Étude de la réceptivité des feuilles de tomate à *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise, en relation avec l'activité antagoniste de quelques isolats de *Trichoderma* et de *Gliocladium*.

*Hmouni A., Mouria A. et Douira A.**

* *Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, B.P. 133, Kénitra, Maroc.*

Résumé

La réceptivité de feuilles de tomate à la pourriture grise causée par Botrytis cinerea a été étudiée in vitro (sur disques foliaires) et in vivo sur des feuilles jeunes en émergence, sur des feuilles vertes complètement formées et sur des feuilles jaunes sénescentes.

Les mesures de diamètre des lésions, réalisées sept jours après l'inoculation, ont révélé une forte réceptivité des feuilles sénescentes à B. cinerea. L'évaluation des pourcentages d'infections a montré ce même résultat après inoculation in vitro par suspension sporale. Par contre, dans le cas du test in vivo, ce sont les feuilles jeunes qui se sont montrées les plus réceptives. La réceptivité des feuilles complètement formées s'est avérée faible sinon équivalente à celle des feuilles jeunes. Le suivi in vitro de la sporulation sur disques foliaires, après 15 jours d'incubation, a montré que c'est sur ces dernières que le potentiel de sporulation est le plus élevé. Les indices de sporulation obtenus ont été de 6,67 et de 1,83 sur disques foliaires inoculés respectivement par disque mycélien ou par suspension sporale. Ces indices sont de l'ordre de 4.83 et 0.83 de 1.5 et 0.33 respectivement pour les feuilles jeunes et pour les feuilles sénescentes.

L'application préventive (24 h avant) des antagonistes a réduit significativement la réceptivité des feuilles de tomate (potentiel d'infection et de sporulation), indépendamment de leurs âges, à B. cinerea. Les taux de réduction les plus importants ont été enregistrés sur les feuilles complètement développées. L'application des isolats antagonistes a réduit également la germination des conidies de B. cinerea sur les feuilles de tomate.

Mots clés : Pourriture grise, *B. cinerea*, tomate, feuilles, réceptivité, sporulation, *Trichoderma*, *Gliocladium*.

دراسة قابلية أوراق الطماطم للإصابة بفطر التعفن الرمادي الناتج عن الإصابة بفطر بوتريتيس سينيريا *Botrytis cinerea* في علاقتها بنشاط تضاد الفطريات المنافسة من نوع طريكوديرما Trichoderma وجليوكلاديوم *Gliocladium*

عبد الغني حموني، عفيفة مورية و علال ادويرة
مختبر وقاية النباتات، كلية العلوم، جامعة ابن طفيل، القنيطرة

ملخص

تمت دراسة قابلية أوراق الطماطم، من مختلف مراحل النمو، للإصابة بفطر التعفن الرمادي في وسط مخبري (على أقراص من أوراق الطماطم) و في وسط حي على أوراق صغيرة، أوراق مكتملة النمو، و أوراق مسنة (بداية الاصفرار).

أظهر قياس قطر الإصابة، سبعة أيام بعد التطعيم بالفطر الطفيلي، أن الأوراق المسنة هي الأكثر قابلية للإصابة بالفطر الطفيلي. نفس النتيجة تم الحصول عليها مخبريا عند معاينة نسبة تعفن الأوراق بعد رشها بمحلول ابواغ الفطر الطفيلي. على العكس من ذلك، بدت الأوراق الفتية أكثر قابلية للإصابة بالتعفن عند قيامنا بهذه الدراسة في وسط طبيعي. أبانت الأوراق الكاملة النمو عن قابلية منخفضة للإصابة بالتعفن الرمادي إن لم تكن مماثلة لقابلية الأوراق الفتية للإصابة بالمرض. من جهة أخرى، عند متابعة قدرة الفطر الطفيلي على إنتاج الأبواغ، 15 يوما بعد التطعيم، أظهرت الدراسة المخبرية قدرة الفطر العالية على التبويغ فوق الأوراق المكتملة النمو بعلامة تصل الى 6,67 و الى 1,83 فوق أقراص مطعمة على التوالي بقرص مشيجي أو بمحلول أبواغ الفطر الطفيلي. هذه المعدلات تراوحت بين 4,83 و0,83 بالنسبة للأوراق الفتية و بين 1,5 و 0,33 بالنسبة للأوراق المسنة.

مكنت المعالجة الوقائية لأوراق الطماطم 24 ساعة قبل التطعيم بالفطر الطفيلي من تخفيض قابلية أوراق الطماطم للإصابة بالتعفن الرمادي (القدرة على إحداث التعفن والقدرة على التبويغ) بغض النظر عن سن الأوراق. أقل نسب للإصابة سجلت على الأوراق المكتملة النمو. مكنت كذلك المعالجة بالفطريات المنافسة من تقليص نسبة انتاش أبواغ الفطر الطفيلي *B. cinerea* على أوراق الطماطم.

الكلمات المفتاحية: التعفن الرمادي، *B.cinerea*، الطماطم، ورق، قابلية التوبيغ، *Trichoderma*، *Gliocladium*.

Introduction

Botrytis cinerea compte parmi les champignons les plus étudiés de nos jours. Agent causal de la pourriture grise, ce pathogène est connu par l'importance économique des dégâts qu'il occasionne, son cosmopolitisme, sa polyphagie, sa variabilité génétique et le développement rapide de souches résistantes. Le contrôle de la maladie, principalement basé sur l'utilisation des fongicides, soulève de nos jours beaucoup de questions quant à l'efficacité des produits utilisés, les risques de développement de souches résistantes, les dommages portés à l'environnement ou encore le taux de résidus toxiques dans les denrées alimentaires. L'application de mesures plus saines semble alors s'imposer.

