



Antagonisme *in vivo* des *Trichoderma* vis-à-vis de *Pyricularia oryzae*

Ouazzani Touhami A¹, Mouria A¹, Douira A¹, Hmouni A¹, Mlaiki A², et El Yachioui 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'inoculation simultanée de Pyricularia oryzae et de l'antagoniste aux plantes du riz a montré que les Trichoderma testés présentent un bon pouvoir protecteur des feuilles du riz contre la pyriculariose. Les dégâts de la maladie sont réduits de 71 à 88 % par rapport à ceux induits par le pathogène lorsqu'il est inoculé seul aux plantes de riz. Les valeurs des coefficients d'infection ont diminué également d'une manière importante lorsque les plantes ont été inoculées par Pyricularia oryzae et les antagonistes.

Mots clés : *Pyricularia oryzae*, riz, *Trichoderma*, pyriculariose, protection

Abstract: The ability of *Trichoderma* species to reduce leaf infection in rice

Antagonistic Trichoderma sp. did show a good efficacy against blast disease caused by Pyricularia oryzae when plants of rice were simultaneously inoculated by the pathogenic and the antagonists. The foliar symptoms are reduced between 71 and 88 % as compared to those induced by Pyricularia oryzae when it is inoculated alone to plants of rice. The values of coefficient of infection are much reduced too when plants were inoculated by the pathogen and the antagonists.

Key words: *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma sp.*, blast disease, protection

ملخص : تأثير بعض أنواع الطريكويدي ' في الجسم الحي (نبته الأرز) على نمو بيريكيلاريا أوريزا

1. وزاني توهامي 1، أ. مربية 1، ع. ادويرة 1، ر. بن كيران 1، أ. مالكي 2 وم. يشيوي 3

1 : كلية العلوم، القنيطرة، المغرب

2 : المعهد الوطني للبحث الزراعي، تونس

3 : كلية العلوم، القنيطرة، المغرب

التلقيح المتزامن لنباتات الأرز بالمتطفل (بيريكيلاريا أوريزا) و المضاد (بعض أجناس الطريكويديما) أوضح أن أجناس الطريكويديما قد أبرزت قدرة كبيرة في حماية أوراق الأرز من مرض اللفحة (Blast Disease). لقد انخفضت قروح الأوراق بنسب تتراوح بين 71 و 88% مقارنة مع تلك التي لوحظت على أوراق نباتات الأرز المطعم بالمتطفل وحده. انخفضت أيضا مقاييس معامل الإصابة انخفاضاً كبيراً عند النباتات المطعمة ببيريكيلاريا أوريزا و المضاد.

الكلمات المفتاحية : بيريكيلاريا أوريزا، أرز، طريكويديما، مرض اللفحة، حماية

Introduction

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des micro-organismes saprophytes s'est accrue vu leur rôle dans la réduction de l'incidence des maladies foliaires (Whipps 1992). Les surfaces foliaires sont colonisées par des micro-organismes pathogènes et saprophytes qui s'interagissent. Sous l'effet des facteurs biotiques et abiotiques, se crée au niveau de la phyllosphère un écosystème caractérisé par sa complexité et par la diversité de ses composantes, ce qui rend la lutte biologique plus difficile. Au sein de la phyllosphère, les microorganismes saprophytes et parasites réagissent entre eux par les phénomènes de synergie, ou d'antagonisme. Ces interactions peuvent avoir des conséquences importantes sur le développement des maladies.

De nombreuses études ont été effectuées sur le rôle des champignons saprophytes, en particulier les *Trichoderma*, dans la lutte contre les pathogènes foliaires (Fokkema 1978 ; Fleming, 1980 ; Dubos et Bulrr 1981 ; Freeman 1981 ; Lockwood 1981 ; Macauley et Waid 1981 ; Blakeman et Fokkema 1982 ; Cullen et Andrews 1985 ; Melgarejo *et al.* 1985). Ainsi, les *Trichoderma* se sont montrés aptes à contrôler l'helminthosporiose, quand ils sont utilisés pour protéger les feuilles des céréales (Akai et Kuramoto 1968).

les *Trichoderma* ont été aussi utilisés avec succès contre le *Botrytis cinerea* sur la vigne en France (Dubos *et al.* 1978 ; 1982 a et b 1983) et en Italie (Gullino et Garibaldi 1983 ; Bisiach *et al.* 1985 ; Gullino *et al.* 1985).

