Contribution à la lutte biologique contre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Hajlaoui M. R.[1], Diop D[1]. & Cherif M[2].
[1] Laboratoire de Cryptogamie-Bactériologie, INRA Tunisie, 2049 Ariana, Tunisie
[2] Laboratoire de Phytopathologie, INAT, 45 Av. Charles Nicolle , 1002 Le Belvédère, Tunisie

Résumé

Dans le but de développer une stratégie de lutte biologique contre la sclérotiniose, l'antagonisme de certaines espèces de Trichoderma et Gliocladium à l'égard des hyphes et des sclérotes de Sclerotinia sclerotiorun a été étudié.

Les tests d'antagonisme in vitro montrent la sensibilité du pathogène à l'égard des différents mécanismes déployés par les antagonistes. Les Trichoderma agissent par compétition et mycoparasitisme en produisant des enroulements autour des hyphes de l'hôte avec pénétration, alors que G. roseum attaque principalement par antibiose en produisant des métabolites antifongiques. L'activité antagoniste des champignons testés est nettement influencée par la température et le pH du milieu. Les Trichoderma sont plus efficaces à inhiber le pathogène à une température de 25 °C et à des pH acides, contrairement à l'espèce G. roseum qui est plus active à des pH basiques et à une température plus basse (15 °C).

Plusieurs réactions ont été observées chez les hyphes de l'hôte telles que la vacuolisation, la désintégration, le brunissement des hyphes et la sécrétion de masses gélatineuses. Ces deux dernières manifestations, observées uniquement chez les hyphes non parasités, pourraient être le résultat d'une réaction de défense du pathogène à l'attaque des antagonistes.

En culture liquide, les différents antagonistes ont produit des métabolites capables d'inhiber la croissance in vitro du S. sclerotiorum ainsi que de plusieurs autres champignons phytopathogènes. La purification partielle de ces métabolites par CCM a révélé que les fractions actives ont des Rf situés entre 0,73 et 0,82.

L'expérience visant la destruction des sclérotes dans le sol en utilisant les antagonistes sous formulation "Bran Acid-Fermentation Biomass" a montré que les espèces de Trichoderma

et de Gliocladium sont capables de détruire les sclérotes du pathogène avec des taux variant entre 38 et 64 %.

Mots clés : Antagonisme, *sclérotinia*, *Trichoderma*, Gliocladium

Abstract : Contribution to biological control of sclerotinia blight caused by *sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

In order to develop a biocontrol strategy against Sclerotinia disease, the antagonistic effect of Trichoderma and Gliocladium species on hyphae and sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum was studied. In vitro tests revealed that the pathogen was sensitive to different mechanisms deployed by the antagonists. Trichoderma species act by competition and mycoparasitism producing a coiling around hyphal host with penetration whereas G. roseum attacks by antibiosis. The antagonistic activities were temperature and pH dependent. Trichoderma species were more efficient at 25 °C and acid pH where the antagonism of G. roseum was optimal at 15 °C and basic pH.

Many reactions, such as vacuolation, desintegration, browning and secretion of gelatinous substances, were observed in infected hyphal host. The two last reactions were also detected in non-infected hyphae. We, thus, stipulate that browning and secretion of gelatinous substances, could be defense reactions deployed by the pathogen against antagonistic attack.

The antagonists were mostly efficient when incorporated in the soil as bran acid-fermentation biomass. Gliocladium and Trichoderma limited sclerotia developpment at 38 and 64 %, respectively.

ملخص : مساهمة في المقاومة البيولوجية ضد فطر *S.sclerotiorum* المسبب لمرض *Sclerotiniose*

حجلاوي و. ر.[1] ، ديوب د.[1] و شريف م.[2]

1 المعهد القومي للبحوث الزراعية بتونس، أريانة، تونس

2 المعهد القومي للبحوث الزراعية بتونس،

من اجل تطوير طريقة بيولوجية ضد مرض *Sclerotiniose* تمت دراسة المضادات الفطرية من نوع *Trichodema* و *Gliocladium* لاستعمالها ضد *sclérote* وخيوط فطر *Sclérotinia*.

التجارب المخبرية للمضادات الفطرية اثبتت حساسية الفطر الضار امام مختلف التفاعلات. النوع *Trichoderma* يتفاعل عن طريق المنافسة والتطفل الفطري حيث يحدث التواءات واختراقات لخيوط الفطر المضيف. اما بالنسبة *G. roseum* ففعاليته تكمن فيما ينتجه من مواد ثانوية ضد فطرية. النشاط المضاد لهذه الانواع الفطرية يتأثر بدرجة الحرارة ومدى حموضة الوسط. النوع *Trichoderma* يكون فعالا عند درجة حرارية تساوي 25°C ووسط حامض. بعكس *G. roseum* الذي يتنشط عند درجة حرارة اقل (15°C) وفي وسط قلوي.

العديد من التفاعلات تمت ملاحظتها عند خيوط المضيف، كالالتواءات، الضمور، التلون وكذلك انتاج مادة هلامية لزجة. هذين التفاعلين الاخيرين لم يتم مشاهدتهما الا في الخيوط الغير مخترقة، مما يمكن تفسيره على كونه طريقة دفاعية يستعملها الفطر الضار للحد من فاعلية المضادات.

في مكان وسط اتمائي مائي، انتجت مختلف المضادات مواد ثانوية قادرة على الحد من النمو المخبري لخيوط الفطر *Sclerotiorum* وعدة طفيليات فطرية اخرى. التقنية الجزئية لهذه المواد بطريقة CCM اثبتت وجود مستخلصات فعالة ما بين 0,73RF و 0,82. اما بالنسبة للتجربة التي تستهدف تدمير Sclerote في التربة باستعمال المضادات الفطرية بطريقة Bran acid-fermentation biomass فقد برهنت النتائج ان *Trichoderma* و *Gliocladium* يسببان ضررا يقدر ب 38% و 64% عند *sclerote* الفطر الضار.

كلمات مفتاحية : مقاومة بيولوجية، *Sclérotiniose*، *Trichoderma*

Introduction

L'utilisation de l'agrochimie, pour combattre les champignons parasites des cultures, a eu des conséquences néfastes sur l'environnement, la santé humaine et surtout sur le développement de formes de résistance. En effet, plusieurs espèces de champignons manifestent déjà une résistance complète ou partielle à la plupart des matières actives offertes sur le marché (Vincent et Coderre, 1992). Cette situation a conduit à la recrudescence de certaines maladies d'où la nécessité de trouver des solutions de substitution.