Les épidémies causées par *B. cinerea* sont initiées en grande partie par des conidies produites localement à l'intérieur de la culture (Miller et Waggoner, 1957). Le pathogène infecte ainsi les différentes parties de la plante y compris les fruits (Powelson, 1960 ; Bristow et al., 1986). L'élimination des débris végétaux est une pratique culturale de base qui pourrait réduire l'importance de l'inoculum primaire de *B. cinerea* (Sutton, 1990). En plus, l'application de certains agents antagonistes, utilisés comme moyens de lutte biologique et ayant montré leur efficacité, a permis de réduire le potentiel d'infection et de sporulation de ce pathogène sur plusieurs plantes hôtes (Peng et Sutton, 1991 ; Elad et al., 1994 a et b). Si les résultats obtenus sont certes prometteurs, la réussite d'une telle approche de lutte passe avant tout par une compréhension approfondie des mécanismes qui régissent l'interaction de *B. cinerea* avec la plante de tomate. En outre, les études entreprises dans ce sens ont négligé l'influence de la plante hôte comme support de l'interaction agent pathogène – agent antagoniste.

L'objectif de ce travail est d'évaluer, in vitro et in vivo, la réceptivité des feuilles de tomate, de différents âges, à la pourriture grise via l'estimation des potentiels d'infection et de sporulation de ce pathogène. De la même manière, nous avons procédé à une évaluation de l'activité protectrice de certains isolats antagonistes à l'égard de la germination, l'infection et la sporulation de ce parasite, en fonction de l'âge des feuilles de tomate.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel fongique

L'isolat de *B. cinerea* utilisé dans cette étude a été récolté sur une plante de tomate (variété Gabriella) cultivée sous serre dans la région du Gharb. Il est maintenu en culture sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) dans une étuve à 22°C. Les mêmes conditions de culture sont appliquées pour les isolats antagonistes retenus pour cette étude.

1.2. Matériel végétal

Des plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. 'Roma'), âgées de 2 mois et cultivées sous serre en plastique, sont utilisées pour la récolte et l'inoculation des feuilles par *B. cinerea*. La réceptivité des feuilles est testée sur trois ages foliaires : des feuilles jeunes en pleine émergence, des feuilles vertes entièrement formées et des feuilles en stade de sénescence (couleur jaunâtre). Ces feuilles seront notées respectivement FJ, FM et FS.

Pour les tests in vitro, les feuilles sont découpées en disques de 2,5 cm de diamètre. Ces derniers sont déposés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Chaque boîte contient au préalable trois disques de papier buvard constamment imbibés d'eau distillée stérile durant l'expérimentation afin de maintenir au maximum la fraîcheur des feuilles. Pour les tests in vivo, les feuilles sont mises dans des sachets en plastiques transparents pour maintenir une humidité élevée et favoriser ainsi l'infection par *B. cinerea*.

1.3. Évaluation de la réceptivité des feuilles de tomate à *B. cinerea*

1.3. 1. Potentiel d'infection

Pour les tests in vivo, les feuilles sont inoculées par une suspension sporale de *B. cinerea* récoltée à partir d'une culture fongique âgée de 15 jours et dont la concentration est ajustée à 106 conidies/ml. La suspension sporale est additionnée de glucose à 0,02 M et de KH_2PO_4 à 0.04 M pour favoriser l'infection (Leone et Tonneijck, 1990). L'inoculation est réalisée aussi en déposant 15 disques mycéliens de 5 mm de diamètre, prélevés d'une culture âgée de 4 jours, sur la face supérieure des feuilles. Ces dernières sont mises dans des sachets en plastique transparents où elles sont mises à incuber aux conditions ambiantes de température et de photopériode dans une serre en plastique. L'expérimentation a eu lieu durant les mois de décembre et janvier.

Pour les tests de réceptivité entrepris in vitro, nous avons utilisé les mêmes procédés d'inoculation. Les disques foliaires inoculés sont déposés dans les boîtes de Pétri. L'incubation est réalisée aux conditions ambiantes du laboratoire.

La lecture des résultats est réalisée après 7 jours d'incubation. Le taux d'infection est estimé en cm (diamètre de la lésion) pour les inoculations réalisées par les disques mycéliens alors qu'il est estimé en pourcentage d'infection pour les inoculations effectuées par la suspension sporale. L'évaluation est faite aussi en se référant à une échelle de notation de 0 à 5 (Elad et Shtienberg,1994): 0: pas de symptômes; 1: 1 à 5% de la surface foliaire couverte de pourriture ; 2 : 6 à 15% de pourriture ; 3 : 16 à 50% de pourriture ; 4 : 51 à 95% de pourriture et 5 : tissus complètement détruits. Cette échelle a été adoptée à titre comparatif.

1.3. 2. Potentiel de la sporulation

L'évaluation in vitro du potentiel de sporulation est réalisé sur des disques foliaires préalablement traités par *B. cinerea*. Les disques foliaires de différents âges sont inoculés comme précédemment. Le temps d'incubation est prolongé à 15 jours.

Dans un autre test réalisé in vivo, les feuilles de tomate, de différents âges, sont pulvérisées par une suspension sporale de *B. cinerea* préalablement ajustée à 106 conidies/ml. Les feuilles sont incubées pendant 7 jours sans toutefois être mises dans des sachets en plastique. Les feuilles, apparemment saines, sont alors récoltées puis découpées en disques de 2,5 cm de diamètre qui sont par la suite déposées dans des boîtes de Pétri contenant 3 couches de papier buvard, constamment imbibés d'eau distillée stérile. Les boîtes sont incubées pendant 15 jours à une température ambiante.

