

Sélection de quelques souches de *Trichoderma* d'origine marocaine selon leur aptitude à la compétition saprophytique dans le sol

Mouria A., Ouazzani Touhami A. et Douira A.

Lab. de Botanique et de Protection des Plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, BP. 133

Résumé

Pour être efficace, un antagoniste doit posséder une bonne aptitude à la compétition saprophytique. Quatre méthodes ont été utilisées dans cette étude pour évaluer ce caractère : colonisation de la paille, des pastilles gélosées, du papier filtre et l'hydrolyse de la carboxyméthylcellulose. L'application de ces méthodes à quelques souches de Trichoderma d'origine marocaine a abouti à des résultats convergents qui ont permis de retenir T. viride (TV1, TV2, TV3, TV4) et T. harzianum (TH1 et TH2) comme souches possédant une forte aptitude saprophytique.

Mots clés : *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, technique, compétition saprophytique, sol

Abstract : Selection of some moroccan strains of *Trichoderma* according to their aptitude for saprophytic competition in the soil

In order to be effective, an antagonist has to have a good aptitude to saprophytic competition. Four methods were used in this study in order to evaluate this character: colonisation of the straw, some drops of jelly-like agar medium, filter papers and the carboxymethylcellulose hydrolysis ability. The results obtained after the application of these methods to some moroccan strains of Trichoderma allowed to select T. viride (TV1, TV2, TV3, TV4) and T. harzianum (TH1 and TH2) as an isolates possessing a strong saprophytic faculty.

Key-words : *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, technic, saprophytic competition, soil

ملخص : إنتقاء عدة عزلات من الطريكودرما من أصل مغربي حسب قدرتها على التنافس على العيش في التربة

مورية ع.، وزاني تهامي أ. و ادويرة ع.
مختبر علوم و وقاية النباتات، كلية العلوم، مرب 133، جامعة ابن طفيل، القنيطرة، المغرب

يجب على الفطر المضاد لكي يكون فعالا أن يمتلك قدرة جيدة على التنافس على العيش في التراب. لهذه الغاية تمت دراسة و مقارنة أربع طرق بما فيها: القدرة على العيش في التبن، على قطع مأخوذة من وسط مكون من الأكار- أكار وعلى الورق الراشح وكذا القدرة على تحليل الكربوكسيمثيل سيليلوز. مكن استعمال هذه الطرق على عدة عزلات من الطريكودرما من أصل مغربي من الحصول على نتائج جيدة تم على إثرها الإحتقا بعزلات طريكودرما فيريدي (TV1, TV2, TV3, TV4) و عزلات طريكودرما هارزينوم (TH1 و TH2) التي تمتلك أعلى قدرة تنافسية على العيش في التربة.

الكلمات المفتاحية : الطريكودرما فيريدي، طريكودرما هارزينوم، طريكودرما هارزينوم، طرائق، القدرة على العيش، التربة

Introduction

Au Maroc, plusieurs travaux ont prouvé que les *Trichoderma* peuvent être utilisés comme des agents de lutte biologique contre divers champignons telluriques tel que *Verticillium dahliae* (Ouazzani Touhami et al., 1995 ; Ouazzani Touhami, 1995), contre les pathogènes foliaires tels que : *Botrytis cinerea* (Hmouni et Douira 1999), *P. oryzae* (Ouazzani Touhami et al., 1997 a et b; Mouria et al., 1997 a ; Mouria 2000 et Ouazzani Touhami 2001), *H. oryzae* (Mouria et al., 1997 b), *H. sativum*, *H. spiciferum* et *H. australiensis* (Ouazzani Touhami, 2001) et contre ceux transmis par les semences du riz (Ouazzani Touhami et al., 1999 et Hassikou, 2000).

Pour être efficace, un antagoniste doit posséder non seulement une activité mycoparasitaire spécifique mais aussi une bonne aptitude à la compétition saprophytique pour qu'il soit utilisé contre les pathogènes du sol ou en enrobage des semences pour protéger les plantes contre les maladies foliaires.

Plusieurs chercheurs ont associé le pouvoir antagoniste des *Trichoderma* essentiellement à leur aptitude à la compétition saprophytique dans le sol vis-à-vis de la microflore indigène (Rodriguez et al., 1975 ; Papavizas et Collins, 1990; Berry et Deacon, 1991; Keel, 1991; Mcque, 1991 ; Guevas et al., 1994 et 1996 ; Dinakaran et Marimuthu, 1998). Cependant, il était très difficile, voire même impossible, d'assurer l'installation d'un micro-organisme étranger dans un sol non stérile (Garett, 1965). Les tentatives de lutte biologique, contre les champignons parasites telluriques, se sont pendant longtemps heurtées à cet obstacle. Quelques succès ont pourtant été enregistrés ces trois dernières décennies, notamment avec les *Trichoderma*.

En effet, en plus des doses élevées des organismes à introduire, il est nécessaire d'apporter une base nutritive capable de leur fournir l'énergie nécessaire pour surmonter les antagonismes naturels dans le milieu microbiologiquement surpeuplé que constituent les sols (Davet et al., 1981; Davet et Camporota, 1986).

Tous les *Trichoderma* n'ont pas les mêmes potentialités (Artigue et Davet, 1984). Aussi, est-il indispensable de les trier. Donc pour choisir judicieusement les souches, il faut pouvoir apprécier ce caractère d'une manière rapide et sûre.

C'est pourquoi nous nous proposons d'évaluer la compétitivité de quelques souches de *Trichoderma* d'origine marocaine, en présence de la microflore du sol, par quatre techniques qui se basent sur leurs aptitudes à coloniser un substrat en situation de compétition (Davet et Camporota, 1986).

