

# Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes

O Besnard<sup>1</sup>, P Davet<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Société de nouvelle fertilisation Letellier, BP 1233, F 34011 Montpellier Cedex 1;

<sup>2</sup> Laboratoire de biologie et pathologie végétale, INRA-ENSA, F34060 Montpellier Cedex 1, France

(Reçu le 8 février 1993; accepté le 15 février 1993)

**Résumé** — Un tri réalisé parmi 113 isolats de *Trichoderma* spp appartenant à divers groupes d'espèces (*sensu* Rifai) a permis de trouver 7 souches dont les filtrats de culture sont capables d'augmenter la vitesse et le taux de germination de tomates et de concombres *in vitro* et 4 souches manifestant une forte activité antagoniste vis-à-vis de *Pythium ultimum*. Deux souches au moins, AGI (*T. polysporum*) et BR 105 (*T. harzianum* résistant au bénomyl) possèdent les deux types d'activité. Ces résultats sont confirmés par des essais en serre dans des pots contenant un mélange autoclavé de tourbe et de vermiculite. Dans ces conditions BR 105, ajouté à raison de  $10^7$  propagules  $g^{-1}$ , améliore la levée (+31 et +25%), la masse (+72 et +68%) et la production de fleurs à l'âge de 2 mois (+84 et +236%) de tomates et de concombres, respectivement. Dans un substrat contaminé par *P. ultimum*, l'incorporation de BR 105 augmente le taux de levée des concombres de 138% et le nombre de fleurs à 2 mois de 183%. Enfin, la quantité de pensées fleuries, 47 j après leur repiquage chez un horticulteur dans un substrat organique du commerce, est plus élevée en présence de BR 105 (+83%). Cependant, un traitement fongicide du terreau permet d'obtenir un résultat du même ordre. L'interprétation de résultats de cette sorte doit donc être faite avec prudence.

**Trichoderma / *Pythium ultimum* / antagonisme microbien / stimulation**

**Summary** — Observations on some *Trichoderma* spp strains that are simultaneously antagonistic to *Pythium ultimum* and growth stimulating. One hundred and thirteen *Trichoderma* spp isolates belonging to several species aggregates (*sensu* Rifai) were screened. Culture filtrates from 7 of these isolates were found capable of increasing germination speed and rate of tomato and cucumber seeds *in vitro*; 4 isolates exhibited high antagonistic activity against *Pythium ultimum* in Petri dishes. At least 2 strains, AGI (*T. polysporum*) and BR 105 (a benomyl-resistant *T. harzianum*) showed both types of biological activity. These results were confirmed in greenhouse trials. When plants were seeded in pots filled with an autoclaved mixture of peat and vermiculite, addition of BR 105 ( $10^7$  cfu  $g^{-1}$ ) improved emergence rate (+31 and +25%), dry mass (+72 and +68%) and flower setting at 2 months (+84 and +236%) of tomatoes and cucumbers, respectively. In a *P. ultimum*-infested substrate, emergence rates of cucumber and flower production by 2-month-old plants were increased by 138 and 183% respectively in pots treated with BR 105. Finally, pansies grown in a potting mixture in a commercial greenhouse had more flowering plants (+83%), 47 d after planting out when BR 105 had been incorporated into the substrate. However, a similar result was obtained through substrate treatment with a fungicide. Consequently, the interpretation of this kind of results should be made with care.

**Trichoderma / *Pythium ultimum* / microbial antagonist / stimulation**

## INTRODUCTION

Dans les cultures sous abri, la forte densité de plantation, les conditions de production intensive et l'utilisation de variétés à hautes performances, de plus en plus éloignées des types

rustiques, créent des conditions favorables au développement des maladies. L'abandon des cultures en pleine terre et l'adoption de substrats artificiels ont permis de limiter l'incidence des maladies dues à des champignons du sol. Mais l'humidité permanente entretenue au pied

\* Correspondance et tirés à part

des plantes par les systèmes d'arrosage tend à favoriser certaines catégories de parasites qui, malgré les précautions prises, demeurent un risque constant. C'est ainsi que les *Pythium* spp, responsables de fontes de semis et d'accidents de levée, demeurent une des préoccupations majeures des maraîchers et des horticulteurs.

L'efficacité de la protection chimique n'est pas toujours satisfaisante, et ses effets sur l'environnement ne sont pas négligeables. Cependant la possibilité d'une protection par des auxiliaires biologiques devient une solution alternative envisageable. Durant ces dernières années, un grand nombre de bactéries et de champignons antagonistes des *Pythium* spp ont ainsi été mis en évidence (Whipps et Lumsden, 1991) mais les résultats les plus intéressants et les plus solidement établis ont été obtenus avec des *Trichoderma* spp (Sivan *et al*, 1984; Lifshitz *et al*, 1986; Harman *et al*, 1989).

Il se trouve par ailleurs que certaines souches de *Trichoderma* spp semblent exercer une action stimulatrice sur la croissance des plantes, aussi bien *in vitro*, dans des conditions contrôlées et en l'absence de tout agent pathogène, que dans des substrats de culture (Baker, 1988). Curieusement, ces résultats intéressants n'ont pas donné lieu à d'autres recherches, hormis les travaux tout récemment publiés de Lynch *et al* (1991) et de Kleifeld et Chet (1992).

