Etude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la tomate

Hmouni A.[1], Massoui M.[2] et Douira A. M.[1]
[1] Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc
[2] Laboratoire de Chimie des Agro-ressources, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

Résumé

Dans la perspective de mettre au point une méthode de lutte biologique basée sur l'antagonisme microbien, onze isolats de Trichoderma spp. et trois isolats de Gliocladium spp., d'origine écologique et géographique diverses, ont été mis en confrontation avec Botrytis cinerea, agent causal de la pourriture grise de la tomate. Comparés aux Gliocladium, les Trichoderma ont présenté le potentiel d'antagonisme le plus élevé avec des pourcentages d'inhibition qui varient de 32.8 % à 81 %.

L'étude des mécanismes d'antagonisme mis en jeu dans la relation antagoniste a révélé l'aptitude des Trichoderma et des Gliocladium à agir par antibiose en libérant des substances volatiles actives sur la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition qui atteint 48 % pour les Trichoderma et ne dépasse pas les 8 % pour les Gliocladium. Les substances libérées par les Trichoderma réduisent les pourcentages de germination à 18 %.

Les Trichoderma et les Gliocladium libèrent aussi des substances diffusibles inhibitrices de la croissance mycélienne avec des pourcentages d'inhibition qui peuvent atteindre respectivement 41 % et 52 %. La germination conidienne est complètement inhibée par les substances diffusibles des Trichoderma. En outre, les observations microscopiques ont révélé le comportement parasitaire des isolats de Trichoderma à l'égard des hyphes et des spores de B. cinerea.

Sur des feuilles de tomate détachées, l'application des isolats testés a permis de réduire l'indice d'attaque de la pourriture à 1.7 en présence de Trichoderma et 1.2 en présence de Gliocladium alors qu'il est de 4,77 pour le témoin.

Mots clés : Tomate, pourriture grise, *Botrytis cinerea*, lutte biologique, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., antagonisme, antibiose, mycoparasitisme

Abstract : Study of antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. against *Botrytis cinerea* : causal agent of tomato grey mould

To improve a biocontrol method of grey mould based on antagonistic activities of certain organisms, eleven strains of Trichoderma spp. and three isolate of we have isolated some fungi from different geographical and ecological regions. Confronted to the pathogen, Trichoderma spp. showed the highest level of inhibition of Botrytis cinerea mycelial growth, in comparison to Gliocladium spp., the quantum of inhibition ranged from 32.8 % to 81 %.

Trichoderma and Gliocladium species were able to produce volatile metabolites which inhibited the mycelial growth of B. cinerea respectively to 48 % and 8 %. These volatile substances reduced the conidial germination of the pathogen to 18 % for Trichoderma isolates.

The tested fungi produced also inhibitory metabolites which diffused through the medium and inhibited mycelial growth of B. cinerea to 41 % for Trichoderma spp. isolates and to 52 % for Gliocladium spp. isolates. Conidial germination was completely inhibited by diffusible substances secreted by certain isolates of Trichoderma spp.

All the Trichoderma isolates were found to be hyperparasite of hyphae and conidia of B. cinerea.

The application of the tested fungi on tomato leaves reduced the severity index of grey mould to 1.7 and 1.2 respectively in the presence of Trichoderma and Gliocladium isolates while this index was 4.77 for the control.

Key words : Tomato, grey mould, *Botrytis cinerea*, biological control, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., antagonism, antibiosis, mycoparasitism

ملخص : دراسة نشاط تضاد طريكوديرما (*Trichoderma* spp) و جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp) اتجاه فطر بوتريس سينيريا (*Botrytis cinerea*) المتسبب في مرض التعفن الرمادي للطماطم

حموني ع.[1]، مسوي م.[2] و ادويرة ع.[1]

[1] مختبر دراسة و وقاية النباتات، كلية العلوم، جامعة ابن طفيل، القنيطرة، المغرب

[2] كلية العلوم، جامعة ابن طفيل، القنيطرة، المغرب

في أفق تطوير طريقة مقاومة بيولوجية تعتمد على التضاد الميكروبي ضد مرض التعفن الرمادي للطماطم الناتج عن الإصابة بفطر بوتريتيس سينيريا (*Botrytis cinerea*) تم عزل إحدى عشر عزلة من فطر طريكوديرما (*Trichoderma* spp) و ثلاث عزلات من جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp) ثم مواجهتها بالفطر الطفيلي حيث أظهرت عزلات طريكوديرما أعلى طاقة تضاد بنسب كبح مائوية تتراوح بين 32,8 % و 31 %.

أظهرت دراسة الميكانزمات العاملة في علاقة التضاد قدرة العزلات المنتقاة على إطلاق مواد متبخرة فاعلة على نمو مشيج البوتريتيس بنسبة كبح تصل إلى 48 % بالنسبة لطريكوديرما (*Trichoderma* spp) و لا تتجاوز 8 % بالنسبة لعزلات جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp) هذه المواد المتبخرة تنقص أيضا من نسبة إنتاش البواغ إلى 48 % بالنسبة لطريكوديرما (*Trichoderma* spp).

من جهة أخرى أبانت عزلات طريكوديرما (Trichoderma spp) و جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp) عن قدراتها في إفراز مواد غير متبخرة قادرة على كبح نمو مشيج الفطر الطفيلي بنسب مائوية تصل بالتوالي إلى 41 % و 52 % كما أوقفت إنتاش الأبواغ كليا بالنسبة لعزلات طريكوديرما (*Trichoderma* spp) أظهرت الملاحظات المجهرية التعامل الطفيلي لعزلات طريكوديرما (*Trichoderma* spp) تجاه مشيج و أبواغ الفطر الطفيلي بوتريتيس (*Botrytis cinerea*) .

مكنت معالجة أوراق الطماطم بالعزلات المختبرة من تخفيض مؤشر هجوم التعفن إلى 1,7 في وجود طريكوديرما(*Trichoderma* spp) و 1,2 في وجود جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp) في حين وصل المؤشر إلى 4,77 بالنسبة للشاهد.

الكلمات المفتاحية : الطماطم، التعفن الرمادي، بوتريتيس سينيريا (*Botrytis cinerea*)، المقاومة البيولوجية طريكوديرما (*Trichoderma* spp)، جليوكلاديوم (*Gliocladium* spp)، التضاد، مواد متبخرة، مواد غير متبخرة

Introduction

La pourriture grise est une maladie foliaire grave qui sévit particulièrement sous l'ambiance humide des serres et elle a pour agent causal le *Botrytis cinerea* Pers. Ce champignon polyphage et ubiquiste constitue un problème pathologique persistant capable de ravager à tout instant un grand nombre de cultures (tomate, vigne, fraisier...) (Agrios, 1988).