Matériel et méthodes

Matériel fongique

14 souches de *Trichoderma* provenant de la collection " Mycologie " du Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes à la Faculté des Sciences de Kénitra (L. B. P. P.) sont utilisées. Ces souches sont conservées sur des rondelles de papier filtre au congélateur. Pour la production de l'inoculum, elles sont cultivées sur milieu P. D. A.

Préparation de l'inoculum

La terre utilisée dans tous les essais est celle du sol de la forêt de Maâmora (à texture très sableuse et à faible teneur en matière organique 0,6%).

Pour les essais de colonisation saprophytique, toutes les souches sontensemencées dans des fioles de Roux sur un milieu constitué d'un mélange de sable et de farine d'avoine, humidifié (200 g de sable, 6 g de farine d'avoine et 30 ml d'eau distillée ; 2 autoclavages à 100°C pendant 30 mn et à 24 h d'intervalle). Ces cultures sont maintenues à 28°C pendant 12 jours, puis elles sont laissées pendant une période équivalente dans les conditions ambiantes du laboratoire. Les fioles sont alors vidées, leur contenu est homogénéisé puis séché à l'air pendant 3 jours. Les poudres ainsi obtenues sont conservées à 5°C et constituent ce que nous appellerons par la suite l'inoculum.

Méthodes d'estimation de la compétition saprophytique des *Trichoderma*

Selon Davet et Camporota (1986), quatre méthodes peuvent être utilisées pour estimer la compétition saprophytique dans le sol de différentes souches de *Trichoderma*.

Colonisation saprophytique de la paille par les *Trichoderma*

L'inoculum est mélangé à la terre tamisée à raison de 0, 1, 1, 10, 25 et 50% (g/g). Le mélange est homogénéisé à sec pendant 8 mn. A 200 ml de sol ainsi inoculé, on ajoute 2 g de paille

de riz hachée en fragments de 2 cm environ, puis de l'eau pour humidifier. Après brassage à l'aide d'une cuillère, l'ensemble est introduit dans un sac de polyéthylène dont l'ouverture est scellée avec un ruban adhésif. Les sacs sont mis en incubation à l'étuve à 28°C et à l'obscurité. Quatre jours plus tard, la paille est recueillie, lavée sous un courant d'eau, désinfectée superficiellement à l'hypochlorite de sodium pendant 2 mn, rincée et découpée en fragments de 5 mm de long. Pour chaque sac, 100 fragments sont mis en culture sur milieu P.D.A.

Après une semaine d'incubation à 28°C et à l'obscurité, on compte le nombre de fragments de paille colonisés. Pour chaque souche, 3 répétitions ont été réalisées.

Il est alors possible de calculer la proportion d'inoculum nécessaire pour obtenir 50% de colonisation. Ces valeurs appelées C50 peuvent être déterminées après linéarisation des courbes, en exprimant les concentrations en logarithmes.

Développement des *Trichoderma* en compétition par la méthode des pastilles gélosées

Principe

Cette méthode consiste à mélanger à la terre des quantités croissantes d'inoculum, dans des proportions de 6, 24 et 90% en poids. Un échantillon de 12 g de chaque mélange est réparti au fond d'une boîte de Petri. On verse par-dessus 20 ml d'eau gélosée en surfusion et l'on imprime à la boîte un mouvement circulaire rapide de façon à bien homogénéiser l'ensemble. Après refroidissement et solidification, des pastilles de 8 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce et déposées sur milieu P.D.A. (à raison de quatre pastilles disposées en croix, par boîte de Petri). Les boîtes sont mises en incubation à l'obscurité et à 28°C pendant 5 jours, puis exposées durant 2 jours à la lumière continue et à la température du laboratoire avant d'être notées. Cinq boîtes de 4 pastilles chacune sont ensemencées pour chaque traitement. Les essais sont répétés trois fois.

Notation

Chaque pastille est notée de 0 (aucun développement) à 4 (toute la surface autour de la pastille est colonisée par *Trichoderma*). Les notes des 20 pastilles, correspondant à chaque traitement, sont ensuite additionnées et la note maximale étant donc de 80. Il est alors possible de calculer la proportion d'inoculum nécessaire pour obtenir la note 40, moitié de la note maximale. Ces valeurs appelées C40, peuvent être aussi déterminées en linéarisant les courbes, après avoir exprimé les concentrations en logarithmes. On aboutit alors à un classement des souches, les plus compétitives étant celles dont la valeur de C40 est la plus basse. On peut encore classer les souches d'une deuxième manière, en attribuant à chacune d'elles une note égale au total des différentes notes obtenues pour chacune des concentrations testées.

Développement des *Trichoderma* en compétition par la méthode des pièges de papier filtre

Protocole expérimental

Le sol est inoculé à raison de 15 grains fertiles d'inoculum /g et constitue le stock initial qui sera ensuite dilué par mélange avec de la terre désinfectée à 3 reprises à 100°C, de façon à avoir des rapports de 100, 10, 1, 0,1 et 0,01 %. Après humidification, chaque lot est divisé en deux parties : l'une est analysée aussitôt, l'autre est conservée à 28°C dans un cristalliseur fermé par un film plastique perforé pour être analysée après 30 j.

