P. oryzae* par les antagonistes du genre *Trichoderma* apparaît nettement dépendante non seulement de la température, mais également du pH. Ceci est en accord avec les résultats de Sy (1987) et Moustafa *et al.* (1992).

Dans le présent travail, nous avons observé que l'inhibition induite par les champignons antagonistes est plus élevée à pH nettement acide (4,5) et faiblement acide (6) qu'à pH proche de la neutralité (6,9) ou basique (8).

Il est à remarquer que concernant les confrontations antagonistes *P. oryzae*-*T. viride* 2 à 28 °C (température optimale de croissance pour *P. oryzae*), ce dernier s'est montré très actif à tous les pH testés y compris le pH 7 optimal à la croissance mycélienne de *P. oryzae*.

Notons que lors des confrontations des autres *Trichoderma* avec *P. oryzae*, l'antagonisme s'exprime d'autant mieux que les antagonistes trouvent les conditions favorables à leur croissance (pH 4,5 et 6). De telles conditions étant au surplus défavorables au développement du pathogène, l'effet antagoniste s'en trouve accru. Ce constat est en accord avec les résultats obtenus par divers auteurs dont Marshall (1982) et Harman et Taylor (1988). Chet et Baker (1980) pensent que l'action des pH acides se traduit par une stimulation de la production des conidio-phores et l'augmentation de l'activité des enzymes lytiques.

Ces expériences nous ont permis également d'identifier les limites thermiques d'efficacité de chaque espèce antagoniste. Ainsi, *T. viride* 2, *T. viride* 1, *T. harzianum* 20 et *T. harzianum*, sont plus efficaces à 28 °C. Ce résultat est en accord avec ceux de Munnecke *et al.* (1976 et 1981) concernant l'antagonisme des *Trichoderma* spp.-*Armellaria*. Ces auteurs signalent en effet que la température la plus favorable à la croissance mycélienne de *Trichoderma* et à la production d'antibiotiques est de 28 °C. Pour *T. orsan* et *T. viride* 3, les températures 15 °C et 23 °C, ont permis une activité antagoniste plus élevée qu'à 28 °C.

Au terme de nos essais effectués in vitro, et dont les résultats ne peuvent être qu'indicatifs, il était nécessaire d'apprécier les interactions antagoniste-pathogène-plante hôte grâce à des tests in vivo. Signalons également que dans beaucoup des cas les résultats des travaux in vitro ont trouvé confirmation in vivo aussi que le signalent Das et Pal (1968), Norng (1979) et Moustafa (1982).

Références bibliographiques

- Benkirane R. (1995). Contribution à l'étude des maladies du riz au Maroc, cas de la pyriculariose due à *P. oryzae*. Thèse de docteur de 3^e cycle, Faculté des sciences, Kénitra. 189 p.
- Chet I. et Baker R. (1980). Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, **70** : 994-998.
- Cook R.J. et Baker K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, MN., 539 p.
- Das C. R. et Pal A. (1968). Influence of *Rhizopus nigricans* Ehrenb. on the development of *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout. *Phytopathology* Z., **63** : 40-46.

- EL Oirdi M., Douira A., Benkirane R., Ouazzani-Touhami A., Mouslim J., Bouslim F., Karmoussi M., El Hassani N. et El Haloui N.E. (1995). Comparaison du caractère pathogène de quelques isolats marocains de *Pyricularia oryzae* vis-à-vis de certaines variétés de riz. Rev. rés. amélio. Prod. agr. *Milieu aride*, **7** : 231-240.
- Harman G.E. et Taylor A.G. (1988). Improved seedling performance by integration of biological control agents at favorable pH levels with solid matrix priming. *Phytopathology*, **78**: 520-525.
- Marshall D.S. (1982). Effect of *Trichoderma harzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off of snap bean in acidic soil. *Plant Dis.*, **66**: 788-789.
- Michala-Doukaga E., Albertini L. et Petitpres M. (1978). Action in vitro d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium turcicum* Pass., parasite du maïs. Note préliminaire. *Bull. soc. myc. Fr.* **94** : 33-47.
- Moustafa M.M. (1982). Recherches sur la lutte biologique contre l'*Helminthosporium teres* Sacc., parasite de l'orge (*Hordeum sativum* Jessen) par l'utilisation de microorganismes antagonistes et d'une souche pathogène hypogressive. Thèse Docteur Ingénieur, n° 220, Institut national polytechnique, Toulouse, France.
- Moustafa M.M., Barrault G. et Albertini L. (1992). Lutte biologique contre *Drechslera teres* : Action in vitro de microorganismes antagonistes sur la croissance mycélienne et la germination. *Crypt. Mycol.*, **13** : 125-133.
- Munnecke D.E., Wilbur W.D. et Darley F. (1976). Effect of heating or drying on *Armellaria mellea* or *Trichoderma viride* and the relation to survival of *A. mellea* in soil. *Phytopathology*, **66**: 1363-1368.
- Munnecke D.E., Kolbezen M.J., Wilbur W. D. et Ohr H.D. (1981). Interactions involved in controlling *Armillaria mellea*, *Plant. Disease*, **65**: 384-389.
- Norng K. (1979). Recherches sur la lutte biologique contre le *Botrytis cinerea* Pers., parasite de la vigne, par utilisation d'antagonistes fongiques. Études principalement in vitro. Thèse docteur ingénieur, n° 72, Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Sy A.A. (1987). Lutte biologique contre la pyriculariose du riz : Stratégie et application. Thèse de Doctorat d'Etat es-science, Institut national polytechnique de Toulouse, France. 152p.