Il est certain qu'il serait extrêmement avantageux de pouvoir disposer d'un clone de *Trichoderma* qui soit à la fois protecteur et stimulateur de croissance. Les résultats que nous nous proposons d'exposer montrent qu'il est effectivement possible de trouver de telles souches.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Origine des champignons utilisés*

Une collection de 100 souches de *Trichoderma*, isolées à partir de sols de différentes régions de France, a été utilisée dans les tests préliminaires. La majorité appartiennent au groupe d'espèces *T harzianum* Rifai. Quelques isolats appartiennent aux groupes *T hamatum* (Bon) Bain, *T aureoviride* Rifai, *T viride* Pers ex S F Gray et *T polysporum* (Link ex Pers) Rifai. Ces souches proviennent des collections des laboratoires de pathologie végétale de l'INRA de Bordeaux et de Montpellier. Par ailleurs, une suspension conidienne d'une culture monospore (B 11) obtenue à partir d'un *T harzianum* du sol a été exposée

pendant 2 min à un rayonnement ultra-violet de 200  $\mu\text{W cm}^{-2}$  (Billette, travaux non publiés). Certaines des conidies irradiées ont produit des mutants résistants au bénomyl, dont 13 ont été utilisés dans nos essais comparatifs.

Pour toutes les études du pouvoir antagoniste des souches de *Trichoderma* nous avons utilisé une souche de *Pythium ultimum* Trow var *ultimum*, isolée sur racines de soja dans la région de Toulouse.

### *Sélection des souches in vitro*

#### Stimulation de croissance

Les souches de *Trichoderma* sont cultivées en erlenmeyer dans le milieu S liquide de Messiaen et Lafon (1965) additionné de 1 g l<sup>-1</sup> de Ca Cl<sub>2</sub> (Gindrat, 1977). Les liquides de culture sont récoltés après 10 j d'incubation sur un plateau oscillant à la température du laboratoire. Après filtration sur mousseline, les liquides sont stérilisés par passage sur un filtre stérile à pores de 0,45  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cinq millilitres de filtrat sont répartis à la surface d'une boîte de Petri contenant de l'eau gélosée solidifiée. Les témoins reçoivent 5 ml de milieu S non ensemencé.

Sur chaque boîte sont déposées 10 graines de tomate (cv Saint Pierre) ou de concombre (cv Le Généreux). Les graines sont préalablement désinfectées par trempage pendant 1 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5%, puis rincées 2 fois à l'eau distillée stérile et séchées. Les boîtes sont mises en incubation à l'obscurité à 24 °C. Chaque essai comprend 4 répétitions. Les essais de confirmation, portant sur un nombre plus restreint de souches, comprennent 8 répétitions.

Après 1 semaine d'incubation, on mesure le pourcentage de germination et la masse des plantes après séchage pendant 3 j à l'étuve à 50 °C.

#### Activité antagoniste

La méthode est comparable à celle utilisée par Lynch (1987). Un implant de *Trichoderma* et un implant de *P ultimum* sont déposés à la surface de boîtes de Petri de 9 cm de diamètre contenant 10 ml de milieu PDA. Les implants sont placés à 5 cm l'un de l'autre, selon une ligne diamétrale. Les boîtes, comprenant 4 répétitions par souche, sont incubées à l'obscurité à 20 °C. Trente-six heures après l'ensemencement, on note la présence de zones d'inhibition ou l'interpénétration des cultures ; le développement des 2 champignons est apprécié en planimétrant la surface occupée par leurs thalles respectifs, au moyen d'une caméra couplée à un ordinateur. Après un premier tri, 4 des meilleurs clones et 5 des moins bons choisis au hasard sont confrontés à *P ultimum* et à 2 autres champignons parasites : *Rhizoctonia solani* Kühn et *Sclerotium rolfsii* Sacc.

## Essais en serre

### Conditions générales

Les souches de *Trichoderma* sélectionnées à la suite des essais *in vitro* sont multipliées en fioles de Roux (pour une fiole : 200 g de sable lavé, 6 g de farine d'avoine, 30 ml d'eau distillée; 2 autoclavages à 120 °C pendant 30 min à 48 h d'intervalle). Les fioles sont incubées pendant 15 j à 24 °C à l'obscurité.

L'inoculum est incorporé dans un mélange à parties égales de tourbe blonde fine et de vermiculite stérilisé par 2 autoclavages à 120 °C pendant 30 min. La quantité d'inoculum est calculée de façon à obtenir  $10^7$  propagules par g de substrat. Les mélanges sont répartis dans des pots de 15 x 15 x 15 cm. Dans chaque pot sont semées 10 graines de tomate (cv Saint Pierre) ou de concombre (cv Le Généreux). Les graines sont préalablement désinfectées superficiellement par trempe dans l'hypochlorite de sodium à 0,5% pendant 1 min, puis dans l'acide peracétique à 2% pendant 20 min. Elles sont ensuite rincées 2 fois dans de l'eau stérile, puis égouttées. Les pots sont arrosés à l'eau distillée pendant les 10 premiers jours après le semis. Ils sont ensuite arrosés avec une solution fertilisante, d'abord tous les 2 jours, puis tous les jours. Les pots sont disposés dans une serre, en blocs randomisés.