Deux dates d'analyse ont été retenues : au moment de l'introduction de l'inoculum dans le sol (J 0) et après 30 j d'incubation du sol inoculé (J 30)

Principe

La méthode consiste à enfouir dans des boîtes de Petri contenant le sol inoculé, et humidifié, des pièges constitués de rondelles de papier filtre de 10mm de diamètre, imprégnées de milieu de Richards (KH_2PO_4 : 1 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5 mg ; ZnSO_4 : 5 mg ; MnCl_2 : 2 mg ; galactose : 20 g ; glycolle : 2,25 g et H_2O distillée q.s.p. 1000 ml) additionné de (rose Bengale : 100 mg; sulfate de streptomycine : 100 mg; bénomyl : 5 mg; sulfate de cuivre : 5 mg) (le bénomyl n'a pas montré d'effet inhibiteur sur le développement des *Trichoderma*, Mouria, 2000). Pour chacune des concentrations, on remplit quatre boîtes de Petri de 90 mm de diamètre avec une quantité constante de mélange dans lequel, après humidification, on place verticalement 10 pièges par boîte, espacés de 20 mm en tous sens. Après une incubation de 5 jours à 25°C, ces pièges sont rincés, essorés et déposés sur milieu P.D.A. La colonisation des pièges par les *Trichoderma* est notée après 48 h d'incubation à 28°C.

Quantification

L'équation de la droite de régression liant le pourcentage de colonisation des pièges et les concentrations correspondantes permet de déterminer le poids de sol nécessaire pour que 50 % des pièges soient colonisés. Ce poids est appelé " Unité de colonisation 50 " (UC 50) qui permet de comparer différents échantillons de sol entre eux, en nombre d'UC 50 /g de terre.

Hydrolyse de la carboxyméthylcellulose

Pour les essais des activités enzymatiques, les souches sont cultivées dans un milieu liquide dans des fioles de Roux contenant un disque de filtre cellulosique de 12,5 cm de diamètre, découpé en 8 secteurs égaux, et 80 ml de solution minérale ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 1g ; KNO_3 : 250 mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 250 mg ; KH_2PO_4 : 125 mg ; K_2HPO_4 : 125 mg et de l'eau distillée q.s.p 1000 ml).

Après 9 jours d'incubation à 28°C, les cultures en milieu liquide sont filtrées sur de la mousseline, puis sur du papier filtre, permettant d'obtenir un filtrat de culture. 0,1 ml du filtrat est utilisé immédiatement pour chaque souche. L'activité enzymatique est appréciée par la méthode colorimétrique de Nelson-Somogyi. Le milieu réactionnel est constitué d'1 ml de so-

lution de carboxyméthylcellulose à 1,2% dans un tampon citrate 0,05 M à pH = 4. Le dosage du glucose libéré est réalisé après 6 h d'incubation à 38°C. Chaque analyse est répétée 3 fois.

Analyse statistique

Le traitement statistique des données a porté sur l'analyse de la variance et le test de la P. P. D. S. au seuil de 5% selon le test de Neuman et Keuls.

Résultats

Colonisation de la paille

Le tableau 1 récapitule les pourcentages de colonisation des fragments de paille de riz par les *Trichoderma* apportés à différentes concentrations. L'ensemble des résultats obtenus montre que lorsque les souches TH1 et TH2 sont apportées à 1 % d'inoculum, elles arrivent à coloniser tous les fragments de paille. Les souches TV1 et TV2 ont besoin d'être apportées à 10% d'inoculum pour atteindre 100% de colonisation des fragments. Quant à la souche TV3, elle exige 25% d'inoculum pour atteindre le même pourcentage de colonisation; alors que les souches TV4, T3, TG3 et TFQ ont besoin d'être apportées à 50% pour pouvoir coloniser à 100% les fragments de paille.

Tableau 1. Pourcentages moyens de fragments de paille colonisés par chaque souche de *Trichoderma*, apportée à différentes concentrations, après 4 jours d'incubation dans un sol non stérile

Souches	Concentrations d'inoculum				
	0,1% (g/g)	1% (g/g)	10% (g/g)	25% (g/g)	50%g /g)
TH1	73 a	100 a	100 a	100 a	100 a
TH2	69 a	100 a	100 a	100 a	100 a
TV1	60 b	72 b	100 a	100 a	100 a
TV4	57 b	60 c	70 d	85 c	100 a
TV2	56 b	69 b	100 a	100 a	100 a
TV3	54 b	62 c	89 b	100 a	100 a
T3	45 c	60 c	74 d	85 c	100 a
TG3	43 c	58 c	69 d	91 b	100 a
TFQ	41 c	55 c	80 c	84 c	100 a
TBP	30 d	58 c	63 e	80 c	91 b
I2	14 e	25 d	38 f	52 d	65 c
TG2	8 f	12 e	29 g	43 e	50 e
TG1	6 fg	16 e	23 h	40 e	55 d
TG4	4 g	6 f	18 i	22 f	46 f

Deux résultats de la même colonne affectés de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Newman et Keuls).

Toutefois, les souches TBP, I2, TG2, TG1 et TG4 n'atteignent pas 100% de colonisation même lorsqu'elles sont apportées à 50%.

Dans le tableau 2, les *Trichoderma* sont classés par ordre d'efficacité décroissante, en comparant leurs C50 (concentration d'inoculum nécessaire pour que 50% des fragments de paille soient colonisés). Les plus compétitifs sont ceux ayant une C50 faible.

Il ressort clairement de ces résultats qu'on peut subdiviser les *Trichoderma* en trois groupes:

- Un premier groupe formé par les souches TH1, TH2, TV1, TV2, TV4 et TV3 qui ont une forte à très forte activité saprophytique ($C50 < \text{ou} = 0,1\%$) ;
- Les souches T3, TG3, TFQ, TBP et I2 forment un deuxième groupe qui a une activité saprophytique moyenne à faible ($0,1\% < C50 < 25\%$) ;
- Le troisième groupe est formé par les souches TG2, TG1 et TG4 qui ont une activité saprophytique très faible ($C50 > 50\%$).