Actuellement, la lutte contre la pourriture grise due au *Botrytis cinerea* demeure difficile et le contrôle, même partiel, de ce pathogène ne se fait souvent que par l'utilisation répétée de fongicides. Cependant, malgré la diversité des produits utilisés, des cas de résistance à divers produits ont été détectés dans différents pays : France (Leroux et Gredt, 1982), Maroc (Besri et Diatta, 1985), Israël (Elad et *al.*, 1988 ; Katan et al., 1989), Etats Unis d'Amérique (Moorman et Lease, 1992 ; Johnson et *al.*, 1994), Tunisie (Hmouni et *al.*, 1996).

Outre le phénomène de résistance, la chimiothérapie a révélé certains effets néfastes qui ont remis en cause l'avenir de la lutte chimique (Corbaz, 1990 ; Dewaard et *al.*, 1993). Cette situation a conduit les chercheurs à développer d'autres méthodes de lutte telle la lutte biologique (James et *al.*, 1993). En effet, nombreux sont les travaux faisant état des possibilités de lutte biologique contre cette maladie à l'aide d'organismes antagonistes (Tronsmo, 1980 ; Janisiewicz et Roitman, 1988 ; Peng et Sutton, 1991 ; Roberts, 1990). L'application pratique d'agents de biocontrôle contre la pourriture grise, comme pour presque toutes les maladies foliaires, n'a pas donné les résultats escomptés (Andrews, 1992). Ceci est probablement lié à la méconnaissance des modes d'action et des facteurs externes influençant l'efficacité de ces agents (Blakeman et Fokkema, 1982).

La connaissance du mode d'action d'un agent antagoniste représente une étape importante dans le cadre de la mise au point d'une méthode de lutte fondée sur l'antagonisme microbien (Cook et Baker, 1983 ; Andrews, 1990 ; Baker, 1991 ; Whipps, 1992b ; Elad, 1993a). Parmi les dif-

férents processus mis en jeu dans la relation antagoniste, ce sont les phénomènes de compétition, de parasitisme et d'antibiose qui ont été le plus souvent étudiés (Singh et Faull, 1988 ; Whipps et *al.*,1988 ; Baker, 1991).

Dans la perspective de mettre au point une méthode de lutte biologique contre la pourriture grise basée sur l'antagonisme microbien, nous avons cherché à isoler des germes susceptibles d'inhiber le développement de *Botrytis cinerea* et nous avons étudié leurs modes d'action dans la relation antagoniste.

Matériel et Méthodes

Agent pathogène

L'isolat de *Botrytis cinerea* utilisé dans cette étude a été récolté sur une plante de tomate (variété gabriella) cultivée sous serre dans la région de Tiflelt. Sur la tige, l'infection de la plante s'est manifestée par l'apparition de lésions concentriques au niveau des nœuds. Sur les fruits, l'infection commence d'ordinaire à la pointe florale puis se développe pour former une couche de mycélium grisâtre et enfin une pourriture molle et aqueuse.

Isolement et identification des champignons antagonistes

Dans une première partie de notre travail, nous avons procédé à l'isolement des germes fongiques, à forte activité antagoniste, susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre la pourriture grise de la tomate.

L'isolement des germes antagonistes a été effectué à partir d'organes végétaux de chêne liège (*Quercus suber*), de chêne zène (*Quercus faginea*), d'Acacia et de riz (*Oryza sativa*). La technique utilisée est celle des suspensions dilutions couramment utilisée pour l'énumération des organismes du sol (Rappilly, 1968 ; Dhingra et Sinclair, 1987). Des fragments de feuilles, de bois ou encore des graines de riz sont placés dans 20 ml d'eau distillée stérile. Après agitation au vortex pendant 2 mn, nous avons procédé à une série de dilutions. Des volumes de 0,2 ml de chaque dilution ont été mis dans des boîtes de Pétri à raison de dix boîtes par dilution par échantillon utilisé. L'isolement est réalisé sur le milieu de culture PDA additionné de streptomycine ou de chloramphénicol pour éviter le développement des bactéries. L'isolat TVC de *Trichoderma* a été directement isolé sur un carpophore de Basidiomycètes. Les boîtes sont ensuite incubées à 22 °C et observées quotidiennement sous loupe binoculaire. L'identification des germes est réalisée sous microscope optique.

Les isolats de *Trichoderma* TV1, TV2 isolés respectivement de feuilles de tomates saines ou infectées par la pourriture grise et l'isolat TH20 isolé sur racine de navet, préalablement testés sur *B. cinerea* en Tunisie, ont été utilisés à titre comparatif (Hmouni et *al.*, 1997). Au même titre, nous avons testé le pouvoir antagoniste de certains isolats de *Trichoderma* et de *Gliocladium* gracieusement fournis par le laboratoire de Biochimie et de Phytopathologie de Paris

VI (France). L'isolement a été aussi réalisé, selon le même procédé, à partir du sol de Maamora.

Seuls les isolats appartenant aux genres *Trichoderma* et *Gliocladium* seront utilisés pour notre étude vu leur efficacité dans la lutte contre un grand nombre de parasites aussi bien foliaires que racinaires (Papavizas, 1985). De plus, nous n'avons retenu qu'un seul isolat antagoniste par échantillon végétal utilisé. Nous avons tenu à tester des isolats fongiques d'origines écologique et même géographique différentes et tirer au maximum profit de la diversité biologique de ces champignons antagonistes

Les *Trichoderma* isolés se caractérisent par des conidiophores branchés irrégulièrement, des phialides courtes, globuleuses ou ovoïdes et des phialospores vertes (Rifai, 1969). Alors que les *Gliocladium* se caractérisent par des hyphes septés et hyalins, des conidiophores plus ou moins dressés et branchés ressemblant à *Verticillium* ou à *Penicillium*, des phialides en forme de bouteilles et des conidies, asymétriques, naissant dans des sommets gluants (Morquer et *al.*, 1963).

Mise en évidence de l'activité antagoniste.

Disposant d'une série d'isolats fongiques, et afin de tester leur pouvoir antagoniste à l'égard de *B. cinerea*, nous avons utilisé le test de confrontation mycélienne en boîtes de Pétri. A l'issue de ce test, n'ont été retenus que les germes exerçant une activité antagoniste jugée significative. Ils feront l'objet d'études plus approfondies.