Le nombre de conidiophores est compté, quand la densité de ces derniers le permet. Sinon, la surface foliaire occupée par 10 ou 25 conidiophores est estimée puis extrapolée afin d'estimer le nombre total de conidiophores (Braun et Sutton, 1988). L'estimation du potentiel de sporulation de *B. cinerea* est réalisée selon l'échelle établie par Peng et Sutton (1991) formée de 7 notes : 0= pas de sporulation (0 conidiophore) ; 1=1-12 ; 2=13-24 ; 3=25-48 ; 4=49-100 ; 5=101-200 ; 6=201-300 ; 7=301-400.

Dans une autre expérience, nous avons évalué la croissance mycélienne, la germination des conidies et la sporulation de *B. cinerea* sur des milieux gélosés à base des feuilles de tomate de différents âges. Les feuilles de tomate de même âge sont lavées, découpées en morceaux puis mises dans de l'eau à raison de 100g/litre additionnée de 15 g d'Agar, le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 mn. Le milieu débarrassé des fragments de feuilles est coulé dans des boites de Petri de 90 mm de diamètre. Après solidification, un disque mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé sur une jeune colonie âgée de 3 jours de *B. cinerea*, est déposé au centre de chaque boîte. Après 4 jours d'incubation, la croissance du champignon est estimée en mesurant le diamètre moyen de chaque colonie (deux diamètres perpendiculaires). Trois boîtes pour chaque traitement ont été observées ; l'expérience est répétée 3 fois.

La sporulation est évaluée après 15 jours d'incubation en prélevant, sur deux diamètres orthogonaux, 8 disques mycéliens de 5 mm de diamètre. Ces disques sont mis en suspension dans 3 ml d'eau distillée stérile. Après 2 mn d'agitation, nous procédons au comptage des conidies à l'aide d'une cellule de Malassez.

1.4. Évaluation de la réceptivité des feuilles de tomate à B. cinerea en présence des isolats antagonistes

1.4. 1. Potentiel d'infection et de sporulation

Six isolats antagonistes sont retenus pour cette étude. Un isolat de *Gliocladium* (G1) et cinq isolats de *Trichoderma* (TH, TH20, TO, T3 et I2). Ces isolats proviennent de la mycothèque du laboratoire de botanique et protection des plantes de Kénitra. Leur pouvoir antagoniste a fait l'objet d'études préalables par Hmouni et al. (1999).

La technique adoptée pour l'évaluation des potentiels d'infection et de sporulation est identique à celle utilisée pour tester la réceptivité des feuilles de tomate à *B. cinerea*. Les organes végétaux (disques foliaires et feuilles), de différents âges, sont inoculés préventivement par des suspensions sporales des antagonistes retenus (106 conidies/ml).

1.4. 2. Action des antagonistes sur la germination des conidies de *B. cinerea* sur feuilles de tomate

La technique adoptée est celle de Elad et al. (1994 a et b). Elle consiste à déposer, sur des feuilles traitées par les antagonistes, des gouttes d'une suspension sporale de *B. cinerea*. Pour ce test, la suspension conidienne du pathogène est ajustée à 104 conidies/ml (à cette concentration le parasite demeure pathogène) pour faciliter le comptage des conidies germées. Les feuilles sont placées dans des boites de Pétri contenant 3 rondelles de papier filtre humidifiées. Après 20 heures d'incubation, à la température ambiante, nous avons procédé au comptage des spores germées au microscope photonique. La germination est évaluée sur des feuilles complètement formées (FM).

1.5 Analyses statistiques

Les traitements sont arrangés en dispositif complètement aléatoire. L'expérience est répétée deux fois. Les résultats, exprimés en pourcentages, sont transformés (Arcsin$\sqrt{P}$) , puis analysés par le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

2. Résultats

1. Évaluation de la réceptivité des feuilles de tomate à *B. cinerea*

1. 1. Potentiel d'infection

Le potentiel d'infection de *B. cinerea* varie en fonction de l'âge physiologique des feuilles de tomate (Tableaux 1 et 2). Les feuilles de tomate diffèrent dans leur réceptivité, compte tenu de l'évaluation du pouvoir d'infection, selon l'âge phénologique testé et le mode d'inoculation utilisé. L'évaluation du potentiel d'infection in vivo et in vitro a révélé que c'est sur les feuilles sénescentes que le diamètre des lésions est plus grand avec des moyennes de 6.08 pour le test réalisé in vivo et de 2.5 pour le test réalisé in vitro soit le diamètre du disque foliaire. Sur les feuilles jeunes et complètement formées, des résultats statistiquement similaires ont été observés. Les estimations des pourcentages d'infection ont montré des différences entre les tests réalisés in vitro et in vivo. Toutefois, le plus petit pourcentage d'infection a été noté sur les feuilles complètement formées pour les deux tests à savoir des pourcentages de 30% et 40,83% (Tableaux 1 et 2). L'adoption de l'échelle établie par Elad et Shtienberg (1994) pour la lecture de ces mêmes résultats n'a révélé aucune différence entre les indices d'infection des feuilles jeunes et ceux des feuilles sénescentes pour les deux tests. Pour ces dernières, l'indice d'infection est de l'ordre de 4 alors qu'il est de l'ordre de 3 pour les feuilles complètement formées.

1. 2. Potentiel de sporulation

L'évaluation in vitro du pouvoir de sporulation de *B. cinerea*, tel qu'il est représenté dans le tableau 3, a révélé l'aptitude élevée de ce pathogène à sporuler sur les feuilles vertes complètement formées. Par ailleurs les indices de sporulation sont plus élevés sur les disques foliaires inoculés par le mycélium que par les spores (respectivement de l'ordre de 6,67 et de 4,83). les plus faibles notes de sporulation ont été également notées sur les feuilles sénescentes pour les deux types d'inoculation à savoir 1,5 et 0,33.