Tableau 2. Classement des *Trichoderma* en comparant leurs C50 (concentrations d'inoculum nécessaires pour l'obtention de 50% de colonisation des fragments de paille).

Souches	C50	R ²	Classement
TH1	0,0009	0,75	1
TH2	0,007	0,927	2
TV1	0,03	0,94	3
TV2	0,05	0,94	4
TV4	0,09	0,80	5
TV3	0,1	0,95	6
T3	0,25	0,95	7
TG3	0,33	0,92	8
TFQ	0,37	0,97	9
TBP	0,81	0,93	10
I2	17,7	0,92	11
TG2	94,2	0,91	12
TG1	93,9	0,84	13
TG4	1000	0,72	14

R² : Coefficient de corrélation.

Méthode des pastilles gélosées

Les tableaux 3 et 4 où sont indiquées respectivement les notes attribuées à chaque souche de *Trichoderma*, en se basant sur son degré de colonisation des pastilles gélosées et où les souches sont classées soit par comparaison de leurs C40 (concentration d'inoculum nécessaire pour obtenir la note 40) calculées après transformation des concentrations en logarithmes soit par sommation des notes partielles, montrent clairement que les souches forment quatre groupes :

- Un premier groupe formé par les souches TH1, TH2, TV1, TV3 et T3 qui sont hautement compétitives puisqu'il suffit d'un faible apport d'inoculum (<6%) pour atteindre la note 40.

- Un deuxième groupe formé par les souches TV4, TV2 TG3 et I2 qui sont moyennement compétitives (6% < C40 < 24%) .
- Un troisième groupe qui contient les souches TBP, TFQ et TG4 qui sont moyennement à faiblement compétitives (24% < C40 < 90%) .
- Un quatrième groupe contenant les souches TG1 et TG2 qui sont très faiblement compétitifs (C40 > 90%).

Si l'on compare les résultats de la méthode de colonisation des fragments de paille à ceux de la méthode des pastilles gélosées, on trouve que malgré les différences notées entre l'ordre de classement, la subdivision des groupes reste sensiblement analogue.

Tableau 3. Activité saprophytique des souches de *Trichoderma*, exprimée en note de colonisation, par la méthode des pastilles gélosées.

Souches	Concentration d'inoculum		
	6% (g/g)	24% (g/g)	90% (g/g)
TH1	63 a	80 a	80 a
TH2	56 b	70 b	80 a
TV1	50 c	68 b	72 bc
TV4	32 ef	50 c	62 de
TV2	35 e	63 b	67 cd
TV3	42 d	67 b	70 bc
T3	45 cd	69 b	75 ab
TG3	30 f	45 c	55 e
TFQ	18 i	25 e	49 f
TBP	22 gh	30 de	58 e
I2	26 g	33 d	62 de
TG2	8 j	11 h	32 h
TG1	10 j	15 g	38 g
TG4	15 i	21 f	43 g

Deux résultats de la même colonne affectés de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

Tableau 4. Classement des *Trichoderma* par comparaison de leurs C40 (concentration d'inoculum nécessaire pour obtenir la note 40, moitié de la note maximum).

Souches	C40 calculée après linéarisation	R2	Note obtenue par sommation des notes partielles	Classement
TH1	0,1	0,76	223	1
TH2	0,9	0,99	206	2
TV1	1,37	0,89	190	3
T3	3	0,9	189	4
TV3	3,58	0,84	179	5
TV2	6,68	0,85	165	6
TV4	11,44	0,99	144	7
TG3	16,38	0,99	130	8
TBP	30,12	0,9	110	9
TFQ	52,96	0,9	92	10
TG4	87,89	0,89	79	11
I2	22,86	0,88	121	12
TG1	147,39	0,87	63	13
TG2	315,28	0,83	51	14

R² : Coefficient de corrélation.

Méthode des pièges de papier filtre

Les pourcentages de colonisation des pièges de papier filtre par les *Trichoderma*, apportés à différentes concentrations d'inoculum le jour de l'incorporation de l'inoculum dans le sol (J0), sont consignés dans le tableau 5. Le classement des souches par cette méthode a été réalisé par comparaison du nombre d'unités de colonisation par gramme de terre (UC50/g) (tableau 6). L'ensemble des résultats obtenus montre que TH1, TH2 et TV1, ont une aptitude saprophytique très forte (UC50 / g > 66). TV4, TV2, TV3, TG3 et TBP ont une aptitude saprophytique moyenne à forte (UC50 / g > 1). T3 et I2 ont une aptitude faible (0,1 < UC50 / g < 1). Par contre, TFQ, TG1, TG4 et TG2 ont révélé une aptitude saprophytique très faible (UC50 / g < 0,1).

A J30 (tableau 5 et 6), on obtient un classement sensiblement analogue avec une tendance à la diminution du nombre d'UC50 par gramme de terre chez la majorité des souches. Contrairement aux souches TH1, TH2 et TV4 dont le nombre d'UC50 augmente et TFQ et I2 pour lesquelles ce nombre reste à peu près le même.

Il est intéressant de noter que, quelle que soit la méthode d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique, les deux souches de *T. harzianum* (TH1 et TH2) occupent toujours les premières positions.

Tableau 5. Pourcentages de colonisation des pièges de papier filtre par les *Trichoderma* apportés à différentes concentrations, le jour de l'incorporation de l'inoculum dans la terre (J0) et 30 jours après l'incorporation de l'inoculum dans la terre (J30).