Le test consiste à placer dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre contenant un milieu PDA, de façon diamétralement opposée, un disque mycélien de *B. cinerea* et un autre de l'antagoniste à tester. Les disques de 5 mm de diamètre, prélevés de culture de même âge, sont déposés à environ 30 mm de distance l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte.

Les boîtes sont incubées à une température de 22 °C pendant une durée de 4 jours et le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale est calculé selon la formule utilisée par Fokkema (1973) et Sy (1976) :

$$M\ (\%) = 100 \times (M0 - M1) / M0$$

où M0 est la croissance normale exprimée en mm et M1 représente la croissance mycélienne influencée (mm).

Etude in vitro des mécanismes d'antagonisme

L'antibiose

Substances volatiles

Effet sur la croissance mycélienne

L'effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne a été évalué selon la méthode de Dennis et Webster (1971b) modifiée par Nelson et Powlson (1988). Un disque mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé des colonies de *Trichoderma* et de *Gliocladium* âgées respectivement de 4 et 7 jours, est transféré à l'aide d'un emporte-pièce au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Une deuxième boîte contenant du PDA non inoculé est renversée sur cette dernière et lui servira de couvercle. Les deux boîtes sont scellées de manière hermétique à l'aide de parafilm. Après 2 jours d'incubation, à une température de 22°C, les boîtes " couvercles " sont enlevées et rapidement inoculées par des disques mycéliens de *B. cinerea* de 5 mm de diamètre et âgés de 3 jours puis elles sont remises au dessus des boîtes contenant les antagonistes comme il est décrit précédemment. Des boîtes inoculées par *B. cinerea* puis retournées sur des boîtes vides (non inoculées par les antagonistes) serviront de témoins.

La croissance radiale des hyphes du parasite est mesurée après 4 jours d'incubation et le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au diamètre de la colonie du témoin

$$I\,(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

où A est le diamètre moyen des colonies témoins et B est le diamètre moyen des colonies traitées.

Effet sur la germination des spores

En vue de déterminer l'effet des substances volatiles sur la germination conidienne de *B. cinerea*, les boîtes " couvercles " contiennent cette fois une mince couche de milieu MEA (Extrait de malt 20 g, Agar 15 g, eau distillée q.s.p. 1000 ml) pour faciliter le comptage des spores. Comme la germination des spores de *B. cinerea* est fonction de l'âge de la culture ainsi que de la concentration des spores (Rhouma, 1995), des suspensions sporales âgées de 15 jours et de concentration 10^6 spores/ml ont été utilisées pour ce test. Un volume de 0.5 ml de cette suspension est étalé dans chaque boîte.

La germination des spores est observée au microscope après une période d'incubation de 16 h à 22 °C. Une spore est considérée germée si la longueur du tube germinatif est supérieure au plus petit diamètre de la spore (Besri et Diatta, 1985). Environ 300 spores sont observées par isolat . L'expérience a été répétée deux fois.

Substances diffusibles

Effet sur la croissance mycélienne

Nous avons utilisé à cette fin la technique de Dennis et Webster (1971a).

Des membranes de Cellophane stériles, préalablement découpées en disques de 8 cm de diamètre, sont placées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Sur ces membranes, on a déposé un disque mycélien de l'antagoniste à tester, prélevé d'une culture âgée de 4 jours pour les *Trichoderma* et de 7 jours pour les *Gliocladium* vu la différence de leur vitesse de croissance. Après incubation à 22 °C pendant 48 h, les colonies d'antagonistes sont enlevées en prélevant les membranes de Cellophane sous-jacentes. Ces même boîtes sont ensuite inoculées par des disques mycéliens de *B. cinerea* prélevés d'une jeune culture. Des disques similaires déposés dans des boîtes vierges (non inoculées) serviront de témoin. Les boîtes sont incubées à 22 °C pendant une durée de 4 jours. Le diamètre des colonies est ensuite mesuré et le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin.

Effet sur la germination des spores

Afin d'étudier l'effet des substances diffusibles sur la germination conidienne, nous avons utilisé la même technique des membranes de Cellophane. Des suspensions sporales de *B. cinerea* sont alors mises à germer sur le milieu qui a servi au développement des agents antagonistes. Le milieu utilisé, la durée d'incubation, ainsi que la concentration des spores utilisée sont les mêmes que pour le test d'effet des substances volatiles sur la germination conidienne.

Le mycoparasitisme

La mise en évidence de l'activité mycoparasitaire des *Trichodema* et des *Gliocladium* vis à vis des spores de *B. cinerea*, a été faite selon la technique de Dennis et Webster (1971a) utilisée dans le test des substances diffusibles modifiée dans notre laboratoire. La durée d'incubation est de 3 à 4 jours, ce qui permet au mycélium de l'agent antagoniste de déborder les membranes de Cellophane et de coloniser le pourtour des boîtes. Les membranes de Cellophane sont alors enlevées et chaque boîte reçoit 0.5 ml d'une suspension sporale de *B. cinerea* de concentration 10^6 spores/ml. Les boîtes sont ensuite incubées à 22 °C pendant 24 h puis observées sous microscope optique. Pour chaque antagoniste l'observation a concerné cinq boîtes et a été répétée deux fois.

La germination des spores de *B. cinerea* étant partiellement inhibée par les substances diffusibles libérées dans le milieu, cela permet une bonne observation de l'interaction hyphe de *Trichoderma* - spores de *B. cinerea*.

L'étude de l'interaction hyphale *B. cinerea* - *Trichoderma* et *B. cinerea* - *Gliocladium* est réalisée en mettant en confrontation mycélienne les deux protagonistes sur milieu MEA coulé en couche mince. Après un temps d'incubation suffisant durant lequel les deux champignons sont en contact, la zone d'interaction est observée au microscope photonique et photographiée.

Bioessai

Dans ce test, nous avons essayé d'évaluer le pouvoir antagoniste des *Trichoderma* à l'égard de *B. cinerea*, non plus sur un milieu gélosé, mais sur des feuilles de tomate détachées.

Des feuilles de tomate, collectées sur des plantes âgées de 4 à 5 semaines, sont placées dans des boîtes de Pétri. Chaque boîte contient trois disques de papier buvard constamment imbibés d'eau distillée stérile afin de maintenir au maximum la fraîcheur des feuilles. Les feuilles reçoivent une pulvérisation de suspension sporale de l'agent antagoniste à tester et sont mises à incuber à 22 °C. Vingt quatre heures après, elles sont inoculées par une suspension sporale de *B. cinerea* additionnée de glucose à 0,02 M et de KH_2PO_4 à 0.04 M (Leone et Tonneijck, 1990). L'inoculation est réalisée en déposant 4 à 5 gouttes de cette suspension sporale sur chaque foliole.