Les notes de sporulation estimées sur les feuilles inoculées in vivo par la suspension sporale du pathogène sont de l'ordre de 0.41 et de 0.55 respectivement pour les feuilles jeunes et les feuilles vertes complètement formées. Cet indice est nul pour les feuilles sénescentes; il est intéressant de noter que ces indices ne diffèrent pas significativement entre eux.

Tableau 1. Potentiel d'infection des disques foliaires de tomate par *B. cinerea*.

	Diamètre de lésion	Pourcentage d'infection
Feuilles jeunes en émergence	2.15 b	65 b
Feuilles complètement formées	2.20 b	40.83 c
Feuilles sénescentes (jaunes)	2.5 a	88 a

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

Tableau 2. Potentiel d'infection des feuilles de tomate par *B. cinerea*.

	Diamètre de lésion	Pourcentage d'infection
Feuilles jeunes en émergence	4.25 b	87.17 a
Feuilles complètement formées	4.67 b	30 c
Feuilles sénescentes (jaunes)	6.08 a	70 b

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

Tableau 3. Potentiel de sporulation de *B. cinerea* sur les disques foliaires de tomate.

	Disques inoculés par mycélium	Disques inoculés par suspension sporale
Feuilles jeunes en émergence	4.83 b	0.83 b
Feuilles complètement formées	6.67 a	1.83 a
Feuilles sénescentes (jaunes)	1.50 c	0.33 b

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

L'étude de la croissance de *B. cinerea* sur milieux gélosés à base de feuilles de tomate a révélé sa bonne aptitude à se développer sur le milieu à base de feuilles sénescentes (FS) alors que sa sporulation se trouve meilleure sur milieu à base de feuilles complètement formées (FM) (Tableau 4). Ces résultats semblent en accord avec ceux notés sur les feuilles complètement formées (FM), les feuilles sénescentes (FS) et les disques foliaires récoltés de ces feuilles. Les valeurs de croissance et de sporulation les plus faibles ont été notées sur le milieu à base de feuilles jeunes (FJ).

Tableau 4. Croissance mycélienne et sporulation de *B. cinerea* sur milieux gélosés à base de feuilles de tomate de différents âges.

	Milieux à base de feuilles de tomate		
	Feuilles jeunes	Feuilles adultes (âgées)	Feuilles sénescentes
Croissance Mycélienne (mm)	29,4 c	40,8 b	80,3 a
Sporulation (conidies/ml)	2453 c	6480 a	4320 b

Deux résultats de la même ligne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

La germination des spores n'est pas affectée par les différents types de milieux. Ainsi, les conidies de *B. cinerea* ont germé de manière similaire sur les 3 milieux. Les pourcentages de germination sont de 89%, 91% et 87% respectivement sur milieux FJ, FM et FS.

2. Évaluation de la réceptivité des feuilles de tomate à *B. cinerea* en présence des isolats antagonistes

2. 1. Potentiel d'infection

Il parait clairement, dans tous les tests réalisés, que l'application des isolats antagonistes a réduit de façon significative le potentiel d'infection de *B. cinerea* indépendamment de l'âge des feuilles (Tableaux 5 et 6). Les agents antagonistes testés semblent être plus performants sur les feuilles complètement formées ainsi que sur les disques foliaires prélevés sur ces mêmes feuilles que sur les feuilles des autres âges.

Le test in vitro du potentiel d'infection a révélé que c'est en présence de l'isolat G1 que les diamètres d'infection et les pourcentages d'infection les plus élevés ont été notés. C'est probablement du à la faible vitesse de croissance de *Gliocladium* sp. comparé à *Trichoderma* sp (TH et TH20 *T. harzianum*, TO, I2, T3 : T. viride) (Tableau 5).

Sur les disques foliaires FJ inoculés par suspension sporale de *B. cinerea*, c'est l'isolat T3 qui a réduit le pourcentage d'inhibition à un minimum de 20% ou encore à un indice de 2.58. Sur les disques foliaires FM et FS, les isolats TH20, TO, T3 et I 2 forment un groupe homogène qui a réduit l'infection de façon similaire et maximale (Tableau 5).

Tableau 5. Potentiel d'infection des disques de feuilles de tomate, traités par les isolats antagonistes, par *B. cinerea*.

	Inoculation par mycélium			**Inoculation par suspension sporale (10^6 conidies/ml)**					
	FJ	FM	FS	FJ		FM		FS	
	Diamètre en cm			Note	%	Note	%	Note	%
B. cinerea	2.19 a	2.15 a	2.44 a	3.92 a	64.2 a	3.08 a	40.4 a	4.17 a	89.6 a
G1	1.95 b	1.81 b	2.37 a	3.25 b	50 b	2.58 b	22.5 b	3 b	45.8 b
TH	1.83 b	1.37 d	2.14 b	3 c	36.7 c	2.33 b	14.7 c	2.67bc	25.8 c
TH20	1.90 b	1.48 cd	2.03 c	2.83 bc	29.2 d	1.67 c	8.7 d	2.33cd	13.3 d
TO	1.90 b	1.51 cd	2.10 c	3.17 b	38.3 c	1.42 c	7 d	1.92 d	11 d
T3	1.84 b	1.48 cd	1.95 cd	2.58 c	20 e	1.7 c	9.3 d	2.42cd	16.2 d
I 2	1.92 b	1.58 c	1.92 d	3.20 b	41.7 c	1.42 c	6.3 d	2.33cd	15.2 d

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls

Le test de la réceptivité des feuilles in vivo a révélé globalement le même profil de résultats (Tableau 6). Sur les disques foliaires (FJ) inoculés par le mycélium, ce sont les isolats TH et TH20 qui ont réduit au minimum le diamètre de la lésion. Par ailleurs, dans tous les tests, c'est en présence de l'isolat G1 que les plus faibles taux de protection ont été notés.