Souches	Concentration d'inoculum									
	0,01 (g/g)		0,1 (g/g)		1 (g/g)		10 (g/g)		100 (g/g)	
	J0	J30	J0	J30	J0	J30	J0	J30	J0	J30
TH1	52 a	59 a	78 a	75 a	95 a	90 a	100 a	100 a	100 a	100 a
TH2	42 b	50 b	68 b	76 a	75 b	93 a	100 a	100 a	100 a	100 a
TV1	49 a	40 c	65 bc	53 c	80 b	69 b	100 a	89 b	100 a	100 a
TV4	26 de	40 c	45 e	59 b	52 de	65 bc	69 c	80 c	100 a	100 a
TV2	30 cd	23 d	54 d	41 d	65 c	54 d	70 c	65 d	100 a	95 b
TV3	35 c	25d	60 e	48 c	78 b	61 c	92 b	83 c	100 a	100 a
T3	22 e	15 e	40 e	30 e	54 d	41 e	56 d	55 e	100 a	91 c
TG3	20 ef	11 f	42 e	25 e	46 def	35 e	50 de	41 f	100 a	88 c
TFQ	11 g	20 de	18 g	39 d	25 g	42 e	35 gh	53 e	73 c	95 b
TBP	15 fg	17 e	28 f	25 e	39 f	36 e	45 ef	42 f	81 b	83 d
I2	12 g	2 g	24 f	8 f	45 ef	21 f	41 fg	26 g	80 b	41 f
TG2	0 i	0 h	2 j	0 g	14 hi	0 h	12 j	6 h	35 e	11 h
TG1	6 h	3 g	11 h	10 f	16 h	18 f	32 h	25 g	75 c	61 e
TG4	4 h	0 h	6 i	0 g	10 i	5 g	22 i	11 h	50 d	27 g

Deux résultats de la même colonne affectés de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Newman et Keuls).

Tableau 6. Classement des *Trichoderma* en fonction du nombre d'unités de colonisation par gramme de terre, le jour de l'incorporation de l'inoculum dans la terre (J0) et 30 jours après l'incorporation de l'inoculum dans la terre (J30).

Souches	UC50		Nombre d'UC 50/g de terre		R2		Classement	
	J0	J30	J0	J30	J0	J30	J0	J30
TH1	0,001	5,5 10 ⁻⁴	1000	1818,2	0,82	0,92	1	1
TH2	0,015	0,001	66,7	1000	0,93	0,85	3	2
TV4	0,32	0,046	3,1	21,7	0,95	0,98	6	3
TV1	0,008	0,051	125	19,6	0,95	0,99	2	4
TV3	0,038	0,189	26,3	5,3	0,96	0,99	4	5
TV2	0,13	0,464	7,7	2,2	0,94	0,97	5	6
TFQ	17,71	1,028	0,06	1	0,84	0,86	11	7
T3	3,662	1,597	0,3	0,6	0,90	0,94	9	8
I2	4,241	3,166	0,2	0,3	0,88	0,98	10	9
TG3	0,803	3,875	1,2	0,3	0,81	0,85	8	10
TBP	0,564	4,274	1,8	0,2	0,90	0,85	7	11
TG1	24,191	107,28	0,04	0,009	0,80	0,84	12	12
TG4	843	2,34 10 ⁶	0,001	0,4 10 ⁻⁶	0,81	0,84	13	13
TG2	47,3 10 ³	4,39 10 ¹⁴	2 10 ⁻⁵	0,2 10 ⁻¹⁴	0,83	0,79	14	14

R2 : Coefficient de corrélation.

Activité cellulolytique

Le tableau 7, où sont consignés les résultats de l'activité cellulolytique des différentes souches de *Trichoderma*, indique que les filtrats de cultures hydrolysent la carboxyméthylcellulose dans des proportions variables. Ainsi, la plus grande activité est observée chez TH1, avec 0,539 mg de glucose libéré /ml, suivie par TV2, TV3 TH2 et TV4 qui ont libéré respectivement 0,317; 0,307; 0,283 et 0,274 mg de glucose /ml.

Une activité moyenne est notée pour TV1 et T3 avec respectivement 0,222 et 0,115 mg/ml de glucose libéré. Alors que les autres souches testées ont les activités les plus faibles (la quantité de glucose libérée varie entre 0,026 mg/ml pour TG1 et 0,081 mg/ml pour TG3

Tableau 7. Activité cellulolytique des différents *Trichoderma*, représentée par l'apparition de molécules de glucose dans une solution de Carboxyméthylcellulose, incubée pendant 6 heures à 38°C, en présence de filtrats de cultures.

Souches	Glucose libéré (mg/ml)	Classement
TH1	0,539 a	1
TV2	0,317 b	2
TV3	0,307 b	2
TH2	0,283 bc	3
TV4	0,274 c	4
TV1	0,223 c	4
T3	0,115 d	5
TG3	0,081 de	6
TBP	0,072 de	6
TFQ	0,064 de	6
I2	0,054 de	6
TG2	0,044 de	6
TG4	0,032 e	7
TG1	0,026 e	7

Deux résultats de la même colonne diffèrent significativement au seuil de 5% s'ils ne sont affectés d'aucune lettre commune (test de Newman et Keuls).

Discussion et conclusion

Vu que le problème majeur rencontré lors de l'application des antagonistes dans le sol d'un écosystème donné est de surmonter la compétition exercée par la microflore existante dans ce sol, un travail de sélection s'impose donc puisque seuls peuvent être retenus, comme candidats à la lutte biologique, les souches possédant une compétitivité élevée (Dinakaran et Marimuthu, 1998). Otieno (1998) a introduit trois souches de *Trichoderma* dans le sol et il a montré qu'elles se maintiennent à un niveau très élevé et pendant longtemps, mais la population établie n'a pas d'effet sur la viabilité ou l'infection de l'inoculum du pathogène. Toutefois, bien que l'activité antagoniste d'un auxiliaire biologique ne soit pas forcément liée à

la taille de sa population, le maintien d'un inoculum important est la garantie d'une action prolongée (Davet, 1983).