La concentration sporale utilisée est de 10^6 spores/ml aussi bien pour les antagonistes que pour le pathogène. Après 4 jours d'incubation à la température de 22 °C, la sévérité des symptômes induits par le pathogène est estimée sous loupe binoculaire en se référant à une échelle de notation de 0 à 5 (Elad et *al.*,1994) : 0 : pas de symptômes ; 1 : 1 à 12 % de la surface foliaire, sous la goutte, sont pourris ; 2 : 13 à 25 % de pourriture ; 3 : 26 à 50 % de pourriture ; 4 : 51 à 100 % de pourriture et 5 : la pourriture s'étend 2 mm au delà de la goutte.

Analyse statistique : les résultats sont transformés (Arcsin) et analysés par le test de Duncan au seuil de 5 %.

Résultats

Isolement et identification des champignons antagonistes

Un grand nombre d'espèces fongiques a été ainsi isolé. On peut citer *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Gliocladium* spp., *Trichoderma* spp. Mais seuls les isolats de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. qui ont fait l'objet de cette étude. L'origine des isolats retenus est indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 . Origine des champignons antagonistes

Isolats	Origine
Gliocladium spp.	
GA	Bois d'Acacia, Maroc.
GFQ	Feuilles de Quercus suber, forêt de Maamora, Maroc.
G 1	Lab. de Biochimie et de Phytopathologie, Paris VI, France.
Trichoderma spp.	
TV 1	Feuilles de tomates saines, INRAT, Tunisie.
TV 2	Feuilles de tomates infectées par *B. cinerea*, INRAT, Tunisie.
TH	Lab. de Biochimie et de Phytopathologie, Paris VI, France.
TH 20	Racines de navet, INRAT, Tunisie.
TBP	Bois de Quercus faginea, forêt Jaaba, Ifrane, Maroc.
TFQ	Feuilles de Quercus suber, forêt de Maamora, Maroc.
TVC	Carpophore de Basidiomycètes, Maroc.
I 2	Bois d'Accacia, Maroc.
T 3	Graines de riz , Maroc.
TO	Lab. de Biochimie et de Phytopathologie, Paris VI, France.
U 5	Mycothèque du Lab. de Botanique, Fac. Sc. Ibn Tofail, Maroc.

Mise en évidence de l'activité antagoniste

Le tableau 2 résume les résultats de la confrontation mycélienne. Tous les isolats antagonistes testés ont inhibé la croissance mycélienne de *B. cinerea*, mais à des degrés différents. Comparés aux *Gliocladium*, les *Trichoderma* se sont montrés les plus efficaces avec des pourcentages d'inhibition qui varient de 32.8 % pour TV 2 à 81 % pour T 3. En présence des *Gliocladium*, ce taux d'inhibition n'a pas dépassé les 20 %. Tous les isolats antagonistes ont présenté une action de contact. Outre cela, les *Trichoderma* ont présenté une action à distance. Après un temps d'incubation prolongé, les *Trichoderma* enveloppent la colonie de *B. cinerea* et finissent par l'envahir.

Etude in vitro des mécanismes d'antagonisme

L'antibiose

Substances volatiles

Le tableau 2 montre l'action des substances volatiles sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*. Tous les isolats de *Trichoderma* testés ont libéré effectivement des substances volatiles inhibant la croissance mycélienne du parasite. Le degré de cette inhibition varie selon l'isolat testé. En effet, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea* est de l'ordre de 48,8 % pour l'isolat TO. En présence de l'isolat TBP de *Trichoderma* ainsi que

pour les *Gliocladium*, le pourcentage d'inhibition n'a pas dépassé les 8 %. En présence des autres isolats de *Trichoderma*, nous avons noté des taux d'inhibition intermédiaires.

Les résultats relatifs à l'effet de ces substances sur la germination sporale de *B. cinerea* montrent que le processus de germination n'est pas entravé par l'activité des trois isolats de *Gliocladium* spp. En effet, Le pourcentage de germination noté en présence de ces isolats est similaire à celui du témoin.

En présence des *Trichoderma*, la germination des spores de *B. cinerea* est plus ou moins affectée par les substances dégagées par les différents isolats. Ainsi, moins de 20 % des spores ont germé en présence de TFQ, TVC, ou T3 alors que ce pourcentage de germination a dépassé les 70 % pour TH, TH20, TV2 et TV1. En présence des autres isolats, des pourcentages intermédiaires ont été notés. De même, une réduction de la longueur du tube germinatif des spores de *B. cinerea* en comparaison avec le témoin a été observée.

Substances diffusibles

Le tableau 2 représente l'effet des substances diffusibles sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*. Il montre que les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, en présence des *Gliocladium*, varient de 0 % pour GA à 52.7 % pour G1. En présence des *Trichoderma*, les degrés d'inhibition varient de 18.88 % pour TVC à 41 % pour TH20. Tous les isolats de *Trichoderma* ont libéré dans le milieu de culture des substances inhibitrices de la croissance mycélienne de *B. cinerea*, mais à des degrés différents.

Tableau 2. Action de l'activité antagonistes des *Trichoderma* spp. et des *Gliocladium* spp. sur la croissance mycélienne, sur la germination conidienne et sur l'infection des feuilles de tomates par *B. cinerea*

	Confrontation mycélienne		Substances volatiles		Substances diffusibles		Bioessai
Isolats	Inhibition de la croissance mycélienne (%)	Remarques	Inhibition de la croissance mycélienne (%)	Germination conidienne (%)	Inhibition de la croissance mycélienne (%)	Germination conidienne (%)	Indices d'attaque de feuilles
Gliocladium spp.							
G 1	16 e	Action de contact	7.26 bc	95 h	52.7 a	75 e	1.2
GFQ`	18 de	Idem	3.77 c	93 h	12.2 e	92 f	2.07
GA	20 de	Idem	6.97 bc	95 h	0 f	92 f	2.2
Trichoderma spp.							
TH 20	81 a	Actions de contact et à distance	38.4 a	74 f	41.4 ab	5 bc	1.71
TBP	77.6 a	Idem	7.8 bc	65 e	38.3 abC	10 d	2.2
TH	75 ab	Idem	43 a	72 f	34.4 abcd	3 b	2.87
TV 1	69.6 abc	Idem	28.3 ab	82 g	34.4 abcd	6.5 c	2.44
T 3	66 abc	Idem	43.8 a	19 a	33.3 bcd	0 a	3.28
U 5	63.2 abc	Idem	46.9 a	27 b	24.4 bcd	0 a	2.2
TO	63 abc	Idem	48.8 a	34 c	23 bcd	0 a	3
TV 2	56 bc	Idem	26.4 ab	74 f	32.7 bcd	7.2 cd	2.4

TFQ	57 bc	Idem	24.1 ab	18 a	31.5 bcd	0 a	1.86
I 2	52 cf	dem	26.7 ab	49 d	22.2 cd	0 a	3
TVC	32.8 d	Idem	12.8 bc	18 a	18.9 de	0 a	2.8
Botrytis cinerea	--	--	--	96 h	--	98 g	4.77

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test Duncan).