La sclérotiniose ou pourriture blanche due à *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary est une maladie cryptogamique très préjudiciable rencontrée dans le monde entier. Ce parasite qui est remarquable surtout par sa polyphagie et son ubiquité s'attaque à plus de 400 espèces de plantes cultivées (Hannusch et Boland, 1996). Présentement, ce champignon constitue un problème en raison de sa haute capacité d'adaptation, de sa longévité de conservation sous forme de sclérotes et de sa résistance aux fongicides. En effet, les populations de S. sclerotiorum ont déjà triomphé de plusieurs générations de fongicides (Davet et Martin, 1993). Ainsi, des souches de ce parasite résistantes aux benzimidazoles ont été décrites depuis 1995

(Souliac et Leroux, 1995). Il s'ajoute à cette situation l'inefficacité des méthodes de lutte culturale et l'absence de cultivars génétiquement résistants à toutes les formes de la sclérotiniose (Mathilde et al., 1997). Face à cette situation, la lutte biologique apparaît comme une alternative prometteuse pour pallier aux problèmes que pose ce champignon.

A cet effet, nous nous sommes intéressés au cours de cette recherche à: i) évaluer l'antagonisme in vitro des espèces de *Trichoderma* et de *Gliocladium* à l'égard de *S. sclerotiorum* en étudiant l'effet de l'antagonisme global, du mycoparasitisme et de l'antibiose ; ii) extraire et caractériser partiellement les métabolites antifongiques des antagonistes, puis déterminer le spectre antifongique ; et iii) tester le potentiel d'une formulation à base de ces antagonistes à détruire les sclérotes, principale forme de conservation du pathogène, dans le sol.

Matériel et méthodes

Isolement du champignon pathogène

Les isolats de *S. sclerotiorum* ont été collectés sur différentes plantes hôtes (Haricot, piment, carotte et tournesol). L'isolement a été effectué : i) à partir de tiges montrant les symptômes de la maladie : les tiges infectées sont découpées en morceaux, trempées dans l'alcool 75° puis flambées très rapidement avant d'être repiquées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) additionné d'antibiotiques pour empêcher le développement de bactéries ; ii) à partir du mycélium présent au niveau des lésions : des fragments de mycélium sont prélevés à l'aide d'une aiguille stérilisée puis déposés sur milieu PDA et iii) par prélèvement de sclérotes à partir du sol ou de la plante : les sclérotes sont stérilisés superficiellement au chlorure mercurique (Hg Cl2 à 2‰) pendant 2 mn, puis rincés à l'eau distillée stérile ; séchés à l'aide de papiers filtres stériles puis déposés sur milieu PDA. La purification des isolats de *S. sclerotiorum* a été faite par repiquages successifs sur de nouveaux milieux.

Collection des germes antagonistes

Trichoderma et *Gliocladium*, deux agents de lutte biologique largement utilisés pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes, ont été retenus pour tester leur antagonisme vis-à-vis de *S. sclerotiorum*. Les espèces *T. harzianum* 1 (Th1) et T. viride (Tv) sont issues de la mycothèque de l'INRAT, alors que les espèces *T. harzianum* 2 (Th2) et *Gliocladium roseum* (Gl) sont issues de la mycothèque du laboratoire de phytopathologie à l'INAT. Les autres isolats de *Trichoderma* (Tc, Ts et Tt) ont été obtenus respectivement à partir du concombre, du gazon et de la tomate. L'isolement des germes antagonistes a été effectué par rinçage des organes de la plante dans de l'eau stérile suivi d'ensemencement sur milieux de culture additionnés d'antibiotiques. La purification des isolats de *Trichoderma* a été obtenue par culture monosporale et leur identification a été effectuée par observation microscopique en se basant sur les clés d'identification décrites par Cook et Baker (1983).

Influence de la température et du pH sur le pouvoir antagoniste des *Trichoderma* et *Gliocladium*

Pour tester l'effet de la température et du pH sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* par les antagonistes, les températures 15, 20 et 25 °C, et les pH 4, 6, 8 et 10 ont été retenus.

L'inhibition de la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* par les germes antagonistes a été testée par la technique de culture double (dual culture). Un disque mycélien de 9 mm de diamètre prélevé d'une culture de *fou* de *Gliocladium* et un disque de taille similaire du pathogène sont placés à 4 cm l'un de l'autre sur milieu PDA à différents pH. Les boîtes sont incubées à l'obscurité pendant 48 h à différentes températures et le taux d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène a été calculé selon la formule établie par Fokkema (1973):

$I(\%) = 100 \times (r1 - r2)/r1$

avec

I : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène.

r1 : croissance mycélienne du pathogène dans l'axe opposé à celui reliant les deux explants

r2: croissance mycélienne du pathogène dans l'axe reliant les deux explants

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne sont exprimés en pourcentage et la comparaison des moyennes a été effectuée selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5 %.

Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme exercé par les agents antagonistes à l'encontre du pathogène a été étudié en observant l'interaction hyphale sur milieu à base d'extrait de pomme de terre gélosé. De minces couches de milieu sont coulées à la surface des boîtes de Petri, sur lesquelles, on repique en culture double des pastilles des antagonistes et du pathogène. Les boîtes sont incubées à 20 °C, pendant un temps nécessaire pour que les cultures se touchent. Les zones de contact entre le pathogène et chacun des antagonistes ont été observées au microscope optique.

Antibiose

L'antibiose basé sur la production de substances antifongiques volatiles et diffusibles par les antagonistes en présence du pathogène a été étudié selon la technique de Dennis et Webster (1971a, 1971b).

Pour étudier l'effet des substances volatiles, un disque mycélien de 9 cm de diamètre est prélevé des cultures d'antagonistes *(Trichoderma* ou *Gliocladium)* et repiqué au centre d'une boîte de Petri contenant du PDA. Une deuxième boîte contenant du PDA inoculée par le pathogène est retournée sur celle contenant l'antagoniste. D'autres boîtes inoculées par *S. sclerotiorum* puis retournées sur des boîtes vides (non inoculées par les antagonistes) serviront de témoins. Toutes les boîtes sont ensuite incubées à 20 °C pendant 48 heures, au bout desquelles, l'inhibition de la croissance mycélienne est calculée et exprimée en pourcentage par rapport aux témoins.

Pour étudier l'effet des substances diffusibles, une membrane de Cellophane stérile de 8 cm de diamètre, est aseptiquement placée à la surface du milieu PDA dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. Des disques de 9 mm de diamètre issus de jeunes cultures de chaque antagoniste sont placés au centre de la membrane de Cellophane. Après 48 h d'incubation à l'obscurité à 20 °C, les membranes de Cellophane sont enlevées en même temps que la colonie des antagonistes et remplacées par un explant du pathogène. Les boîtes sont incubées à l'obscurité à 20 °C pendant 48 h. Les explants témoins sont repiqués sur PDA ne contenant pas les substances diffusibles. Le diamètre des colonies est ensuite mesuré et le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport aux témoins.