### Étude de l'activité stimulatrice de croissance

Le mélange du substrat avec les auxiliaires est réalisé 2 semaines avant le semis. Les clones actifs sont comparés à deux témoins constitués, l'un par du substrat nonensemencé, l'autre par un mélange de substrat avec une souche choisie au hasard parmi celles qui n'ont pas manifesté d'effet stimulant dans les essais *in vitro*.

Les pots sont maintenus à la température de  $26 \pm 2$  °C pendant toute la durée de l'essai. Les taux de levée sont calculés lorsque les plantes ont 2 vraies feuilles (soit 21 j après le semis). Le nombre de plantes est alors ramené à 2 par pot. Les individus excédentaires, arrachés avec précaution, sont rincés pour les débarrasser du substrat adhérent, puis leur masse est déterminée après séchage à l'étuve à 50 °C pendant 3 j. À la fin de l'essai, c'est-à-dire environ 2 mois après le semis, les fleurs sont comptées, et les plantes restantes sont pesées comme précédemment.

Un essai est aussi mis en place chez un horticulteur. Des pensées (*Viola tricolor* cv *Diva*), achetées en godets au stade 5 feuilles chez un grossiste, sont repiquées dans des pots de 9 x 9 x 8 cm contenant un substrat commercial à base de tourbe et de sphagnes, à pH = 6. Le substrat a préalablement subi l'un des 3 traitements suivants : incorporation de la souche BR 105 à raison de  $10^{10}$  propagules par pot (soit environ  $15 \times 10^6$  propagules  $\text{ml}^{-1}$  de substrat); traitement à l'oxyquinoléine à la dose préconisée de  $2\ 100\ \text{g ha}^{-1}$  (soit 1,7 mg par pot); incorporation de la BR 105 et traitement à l'oxyquinoléine. Un quatrième

lot, non traité, sert de référence. Les plantes, réparties en 4 blocs comprenant chacun 16 plantes par traitement, sont placées dans une serre parmi les autres pensées. Les relevés commencent 1 mois plus tard à raison d'un, puis 2, par semaine et sont poursuivis jusqu'au stade de la commercialisation, qui a lieu 47 j après le repiquage, juste au début de la floraison. On compte le nombre de plantes subsistantes et le nombre de fleurs formées.

### Étude de l'activité antagoniste

Le mélange du substrat avec les souches de *Trichoderma* est réalisé, comme précédemment, 2 semaines avant le semis. Une semaine avant le semis, ces mélanges sont infectés avec une souche de *P. ultimum*. Les témoins sont constitués par du terreau nonensemencé et par du terreau contenant *P. ultimum* seul.

L'inoculum de *P. ultimum* est préparé sur farine de maïs gélosée (farine de maïs : 17 g, gélose : 20 g, eau distillée : 1 l) en boîtes de Petri. Après une semaine d'incubation à 20 °C, les cultures sont broyées dans une petite quantité d'eau distillée stérile. Le pathogène est introduit dans le substrat à la dose de 250 propagules (spores ou oosphères) par g. La température de la serre est maintenue à  $20 \pm 2$  °C pendant la durée de l'essai. Il y a 16 pots pour chaque traitement.

Le nombre de plantes dans chaque pot est déterminé 21 j après le semis. Ce nombre est alors ramené à 2 par pot. Les individus excédentaires sont arrachés et lavés, puis mesurés et pesés comme dans les essais précédents. Au bout de 8 semaines, on compte le nombre de fleurs et les plantes sont mesurées et pesées.

### Évolution des populations dans les substrats

Le milieu sélectif et la méthode de Ricci *et al* (1976) sont utilisés pour l'estimation des populations de *P. ultimum*. Ce milieu contient du bénomyl qui inhibe les populations «sauvages» de *Trichoderma*. Pour les échantillons dans lesquels la souche résistante BR 105 est présente, on remplace le bénomyl par du triadiménol ( $15\ \text{mg l}^{-1}$ ) qui inhibe son développement sans empêcher celui de *P. ultimum*. Les populations de *Trichoderma* sont estimées à l'aide du milieu sélectif et de la méthode de Davet (1979). Pour chaque mesure, l'échantillon moyen est constitué du mélange de prises d'environ 200 ml de substrat, provenant de 4 pots différents d'un même traitement.

Les populations de *Trichoderma* et de *P. ultimum* sont ainsi évaluées à la fin de l'essai concernant l'activité antagoniste. Pour avoir une idée plus précise de l'évolution de ces populations, un deuxième essai est réalisé, dans lequel les champignons, seuls ou en combinaison, sont incorporés au substrat et répartis dans des pots où aucune graine n'est semée. Dans

cet essai, l'inoculum de *P. ultimum* (250 prop g<sup>-1</sup>) est introduit dans le terreau 10 j après l'inoculum de *Trichoderma* (10<sup>8</sup> prop g<sup>-1</sup>). Les pots sont disposés dans une serre à 20 ± 2 °C et arrosés de façon à obtenir une teneur en eau correspondant à 70% de la capacité de rétention. Les populations sont estimées 0, 15 et 48 j après l'incorporation de *P. ultimum*, chaque fois dans 2 pots.