La germination conidienne de *B. cinerea* est inhibée de façon plus ou moins intense par les substances diffusibles libérées par les différents antagonistes. Les *Trichoderma* se sont montrés les plus efficaces. Deux groupes d'isolats peuvent être distingués. Le premier groupe constitué des isolats TFQ, TVC, I2, T3, TO et U5 inhibant totalement la germination des spores de *B. cinerea*. Chez le deuxième groupe, constitué par les autres isolats, le taux de germination varie entre 3 % pour TH et 10 % pour TBP alors qu'il est de 98 % pour le témoin.

En présence des isolats de *Gliocladium*, les pourcentages de germination des spores du parasite demeurent très élevés et varient de 75 % pour G1 à 92 % pour GFQ et GA.

Le mycoparasitisme

Les observations au microscope photonique révèlent le comportement parasitaire des isolats de *Trichoderma* testés vis-à-vis de *B. cinerea*. En effet, tous les isolats testés ont présenté le même comportement aussi bien à l'égard des spores que des hyphes de *B. cinerea*. Il semble qu'il existe un certain tropisme qui mène les hyphes de *Trichoderma* à l'encontre des spores du parasite. En effet, nous avons remarqué que les hyphes de *Trichoderma* émettent des diverticules qui se dirigent vers les spores de *B. cinerea*. De plus, on a noté une forte inhibition de la germination des spores situées à proximité des hyphes des antagonistes, même en absence de tout contact. Ces spores sont incapables de germer même après 24h d'incubation.

Quant à l'interaction hyphale *Trichoderma - B. cinerea*, nous avons constaté un enroulement des hyphes de *Trichoderma* aussi bien autour des hyphes que des spores. Des cas de pénétration ont aussi été observés. Nous avons pu observer une forte vacuolisation du contenu cytoplasmique des hyphes de *B. cinerea* au contact des hyphes de *Trichoderma*.

En présence des isolats GFQ et GA de *Gliocladium*, nous n'avons pas pu démontrer clairement l'existence d'un comportement parasitaire de *Gliocladium* à l'égard des spores et des hyphes de *B. cinerea*. l'isolat G 1 a révélé plus nettement ce comportement qui demeure difficile à photographier. Comme pour les *Trichoderma*, les *Gliocladium* provoquent une vacuolisation du mycélium de *B. cinerea*, parfois on note une fuite du contenu cytoplasmique.

Bioessai

Les résultats du bioessai sur feuilles de tomate détachées sont présentés dans le tableau 2. L'application de tous les isolats antagonistes testés a permis de réduire l'incidence de la pourriture grise.

Les isolats TH de *Trichoderma* et G1 de *Gliocladium* se sont révélés les antagonistes les plus efficaces à protéger les feuilles avec des indices d'attaque respectifs de 1.71 et 1.2. Alors que sur des feuilles inoculées par le *Botrytis* seul, l'indice d'attaque est de 4.77. Les autres isolats de *Trichoderma*. et de *Gliocladium* ont pu réduire eux aussi l'incidence de la maladie avec des indices d'attaque variant de 1.86 pour l'isolat TFQ à 3.28 pour l'isolat T3.

Discussion et conclusion

Le contrôle biologique des maladies des plantes est un phénomène couramment rencontré dans la nature. En effet, les agents pathogènes sont constamment réprimés par l'activité antagoniste de certains germes saprophytes (Fokkema, 1983 ; Agrios, 1988). L'isolement de ces organismes constitue donc la première étape de tout programme de lutte biologique (Andrews, 1985 ; Andrews, 1990). Au cours de ce travail, un intérêt particulier est porté aux genres *Trichoderma* et *Gliocladium*. Ceux-ci constituent en effet d'excellents promoteurs de lutte biologique contre de nombreux champignons phytopathogènes (Howell et Stipanovic, 1983 ; Sivan et al., 1984 ; Papavizas, 1985, Tronsmo, 1986 ; Chet, 1987 ; Dubos, 1987). Après leur isolement et leur purification, les germes sont testés contre *B. cinerea* afin d'évaluer leur potentiel antagoniste. Ainsi, les pourcentages d'inhibition ont varié de 32.8 % à 81 % pour les *Trichoderma* et de 16 % à 20 % pour les *Gliocladium*.

L'utilisation de tout agent de lutte biologique est fondée sur une bonne connaissance des processus mis en jeu par ce dernier lors de son activité antagoniste. Cette dernière est en général la résultante d'un ensemble de mécanismes dont les principaux sont la compétition pour les nutriments et l'espace, l'antibiose et le mycoparasitisme (Campbell, 1989 ; Lepoivre et Semal, 1989 ; Sy et al., 1991 ; Whipps, 1992 b).

Le test de confrontation mycélienne est souvent utilisé pour évaluer l'aptitude des germes antagonistes à la compétition pour l'espace (Mukerji et Garg, 1988). Contrairement aux isolats de *Gliocladium*, les isolats de *Trichoderma* testés présentent un bon pouvoir de compétition. Outre cela, la forme des colonies résultantes de la confrontation mycélienne montre bien la mise en jeu de substances diffusibles.