Fongitoxicité des substances diffusibles

Pour tester la fongitoxicité des substances diffusibles, la technique de Pionnat (1982) a été adoptée. Des explants de *S. sclerotiorum* sont repiqués sur milieu PDA en présence des substances diffusibles. Après incubation à 20 °C pendant une semaine, un développement mycélien indique l'absence de pouvoir fongicide. Dans le cas contraire, les explants sont repiqués de nouveau sur du PDA (ne contenant pas de substances diffusibles) et incubés à 20 °C pendant 7 jours. Après ce temps d'incubation, le développement mycélien indique un pouvoir fongistatique alors que l'absence de développement indique un pouvoir fongitoxique des substances diffusibles.

Induction et extraction des métabolites produits par les antagonistes en milieu liquide

Pour induire la production des métabolites, les antagonistes ont été cultivés en milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth). Chaque 100 ml de PDB contenus dans des erlenmeyers 250 ml sont inoculés avec trois disques mycéliens provenant d'une culture de chaque antagoniste. Les cultures sont ensuite incubées à 20 °C à 12 h de photoperiode en mode agité. Après une semaine d'incubation, le mycélium a été séparé du milieu par filtration sous vide à travers du papier Whattman N° 1 suivie d'une centrifugation à 4500 t/mn pendant 30 mn. Les surnageants sont collectés séparément et la fraction active a été extraite dans du chloroforme. Pour 100 ml de filtrat de culture, deux extractions successives avec 50 ml de chloroforme ont été effectuées. Après mélange et agitation du chloroforme et du filtrat de culture, le mélange est mis dans des ampoules à décanter pour la séparation de phases. La phase chloroformique contenant les métabolites antifongiques a été récupérée et concentrée par évaporation au 1/50ème du volume initial à l'aide d'un évaporateur rotatif (120 t/mn à 40 °C). Le volume résiduel (environ 2 ml) est conservé au réfrigerateur à 5 °C jusqu'à son utilisation ultérieure.

Purification partielle de la fraction active par CCM

La purification partielle de la fraction active des filtrats de culture des antagonistes par CCM a été réalisée sur feuille d'aluminium (20 x 20 cm) avec un gel de silice (60 F 254) de 0,2 mm d'épaisseur. Le dépôt des échantillons se fait à 3 cm de la bordure inférieure à l'aide de tubes capillaires. Les plaques sont développées avec une phase mobile constituée d'un mélange de chloroforme et de méthanol (90/10 ; v/v). Après migration, les plaques sont séchées à l'air libre,

puis visualisées sous lumière UV à 254 nm. Une révélation chimique avec 20 % d'acide sulfurique dans le méthanol a été également effectuée.

La révélation biologique des bandes présentant une activité antifongique est faite selon la technique de De cal et al. (1988) en utilisant Cladosporium cladosporoides. Une suspension sporale de ce champignon est aseptiquement incorporée au milieu malt agar en surfusion puis pulvérisée sur les plaques chromatographiques à l'aide d'un atomiseur à main. Les plaques sont incubées jusqu'à la germination effective des spores de *C. cladosporoides*. L'inhibition du champignon test est indiquée par l'apparition de zones claires au niveau de la plaque de chromatographie.

Spectre antifongique des métabolites produits par les antagonistes

L'activité antifongique des métabolites produits par les différents antagonistes a été testée à l'égard de *Ascochyta fabae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Phoma tracheiphila* et *S. sclerotiorum*. De plus, l'effet antifongique des métabolites a été testé contre les antagonistes eux-mêmes.

Une quantité d'environ 100 µl d'extrait de filtrat de culture concentré au 1/50ème a été déposée sur des disques de papier filtre stérile. Le chloroforme est ensuite évaporé en laissant sécher les disques sous hotte à flux laminaire. Les tests d'inhibition de la croissance mycélienne sont effectués sur milieu PDA suivant la méthode " paper-disk agar diffusion ". Quatre disques dont trois contenant la fraction active dissoute dans du chloroforme et un disque contenant le même volume de chloroforme jouant le rôle de témoin sont déposés sur du PDA de sorte qu'ils forment un carré. Le champignon à tester est repiqué au centre de ceux-ci. Les boîtes sont incubées à 20 °C jusqu'à l'obtention d'un développement mycélien qui dépasse les disques de papier filtre. L'inhibition est notée par + si elle est nette au niveau des trois papiers filtres contenant la fraction active et par - s'il n'y a pas d'inhibition.

Tests de destruction des sclérotes dans le sol par une préparation à base d'antagonistes

La production en masse des sclérotes du pathogène a été réalisée selon la méthode de Nelson et al. (1988) dans un milieu composé de 54 g de farine de maïs, 3,5 g de perlite, 37,5 ml d'une solution de 10 % de V8 juice et 1 % d'extrait de levure. L'ensemble est mis dans des fioles de Roux contenant 38 ml d'eau distillée. Après autoclavage, le milieu est ensemencé par des pastilles d'une culture de *S. sclerotiorum* et incubé à 20 °C à 12 h de photopériode. Au bout de deux mois, les sclérotes sont récupérés par lavages successifs à l'eau distillée qui éliminent le maïs et la perlite au fur et à mesure.

La formulation des antagonistes a été faite selon la technique de Lewis et al. (1991) modifiée dans un mélange constitué de vermiculite, de son de blé, et de la biomasse de l'antagoniste La biomasse des antagonistes (FB) est produite dans un milieu de fermentation à base de 5 g d'extrait de levure, 500 ml d'extrait de pomme de terre et 500 ml d'eau distillée stérile. Après deux semaines de culture dans ce milieu de fermentation, le mycélium de chaque antagoniste est récupéré et séché au four pasteur à 35 °C pendant 12 h puis broyé en poudre et mélangé au son de blé stérile dans la proportion de 1 g de mycélium pour 2 g de son. L'ensemble est acidifié à raison de 175 ml de HCl 0,05 N pour 15 g de poids sec du mycélium. Cette formulation

appelée BA-FB (Bran Acid - Fermentation Biomass) constitue l'inoculum des antagonistes pour le test de destruction des sclérotes dans le sol.