En outre, 200 ml de substrat sont prélevés après 0, 5, 15 et 84 j, chaque fois dans 2 pots préparés comme précédemment. Après séchage à l'air, ces échantillons sont broyés et tamisés à la maille de 1 mm, puis additionnés de poudre de flocons d'avoine (20 g l<sup>-1</sup>). Chaque mélange est alors déposé autour du collet d'une douzaine de jeunes plants de concombre âgés de 6 j, préalablement semés dans du terreau stérilisé ajusté à 80% de la capacité de rétention en eau (Bouhot et Ellal, 1976). Les concombres sont maintenus 24 h à 15 °C puis placés dans une pièce à 20 °C. Le taux de mortalité des concombres est déterminé 6 j après l'apport de l'amendement.

## RÉSULTATS

### Stimulation de croissance

#### Essais *in vitro*

L'étude préliminaire portant sur l'ensemble de la collection de *Trichoderma* montre que presque tous les filtrats de culture (92,9% des isolats)

sont sans effet, ou exercent même un effet dépressif sur la germination des graines de tomate et de concombre (résultats non présentés). Pour quelques isolats cependant, les taux de germination et la production de matière sèche sont supérieurs à ceux des témoins.

Nous avons alors comparé les 7 meilleures et les 4 moins bonnes souches mises en évidence à l'issue de ce premier tri. Les résultats (tableau I) confirment la validité du premier classement. Deux souches de *T. polysporum* (AGI et JI 1) et un des clones résistant au bénomyl issus de B 11 (BR 105) paraissent particulièrement intéressants. À l'opposé, la souche ZK se montre nettement inhibitrice.

#### Essai en serre

La souche JI 1 ayant un développement lent et une faible sporulation, seules AGI et BR 105 ont été retenues. Nous les avons comparées à la souche Tsp2, choisie au hasard parmi les 4 moins bonnes.

On constate (tableau II) que les souches AGI et BR 105 améliorent significativement la levée des tomates et des concombres, le gain relatif par rapport au témoin pouvant atteindre 30%. Dans les pots contenant AGI ou BR 105, la masse des plantes âgées de 3 semaines, mesurée après séchage, est supérieure de 50 à 100%

**Tableau I.** Effet *in vitro* des filtrats de culture de 11 isolats de *Trichoderma* sur le taux de germination (après 1 semaine d'incubation à 24 °C) et sur la production de matière sèche de tomates et de concombres (moyennes de 8 répétitions). Dans chaque colonne, les pourcentages suivis d'une même lettre ne sont pas différents au seuil de 5%, selon le test de Newman et Keuls.

Souches	Pourcentages de germination		Matière sèche (mg)	
	Tomate	Concombre	Tomate	Concombre
BR 105	97,5 a	86,3 a	125,7 a	780,2 a
AGI	83,8 b	71,3 b	120,4 ab	772,7 ab
JI 1	87,5 b	80,0 ab	127,4 a	787,6 a
ABT	78,8 bc	72,5 b	125,1 a	765,3 ab
LR	77,5 bc	86,3 a	121,5 a	765,0 ab
RL	85,0 b	73,8 b		750,0 b
QJ	80,3 b	71,8 b		750,0 b
HH 15	75,8 bc		115,6 bc	743,0 b
QN	73,5 bc	68,8 b	118,0 b	750,0 b
Tsp 2	66,8 cd	67,5 b	115,3 bc	740,0 b
ZK	60,0 d	67,5 b	96,8 d	728,0 c
Témoin	75,0 bc	68,8 b	118,0 b	743,0 b

**Tableau II.** Effet en pots à la serre de l'incorporation de souches de *Trichoderma* dans le substrat de culture sur les taux de germination de tomates et de concombres (moyennes de 16 répétitions). Dans chaque colonne, les pourcentages suivis d'une même lettre ne sont pas différents au seuil de 5%, selon le test de Newman et Keuls. Les chiffres indiqués entre parenthèses représentent les pourcentages de variation par rapport au témoin.

Traitements	Tomate		Concombre
	(1990)	(1991)	
BR 105	90,0 a (+31)	81,3 b (+13)	93,8 a (+25)
AGI	88,8 a (+29)	86,9 a (+21)	95,0 a (+27)
Tsp 2	69,4 b (+1)	80,0 b (+11)	74,4 b (-1)
Témoin	68,8 b	71,9 c	75,0 b

à celle des plantes témoins ou des plantes élevées en présence de Tsp2 (tableau III). Enfin, le nombre de fleurs par plante après 2 mois de culture est significativement plus élevé chez la tomate et surtout chez le concombre (tableau IV); cependant, à ce stade, les masses sèches ne sont plus significativement différentes.