Elad *et al.* (1994) ont rapporté que *Trichoderma harzianum* réduit la pourriture grise des feuilles de la tomate. De son côté, Grosclaude (1970) a signalé que *Trichoderma viride* qui est antagoniste *in vitro* contre *Chondrostereum purpureum*, l'inhibe aussi fortement *in vivo*. De même, d'après Biles et Hill (1988), *T. harzianum* empêche la sporulation de *Cochliobolus sativus* sur les feuilles du blé.

Ainsi, dans ce travail nous avons observé l'effet des inoculations simultanées des plantes de riz par les antagonistes et *Pyricularia oryzae* sur l'expression de la pyriculariose.

Matériel et méthodes

Les graines de la variété Triomphe du riz sont stérilisées par un trempage dans l'hypochlorite de sodium à 0,6 %, pendant 10 mn puis rincées rigoureusement à l'eau distillée stérile. Après avoir été séchées sur papier filtre stérile, les graines sont ensuite mises à prégermer sur coton imbibé avec de l'eau distillée stérile. L'incubation est faite à l'obscurité et à 28 °C. Après 75 h, les plantules émanant des graines prégermées sont arrosées avec l'eau de robinet jusqu'au stade requis pour l'inoculation, soit 4 à 6 feuilles. 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'INRAT (Tunisie). *T. viride* 3 provient du mycothèque du laboratoire de Botanique, Université Ibn Tofail, Kénitra (Maroc). *T. harzianum* et *T. orsan* sont aimablement fournis par le laboratoire de Biochimie et de pathologie végétale, Université Pierre et Marie Curie (France). Ces antagonistes sont mis à croître sur milieu PDA et sont incubés à l'obscurité pendant 15 jours, au terme desquels des suspensions sporales sont préparées à partir de ces cultures et ajustées avec l'eau distillée contenant 0,02 % de Tween 20 et 0,5 % de gélatine de façon à avoir une concentration finale de l'ordre 10⁶ spores/ml.

L'isolat Fk1 de *P. oryzae*, le plus pathogène sur le riz (Eloirdi *et al.* 1995), a été obtenu à partir d'une lésion foliaire d'une plante malade du riz (variété Kenz). Cet isolat est repiqué dans des boîtes de Pétri contenant le milieu à base de farine de riz (14 g de farine de riz, 4 g d'extrait de levure, 15 g d'agar et 1000 ml d'eau distillée) favorable à la production sporale. L'incubation est faite à 28 °C et à l'obscurité pendant 8 jours.

Lorsque le champignon couvre les boîtes de Pétri, la surface chargée de spores est raclée stérilement, à l'aide d'une spatule métallique. Le mycélium est mis en suspension dans l'eau distillée stérile, puis agité pendant 30 à 60 secondes. Après filtration à travers un papier Watman, la concentration de la suspension est ajustée à 10⁵ spores/ml par estimation de la densité initiale (comptage à l'hématimètre) puis dilution avec l'eau distillée contenant 0,2 % de Tween 20 et 0,5 % de gélatine.

L'inoculation est faite par pulvérisation simultanée de la suspension sporale des antagonistes et celle du pathogène sur la surface foliaire des plantes du riz. Trois témoins ont été réalisés:

- Plantes inoculées par la suspension sporale du pathogène ;
- Plantes inoculées par la suspension sporale des antagonistes ;
- Plantes pulvérisées seulement par l'eau distillée contenant de la gélatine et du Tween 20.

Toutes les plantes inoculées sont placées, pendant 48 heures, sous une housse en plastique noir permettant de maintenir une humidité relative de 100 %. Les plantes inoculées sont ensuite placées en serre.

La notation est faite au bout de 7 jours en estimant la sévérité de la maladie (la surface foliaire infectée) en utilisant l'échelle de Notteghem *et al.* (1980) (Tableau 1) et l'incidence de

la maladie (nombre de feuilles infectées par traitement). Le coefficient d'infection est calculé en multipliant l'incidence par la sévérité (Loegering 1959). Chaque traitement fait l'objet de deux répétitions, avec 12 plantes par pot. Les pots sont disposés en bloc aléatoire.

Les résultats sont analysés statistiquement selon le test L.S.D.

Tableau 1. Echelle de notation de Notteghem *et al.* (1980)

Note	% SFM*
0	0
1	0,05
2	0,5
3	1,5
4	3,5
5	7,5
6	17,5
7	37,5
8	62,5
9	87,5

*SFM = Surface foliaire malade

Résultats et discussion

Les résultats rapportés sur le tableau 1 montrent que l'inoculation simultanée des feuilles du riz avec l'antagoniste et le parasite entraîne une réduction importante aussi bien du nombre de feuilles infectées que de la sévérité de la maladie et donc du coefficient d'infection. En effet, le nombre de feuilles infectées est très élevé pour les plantes inoculées uniquement avec *Pyricularia oryzae* et il est de l'ordre de 52. Ce nombre diminue quand les plantes sont inoculées simultanément par l'agent pathogène et l'antagoniste (il varie de 15 à 25).