La confrontation sclérote/BA-FB a été réalisée dans 200 g de sol humide stérile à raison de 50 sclérotes de taille uniforme pour 1,5 g BA-FB. Après trois semaines d'incubation dans des sachets en polyéthylène à 25 °C à l'obscurité, les sclérotes sont récupérés et le taux de destruction est estimé selon la méthode de Davet (1986). Les sclérotes mous sont considérés comme détruits et sont incapables de germer alors que les autres sclérotes sont mis à germer sur PDA après désinfection superficielle. Après incubation à 25 °C, les sclérotes donnant exclusivement une colonie de l'antagoniste sont considérés comme détruits alors que ceux colonisés, mais qui parviennent à germer sont considérés non détruits.

Le taux de destruction des sclérotes est calculé selon la formule de Davet (1986) :

$DS = 100 X (n_1 + n_2)/N$

Où DS est le taux de destruction des sclérotes, n_1 est le nombre de sclérotes mous, n_2 est le nombre de sclérotes donnant une colonie pure de l'antagoniste et N est le nombre total de sclérotes observés. L'expérience a été répétée deux fois avec quatre observations pour chaque traitement.

Résultats

Influence de la température et du pH sur l'antagonisme global des espèces du genre *Trichoderma* et *Gliocladium* vis-à-vis de *S. sclerotiorum.*

Toutes les espèces antagonistes sont aptes à inhiber le pathogène bien que cette inhibition soit modérée pour les souches de *Trichoderma* (40,25 % à 60,92 %) et faible pour *G. roseum* (34,5 %). Les résultats de l'influence de la température sur l'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (ICMP) montre des différences significatives entre les trois températures testées (15 , 20 et 25 °C). On note aussi des différences au niveau du comportement des deux genres lorsqu'on fait varier la température : l'ICMP obtenue par les espèces de *Trichoderma* diminue généralement avec la diminution de la température, alors que l'ICMP provoquée par *G. roseum* présente un optimum à 15 °C (Fig. 1A).

L'analyse globale de l'effet du pH sur ICMP permet de constater une différence significative entre les pH acides et les pH basiques (Fig. 1B). Pour les espèces de *Trichoderma,* les taux d'ICMP les plus élevés sont enregistrés à pH 4 et varient de 56,42 % à 60,83 %. Dans le cas de *G. roseum*, le taux d'ICMP le plus élevé est enregistré à pH 8 et est de l'ordre de 28 %. Pour l'ensemble des souches testées, une diminution de d'ICMP à pH 10 est observée (Fig 1B).

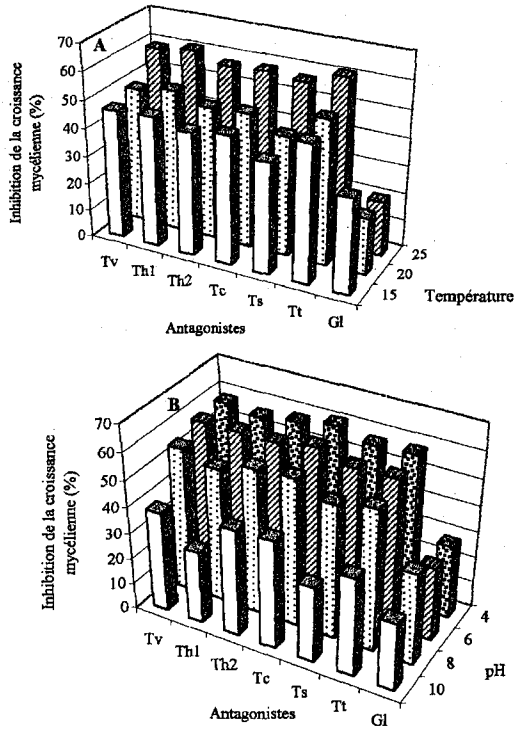

Figure 1. Effet de la température (A) et du pH (B) sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Sclerotinia sclerotiorum* par différents antagonistes.

Mycoparasitisme

La confrontation des antagonistes avec le pathogène en culture double entraîne la vacuolisation et la granulation des hyphes du champignon hôte (Tableau, 1 et Planche 1C). Contrairement à *G. roseum*, les espèces de *Trichoderma* sont capables de mycoparasiter *S.sclerotiorum* en produisant des enroulements autour des hyphes de celui-ci (Tableau, 1 et Planche 1A). La pénétration des hyphes de *S. sclerotiorum* par ceux de *Trichoderma* a été observée avec les espèces *T. viride* et Tc (Planche, 1B). Dans la zone de confrontation, on peut observer une sécrétion d'une masse gélatineuse brune et un brunissement des hyphes du pathogène en contact avec ceux des antagonistes (Planche , 1D).