#### Essai en conditions de production commerciale

On observe très peu de mortalité dans les pensées repiquées chez le producteur horticole, quel

**Tableau III.** Effet en pots à la serre de l'incorporation de souches de *Trichoderma* dans le substrat de culture sur la masse de matière sèche (en mg) produite 21 j après le semis par des tomates et des concombres (essais de 1991; moyennes de 16 répétitions). Dans chaque colonne, les masses suivies d'une même lettre ne sont pas différentes au seuil de 5%, selon le test de Newman et Keuls.

Traitements	Tomate		Concombre	
	Parties aériennes	Racines	Parties aériennes	Racines
BR 105	390 a	110 a	250 a	70 a
AGI	380 a	90 ab	275 a	60 b
Tsp 2	240 ab	61 b	170 b	30 c
Témoin	230 b	60 b	160 b	30 c

**Tableau IV.** Effet en pots à la serre de l'incorporation de souches de *Trichoderma* dans le substrat de culture sur le nombre moyen de fleurs par plante, dénombré 8 semaines après le semis des tomates ou des concombres (moyennes de 16 répétitions). Dans chaque colonne, les nombres suivis d'une même lettre ne sont pas différents au seuil de 5%, selon le test de Newman et Keuls. Les chiffres entre parenthèses représentent les pourcentages de variation par rapport au témoin.

Traitements	Tomate		Concombre
	(1990)	(1991)	
BR 105	6,5 a (+86)	4,3 a (+54)	3,7 a (+236)
AGI	5,0 b (+43)	3,7 b (+32)	3,1 b (+182)
Tsp 2	3,2 cd (-9)	3,1 c (+11)	1,6 c (+45)
Témoin	3,5 c	2,8 d	1,1 d

que soit le traitement : le taux de survie est compris entre 94 et 100%. Le début de la floraison n'a pas été noté mais, lors du premier relevé, il y a 4 à 6 fleurs dans chacun des 3 lots traités, contre 2 dans le lot témoin. À la dernière notation, il n'y a que 12 fleurs chez les plantes témoins, chiffre significativement inférieur à ceux des lots traités. On dénombre respectivement 22, 20 et 22 fleurs dans les lots traités par BR 105, par l'oxyquinoléine, et par BR 105 + l'oxyquinoléine. Cela représente des quantités moyennes de 0,35, 0,31 et 0,35 fleur par plante, respectivement, comparées à 0,2 chez les plantes non traitées.

#### Antagonisme vis-à-vis de *Pythium ultimum*

##### Essais *in vitro*

Si, dans la presque totalité des cas, le rapport des surfaces occupées par le *Trichoderma* et par le *Pythium* est supérieur à 1, il apparaît néanmoins une grande diversité de comportement parmi les 113 souches de la collection. Dans 61,1% des confrontations, il y a interpénétration des thalles des 2 champignons. Chez 26,5% des couples, les 2 thalles s'arrêtent au contact l'un de l'autre. Enfin, dans 12,4% des cas, on observe un arrêt de la croissance alors que les thalles sont encore distants l'un de l'autre. Quatre souches seulement manifestent une forte action antagoniste se traduisant par une zone d'inhibition de plus de 1 cm : ce sont la

souche de *T polysporum* AGI et 3 des clones mutants issus de B 11 (dont BR 105). Pour 4 autres souches, la zone d'inhibition est de plusieurs millimètres.

Pour confirmer ces résultats, 4 des souches inhibitrices (BR 105, BR 107, AGI et KZ) et 5 souches non inhibitrices prises au hasard (MP, ABW, ACC, ORN et JI) ont été à nouveau confrontées à *P ultimum*. Les observations (tableau V) montrent la validité du classement précédent. AGI et BR 105 se montrent également, *in vitro*, fortement inhibitrices de *R solani* et de *S rolfsii*, alors qu'ABW ne manifeste pas d'action antagoniste; le clone ORN est faiblement inhibiteur de *S rolfsii* (tableau V).

### Essais en serre

Nous avons retenu pour ces essais les souches AGI et BR 105, déjà remarquées précédemment pour leurs propriétés stimulatrices de croissance. La souche ABW, non inhibitrice *in vitro*, est utilisée comme témoin.

AGI et BR 105 assurent une bonne protection des concombres : leur effet favorable se traduit par la survie d'un plus grand nombre de plantes, mais aussi par un plus grand nombre de fleurs par plante au bout de 2 mois (tableau VI). Cependant, il n'apparaît pas de différences significatives dans la taille et le poids des plantes subsistantes. La souche ABW est totalement inefficace.

### Évolution des populations

À la fin de l'essai précédent, après 8 semaines de culture, la densité d'inoculum de *P ultimum* n'a pas varié par rapport à l'apport initial de 250 propagules g<sup>-1</sup>, en présence d'AGI et de BR 105 (tableau VII). Par contre, la souche ABW n'empêche pas la population pathogène de se multiplier et d'atteindre un niveau presque équivalent à celui du substrat non traité. Les populations de *Trichoderma* se maintiennent au niveau de l'inoculum introduit, sans différence nette entre les traitements.