Davet *et al.* (1981) ont rapporté que lorsque les *Trichoderma* sont apportés sous forme d'une simple poudre de spores, cet inoculum se maintient difficilement dans le sol et y est peu actif. Il paraît donc nécessaire d'introduire le champignon avec un support qui lui fournit une base nutritive suffisante pour échapper, au moins temporairement, à la compétition avec d'autres microorganismes telluriques (Beagle et Papavizas, 1985; Jagadeesh et Geetha, 1994). En effet, de nombreux substrats peuvent remplir cette condition. Certains auteurs (Wells *et al.*, 1972; Backman et Rodriguez, 1975; Lewis et Papavizas, 1980; Elad *et al.*, 1980) ont utilisé des milieux de culture autoclavés. Mais, Davet *et al.* (1981) ont mis au point un substrat simple qui n'a pas besoin d'être autoclavé, ce qui simplifie considérablement sa préparation et le rend convenable à une utilisation pratique : c'est le milieu non stérile à base de paille de blé hachée. En effet, Mata *et al.* (1998) ont rapporté que les *Trichoderma* possèdent une bonne aptitude à coloniser la paille de blé.

Toutefois, *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma lignorum* sont mieux actifs lorsqu'ils sont introduits avec du son de blé (Sreenivasaprasad et Manibhushan, 1993; Aziz *et al.*, 1997). Monaco et Rollon (1999) ont montré également que lorsque les *Trichoderma* sont introduits sous forme de boules d'alginate, ils peuvent être maintenus en vie pendant 3 mois et lorsqu'ils sont introduits dans le sol avec le son de blé, ils demeurent biologiquement actifs plus de deux années.

Cette nécessité d'introduction des *Trichoderma* avec paille de blé a poussé Davet et Comporota (1986) à choisir un modèle qui n'est pas trop éloigné des conditions naturelles, d'où la méthode de la colonisation de fragments de paille enfouis dans un sol non stérile pour évaluer l'aptitude des *Trichoderma* à la compétition saprophytique.

En appliquant cette méthode, on a remarqué que pour un temps d'incubation court (une semaine) et même à une très grande dilution de l'inoculum (0,1 g/g), certaines souches de *T. harzianum* (TH1 et TH2) et de *T. viride* (TV1, TV4, TV3 et TV2) arrivent à coloniser plus de 50% des fragments, montrant ainsi une très forte aptitude à la compétition saprophytique.

Dans nos expériences on a utilisé la paille de riz et non celle de blé dans le but d'optimiser l'utilisation des *Trichoderma* comme moyen de lutte biologique contre les maladies fongiques du riz (Mouria, 2000). Cependant, Lewis *et al.* (1996) ont montré qu'il n'y a pas d'interaction entre les propriétés intrinsèques de l'agent de lutte biologique et la base de nutriment.

Nos résultats montrent également que les souches de *T. harzianum* (TH1 et TH2) et de *T. viride* (TV1, TV4, TV3 et TV2) ont une activité cellulolytique très grande puisqu'ils hydrolysent activement la carboxyméthylcellulose. Le même résultat a été rapporté par Chet et Baker (1980 et 1981) et Harman *et al.* (1981) qui ont démontré qu'il existe des souches de *Trichoderma* fortement productrices de cellulase et aussi de b-1-3 glucanase et de chitinase. En outre, Calderan *et al.* (1993) ont rapporté que l'addition de la cellulase issue de *Trichoderma viride* aux cultures cellulaires de vigne induit des réactions de défense chez la plante, comme réponse d'hypersensibilité, avec production de phytoalexine.

Donc l'apport de *Trichoderma* avec l'addition des substances organiques dans le sol, capables d'être dégradées par ces enzymes, augmente l'efficacité de cet agent. Garret (1966, 1975); Davet et Camporota (1986); Ahmad et Baker (1988) et Lynch (1989) ont montré que la com-

pétitivité est étroitement corrélée à la capacité de dégradation chez les *Trichoderma*. Aussi, une bonne corrélation entre la méthode enzymatique et celle de la colonisation de la paille a été observée lors de la conduite de nos essais.

Par ailleurs, Jayaraj et Ramabadran (1998) ont signalé que les fertilisants nitrogéniques (urée, sulfate d'ammonium et chlorure d'ammonium) favorisent la croissance de *Trichoderma* dans le sol.

De même, Dinakaran et Marimuthu (1998) ont produit des mutants qui ont une aptitude saprophytique beaucoup plus élevée que celle des souches sauvages. Ces mutants ont révélé en parallèle une activité cellulolytique plus élevée.

Donc la méthode de l'activité enzymatique peut être utilisée, en absence d'interférence avec la microflore du sol, pour identifier partiellement les souches les plus compétitives.

Avec la méthode des pastilles gélosées, l'ordre de classement des souches change sensiblement mais la même tendance est notée avec les résultats obtenus suite à la méthode de colonisation de la paille. Ce qui nous porte à confirmer que les souches TH1, TH2 (*T. harzianum*), TV1, TV4, TV3 et TV2 (*T. viride*) sont les plus compétitives.

La méthode des pastilles gélosées permet de travailler dans des conditions plus standardisées. D'une part, Le substrat étant moins sélectif que la paille, on remarque que les doses d'inoculum nécessaires sont plus importantes puisque la concurrence est plus sévère, et aussi que l'activité cellulolytique n'est plus primordiale. D'autre part, le classement peut être obtenu très rapidement après simple addition des notes correspondantes à chacune des concentrations utilisées.