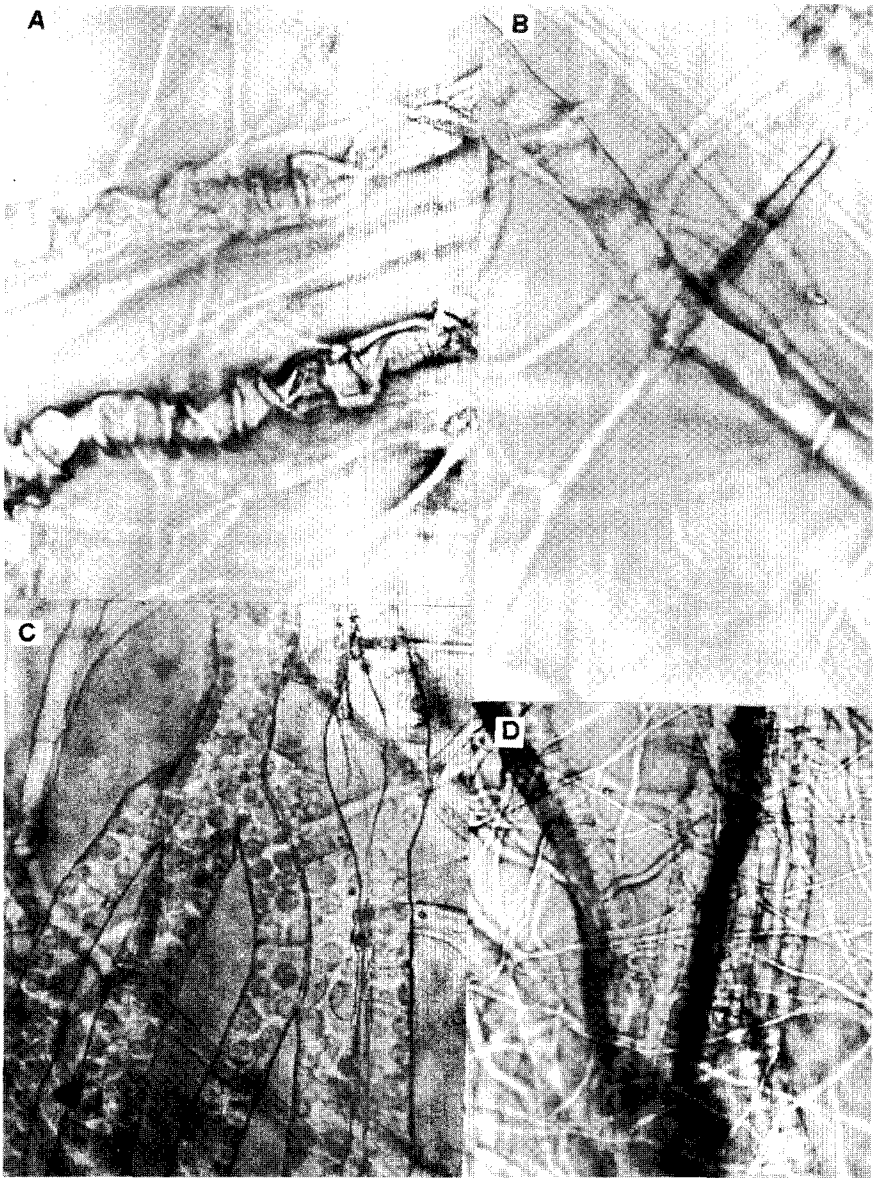

Planche 1. Mycoparasitisme et réactions du champignon pathogène en confrontation avec les antagonistes ; A: Enroulement des hyphes de *Trichoderma harzianum* sur ceux du pathogène ; B: Pénétration de l'hyphe de Trichderma viride dans celui de *Sclerotinia sclerotiorum ;* C: Les réactions du champignon pathogène: vacuolisation des hyphes de *Sclerotinia sclerotiorum ;* D: brunissement des hyphes du pathogène.

Tableau 1. Différents phénomènes de mycoparasitisme exercés par les antagonistes vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum*

Antagoniste	Enroulement	Pénétration	Vacuolisation	Granulation
Gliocladium roseum	-	-	+	+
Trichoderma viride	++	+	+	+
T. harzianum 1	+++	-	+	+
T. harzianum 2	++	-	+	+
Trichoderma spp.(Tc)	++	+	+	+
Trichoderma spp. (Ts)	+	-	+	+
Trichoderma spp. (Tt)	+	-	+	+

+ : phénomène présent
++ : phénomène accentué
+++ : phénomène très accentué
- : phénomène absent

Antibiose

La figure 2 représente l'inhibition de la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* par les substances volatiles et diffusibles produites par les différents antagonistes en confrontation avec le pathogène. Tous les antagonistes sont capables de produire des substances volatiles inhibant la croissance mycélienne du pathogène. Bien que les ICMP par les substances volatiles soient faibles, une différence significative est observée entre les deux genres d'antagonistes.

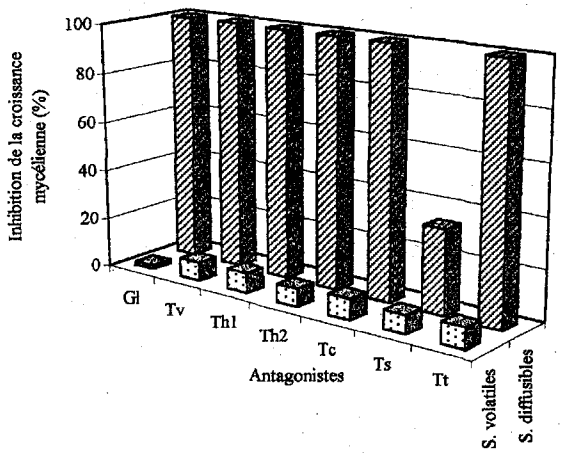

Figure 2. Effet des substances diffusibles et volatiles des antagonistes sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Sclerotinia sclerotiorum*

Les *Trichoderma* comme le *G. roseum* produisent des métabolites qui diffusent à travers le milieu PDA inhibant la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum*. Contrairement aux substances volatiles, les substances diffusibles produites par les antagonistes provoquent des taux ICMP élevés. Cette inhibition est totale pour tous les germes antagonistes exceptée la souche Ts dont le taux d'inhibition reste inférieur à 33 %.

Les tests de fongitoxicité des substances diffusibles produites par les espèces antagonistes sur milieu PDA ont révélé que les substances diffusibles de *G. roseum* ont un effet fongitoxique à l'égard du mycélium de *S. sclerotiorum* alors que celles des espèces de Trichoderma ont un pouvoir fongistatique (Tableau, 2).