De même, on note que la sévérité de la maladie chez les plantes inoculées seulement par le pathogène est plus élevée que celle notée chez les plantes inoculées simultanément avec les antagonistes et le pathogène.

La réduction la plus importante de la pyriculariose est obtenue avec *T. harzianum* et *T. viride* 3, qui provoquent des pourcentages d'inhibition de 88 %. *T. viride* 2 et *T. viride* 1 inhibent également la maladie à un taux de 80 %. De même, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 71 % pour *T. orsan* et *T. harzianum* 20.

Il ressort de ces résultats que, quelque soit l'espèce antagoniste utilisée pour l'inoculation des plantes du riz, l'expression de la maladie est fortement réduite.

Il est difficile de circonscrire *in vivo* les modalités d'action dans les phénomènes d'antagonisme, parce que l'importance relative des mécanismes peut varier avec les conditions environnementales et le développement de l'agent pathogène au sein de la microflore existante dans la phyllosphère. Peng et Sutton (1991) ont noté que cette activité est aussi dépendante de l'espèce de la plante hôte. Toutefois, la majorité des auteurs pensent que ce sont les mêmes

modalités révélées *in vitro* qui sont mises en jeu (Fokkema 1984 ; Cullen et Andrews 1985 ; et Dick *et al.* 1992).

Tableau 2. Analyse de la variance des réductions de l'incidence et de la sévérité de la pyriculariose sur les plantes de riz inoculées avec les différents antagonistes et *P. oryzae*

	Source de variation	ddl	S.C.E	C.M	F observée	Pr > F
Fk1	Isolat	5	0,0877	0,0175	72,52	0,0001
	Erreur	6	0,0015	0,0002		

Tableau 3. Efficacité des antagonistes sur la diminution de l'incidence et de la sévérité de la pyriculariose.

Isolats	Incidence	Sévérité	Coefficient d'infection	Réduction (%)
<i>T. harzianum</i>	15	1,34	20,1	88,1a
<i>T. viride 2</i>	16	2,02	32,32	80,8b
<i>T. viride 1</i>	21	1,63	34,23	79,74b
<i>T. orsan</i>	21	2,27	47,67	71,79c
<i>T. viride 3</i>	15	1,4	21	87,57a
<i>T.harzianum20</i>	25	1,97	49,25	70,85c
<i>P. oryzae</i>	52	3,25	169	0

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

Conclusion

Il est clair que le contrôle biologique des maladies dépend de l'abilité de l'agent antagoniste à entraver les processus d'infection et de croissance du germe pathogène. Cette activité antagoniste est aussi dépendante des facteurs biotiques et abiotiques qui font de l'application des organismes antagonistes pour lutter contre les maladies foliaires une réelle problématique. En effet, l'efficacité de la lutte biologique reste dépendante de l'aptitude du germe antagoniste introduit à se maintenir dans son nouveau habitat (Andrews 1992).

Nos résultats montrent que l'inoculation des feuilles de riz par les *Trichoderma* entraîne une forte réduction de la pyriculariose. Ceci confirme les résultats de certains travaux qui ont montré que les pathogènes foliaires sont contrôlés avec succès par *Trichoderma spp.* En présence de *T. harzianum* et de *T. viride 3*, la réduction de *P. oryzae* est de l'ordre de 88 %. Un traitement préventif 24 heures avant l'inoculation permettrait peut être de donner des résultats encore meilleurs. L'inoculation simultanée des feuilles du riz avec les champignons antagonistes et pathogènes avait surtout pour but de pousser au maximum le criblage des germes antagonistes.