Si le diamètre le plus faible a été noté sur les feuilles complètement formées (1,84 en présence de T3), les taux de réduction les plus importants sont notés sur les feuilles sénescentes. Ainsi, le diamètre de la lésion est passé de 6.04 cm pour le témoin à 2.2 cm en présence de I2 (Tableau 6).

Tableau 6. Potentiel d'infection par *B. cinerea*, sur des feuilles de tomate, traitées par les isolats antagonistes, par *B. cinerea*.

	Inoculation par mycélium			**Inoculation par suspension sporale (10^6 conidies/ml)**					
	FJ	FM	FS	FJ		FM		FS	
	Diamètre en cm			Note	%	Note	%	Note	%
B. cinerea	4.29 a	4.65 a	6.04 a	4.08 a	86.2 a	3.00 a	28.3 a	4.00 a	70.8 a
G1	3.88 b	3.64 b	3.35 b	3.50 b	54.7 b	1.83 b	10.4 b	3.67 b	59.6 b
TH	2.75 de	2.71 c	2.92 c	3.08 c	40 c	1.08 c	4.7 c	3.10 c	44.6 c
TH20	2.55 e	2.83 c	2.60 cd	2.80 c	29.2 d	1.1 c	3.8 c	3.08 c	40 c
TO	3.75 b	2.74 c	2.69 cd	2.67 c	29.2 d	1.67 b	9.2 b	3.10 c	40.8 c
T3	3.33 c	1.84 d	2.64 cd	2.92 c	31.2 d	0.75 c	2.6 c	3.17 c	36.2 c
I 2	3.08 cd	2.07 d	2.24 d	2.83 c	32.9 d	0.92 c	3.2 c	3.20 c	38.3 c

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls

D'un autre côté, les pourcentages d'infection les plus faibles sont enregistrés sur les feuilles complètement formées (FM)(<10%). Des pourcentages d'infection plus ou moins similaires ont été enregistrés sur les feuilles jeunes et sur les feuilles sénescentes. Ceci peut s'expliquer probablement par un échec d'installation des antagonistes sur des feuilles dont la surface est relativement pauvre en nutriments (cas des feuilles jeunes) ou encore sur des feuilles peuplées par une microflore abondante (cas des feuilles âgées). Ce qui peut expliquer en partie les bons résultats enregistrés sur les feuilles complètement formées.

2. 2. Potentiel de sporulation

Les résultats représentés par les tableaux 8 et 9 révèlent clairement le potentiel des antagonistes testés à réduire de manière significative le potentiel de sporulation de *B. cinerea*.

Les tests in vitro ont montré que cette réduction est particulièrement élevée sur les disques foliaires (FM) inoculés par du mycélium, où l'indice de sporulation est passé de 6,54 pour le témoin à un indice moyen de 1,5 en présence des antagonistes. Ce même indice est passé de 1,6 à un indice moyen de 0.6 sur les disques foliaires inoculés par suspension sporale de l'agent pathogène. Une réduction plus faible, mais significative, est enregistrée sur feuilles jeunes inoculées par mycélium. Pour les autres types de disques, une réduction de la sporulation a été observée sans toutefois qu'elle soit statistiquement significative (Tableau 7).

Tableau 7. Potentiel de sporulation de *B. cinerea* sur les disques foliaires de tomate traités in vitro par les isolats antagonistes.

	Inoculation par mycélium (Disque 5 mm)			**Inoculation par suspension sporale (10^6 conidies/ml)**		
	F. jeunes (FJ)	F. matures (FM)	F. âgées (FS)	F. jeunes (FJ)	F. matures (FM)	F. âgées (FS)
B. cinerea	4.78 a	6.54 a	1.44	0.92	1.67 a	0.42
G1	2.67 b	1.67 b	0.58	0.5	0.75 b	0.33
TH	2.42 b	1.5 b	0.67	0.42	0.5 b	0.25
TH20	2.25 b	1.42 b	0.83	0.5	0.42 b	0.5
TO	2.5 b	1.17 b	0.8	0.6	0.4 b	0.3
T3	3.08 b	1.58 b	1	0.5	0.5 b	0.3
I 2	2.25 b	1.33 b	1.08	0.58	0.92 b	0.58

Il est important de souligner que l'isolat G1 de *Gliocladium* ne forme plus un isolat a part. Ainsi, nous avons noté en sa présence des taux de réduction de sporulation similaires à ceux enregistrées en présence des isolats de *Trichoderma*.

Le suivi de la sporulation sur les feuilles inoculées in vivo par suspension sporale de *B. cinerea* a confirmé les résultats obtenus in vitro. Ainsi, tous les isolats testés ont réduit de manière significative la sporulation de l'agent pathogène sur les feuilles de tomate (Tableau 8). Si les isolats testés ont réduit de manière statistiquement similaire la sporulation du Botrytis, il est inté-

ressant de relever qu'en présence des isolats TH20 de *Trichoderma* et G1de *Gliocladium* une inhibition totale de la sporulation a été enregistrée sur les trois types de disques foliaires.

Tableau 8. Potentiel de sporulation de *B. cinerea* sur disques foliaires de tomate traités in vivo par les isolats antagonistes.

	Inoculation par suspension sporale (10^6 conidies/ml)		
	F. jeunes (FJ)	F. matures (FM)	F. âgées (FS)
B. cinerea	0.58 a	0.92 a	0.42 a
G1	0.00 b	0.00 b	0.00 b
TH	0.00 b	0.42 b	0.00 b
TH20	0.00 b	0.00 b	0.00 b
TO	0.00 b	0.17 b	0.08 b
T3	0.33 b	0.25 b	0.17 b
I 2	0.00 b	0.33 b	0.08 b

Deux résultats de la même colonne, ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls

2. 3. Action des antagonistes sur la germination des spores de *B. cinerea* sur feuilles de tomate.