On trouve des résultats analogues lorsque les champignons sont apportés dans un substrat non cultivé : dans ces conditions, la souche AGI réduit de près de 60% l'accroissement de la population de *P ultimum* (fig 1). Les capacités infectieuses d'échantillons de substrat vis-à-vis des concombres varient en fonction du temps (fig 2), mais l'effet inhibiteur des souches AGI et BR 105 demeure très net pendant toute la durée de l'essai. La souche ABW n'a aucun effet inhibiteur.

### DISCUSSION

Il n'est pas difficile de trouver des souches de *Trichoderma* spp manifestant *in vitro* une activité antagoniste vis-à-vis de *P ultimum*. Un tel mécanisme semble aussi bien fonctionner dans des

**Tableau V.** Antagonisme manifesté *in vitro* par des souches de *Trichoderma* vis-à-vis de 3 champignons parasites, après 36 h de confrontation. Le degré d'antagonisme est noté A3, A2 ou A1 (arrêt de croissance et zone d'inhibition respectivement supérieure ou égale à 10 mm, comprise entre 5 et 10 mm, ou inférieure à 5 mm), F (cultures arrivant au contact) ou I (interpénétration des thalles). Le rapport des surfaces est calculé en divisant la surface du thalle de *Trichoderma* par celle du champignon parasite confronté.

	AGI	BR 105	BR 107	KZ	MP	ABW	ACC	ORN	JI
<i>Pythium ultimum</i>									
Degré d'antagonisme	A 3	A 2	A 2	A 2	F	I	I	I	I
Rapport des surfaces	2,5	2,4	2,7	2,4	2,4	1,8	1,5	1	1
<i>Rhizoctonia solani</i>									
Degré d'antagonisme	A 3	A 3				I		F	
Rapport des surfaces	2,5	1,3				0,5		0,2	
<i>Sclerotium rolfsii</i>									
Degré d'antagonisme	A 3	A 3				I		A 1	
Rapport des surfaces	2,5	1,3				0,8		1,1	

**Tableau VI.** Effet sur des concombres de l'incorporation de souches de *Trichoderma* dans un sol contaminé par *Pythium ultimum* en pots à la serre. Les résultats suivis d'une même lettre ne sont pas différents au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls. Les chiffres entre parenthèses représentent les variations relatives (en %) constatées par rapport aux plantes infectées par *P ultimum* et non protégées.

Traitement	Taux de levée	Nombre de fleurs par plante
<i>P ultimum</i>	18,4 d	1,1 a
<i>P ultimum</i> + BR 105	43,8 bc (+138)	3,1 c (+183)
<i>P ultimum</i> + AGI	53,8 b (+192)	2,5 b (+127)
<i>P ultimum</i> + ABW	18,8 cd (+2)	1,4 ab (+27)
Témoin non inoculé	75,0 a	1,1 a

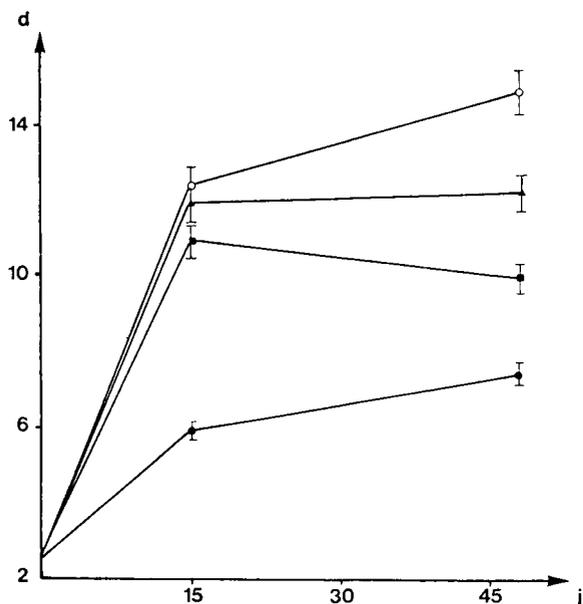
conditions naturelles. C'est ainsi que Lifshitz *et al* (1986) montrent que les processus de l'infection des semences de pois par des *Pythium* spp sont si rapides que seule une production de sub-

stances inhibitrices dans la spermosphère peut expliquer l'effet protecteur assuré par un enrobage des graines avec des conidies de *T harzianum* ou de *T koningii*. Dans nos essais, les souches dont l'effet inhibiteur est le plus marqué *in vitro* sont aussi celles qui protègent le mieux les concombres de la fonte de semis. Par ailleurs, la présence simultanée dans un substrat organique de *P ultimum* et de *Trichoderma* n'entraîne ni prolifération des *Trichoderma*, ni réduction de la population de *Pythium* à un niveau inférieur à son niveau initial, ce qui serait le cas s'il y avait mycoparasitisme.