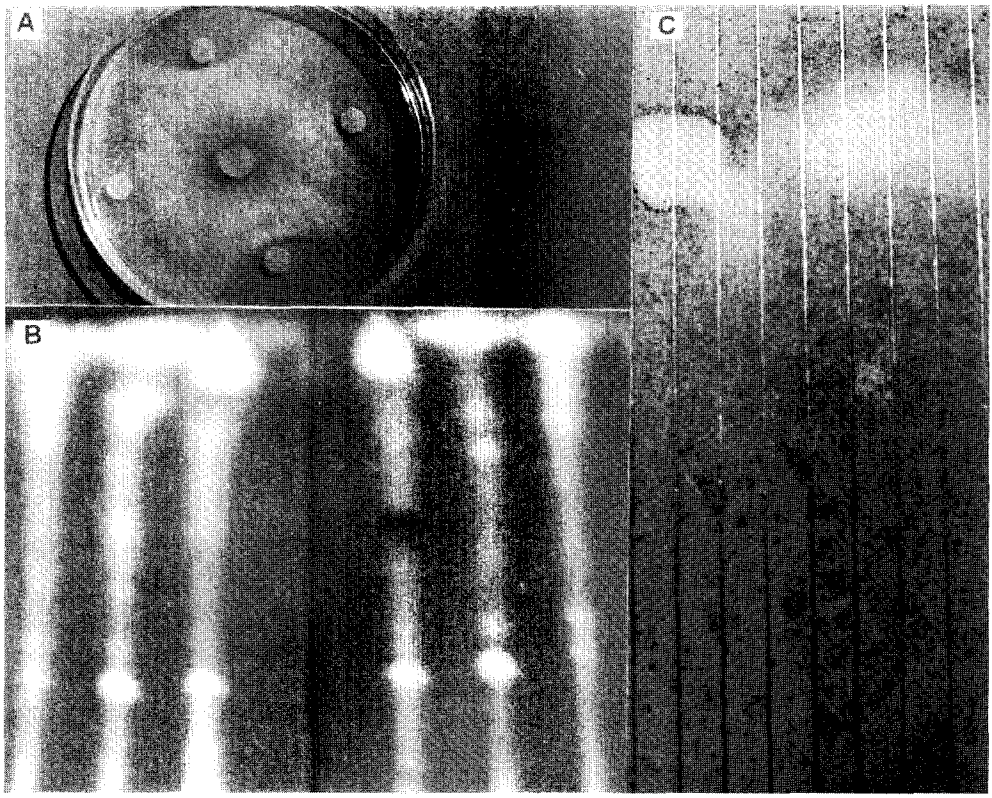

Planche 2. Antagonisme in vitro indirect. A : Inhibition de la croissance mycélienne de *Sclerotinia sclerotiorum* par les métabolites des antagonistes extraits au chloroforme et appliqués sur des disques de papier filtre. B : Profil chromatographique sur couche mince (CCM) des métabolites des antagonistes extraits au chloroforme et développés avec une phase mobile: chloroforme /méthanol (90/10 v/v). La visualisation des plaques a été faite en lumière UV à 254 nm. C : Révélation biologique de l'action inhibitrice des spots, obtenue en utilisant Cladosporium cladosporoïdes, montrant des zones de lyse situées à Rf 0,82, 0, 79 et 0,73, respectivement pour *T. viride*, *G. roseum* et *T. harzianum*.

Tableau 2. Fongitoxicité des substances diffusibles produites par les antagonistes

Espèces antagonistes	Pouvoir fongicide contre *S. sclerotiorum*
Gliocladium roseum	Fongitoxique
Trichoderma harzianum 1	Fongistatique
T. harzianum 2	"
T. viride	"
Trichderma spp. (Tc)	"
Trichoderma spp (Tt)	"
Trichoderma spp (Ts)	"

Spectre antifongique des métabolites produits par les antagonistes

Les métabolites produits par les antagonistes extraits dans le chloroforme et concentrés par évaporation présentent une action inhibitrice à l'égard de *S. sclerotiorum* (Planche, 2A) et de plusieurs autres champignons tels que *Ascochyta fabae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. moniliforme* , *F. oxysporum*, et *F. solani*. De plus, les métabolites de *G. roseum* ont une action inhibitrice sur *Trichoderma*. Par contre, les substances produites par les *Trichoderma* sont sans effet sur *G. roseum* (Tableau, 2).

Tableau 3. Spectre d'action des métabolites produits par les antagonistes en culture agitée

	Gl	Tv	Th1	Th2	Tt	Ts
Ascochyta fabae	+	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea	+++	-	+	+	-	-
Fusarium culmorum	+++	-	+	-	+	-
F. oxysporum	+	-	-	-	-	-
F. moniliforme	++	-	-	-	-	-
F. solani	+	-	-	-	-	-
Gliocladium roseum	-	-	-	-	-	*
Phoma tracheiphila	+	+	-	-	-	-
Sclerotinia sclerotiorum	+++	+	+++	+	++	-
Trichoderma vride	+++	-	-	-	-	*
T. harianum 1	+++	-	-	-	-	*
T. harzianum 2	+++	-	-	-	-	*

+ + + :inhibition forte

+ + : inhibition moyenne

+ : inhibition faible

- : aucun effet

* : n'a pas été testé

Caractérisation partielle des métabolites produits par les antagonistes

Trois antagonistes *Trichoderma viride*, *T. harzianum* et *Gliocladium roseum* cultivés en milieu liquide ont produit des composés antifongiques solubles dans le chloroforme. Les composés extraits par le chloroforme et concentrés par évaporation, ont été séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) avec une phase mobile constituée d'un mélange de chloroforme/méthanol (90:10 v/v). La révélation biologique de l'action inhibitrice des spots, obtenue en utilisant Cladosporium cladosporoïdes, montre des zones de lyse situées à Rf 0,82, 0, 79 et 0,73, respectivement pour *T. viride*, *G. roseum* et *T. harzianum* (Planche, 2C).

Test de destruction des sclérotes dans le sol par une préparation à base d'antagonistes

Il existe une nette différence dans l'aptitude des antagonistes à parasiter les sclérotes de *S. sclerotiorum*. La comparaison des moyennes de sclérotes détruits permet de distinguer l'espèce *T. viride* en tant que meilleur mycoparasite avec un taux de destruction de 64 %. Au bout de trois semaines d'incubation, les sclérotes attaqués par *T. viride* deviennent mous et sont complètement détruits. Les deux autres préparations à base de *T. harzianum* et *G. roseum* ont engendré des taux de destruction respectifs de 42 % et 38%.

Tableau 4. Test de destruction des sclérotes de *Sclerotinia sclerotiorum* par les antagonistes du genre *Trichoderma* et *Gliocladium*

BA-FB	n_1	n_2	total	DS
T. viride	25	7	32a[z]	64%
T. harzianum	0	21	21b	42%
G. roseum	0	19	19b	38%

DS exprime le taux de sclérotes de *S. sclerotiorum* détruits après confrontation avec les antagonistes. Ce taux représente une moyenne de trois expériences.

n_1 : nombre de sclérotes complètement détruits.

n_2 : nombre de sclérotes donnant des colonies pures d'antagoniste sur PDA.

[z] La comparaison des moyennes a été effectuée selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5 %. Deux résultats sont significativement différents, s'ils ne sont pas affectés de la même lettre. L'expérience a été répétée trois fois avec quatre observations pour chaque traitement.

Discussion

Les tests d'antagonisme in vitro entre microorganismes constituent les premières étapes à entreprendre dans la démarche d'appréciation du pouvoir antagoniste d'un germe candidat pour la lutte biologique. Ces tests permettant de détecter l'efficacité d'un microorganisme vis-à-vis d'un agent pathogène ont l'avantage d'être relativement faciles et rapides pour un criblage exhaustif de nombreuses espèces. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent des différences de sensibilité de *S. sclerotiorum* à l'égard des différents mécanismes déployés par les antagonistes du genre *Trichoderma* et *Gliocladium*. Les espèces du genre *Trichoderma* doi-

vent leurs efficacité aux mécanismes de mycoparasitisme direct et de compétition, alors que G.roseum semble agir principalement par antibiose.

S. sclerotiorum s'est révélé sensible à l'ensemble des antagonistes testés et à leurs mécanismes mis en jeu. Ceci est en accord avec plusieurs études antérieures (Adams et Fravel, 1990; Camporota, 1985 ; Papavizas et Collins, 1990).