Une réduction significative du pourcentage des conidies germées a été observée. Tous les isolats de *Trichoderma* ont réduit de manière similaire la germination des conidies de *B. cinerea* (Figure1) . Le pourcentage de germination le plus faible est de l'ordre de 30% soit un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 65% et il a été noté en présence de l'isolat I2 de *Trichoderma* sp. L'inhibition la plus faible, de l'ordre de 30%, est notée en présence de l'isolat G1 de *Gliocladium* sp.

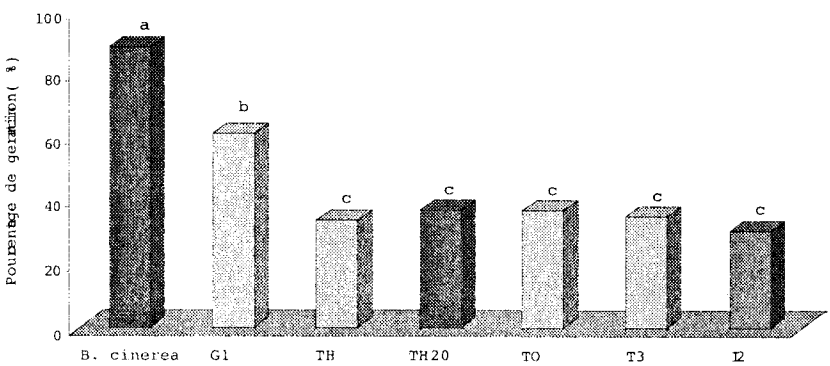

Figure 1. Action des isolats antagonistes sur la germination des spores de *B. cinerea* sur des feuilles de tomate

3. Discussion et conclusions

L'étude de la réceptivité des feuilles de tomate à la pourriture grise, compte tenu de la sévérité des symptômes produits, a révélé une différence marquée entre les différents âges testés. Globalement, la réceptivité s'est avérée grande sur les feuilles sénescentes, moyenne sur les feuilles en émergence et faible sur les feuilles vertes complètement formées. En effet, la réceptivité des feuilles serait conditionnée par les facteurs de l'hôte (statut nutritionnel, âge physiologique) et de la mycoflore foliaire qui s'y développe en fonction des apports endogènes (exudats foliaires) et des apports exogènes (miellat, grains de pollen). Dans une étude similaire mais en comptant le nombre de disques foliaire infectés, Braun et Sutton (1988) ont rapporté une réceptivité élevée à la pourriture grise sur les feuilles jeunes, faible à nulle sur les feuilles entièrement formées puis cette réceptivité augmente avec l'âge sur les feuilles sénescentes. Nous pouvons supposer que la fragilité des tissus des jeunes feuilles a facilité le développement des lésions, alors que sur les feuilles sénescentes, les conditions d'incubation (température, humidité relative) étant favorables à son développement. La flore fongique particulièrement riche en champignons saprophytes parfois nécrotrophes tels que les *Alterneria* spp., les *Cladosporium* spp!!! a pu se développer et amplifier la sévérité des symptômes notés, sans toutefois oublier que *B. cinerea*, comme la majorité des champignons necrotrophes, produit facilement des lésions sur les feuilles âgées que sur les feuilles jeunes (Aldermen et Lacy, 1984).

Compte tenu du potentiel de sporulation, la réceptivité des feuilles s'est avérée grande sur les feuilles vertes complètement formées, faible sur les feuilles jeunes, faible à nulle sur les feuilles sénescentes. Le rôle joué par la mycoflore saprophyte est très important pour expliquer ces résultats. L'implication de cette flore fongique est à l'origine de la réduction du potentiel de sporulation obtenu sur les organes végétaux sénescents (disques et feuilles) d'un côté et sur les organes traités par les isolats antagonistes d'un autre côté. En effet, la suppression de la pourriture grise sur plusieurs plantes hôtes a été liée à l'activité de cette microflore (Newhook, 1957 ; Bhatt et Vaughan, 1962 ; Blakeman et Fraser, 1971). De plus, il a été rapporté que l'application de certains micro-organismes à l'image des *Trichoderma* et des *Gliocladium* sur des lésions déjà préétablies par B. cinerea a permis de réduire le potentiel de sporulation de ce pathogène sur tomate (Elad et al., 1994 a et b) et sur fraisier (Peng et Sutton, 1991).

En conditions favorables et en présence d'inoculum, toutes les variétés de tomate sont sensibles à la pourriture grise (Decognet et al., 1998). Cependant, il est intéressant de noter que l'affection des jeunes fruits de cette plante par le *B. cinerea*, par opposition aux fruits mûrs, ne se traduit pas par une pourriture mais plutôt par la formation de tâches dites spectrales ou fantômes. (Messiaen et Lafon, 1970 ; Jarvis et McKeen, 1984). De leur coté, Wilson puis Verhoeff, cités par Jarvis (1980), ont rapporté que les internoeuds de la base de la tige de tomate sont moins sensibles à l'infection par *B. cinerea* comparés à ceux du sommet. Ces différences de sensibilité pourraient être déterminées par les mécanismes de résistance de la plante hôte, par l'âge physiologique des tissus infectés, par le statut des nutriments au sol et dans les tissus, par l'état de l'eau et d'autres facteurs climatiques et culturaux.