Davet et Camporota (1986) ont comparé deux méthodes de préparation du mélange : apport d'inoculum en proportion déterminée, sans tenir compte de la teneur en propagules, et ajustement des quantités d'inoculum de façon à travailler avec des taux de propagules identiques pour toutes les souches et ils ont constaté que la correspondance, entre les classements par les deux méthodes, est très bonne $r=0,95$. C'est pourquoi on a opté pour l'utilisation de la première méthode qui n'exige pas un ajustement des concentrations d'inoculum, ce qui simplifie les conditions d'expérimentation.

La méthode des pièges de papier filtre donne un classement sensiblement analogue à celui de la méthode des pastilles gélosées, la légère différence observée est due aux pièges qui sont partiellement sélectifs. L'avantage de cette technique par rapport aux autres est qu'elle se prête à une étude de la dynamique de la population sans exiger de grandes quantités d'inoculum, comme c'est le cas pour la méthode des pastilles gélosées et n'entraîne pas des perturbations du sol au cours de l'étude, ce qui est le cas de la méthode de colonisation de la paille.

Nos travaux montrent que les souches de *T. harzianum* (TH1 et TH2) et de *T. viride* (TV1, TV4, TV3 et TV2) peuvent être maintenues dans le sol pendant une longue durée (un mois) et à un niveau élevé, supérieur ou égal à celui noté le jour de l'incorporation de l'inoculum. L'évolution d'UC50/g en fonction du temps confirme bien ce maintien. Il ne s'agit pas seulement d'une persistance à l'état passif, mais aussi d'un maintien actif du moment qu'elles peuvent s'assurer des bases nutritives ce qui explique l'accroissement de leurs populations. Ces résultats concordent avec ceux de Lo et al. (1998).

Ainsi, ces différentes méthodes utilisées ont permis de trier les souches de *Trichoderma* d'origine marocaine les plus compétitives existantes dans la collection du L. B. P. P.

Dans le but de réduire l'utilisation des fongicides, il serait intéressant d'optimiser l'utilisation de ces souches de *Trichoderma* comme des produits biologiques destinés pour lutter contre différents pathogènes telluriques ou ceux transmis par les semences.

Remerciements

Ce travail est financé par le projet PARS AGRO 156.

Références bibliographiques

- Ahmed J. S. et Baker R. 1988. Implication of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol., 34 : 229-234.
- Artigues M. et Davet P. 1984. Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons à sclérotés. Soil Biol. Biochem., 5 : 413-417.
- Aziz N. H., El Fouly M. Z., EL Essawy A. A. et Khalaf M. A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38 (1) : 33-39
- Backman P. A. et Rodriguez-Kabana R. 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. Phytopathology, 65 : 819-821.
- Beagle J. E. et Papavizas G. C. 1985. Survival and Proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. Phytopathology, 75 : 729-732.
- Berry L. et Deacon J. W. 1991. Video-analysis of *Gliocladium roseum* in relation to mechanism of plant pathogens. Proceeding workshop on new approaches in biological control of soilborne diseases, Copenhagen, Denmark, 30 June-4 July.
- Calderan A. A., Zapata J. M., Munoz R., Fedreno M. A. et Barcelo A. R. 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. New Phytologist, 124 : 455-463.
- Chet I. et Baker R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology, 70 : 994-998.
- Chet I. et Baker R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 71 : 286-290.
- Davet P. 1983. Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. Les colloques de l'INRA, France, 18 : 136-159.
- Davet P. et Camporota P. 1986. Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. Agronomie, 6 (6) : 575-581.
- Davet P., Artigues M. et Martin C. 1981. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. Agronomie, 1 (10) : 933-936.

- Dinakaran D. et Marimuthu T. 1998. Efficacy of *Trichoderma viride* mutants on saprophytic survival on cellulolytic enzymes production. *Plant Dis. Res.*, 13 (2) : 208-211.
- Elad Y., Katan J. et Chet I. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopathology*, 70 : 418-422.
- Garett S. D. 1965. Towards biological control of soil borne plant pathogens, in : *Ecology of Soil Borne Plant Pathogens, Prelude biological control*, Ed. K. F. Baker, W. C. Snyder, Univ-California Press, 4-17.
- Garett S. D. 1966. Cellulose-decomposing ability of some cereal foot-rot fungi in relation to their saprophytic survival. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 49 : 57-68.
- Garett S. D. 1975. Cellulolysis rate and competitive saprophytic colonization of wheat straw by foot-rot fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 323-327.
- Guevas V. C., Soniega J. A. et Soriano J. M. 1994. Control of damping off and Fusarium wilt disease in vegetables by *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Philippine-Journal-of-Biotechnology (Philippine)*, 5 (2) : 156.
- Guevas V. C., Soriano J. M., Bagunu L. G., Soniega J. A. et Alfonso A. L. 1996. Control of damping-off diseases of vegetables by *Trichoderma* species. *Philippine-Agriculturist (Philippines)*, 78 (3 and 4) : 255-276.
- Harman G. E., Chet I. et Baker R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biological agent. *Phytopathology*, 71 : 569-572.
- Hassikou K. 2000. Contribution à l'étude de *Curvularia lunata*, agent de la curvulariose du riz au Maroc. Applications de quelques moyens de lutte chimique et biologique. Thèse de Doctorat National, Université Ibn Tofail, Kénitra, 187 p.
- Hmouni A. et Douira A. 1999. Etude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la tomate. *Al Awamia* 99 : 75- 92
- Jagadeesh K. S. et Geetha G. S. 1994. Effect of *Trichoderma harzianum* grown on different food bases on the biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. In groundnut. *Environment and Ecology*, 12 (2) : 471-473.
- Jayaraj J. et Ramabadrán R. 1998. Effect of nitrogenous fertilizers on the survival and competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* in soil. *Journal - of - Mycology -and - Plant - Pathol.*, (India). 28 (1) : 21-23.
- Keel C. J. 1991. Bacterial antagonists of plant pathogens in the rhizosphere : mechanisms and prospects. Proceeding workshop on new approaches in biological control of soilborne diseases, Copenhagen, Denmark. 30 June-4 July.
- Lewis J. A. et Papavizas G. C. 1980. Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of cucumber. *Phytopathology*, 70, 85-89.
- Lewis J. A., Lumsden R. D. et Locke J. C. 1996. Biocontrol of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with alginate prills of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and various food bases. *Biocontrol Sci. and Technol.*, 6 (2) : 163-173.
- Lo C. T., Nelson E. B., Hayes C. K. et Harman G. E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology (USA)*, 88 (2) : 129-136.
- Lynch J. M. 1989. Biological control of plant diseases : achievements and prospects. *Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.*, pp : 587-596.