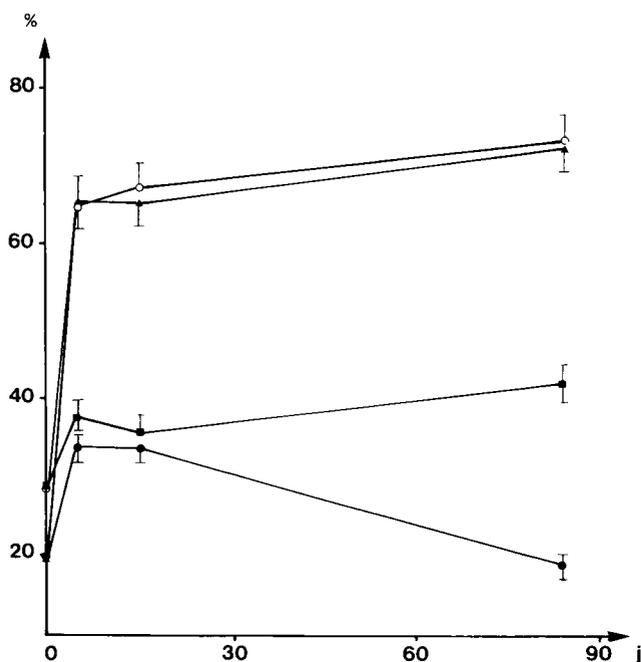
Nos essais ont été réalisés seulement avec l'espèce *P ultimum*, mais les résultats d'autres expérimentations montrent que l'antagonisme des *Trichoderma* vis-à-vis des *Pythium* n'est pas limité à une espèce particulière (Hadar *et al*, 1984). Il serait cependant intéressant de vérifier que nos souches sont antagonistes non seulement des *Pythium* spp agents de fonte de semis, mais aussi des *Pythium* spp délétères qui, bien que faiblement parasites, contribuent

**Tableau VII.** Évolution de populations de *Trichoderma* et de *Pythium ultimum*, seules ou en mélange, sous une culture de concombres en pots, à la serre. Les *Trichoderma* et l'inoculum de *P ultimum* sont incorporés dans le substrat respectivement 2 semaines et 1 semaine avant le semis des concombres. Les prélèvements pour le dénombrement des populations sont faits après 8 semaines de culture. Les chiffres entre parenthèses représentent les limites des intervalles de confiance à 5%.

Traitements	Inoculum en début de culture (concentration théorique dans le sol)		Inoculum après 8 semaines de culture (valeurs réellement mesurées)	
	<i>P ultimum</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>P ultimum</i>	<i>Trichoderma</i>
BR 105		10 <sup>8</sup>		2,8 x 10 <sup>8</sup> (2,1–3,6) x 10 <sup>8</sup>
AGI		10 <sup>8</sup>		5,0 x 10 <sup>7</sup> (2,9–7,1) x 10 <sup>7</sup>
ABW		10 <sup>8</sup>		2,8 x 10 <sup>8</sup> (2,1–3,6) x 10 <sup>8</sup>
<i>P ultimum</i>	250		1 250 (910–1 590)	
<i>P ultimum</i> + BR 105	250	10 <sup>8</sup>	280 (210–350)	2,0 x 10 <sup>8</sup> (1,2–2,8) x 10 <sup>8</sup>
<i>P ultimum</i> + AGI	250	10 <sup>8</sup>	230 (205–255)	4,5 x 10 <sup>7</sup> (3,1–5,9) x 10 <sup>7</sup>
<i>P ultimum</i> + ABW	250	10 <sup>8</sup>	1 000 (735–1 265)	4,5 x 10 <sup>7</sup> (3,1–5,9) x 10 <sup>7</sup>



**Fig 1.** Effet de diverses souches de *Trichoderma* sur l'évolution de la densité d'inoculum (d) de *Pythium ultimum* dans un substrat organique (unités :  $10^2$  propagules  $g^{-1}$ ). Traitements : *P. ultimum* + *T. polysporum* AGI (●), *P. ultimum* + *T. harzianum* BR 105 (■), *P. ultimum* + *T. harzianum* ABW (▲), *P. ultimum* seul (○). Les barres verticales représentent les écarts types de chaque série de mesures.



**Fig 2.** Effet de diverses souches de *Trichoderma* et du temps d'incubation dans le substrat sur la capacité infectieuse de *Pythium ultimum*. La capacité infectieuse est exprimée par le pourcentage de concombres tués après avoir été mis en contact, dans des conditions standard, avec des échantillons de substrat prélevés 0, 5, 15 et 84 j après le début de l'essai. Traitements : *P. ultimum* + *T. polysporum* AGI (●), *P. ultimum* + *T. harzianum* BR 105 (■), *P. ultimum* + *T. harzianum* ABW (▲), *P. ultimum* seul (○). Les barres verticales représentent les écarts types de chaque série de mesures.

par leur présence à un mauvais état général des plantes pendant toute la période de culture (Stanghellini et Kronland, 1986; Stanghellini *et al*, 1988). La forte inhibition que nous avons observée *in vitro* vis-à-vis de *R solani* et de *S rolfsii* peut être considérée comme un indice supplémentaire de la faible spécificité de l'effet fongistatique de nos isolats.