Le suivi de la sporulation de *B. cinerea*, réalisé sur les feuilles de tomates inoculées in vivo, a révélé le maintien de ce pathogène sur les feuilles jeunes et sur les feuilles complètement formées vus les indices de sporulation respectifs qui sont de l'ordre de 0.41 et de 0.55; cet indice

est presque nul pour les feuilles sénescentes; cepndant, il est intéressant de noter que ces indices ne diffèrent pas significativement entre eux. Sur fraisier, les tissus infectés restent souvent sans symptômes et la colonisation n'est pas progressive (Bristow et al., 1986). Les observations microscopiques confirment que *B. cinerea* infecte les feuilles vertes mais reste quiescent dans les cellules épidermiques, au moins jusqu'à la sénescence (Braun et Sutton, 1988) et sporule abondamment sur les feuilles, juste après leur mort (Braun et Sutton, 1987). Les relations qui existent entre *B. cinerea* et les feuilles sont d'une importance critique dans le développement des épidémies de pourriture grise (Sutton, 1990). Les espèces du genre *Botrytis* peuvent se maintenir sous forme de mycélium latent sur des tissus apparemment sains, ne présentant pas de symptômes (Anderson, 1924 ; Coley-Smith, 1980). Les mécanismes de transition de cet état de quiescence à la colonisation progressive de la feuille restent méconnus (Sutton, 1990). L'absence de sporulation sur les feuilles âgées n'implique pas pour autant l'élimination de *B. cinerea* puisque nous y avons noté la formation de sclérotes (formes de conservation).

Les différences de sporulation, notées in vitro et in vivo sur les trois âges foliaires, peuvent être expliquées au moins en partie par le statut nutritionnel à la surface des feuilles et à la forte compétition saprophytique qui augmentent avec l'âge des feuilles pour atteindre le maximum sur les feuilles âgées. Sachant que B. cinerea nécessite des sources exogènes de nutriments afin de germer et infecter ses plantes hôtes ce qui le rend très vulnérable à la compétition pour les nutriments (Blakeman et Broodie, 1977; Elad et al., 1994 a et b). En effet, nos isolats antagonistes ont réduit de façon significative la germination de *B. cinerea* sur les feuilles de tomate. Des taux d'inhibition encore plus élevés ont été rapportés par Elad et al. (1994 a et b). De leur côté, Kapat et al. (1998) ont rapporté un taux de germination de 50% des conidies de *B. cinerea* sur feuilles de fève juste après 3 h d'incubation alors qu'en présence de l'isolat T39 de *Trichoderma* (nom commercial TRICHDEX) ces auteurs n'ont pas observé de germination même après 6 heures d'incubation. Ceci peut expliquer les différences de sporulation notées sur les disques foliaires inoculés par suspension sporale par rapport à ceux inoculés par disques mycéliens où le taux de sporulation est nettement plus important. D'un autre côté, ceci peut expliquer les faibles notes de sporulation relevées sur disques foliaires jeunes. En effet, la surface des feuilles jeunes parait relativement plus pauvres en nutriments et au fur et à mesure de son développement elle va s'enrichir de nutriments endogènes (exudats foliaires) et exogènes (pollens, miellat, etc) (Blakeman, 1985). La qualité et la quantité de ces nutriments varient avec l'âge de la plante (Blakeman et Fokkema, 1982) ainsi que par certains facteurs tels la température, l'humidité de la surface foliaire, la lumière et la fertilisation (Sol, 1967 ; Elad, 1996). Le changement de ces facteurs affecte directement la microflore (Dik et al., 1992). Blakeman (1985) a rapporté l'existence d'une chronologie d'installation des micro-organismes qui accompagnent cette évolution de nutriments à la surface foliaire. Ainsi, dans un premier temps, ce sont les bactéries qui vont dominer la surface foliaire avant d'être remplacées par les levures puis les champignons mycéliens. D'où l'importance d'isoler des organismes fortement compétitifs.

Outre la compétition, les *Trichoderma* sont connus à coté de *Gliocladium* par leurs capacités à agir par antibiose ou encore par parasitisme à l'égard d'un grand nombre de champignons pathogènes (Chet, 1987; Hmouni et al., 1999; Papavizas, 1985; Tronsmo, 1986). Ils sont aussi capables de produire certaines enzymes actives sur *B. cinerea* tels les protéases qui peuvent intervenir sur la germination des spores ou encore désactivent les enzymes hydrolytiques de ce pathogène et qui sont responsables de la nécrose des tissus de la plante (Kapat et al., 1998 ; Elad

et Kapat, 1999). De plus, il semble que les *Trichoderma* à l'image de l'isolat T39 de *Trichoderma* harzianum agissent sur *B. cinerea* en réduisant l'activité de ses enzymes entravant ainsi le processus d'infection (Zimand et al., 1996 ; Kapat et al., 1998). Récemment, il a été rapporté que ce même isolat est capable d'induire une résistance localisée et même systémique des plantes traitées à l'égard de *B. cinerea* (De Meyer et al., 1998; Elad et al., 1998 ; Elad et al., 1999). Il est important de souligner que cet isolat T39 de *Trichoderma* ne présente pas de comportement parasitaire et ne secrète pas de composés inhibiteurs dans son activité antagoniste à l'encontre de *B. cinerea* (Elad et al., 1999).

Il est important de signaler que l'interaction des organismes saprophytes avec la germination des conidies du champignon pathogène a lieu sur des tissus sains pendant un temps de contact court. Par contre, la phase de sporulation a lieu sur des tissus nécrosés quand le temps d'interaction est plus grand (Elad et al., 1994 a et b).

La sporulation élevée de *B. cinerea* sur les feuilles complètement formées d'un côté et les taux de réduction de cette sporulation en présence des antagonistes (sur ce même âge) d'un autre coté révèlent l'importance de ce stade de développement de la feuille dans l'attaque du parasite et dans l'activité protectrice de l'agent antagoniste.