- Mata G., Savoie J. M., Delpech P. et Olivier J. M. 1998. Diminution de l' impact de *Trichoderma* spp. pendant la culture de *Lentinula edodes* sur paille de blé pasteurisée par la supplémentation du substrat avec de la tourbe et l'emploi d' une semence de champignon alternative. *agronomie*, 18 (8-9) : 515-520.
- Mcque A. M. 1991. Prospects to biocontrol of *Armillaria mellea* using mushroom pathogens. Proceeding workshop on new approaches in biological control of soilborne diseases, Copenhagen, Denmark. 30 June-4 July.
- Monaco C. et Rollan M. C. 1999. Survival and proliferation in soil of *Trichoderma koningii* in alginate prills. *World journal of Microbiology & Biotechnology*, 15 (1) : 135-137.
- Mouria A. 2000. Approches de lutte biologique et chimique contre deux pathogènes foliaires du riz ; *Pyricularia oryzae* et *Helminthosporium oryzae*. Thèse de Doctorat National, Université Ibn Tofail, Kénitra, 116 p.
- Mouria A., Ouazzani Touhami A., Douira A., Benkirane R., Mlaïki A., EL Yachoui M. 1997 a. Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis-à-vis de *Pyricularia oryzae*. *Al AWAMIA*, 96: 9-17.
- Mouria A., Ouazzani Touhami A., Douira A., Hmouni A., Mlaiki A. et El Yachoui M. 1997 b. Lutte biologique contre l'helminthosporiose: Antagonisme in vivo de *Trichoderma* sp. vis-à-vis de l'*Helminthosporium oryzae*. Troisième Congrès de L'AMPP, Rabat, 23-24 décembre, p 113-116.
- Otieno W. 1998. *Armillaria - Trichoderma* interaction and management of armillaria root of tea (*Camellia Sinensis*. Tea-Tea-Board-of-Kenya (Kenya). (Résumé).
- Ouazzani Touhami A. 1995. Contribution à l'étude de la mycoflore rhizosphérique de la tomate dans la région du Gharb : application de la lutte biologique contre la verticilliose. Thèse de 3ième Cycle, Université Ibn Tofail, Kénitra, 121p.
- Ouazzani Touhami A. 2001. Etude des relations entre différents champignons foliaires du riz : Virulence, interactions compétitives, contamination et mesures de lutte biologique et chimique Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles, Université Ibn Tofail, Kénitra, 183 p.
- Ouazzani Touhami A., Douira A., Benkirane R., El Oirdi M., Bouslim F., Zidane L., Gmira N. et El Haloui N. E. 1995. Antagonisme in vitro de certaines espèces fongiques vis à vis de *Verticillium dahliae*. *Rev. Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu Aride*, 7 : 197-211.
- Ouazzani Touhami A., Hassikou K., El Yachoui M. et Douira A. 1999. Lutte biologique contre *Curvularia lunata* au niveau des graines de riz par utilisation de quelques espèces du genre *Trichoderma*. *Les Cahiers de la recherche*, Volume I, N(1): 21-31.
- Ouazzani Touhami A., Mouria A., Douira A., Benkirane R., Mlaïki A., EL Yachoui. 1997 a. Influence du pH et de la température sur l'aptitude de *Trichoderma* spp à inhiber in vitro la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae*. *Al AWAMIA*, 96: 19-24.
- Ouazzani Touhami A., Mouria A., Douira A., Hmouni A., Mlaïki A., EL Yachoui. 1997 b. Antagonisme in vivo de *Trichoderma* spp vis-à-vis de *Pyricularia oryzae*. *Al AWAMIA*, 96: 25-31.
- Papavizas C. G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23 : 23-54.
- Papavizas G. C. et Collins D. J. 1990. Influence of *Gliocladium virens* on germination and infectivity of *Sclerotia* of *Sclerotium rofsii*. *Phytopathology*, 80 : 627-630.
- Papavizas G. C. et Lumsden R. D. 1982. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp from soil *Plant Dis.*, 66 : 1019-1020.
- Rodriguez Kabana R., Backman P. A. et William J. C. 1975. Determination of yield losses to *Sclerotium rofsii* in peanut fields. *Plant Dis. Report.*, 59 : 858-862.

Sreenivasaprasad S. et Manibhushan K. 1993. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. Int. J. of Pest Management, 39 (2) 167-171.

Wells H. D., Bell D. K. et Jaworski C. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, 62 : 442-447.