La compétition est le mode d'action le plus important dans la relation antagoniste, mais son impact est difficile à quantifier. Cette difficulté est liée à la nature des relations qui existent entre les différents mécanismes d'antagonisme qui peuvent agir en synergie ou séparément (Sy et *al.*, 1991). En effet, il est difficile de dissocier l'effet de la compétition de celui de l'antibiose (Papavizas, 1985). Toutefois, il ne faut pas oublier que cette aptitude à la compétition n'exclut pas le pouvoir des *Trichoderma* à agir par antibiose ou par mycoparasitisme. En analysant les interactions qui surviennent entre le couple *B. cinerea*-T. viride, Lamy krafft et Roqubert (1981) ont mis en évidence deux étapes principales dans le déroulement de l'action antagoniste : à une première phase purement fongistatique succède une phase finale qualifiée de fongicide au cours de laquelle le contact prolongé entre les mycéliums antagonistes entraîne la mort de *B. cinerea*.

La phase saprophytique de *B. cinerea* joue un rôle important dans le développement ultérieur de la maladie. L'ampleur de l'affection dépendra en effet de l'inoculum formé durant cette phase. Le maintien de l'inoculum primaire à un niveau bas doit se faire en complétant les mesures prophylactiques d'ordre cultural par l'emploi d'agents antagonistes. L'isolement d'agents antagonistes à haut pouvoir de compétition revêt alors un intérêt particulier dans la lutte contre cette maladie. L'application d'organismes compétiteurs pourrait prévenir le développement de *B. cinerea* dans sa phase saprophytique et par conséquent éviter l'infection de la plante par ce champignon (Blakeman et Broodie, 1977 ; Blakeman, 1985 ; Fokkema, 1992)

Tous les isolats de *Trichoderma* et l'isolat G1 de *Gliocladium* testés sont capables de secréter et libérer dans le milieu des substances volatiles et diffusibles, actives sur la croissance mycélienne, sur la germination conidienne de *B. cinerea* ou sur les deux à la fois.

L'aptitude des *Trichoderma* et des *Gliocladium* à agir par antibiose à l'égard de nombreux champignons phytopathogènes notamment *B. cinerea* a été rapportée par plusieurs auteurs (Dennis et Webster, 1971a et b ; Lamy krafft et Roqubert ; 1981 ; Howell et Stipanovic, 1983 ; Fravel, 1988 ; Nelson et Powelson, 1988 ; Tong-Kwee et Keng, 1990 ; Di Pietro et *al.* 1993). Les substances libérées sont de natures diverses, on peut citer des antibiotiques telles la trichodermine, gliovirine, gliotoxine, l'acétaldehyde, et certaines enzymes hydrolytiques (Dennis et Webster, 1971a et b ; Howell et Sipanovic, 1983 ; Papavizas, 1985, Di Pietro et *al.* 1993). Ces substances agissent en induisant des changements de perméabilité au niveau des membranes de l'hyphe du champignon pathogène. Lewis et Papavizas (1987) ont rapporté, en étudiant l'interaction *Trichoderma* sp.- *Rhizoctonia solani*, que ces substances induisent des changements de perméabilité membranaire entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et par conséquent la mort des hyphes de l'agent pathogène.

La répression de la croissance mycélienne et de la germination conidienne par les différents isolats antagonistes se fait de manière plus ou moins intense selon l'isolat testé et le mode d'action étudié. Ainsi, certains isolats sont plus actifs sur la croissance mycélienne que sur la germination conidienne. D'autres isolats sont plus actifs via la libération des substances volatiles que diffusibles et vice versa. Les différences observées entre isolats illustrent la variabilité des populations naturelles des agents antagonistes et démontrent bien la nécessité d'un tri sévère avant de développer une lutte fondée sur l'antagonisme microbien.

Le mycoparasitisme est un phénomène couramment rencontré entre les différents groupes de champignons, depuis les Phycomycètes les plus simples tels que les Chytridiales jusqu'aux Basidiomycètes les plus évolués (Elad, 1993b). Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Weindling (1932), cité par Elad (1993b), en observant l'activité parasitaire de *Trichoderma lignorum* à l'égard de plusieurs champignons pathogènes à savoir *Rhizoctonia solani, Phytophthora parasitica, Pythium* spp. et *Sclerotium rolfsii*. L'aptitude des espèces du genre *Trichoderma* à agir en mycoparasites à été prouvée par la suite par d'autres travaux (Elad et al., 1982 ; Elad et *al.*, 1983 ; Ridout et al., 1988). Cependant, il faut noter que tous les *Trichoderma* spp. n'ont pas les mêmes potentialités (Artigues et Davet, 1984 ; Tong-Kwee et Keng, 1990).

Les *Trichoderma* retenus pour notre étude se sont révélés capables de parasiter aussi bien les hyphes que les spores de *B. cinerea*. Cette activité parasitaire a été observée quand les protagonistes sont mis en confrontation surtout en milieux pauvres en sucres. Il faut signaler cependant que la mise en évidence d'un tel comportement est fonction des conditions physicochimiques de la confrontation : milieu de culture, température, pH etc (Ridout et al., 1988). Outre cela, les espèces du genre *Trichoderma* sont considérées comme étant des parasites facultatifs (Whipps, 1992a).

La relation parasitaire *Trichoderma*-champignons hôtes s'établit en plusieurs étapes successives (Manocha, 1987 ; Chet, 1990 ; Whipps,1992a ; Elad, 1993b) :

❒ Un chimiotropisme positif qui permet à *Trichoderma* de se développer en direction de son hôte (Boosalis, 1964) ;

❒ Reconaissance : les espèces du genre *Trichoderma* ne s'attaquent qu'à un nombre peu élevé de champignons et présentent donc une certaine spécificité. Ceci laisse penser qu'il existe un mécanisme moléculaire de reconnaissance lié à la présence de lectines (Barak et al.,1985 ; Chet, 1990 ; Elad, 1993b) ;

❒ Attachement : après reconnaissance, les *Trichoderma* spp. s'attachent à leurs hôtes, le plus souvent en s'enroulant autour d'eux (Chet, 1990 ; Elad, 1993b) ;

❒ La pénétration : cette dernière étape de la relation parasitaire se fait par le biais d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader la paroi mycélienne du champignon hôte. Les enzymes mises en jeu sont essentiellement des glucanases et des chitinases (Dubourdieu, 1983 ; Artigue et Davet, 1984 ; Sivan et Chet, 1988 ; Chet, 1990 ; Elad, 1993b).

Dans notre étude de l'interaction hyphale, nous avons remarqué une forte vacuolisation du cytoplasme des hyphes de *B. cinerea*. Ce phénomène est courant et a été rapporté par plusieurs auteurs (Dennis et Webster, 1971c ; Elad et al., 1982 ; Tong-Kwee et Keng, 1990 ; Elad, 1993b).