Les tests de confrontation global permettant d'apprécier la capacité des antagonistes à la compétition contre le pathogène révèlent des taux d'inhibition de 40,25 à 60,92% pour les espèces de *Trichoderma* et de 20 à 34,5% pour *G. roseum*. Ces moyennes sont légèrement inférieures à celles observées en confrontant les espèces de *Trichoderma* à l'Helminthosporium teres ou à Rhizoctonia solani ou encore à Sclerotium rolfsii (Camporota, 1985 ; Lim et Teh, 1989). Cependant, ces résultats sont en accord avec ceux démontrés par Whipps et Magan (1987) en confrontant sur milieu gélosé *S. sclerotiorum* à Coniothyrium minitans et *G. roseum*. Le faible taux d'inhibition de *S. sclerotiorum* par *G. roseum* pourraient s'expliquer à la fois, par la grande vitesse de croissance du pathogène et par la lenteur de celle de l'antagoniste.

L'inhibition de *S. sclerotiorum* par *Trichoderma* et *Gliocladium* est nettement influencée par la température et le pH du milieu. Ceci est en accord avec d'autres travaux ayant trait à l'influence de certains facteurs de l'environnement (température, humidité relative, pH...) sur l'aptitude des champignons antagonistes à inhiber les pathogènes (Hajlaoui et Bélanger, 1990 ; Hunnusch et Boland, 1996). Les *Trichoderma* sont plus efficaces à inhiber le pathogène à une température de 25 °C et à des pH acides. Contrairement, *G. roseum* est plus active à pH basiques et à une température plus basse (20 °C). Ces paramètres doivent être pris en considération lors de la formulation et l'application pratique de ces agents antagonistes dans un sol donné.

Toutes les espèces du genre *Trichoderma* testées ont produit des enroulements autour de l'hyphe de *S. sclerotiorum*, mais à des degrés variables. Ceci est en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Tu, 1980; Huang, 1978 ; Lim et Teh, 1989). Contrairement aux espèces de Trichoderma, *Gliocladium* tue les cellules de l'hôte par contact hyphal sans pénétration. Ce mode d'antagonisme a été décrit dans le cas de l'interaction *G. catanulatum/S. sclerotiorum* (Huang, 1978). Cependant, Walker et Maude (1975) ont démontré que l'infection de Botrytis allii par *G. roseum* se fait par la formation d'appressoria suivie de la pénétration et l'invasion des hyphes de l'hôte. L'absence de pénétration dans l'interaction *S. sclerotiorum/G. roseum* pourrait s'expliquer par l'absence de sites de reconnaissances ou par la résistance des hyphes de l'hôte à l'action lytique des enzymes sécrétées par l'agent antagoniste.

Plusieurs réactions ont été observées au niveau des hyphes du champignon hôte en réponse à l'attaque par le mycoparasite. La vacuolisation, la granulation, la coagulation et la désintégration cytoplasmique ont été les plus fréquemment observées. En plus, de nouvelles réactions, chez *S. sclerotiorum* en confrontation avec les mycoparasites, qui consiste en un brunissement des hyphes et une sécrétion de masse gélatineuse, ont été observés dans les zones de contact entre les deux protagonistes. Les hyphes de l'hôte montrant cette réaction n'ont pas été mycoparasités. Ce phénomène, observé pour la première fois, pourrait être une réaction de défense du champignon hôte à l'attaque des antagonistes.

Les tests d'antibiose montrent que tous les antagonistes sont capables de produire des substances volatiles et diffusibles inhibitrices de la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum*. Ce-

pendant, les métabolites diffusibles sont hautement plus efficaces que les métabolites volatiles. L'inhibition de *S. sclerotiorum* par les substances volatiles n'a guère dépassé 9,25 % pour tous les antagonistes alors qu'avec les substances diffusibles, le taux d'inhibition a souvent atteint 100 % pour toutes les espèces exceptée la souche Ts. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Lim et Teh (1989) qui ont étudié l'antagonisme in vitro des espèces de *Trichoderma* contre *S. rolfsii* et plusieurs basidiomycètes phytopathogènes.

L'étude du pouvoir fongitoxique des métabolites diffusibles montre que les substances produites par G. roseum ont un effet fongicide à l'égard de *S. sclerotiorum*. Ce résultat confirme ceux de Huang et Hoes (1976) qui rapportent que G. catamulatum tue les cellules de *S. sclerotiorum* sans une pénétration directe. Plusieurs autres travaux ont démontré que les espèces du genre *Gliocladium* peuvent agir à distance par le biais d'antibiotiques comme la viridine, la gliovirine et la gliotoxine, ou d'enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, et les ((1,3) glucanases (Howell, 1986 ; Young et al., 1991). Contrairement au genre *G. roseum*, les espèces de *Trichoderma* inhibent tout simplement le développement mycélien de *S. sclerotiorum*, sans provoquer la mort des cellules hôtes. Ces résultats s'expliqueraient par le fait que l'antagonisme des espèces de *Trichoderma*à l'égard des agents pathogènes se fait principalement par parasitisme direct et par compétition.

La production, en milieu liquide, de métabolites antifongiques par les différents antagonistes a été démontrée de façon plus nette par l'expérience de spectre antifongique. Les extraits bruts des filtrats de culture des antagonistes ont inhibé la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum*, ainsi que celle de plusieurs autres champignons phytopathogènes. Les métabolites de *G. roseum* provoquent des zones d'inhibition très marquées qui seraient liées à la présence et à la diffusion d'antibiotiques à travers le milieu. Par contre, chez les Trichoderma, les zones d'inhibition sont très petites et la modification de la forme de la colonie du pathogène a lieu seulement dans la zone de contact avec les filtrats de culture. Cela indique la présence d'inhibiteurs mais qui ne diffusent pas à travers le milieu. La révélation biologique des plaques chromatographiques après migration de l'extrait brut des filtrats de culture des antagonistes a permis de localiser les spots présentant une activité antifongique. Une seule bande biologiquement active a été trouvée pour chaque antagoniste testé. Ceci est en accord avec les travaux de Hajlaoui et al. (1994) qui ont montré que chez Sporothrix flocculosa, hyperparasite des Erysiphacées, la production de métabolites extracellulaires ayant une activité antifongique se localisent à une seule bande à Rf 0,65. Après séparation par CCM des métabolites produits par les différents antagonistes, les Rf retrouvés se situent dans l'intervalle de 0,73 à 0,82 sensiblement égaux à celui de la gliotoxine (Rf 0,85) produite par *Gliocladium* virens (Young et al., 1991).

Les métabolites produits par les antagonistes ne sont pas toxiques contre les souches productrices mais ils le sont pour les autres champignons. Ce phénomène a été signalé par Young et al. (1991) qui ont montré que la production de la gliotoxine, un antibiotique qui semble agir au niveau des groupements thiol des protéines membranaires (Jones et Hancock, 1988), par G. virens en culture liquide n'avait pas d'effet toxique sur celui-ci. Ce phénomène pourrait être exploité par les antagonistes pour contrecarrer l'antagonisme exercé par d'autres microorganismes occupant les mêmes niches écologiques.