Il paraît donc que le développement de *B. cinerea* sur les feuilles de tomate est conditionné par l'âge de ces dernières ainsi que par la microflore saprophyte qui s'y développe. Arrivées à la surface des feuilles de tomate de différents âges, les conidies de ce pathogène auront différentes destinations selon le statut nutritionnel à la surface de la feuille. Sur les feuilles jeunes, le pathogène peut se maintenir sous forme d'infection quiescente en attendant les conditions favorables à son développement. Sur les feuilles vertes complètement formées, l'apport de sources exogène et endogène de nutriments représente un atout favorable au développement du pathogène. Mais ce stade phénologique paraît être le moins sensible. Ces feuilles arrivées à la sénescence, Botrytis a déjà pris l'avantage sur les autres champignons et peut alors sporuler abondamment. Sur les feuilles sénescentes, la compétition saprophytique représente la contrainte majeure au développement de *B. cinerea* surtout lors de la germination des conidies. En présence des conditions défavorables à la sporulation, le pathogène est contraint à se conserver surtout sous forme de sclérotes. Il serait intéressant d'étudier l'effet de cette mycoflore saprophyte sur le pouvoir de conservation de *B. cinerea* et sur la survie de ses sclérotes.

Références bibliographiques

Alderman, A. S. et Lacy, M. L. 1984. Influence of leaf position and maturity on development of *Botrytis squamosa*. Phytopathology 74: 1461-1463.

Anderson, J. P. 1924. *Botrytis cinerea* in Alaska. Phytopathology 14: 152-155.

Bhatt, D. D. et Vaugan, E. K. 1962. Preliminary investigations on biological control of gray mold (*Botrytis cinerea*) of strawberries. Plant Dis. Rep., 46: 342-345.

Blakeman, J. P. et Fraser, A. K. 1971. Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of chrysanthemum leaves. Physiol. Plant Pathol. 1: 45-54.

Blakeman, J. P. et Broodie, D. S. 1977. Competition 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.

Braun, P. G. et Sutton, J. C. 1987. Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberries in Ontario. Can. J. Plant Pathol. 9: 1-5.

Braun, P. G. et Sutton, J. C. 1988. Infections cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Can. J. Plant Pathol. 10: 133-141.

Bristow, P. R., McNichol, R. J. et Williamson, B. 1986. Infection of strawberry flowers by Botrytis cinerea and its relevance to Grey mould development. Ann. Appl. Biol. 109: 545-554.

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

Coley-Smith, J. R. 1980. Sclerotia and other structure in survival. Pages 85-114. in: The Biology of Botrytis. Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. et Jarvis, W. R. eds. Academic Press, New York

Decognet, V., Trottin-Caudal, Y., Fournier, C., Leyre, J. M. et Nicot, P. 1998. L'effeuillage et la lutte biologique contre la pourriture grise de la tomate sous abri chauffé. PHM Revue Hort. 398: 36-40.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. et Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in Trichoderma *harzianum* T39 biocontrol of Botrytis cinerea. Eur. J. Plant Pathol. 104: 279-286.

Dik, A. J., Fokkema, N. J. et Van Pelt, J. A. 1992. Influence of climatic and nutritiotinal factors on yeast population dynamics in the phylloplane of wheat. Microb. Ecol. 23 : 41-52.

Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Eur. J. Plant Pathol. 102: 719-732.

Elad, Y. et Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 105: 177-189.

Elad, Y. et Shtienberg, D. 1994. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). Crop Prot. 13: 109-114.

Elad, Y., Köhl, J. et Fokkema, N. J. 1994a. 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., Köhl, J. et Fokkema, N. J. 1994b. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. Phytopatholgy 84: 1193-1200.

Elad, Y., Kirshner, B., Yehuda, N. et Sztejnberg, A. 1998. Management of powdery mildew and gray mold of cumcumber by *Trichoderma harzianum* T39 and Ampelomyces quisqualis AQ10. BioControl 43: 241-251.

Elad, Y., Ray David, D., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B., Guvrin, E. et Levine, A. 1999. Trichoderma *harzianum* T39-Mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. Pages 477-482 in : Modern Fungicides and Antifungal Compounds II. Intercept limited, Andover, Hampshire UK.

Hmouni A., Massoui M. et Douira A. 1999. 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. Al Awamia 99 : 75-92

Jarvis, W. R. 1980. Epidemiology. Pages 219-250 in: The Biology of *Botrytis*. Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. et Jarvis, W. R. eds. Academic Press, New York.

Jarvis, W. R. et Mc Keen, C. W. 1984. Maladies de la tomate. Publication 1479/F. Agriculture Canada, Ottawa. 63 pp.

Kapat, A., Zimand, G. et Elad, Y. 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by Botrytis cinerea. Physiol. Mol. Plant Pathol. 52: 127-137.

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.

Messiaen, C. M. et Lafon, R. 1970. Les Maladies des Plantes Maraîchères. INRA., Paris. 440 pp.

Miller, P. et Waggoner, P. E. 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of Botrytis cinerea among strawberry. Phytopathology 47: 24-25.(Abstr)

Newhook, F. J. 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. New Zeland J. Sci. Technol. Sect. A. 38: 473-481.

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 microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. Can. J. Plant Pathol. 13: 247-257.

Powelson, R. L. 1960. The initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. Phytopathology 50: 491-494.

Sol, H. H. 1967. Influence of different N-sources on (1) the sugars and amino acids leached from leaves and (2) the susceptibility of *Vicia fabae* to attack by *Botrytis cinerea*. Meded. Facult. Landbouwwet. Rijks Univsiiteit. Gent 32 : 768-775.

Sutton, J. C. 1990. Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry: a comparative analysis. Can. J. Plant Pathol. 12: 100-110.

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.

Zimand, G., Elad, Y. et Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86: 1255-1260.