L'aptitude des souches de *Trichoderma* et de *Gliocladium* à agir en antagonistes, préalablement décelée sur milieu gélosé, s'est confirmée sur feuilles de tomate détachées. En effet, Les isolats testés ont protégé ces feuilles, à degrés différents, contre la pourriture grise.

On peut supposer que les champignons antagonistes, appliqués 24 h auparavant, se sont bien développés pour réduire la quantité des nutriments présents à la surface des feuilles et entrer en compétition pour ceux apportés avec la suspension conidienne (Elad et *al.*,1994). La germination des spores de *B. cinerea* s'est avérée vulnérable à la compétition. Des résultats similaires ont été rapportés par Blakeman et Broodie (1977) et Blakeman (1985) qui ont montré en effet que les spores de ce parasite mises au contact d'organismes fortement compétitifs sont peu ou pas capables de germer.

L'emploi de souches de *Trichoderma* spp. à des fins de lutte contre la pourriture grise, sur différentes plantes hôtes a fait l'objet de plusieurs travaux (Tronsmo, 1980 ; Tronsmo, 1986 ; Nelson et Powlson, 1988 ; Peng et Sutton, 1991 ; Fokkema, 1992 ; Sutton et Peng, 1993). Récemment, un produit biologique antibotrytis, à base de souche de *T. harzianum* améliorée, a été homologué en Israël (Elad et al., 1995). Il serait donc intéressant d'exploiter l'activité antagoniste de nos isolats et de tester le pouvoir protecteur de ces agents en cultures abritées. Il devient, en effet, de plus en plus évident que le développement de la lutte biologique ne repose plus tant sur la découverte de nouveaux agents que sur une compréhension exacte des facteurs biotiques et abiotiques qui influencent leurs activités surtout dans un biotope aussi instable que la phyllosphère.

Références bibliographiques

Agrios, G. 1988. Plant Pathology. Academic Press, New York. 803 pp.

Andrews, J. H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. Pages 31-44 in : Biological Control on the Phylloplane. C. E. Windels et S. E. Lindow, eds. APS Press. St Paul, Minnesota.

Andrews, J. H. 1990. Biological control in the phyllosphere : Realistic goal or False hope?. Can. J. Plant Pathol.12 : 300-307.

Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annu. Rev. Phytopathol. 30 : 603-635.

Artigues, M. et Davet, P. 1984. Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de *Trichoderma* vis à vis de quelques champignons à sclérotes. Soil Biol. Biochem. 5 : 413-417.

Baker, R.1991. Molecular biology in control of fungal pathogens. Pages 259-271 in : Handbook of Applied Mycology, vol. 1 . D. K. Arora, B. Ray, K. G. Mukerji et G. R Knudsen, eds. Marcel Dekker, New York.

Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D. et Chet, I. 1985. Lectins : A possible basis for spesific recognition in the interaction of *Trichoderma* and Sclerotium rolfsii. Phytopathology 75 : 458-462.

Besri, M. et Diatta, F. 1985. Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate, aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 15 : 379-386.

Blakeman, J. P. et Broodie, D. S. 1977. Compétition for nutrients between epiphytique microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. Physiol. Plant Pathol. 10 : 29-42.

Blakeman, J. P. et Fokkema, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20 : 167-192.

Blakeman, J. P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. Pages 6-30 in : Biological Control on the Phylloplane. C. E. Windels et S. E. Lindow, eds. APS Press. St Paul, Minnesota.

Boosalis, M. G. 1964. Hyperparasitism. Ann. Rev. Phytopathol. 5 : 363-376.

Campbell, R. 1989. Biological Control of Microbial Plant Pathgens. Cambridge University Press, Cambridge. 218 pp.

Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potentiel as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Pages 137-160 in : Innovative Approaches to Plant Disease Control. I. Chet, ed . John Wiley & Sons, New York.

Chet, I. 1990. Mycoparasitism, recognition, physiology and ecology. Pages 725-733 in : New direction in Biological Control : Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. R. Baker et P. Dunn, eds. R. Alan, Liss Inc. New York.

Cook, R. J. et Baker, K. F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. APS Press. St Paul, Minnesota. 539 pp.

Corbaz, R. 1990. Principes de Phytopathologie et de Lutte Contre les Maladies des Plantes. Presses Polytecheniques et Universitaires Normandes, Lausane. 286 p.

De Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N. et Schwinn, F. J. 1993. Chemical control of plant diseases : Problems and prospects. Annu. Rev. Phytopathol. 31 : 403-421.

Dennis, C. et Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 25-39.

Dennis, C. et Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 41-48.

Dennis, C. et Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 363-369.

Dhingra, O. D. et Sinclair, J. B. 1987. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. Boca Raton, FL. 355 p.

Di Pietro, A. Lorito, M. Hayes, C. K. Broadway, R. M. et Harman, G. E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium* virens, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. Phytopathology 83 : 308-313.

Dubos, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. Pages 107-135 in: Innovative Approaches to Plant Disease Control. I. Chet, ed. Jhon Wiley & Sons, New York.

Dubourdieu, D. 1983. Dégradation du glucane de *Botrytis cinerea* par les (1-3) glucanases de *Trichoderma*. Colloq. l'INRA. 18 : 40-50.

Elad, Y., Chet, I et Henis, H. 1982. Dégradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma* harzianum. Can. J. Microbiol. 28 : 719-726.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. et Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp on Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73 : 85-88.

Elad, Y., Shabi, E. et Katan, T. 1988. Negative cross resistance between benzimidazoles and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. Plant Pathol. 37 : 141-147.

Elad, Y. 1993a. Implementation of biological control of foliar diseases. Bulletin OILB/SROP. 16 : 229-233.

Elad, Y. 1993b. Mycoparasitism. Pages 289-307 in : Pathgenesis and host specificity in Plant Diseases. Vol. 2, U. S. Singh, K. Komoto et R. P Singh, eds. Pergamon Publishers.

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.

Elad, Y., Gullino, M. L., Shtienberg, D. et Aloi, C. 1995. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. Crop Prot. 2 : 105-109.

Fokkema, N. J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against Dreshlera sorokiniana (Helminthosporium sativum) on agar plant and on rye leaves with pollen. Physiol. Plant Pathol. 3 : 195-205.

Fokkema, N. J. 1983. Naturally-occuring biological control in the phyllosphere. Colloq. l'INRA. 18 : 71-79.

Fokkema, N. J. 1992. Strategies for biological control of foliar pathogens. Pages 130-138 in : Biologie Moléculaire des Interactions Plante-Microorganisme et Alternatives en lutte biologique. GRIPP. eds. Laval. Québec.