Pour *S. sclerotiorum*, les sclérotes constituent un moyen de conservation et la principale source de contamination des plantes soit par germination mycélienne soit par germination car-

pogène. La mise au point d'une méthode de lutte efficace contre ce pathogène doit impérativement viser la destruction de ses formes de conservation afin d'interrompre son cycle biologique. L'expérience de destruction des sclérotes dans le sol en confrontant les sclérotes avec les antagonistes sous formulation BA-FB, a permis de montrer qu'aussi bien les espèces de *Trichoderma* que de *Gliocladium* sont capables de détruire les sclérotes du pathogène. En moyenne près de 64, 42 et 38 % des sclérotes sont détruits par des traitements à base d'une formulation de *T. viride*, *T. harzianum* et *G. roseum*, respectivement. Les taux de destruction des sclérotes obtenus lors de cette expérience pourraient en réalité être plus élevés, si l'on considère les conditions naturelles de formation des sclérotes. En effet, selon Merriman (1976), les sclérotes produits in vitro ont un cortex plus épais et plus régulier, assurant ainsi une meilleure protection. Le mycoparasitisme des sclérotes de *S. sclerotiorum* et d'autres champignons à sclérotes, par des antagonistes du sol a été rapporté par plusieurs auteurs (Adams et Ayers, 1984 ; Artigue et Davet, 1984 ; Mclaren et al, 1996 ; Davet, 1986 et Papavizas et Collin, 1990). L'évaluation de l'efficacité de la biomasse des antagonistes sous formulation BA-FB est en cours de réalisation en présence de plantes hôtes en culture sous serre.

Références

Adams P.B. et Ayers, W.A. (1984). Histological and physiological aspect of Sclerotinia species by two mycoparasites. Phytopathology 73 : 1072-1076.

Adams P.B. et Fravel D.R. (1990). Economical biolocal control of Sclerotinia lettue drop by Sporodemium sclerotivorum. Phytopathology 80 : 1120-1124.

Artigue M. et Davet D. (1984). Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de Trichoderma vis-à-vis de quelques champignons à sclérotes. Soil Biol. Biochem. 16 : 413-417.

Camporota P. (1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de Rhizoctonia kühn. Agronomie 5 : 613-620.

Cook R.J. et Baker K.F. (1983) The natural and practice of biolocal control of plant pathogens. 539 pages. APS Press, St. Paul MN.

Davet P. (1986). Activité parasitaire des *Trichoderma* vis-à-vis des champignons à sclérotes : corrélation avec l'aptitude à la compétition dans un sol non stérile. Agronomie 6 : 863-867.

Davet P. et Martin C. (1993). La sclérotiniose des laitues : un problème toujours actuel. Phytoma 450 : 33-36.

De Cal A., Sagasta E.M. et Melgarejo P. (1988). Antifungal substances produced by Penicillium frequentans and their relationship to the biocontrol of Monilinia laxa. Phytopathology 78 : 888-893

Denis C. et Webster J. (1971a). Antagonistic of species groups of Trichoderma. I. Production of volatile anbiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 25-39.

Denis C. et Webster J. (1971b). Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. II. Production of volatiles antibiotics. Trans. Br. Mycol 57 : 41-48.

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

Hunnusch D.J. et Boland G.J. (1996). Influence of air temperature and humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathology 86 : 406-410.

Hajlaoui M.R. et Bélanger R.R. (1990). Comparative effets of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. Nether. J. Plant Pathol. 97 : 203-208.

Hajlaoui M.R., Traquair J.A., Jarvis W.R. et Bélanger, R.R. (1994). Antifungal activity of extracellular metabolites produced by Sporothrix flocculosa. Bio. Science Techol. 4 : 229-237.

Howell C.R. (1986) Relevance of mycoparasites in the biological control of Rhizoctonia solani by *Gliocladium* virens. Phytopathology 77 : 992-994.

Huang H.C. (1978). *Gliocladium catenulatum :* hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and Fusarium species. Can.J. Bot. 56 : 2243-2246.

Huang H.C. et Hoes J.A. (1976). Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by Coniothyrium minitans. Can. J. Bot. 54 : 406-410.

Jones R.W. et Hancock J.G. (1988). Mecanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin activity. J. Gen. Microbiol. 134 : 2067-2075.

Lewis J.A., Papavizas G.C. et Lumsden R.D.(1991). A new formulation system for the application of biocontrol fungi to soil. Bio Sc. Technol 1 : 59-69.

Lim T.K. et Teh B.K. (1989). Antagonism in vitro of *Trichoderma* species against several basidiomycetous soil-borne pathogens and Scleroitum rolfsii. J. Plant Dis. Prod. 97 : 33-41.

Mathilde B., Murielle D. et Yves D. (1997). Du nouveau du côté des Scleortinia. Phytoma 490 : 15-19.

McLaren D.L., Huang H.C. et Rimmer S. R. (1996). Control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* by Coniothyrium minitans and Talaromyces flavus. Plant Dis. 80: 1373-1378.

Merriman P.R. 1976. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. Soil Biol. Biochem. 8 : 385-389.

Nelson B., Duval D. et Wu H. (1988). An in vitro technique for large-scale production of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 78 : 1470-1472.

Papavizas G.C. et Collins D.J. (1990). Influence of *Gliocladium* virens on germination and infectivity of Sclerotium rolfsii. Phytopathology 80 : 627-630.

Pionnat J.C. (1982). Le mal sec Phoma tracheiphila (Petri) : perspectives sur la lutte chimique et les variétés résistantes. Fruit 37 : 237-248.

Souliac L. et Leroux P. (1995). Sclérotiniose du colza -faut-il revoir la stratégie de lutte. Phytoma 474 : 29-31.

Tu J.C. (1980). *Gliocladium virens* : a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 70 : 670-674.

Vincent C. et Coderre D. (1992). Lutte biologique. 671pages. Tec. doc. (Lavoisier, Canada).

Walker J.A. et Maude R.B. (1975). Natural occurrence and growth of *Gliocladium roseum* on the mycélium and sclerotia of Botrytis allii. Trans. Br. Myco. Soc. 65 : 335-337.

Whipps J. M. et Magan N. (1987). Effect of nutrient status and water potential of media on fungal growth and antagonist-pathogen interaction. EPPO Bulletin 17 : 581-591.

Young-H.A., James P. S. et Charles M. K. (1991). Production of glyotoxin by *Gliocladium* virens as a function of source and concentration of carbon and nitogen. Mycol. Res. 95 : 1242-1248.