Il nous a été possible, d'autre part, de trouver dans notre collection des souches dotées de propriétés stimulantes. Cette stimulation se traduit par une meilleure germination *in vitro* et en serre, un développement accru et une floraison plus importante. Le développement concerne non seulement les parties aériennes, mais aussi les racines, et l'augmentation porte sur la masse de matière sèche, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas simplement d'une absorption d'eau plus élevée, mais d'un accroissement général du métabolisme.

Nos résultats sont de même nature que ceux qui sont rapportés par Baker (1988), Lynch *et al* (1991) et Kleifeld et Chet (1992). Cependant, les effets stimulants signalés par ces auteurs n'ont été observés que chez des plantes cultivées dans de la terre ou des substrats de culture, mais pas en conditions axéniques contrôlées. Bien plus, le graphique présenté par Kleifeld et Chet (1992) montre que, en conditions stériles en boîtes de Petri, des graines de poivron ne germent pas mieux en présence de *T. harzianum* que des graines non traitées. Dans leurs essais, comme d'ailleurs dans ceux que nous présentons ici, le substrat de culture organique est préalablement stérilisé mais aucune précaution particulière n'est ensuite prise pour éviter sa recolonisation une fois que les pots sont disposés dans la serre. Il est donc difficile d'affirmer que les effets observés dans ces conditions sont dus à une stimulation de croissance plutôt qu'à un effet protecteur du *Trichoderma* vis-à-vis de champignons délétères présents dans les substrats.

Aucun des auteurs précédents n'a utilisé comme référence un lot de plantes cultivées dans un substrat désinfecté avec un fongicide. Dans notre expérimentation avec des pensées (et dans d'autres essais non rapportés ici), en l'absence d'un traitement fongicide de référence, il aurait été possible de conclure que la plus grande précocité de floraison observée en présence de BR 105 était certainement due à un effet stimulant. Le fait qu'il y ait aussi une amélioration de la floraison dans les pots traités unique-

ment à l'oxyquinoléine nous oblige à une grande prudence dans l'interprétation des résultats.

Cela ne signifie pas que nous excluons que certaines souches de *Trichoderma* spp puissent exercer un effet stimulant. Lindsey et Baker (1967), Windham *et al* (1986) l'ont mis en évidence dans des conditions gnotobiotiques; nous avons montré plus haut que les filtrats de culture stériles de plusieurs de nos isolats augmentaient le taux de germination et la masse de plantes semées sur un support gélosé autoclavé. Nous souhaitons simplement attirer l'attention sur le fait que l'interprétation de ces phénomènes complexes doit être faite avec précaution. Seules l'identification de composés responsables de la stimulation de croissance et la démonstration de leur effet sur des plantes cultivées en serre devraient permettre de conclure sur le mécanisme mis en jeu. Les travaux actuellement en cours permettent de penser qu'un tel mécanisme existe et qu'il est donc possible, comme nous nous le proposons, de trouver des isolats de *Trichoderma* à la fois stimulateurs de croissance et antagonistes de champignons pathogènes.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une bourse CIFRE (O Besnard) cofinancée par le MRT et la Société Letellier. Les auteurs remercient J Peyre pour la qualité de son assistance technique.

## RÉFÉRENCES

- Baker R (1988) *Trichoderma* spp as plant-growth stimulants. *CRC Crit Rev Biotechnol* 7, 97-106
- Bouhot D, Ellal G (1976) Adaptation aux régions tempérées d'une technique de mesure de la densité d'inoculum de *Pythium* dans les sols. *Ann Phytopathol* 8, 241-243
- Davet P (1979) Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann Phytopathol* 11, 529-533
- Gindrat D (1977) Effet de concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de *Trichoderma* spp. *Can J Microbiol* 23, 607-616
- Hadar Y, Harman GE, Taylor AG (1984) Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* 74, 106-110
- Harman GE, Taylor AG, Stasz TE (1989) Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. *Plant Dis* 73, 631-637
- Kleifeld O, Chet I (1992) *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144, 267-272
- Lifshitz R, Windham MT, Baker R (1986) Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76, 720-725
- Lindsey DL, Baker R (1967) Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57, 1262-1263
- Lynch JM (1987) *In vitro* identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. *Curr Microbiol* 16, 49-53
- Lynch JM, Wilson KL, Ousley MA, Whipps JM (1991) Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett Appl Microbiol* 12, 59-61
- Messiaen CM, Lafon R (1965) *Les maladies des plantes maraîchères*. INRA, Paris, tome 2
- Ricci P, Toribio JA, Messiaen CM (1976) La dynamique des populations de *Pythium* dans les sols maraîchers de Guadeloupe. I. Méthodes d'étude. *Ann Phytopathol* 8, 51-63
- Sivan A, Elad Y, Chet I (1984) Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74, 498-501
- Stanghellini ME, Kronland WC (1986) Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. *Plant Dis* 70, 1053-1056
- Stanghellini ME, White JG, Tomlinson JA, Clay C (1988) Root rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore - producing isolates of *Pythium intermedium*. *Plant Dis* 72, 358-359
- Whipps JM, Lumsden RD (1991) Biological control of *Pythium* species. *Biocont Sci Technol* 1, 75-90
- Windham MT, Elad Y, Baker R (1986) A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76, 518-521