Fravel, R. D. 1988. Role of antibiosis in the biological control of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 26 : 75-91.

Hmouni, A., Hajlaoui, M. R. et Mlaiki, A. 1996. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin. 26 : 697-705.

Hmouni, A., Hajlaoui, M. R., Mlaiki, A. et Douira, A. 1997. Etude in vitro de l'activité antagoniste des *Trichoderma* spp. vis à vis de *Botrytis cinerea*. The 8th Arab Conference of Biological Sciences & The 4th Jordanian Conference Biological Sciences, 8-11 Octobre, Aman, Jordanie.

Howell, C. R. et Stipanovic, D. R. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium* virens, and its role in the biologiocal control of Pythium ultimum. Can. J. Microbiol. 29 : 321-324.

James, J. R., Tweedy, B. G. et Newby, L. C. 1993. Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides. Annu. Rev. Phytopathol. 31 : 423-439.

Janisiewicz, W. J. et Roitman, J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with Pseudomonas cepacia. Phytopathology 78 : 1697-1700.

Johnson, K. S., Sawyer, T. L. et Powelson, M. L. 1994. Frequency of benzimidazole- and dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in western oregon small fruit and snap bean plantings. Plant Dis. 78 : 572-577.

Lamy Krafft, P. et Roquebert, M. F. 1981. Analyse des interactions entre deux champignons antagonistes : *Trichoderma* viride Pers et *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. études préliminaires. Cryptogamie Mycol. 2 : 137-151.

Leone, G. et Tonneijck, A. E. G. 1990. A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (Phaseolus vulgaris) to *Botrytis cinerea* and Sclerotinia sclerotiorum. Euphytica 48 : 87-90.

Lepoivre, P. 1989 . Aspects phytopathologiques de la chimiothérapie. Pages 489-506 in : Traité de Pathologie Végétale, J. Semal, ed. Press agronomique de Gembloux, Belgique.

Lepoivre, P. et Semal, J. 1989. La lutte biologique en phytopathologie. Pages 465-487 in : Traité de Pathologie Végétale, J. Semal, ed. Press agronomique de Gembloux, Belgique.

Leroux, P. et Gredt, M. 1982. Phénomènes de résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides. La défense des végétaux 213 : 3-17.

Lewis, J. A. et Papavizas, G. C. 1987. Permeability changes in hyphae of Rhizoctonia solani induced by germiling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Phytopathology 77 : 699-703.

Manocha, M. S. 1987. Cellular and molecular aspects of fungal host-mycoparasite interaction. J. Plant Dis. Prot. 94 : 431-444.

Moorman, G. W. et Lease, R. J. 1992. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from pennsylvania greenhouses. Plant Dis. 76 : 477-480.

Morquer, R. G., Viala, J., Rouch, J., Fayret et Bergé, G. 1963. Contribution à l'étude morphogénique du genre *Gliocladium*. Bull. Soc. Mycol. Fr. 79 : 137-241.

Mukergi, K. G. et Garg, K. L. 1988. Biocontrol of Plant Diseases, Vol 2. CRC Press. Boca Raton. FL. 198 pp

Nelson, M. E. et Powelson, M. L. 1988. Biological control of grey mould of snap beans by Trichoderma hamatum. Plant Dis. 72 : 727-729.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and potential of biological control. Annu. Rev. Phytopathol. 23 : 23-54.

Peng, G. et Sutton, J. C. 1991. Evaluation of microororganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. Can. J. Plant Pathol. 13 : 247-257.

R'houma, A. 1995. Recherches sur *Botrytis cinerea* de la Vigne (Vitis vinifera) : biologie, pathogénèse et mesures de lutte. Mémoire de 3ème cycle de l'INAT. Tunis. 118 p.

Rapilly, F. 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann. Epiphytes, INRA. 19. numéro hors série. 102 p.

Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R. et Lynch, J. M. 1988. Fractionation of extracellular enzymes from a mycoprasitic strain of *Trichoderma* harzianum. Enzyme Microb. Technol. 10 : 180-187.

Rifai, M. A. 1969. Revision of the genus *Trichoderma*. Commonw. Mycol. Inst., Mycol. Papers 116 : 1-56.

Roberts, R. G. 1990. Postharvest biological control of gray mould of apple by Cryptococcus laurentii. Phytopathology 80 : 526-530.

Singh, J. et Faull, J. L. 1988. Antagonism and biological control. Pages 167-177 in : Biocontrol of Plant Diseases. K. G. Mukerji et K. L. Garg. eds. CRC Press. Boca Raton, FL.

Sivan, A. et Chet, I. 1988. Degradation of fungal walls by lytic enzymes of *Trichoderma* harzianum. J. Gen. Microbiol. 135 : 675-682.

Sivan, A., Elad, Y. et Chet, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of Trichoderma harzianum on Pythium aphanidermatum. Phytopatholgy 74 : 498-501.

Sutton, J. C. et Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* strawberry leaves. Phyopathology 83 : 615-621.

Sy, A. A.. 1976. Contribution à l'étude de Pyricularia oryzae Cav. Recherche in vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Docteur-Ingénieur, n°534, INP Toulouse.

Sy, A. A., Albertini, L. Molleti. M. et Hamant. C. I. 1991. Mécanismes potentiels régissant le contrôle biologique des agents phytopathogènes. Cryptogamie, Mycol. 12 : 133-147.

Tong-Kwee, L. et Keng, T. H. 1990. Antagonism in vitro of *Trichoderma* species against several Basidiomycetous soil-borne pathogens and Sclerotium rolfsii. J. plant. Dis. Prot. 97 : 33-41.

Tronsmo, A. 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. Plant Dis. 64 : 1009.

Tronsmo, A. 1986. Use of *Trichoderma* spp. in biological control of necrotrophic pathogens. Pages 348-362 in : Microbiology of the Phyllosphere.. N. J. Fokkema et J. Van Den Heuvel, eds. Cambridge University Press. Cambridge.

Whipps, J. M., Lewis, K. et Cook, R. C. 1988. Mycoparasitism and plant diseases control. Pages 161-187 in : Fungi in Biological Control Systems. M. N. Burges, eds. Manchester University Press. Manchester.

Whipps, J. M. 1992a. Concepts in mycoparasitism and biological control of plant diseases. Bulletin OILB/SROP. 15 : 54-59.

Whipps, J. M. 1992b. Status of biological disease control in horticulture. Biocontrol Science Technol. 2 : 3-24.