Références bibliographiques

- Akai S. et Kuramoto T. (1968). Micro-organisms existing on leaves of rice plants and the occurrence of brown leaf spot. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **34** : 313-316.
- Andrews J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **30** : 603-635.
- Biles C.L. et Hill J. P. (1988). Effect of *Trichoderma harzianum* on sporulation of *Cochliobolus sativus* on excised wheat seedling leaves. *Phytopathol.*, **78** : 656-659.
- Bisiach M., Minervini G., Vercesi A. et Zerbetto F. (1985). Six years of experimental trials on biological control against grapevine grey mould. Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia, Università di Torino, **9** : 285-297.
- Blakeman J. P. et Fokkema N. J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **20** : 167-192.
- Cullen D. J. et Andrews J. H. (1985). Epiphytic microbes as biological control agents. In T. Kosuge E. W. Nester (eds.) : Plant microbe interactions. Molecular and genetic perspectives, (1) : 381-399. Macmillan Publishing Company, New York.
- Dik D. J., Fokkema N. J. et Van Pelt J. A. (1992). Influence of climate and nutritional factors on yeast population dynamics in the phyllosphere of wheat. *Microb. Ecol.*, **23** : 41-52.
- Dubos B., Bulit J., Bugaret Y. et Verdu D. (1978). Possibilités d'utilisation du *Trichoderma viride* Pers. comme moyen biologique de lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pers.) et l'excoriose (*Phomopsis viticola* Sacc.) de la vigne. Comptes rendus des séances de l'Académie d'agriculture de France, **64** : 1159-1168.
- Dubos B. et Bulir J. (1981). Filamentous fungi as biocontrol agent on aerial plant surfaces. In Blackeman J. P. (eds.) : Microbial Ecology of the Phylloplane, pages : 353-367. Academic Press, London.
- Dubos B., Jaillout F. et Bulit J. (1982a). Protection du vignoble contre la pourriture grise : les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. *Les colloques de l'INRA* **11** : 205-219.
- Dubos B., Jaillout F. et Bulit J. (1982b). L'antagonisme microbien dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne. *EPPO Bulletin*, **12** : 171-175.
- Dubos B., Roudet J., Bulit J. et Bugaret Y. (1983). L'utilisation du *Trichoderma harzianum* Rifai dans la pratique viticole pour lutter contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pers.). *Les Colloques de l'INRA* **18** : 289-296.
- Elad Y., Köhl J. et Fokkema N. J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *Euro. J. Plant Pathol.*, **100** : 315-336.
- 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. améli. prod. agr. Milieu aride*, **7** : 231-240.
- Fleming R. A. (1980). The potential for control of cereal rust by natural enemies. *Theor. Popul. Biol.*, **18** : 374-395.
- Fokkema N.J. (1978). Fungal antagonism in the phyllosphere. *Ann. appl. Biol.*, **89** : 115-119.
- Fokkema N. J. (1984). Competition for endogenous and exogenous nutrients between *Sporobolomyces reus* and *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Bot.*, **62** : 2463-2468.
- Freeman T. E. (1981). Use of conidial fungi in biological control. In Cole G. T. et Kendrick B. (eds.) : *Biology of conidial fungi*, **2** : 143-165. Academic Press, New York.
- Grosclaude C. (1970). Premiers essais de protection biologique des blessures de taille vis-à-vis du *Chondrostereum purpureum* Pers. *Annales de phytopathologie*, **2** : 507-516.

- Gullino M.L. et Garibaldi A. (1983). Situation actuelle et perspectives d'avenir de la lutte biologique et intégrée contre la pourriture grise de la vigne en Italie. *Les colloques de l'INRA*, **18** : 91-97.
- Gullino M.L., Mezzalama M. et Garibaldi A. (1985). Biological and integrated control of *Botrytis cinerea* in Italy : Experimental results and problems. Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia, Università di Torino, **9** : 299-308.
- Lockwood J.L. (1981). Exploitation competition. In Wicklow D. T. et Carrol G. C. (eds.). The Fungal Community its Organisation and Role in the Ecosystem. *Mycology series*, **2** : 319-249. Marcel Dekker Inc., New York.
- Loegering W.D. (1959). Method for recording cereals rust data. Washington, International Spring Wheat Rust Nursey, 1959, USDA.
- Macauley J.B. et Waid S.J. (1981). Fungal production of leaf surfaces. In Wicklow T. D. et Carrol G. C. (eds.) : The fungal community its organisation and role in the ecosystem. *Mycology series*, **2**: 501-531. Marcel Dekker Inc., New York.
- Melgarejo P., Carrillo R. et Sagasta E.M. (1985). *Mycoflora* of peach twigs and its possible significance in biological control of *Monilia laxa*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **85** : 313-318.
- Notteghem J.L., Anriatempo G.M., Chatel M. et Dechanet R. (1980). Techniques utilisées pour la sélection de variétés de riz possédant la résistance horizontale à la pyriculariose. *Ann. phytopathol.*, **12** (3) : 199-226.
- Peng G. et Sutton J.C. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can. J. Plant Pathol.*, **13** : 247-257.
- Whipps J.M. (1992). Status of biological disease control in horticulture. *Biocontrol Science Technol.*, **2** : 3-24.