



HAL
open science

Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique

Pierre Davet, Michel Artigues, Christian Martin

► To cite this version:

Pierre Davet, Michel Artigues, Christian Martin. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*, 1981, 1 (10), pp.933-936. hal-00884215

HAL Id: hal-00884215

<https://hal.science/hal-00884215>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique

Pierre DAVET, Michel ARTIGUES & Christian MARTIN (*)

I.N.R.A., Laboratoire de Recherches de la Chaire de Biologie et Pathologie végétales de l'ENSA, F 34060 Montpellier Cedex.

(*) Société coopérative de Recherches et d'Expérimentations agricoles des Pyrénées orientales, 19, Avenue de Grande-Bretagne, F 66025 Perpignan Cedex.

RÉSUMÉ

Milieu sélectif,
Trichoderma harzianum,
Sclerotinia minor,
Laitue,
Lutte biologique.

La note envisage la possibilité de produire un inoculum de *Trichoderma harzianum* en conditions non stériles, pour des essais sous serre ou en plein champ. Le substrat est constitué de paille hachée humidifiée par une solution minérale. L'apport de 12,5 mg/l de vinclozoline et de 2,5 ml/l d'alcool allylique assure la sélectivité du milieu.

Cette préparation a été utilisée pour traiter un sol préalablement infesté par *Sclerotinia minor*. La mortalité de laitues plantées dans de telles parcelles a été significativement réduite par rapport aux témoins non traités. Le traitement chimique à la vinclozoline a toutefois donné, dans cet essai, des résultats supérieurs.

SUMMARY

Selective medium,
Trichoderma harzianum,
Sclerotinia minor,
Lettuce,
Biological control.

About the production, in non-sterile conditions, of a *Trichoderma harzianum* inoculum, in view of biological control trials.

The substrate is prepared in large plastic bags. Chopped straw is moistened by an acid mineral solution, to which selectivity is conferred by addition of 12,5 mg/l of vinclozolin and 2,5 ml/l of allyl alcohol. Such a preparation was employed to treat a soil that had been previously infested by *Sclerotinia minor*. In amended plots, lettuce drop was significantly reduced, compared with non treated controls, in spite of a too short period between *T. harzianum* application and planting. Usual chemical control with vinclozolin still gave the best results.

I. INTRODUCTION

L'utilisation des *Trichoderma* pour une lutte biologique contre des champignons telluriques parasites des cultures nécessite l'incorporation au sol de quantités importantes d'inoculum. Des essais préliminaires montrent que, lorsqu'il est apporté sous la 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 fournisse une base nutritive suffisante pour échapper, au moins temporairement, à la compétition des autres microorganismes telluriques. De nombreux substrats remplissent cette condition mais, pour convenir à une utilisation pratique, ils doivent, en outre, être bon marché et faciles à préparer. Or, les chercheurs qui ont expérimenté avec les *Trichoderma* ont utilisé jusqu'à présent des milieux de culture autoclavés pour produire leur inoculum (WELLS *et al.*, 1972 ; BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1975 ; LEWIS & PAPAIVIZAS, 1980 ; ELAD *et al.*, 1980).

Le substrat que nous avons mis au point n'a pas besoin d'être autoclavé, ce qui simplifie considérablement sa préparation. Nous indiquerons dans cette note sa composition et nous donnerons un exemple de sa mise en œuvre.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Préparation du substrat

1. Composition du milieu

L'inoculum est produit dans des sacs en matière plastique de 100 × 55 cm. La source de carbone est constituée par de la paille de blé, qui sert en même temps de support matériel au mycélium du champignon. Dans chaque sac, on introduit 500 g de paille grossièrement hachée, humidifiée avec 2 l

d'une solution minérale dont la composition, par litre, est la suivante :

Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	1 g
CaCl ₂	1 g
KNO ₃	0,250 g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,250 g
H ₂ KPO ₄	0,125 g
HK ₂ PO ₄	0,125 g
eau du robinet	1 000 ml

Cette solution est acidifiée à pH = 4 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique du commerce. Avant l'emploi on met les spores de *Trichoderma* en suspension dans le liquide et l'on ajoute, par litre : 12,5 mg de vinchlozoline et 2,5 ml d'alcool allylique, destinés à assurer la spécificité du milieu (DAVET, 1979).

2. Ensemencement du substrat

Les suspensions de spores sont obtenues à partir de cultures ayant bien sporulé, développées sur une décoction de pomme de terre gélosée (milieu PDA), dans des tubes inclinés. Quelques ml de solution minérale sont introduits dans les tubes qui, simplement fermés avec le pouce, sont ensuite vigoureusement agités. Ces suspensions concentrées sont alors versées dans la solution minérale de départ dont la teneur en spores peut être éventuellement contrôlée par un comptage à l'hémacytomètre. Nous introduisons en moyenne 10⁹ spores par sac, ce qui correspond à 3 ou 4 tubes de milieu gélosé.

3. Incubation

Après avoir versé sur la paille les 2 l de solution minérale contenant les spores de *Trichoderma*, on agite les sacs de façon à ce que la paille soit bien humectée. On replie ensuite vers le bas la partie supérieure des sacs et on les place dans un local dont la température est comprise entre 24 et 30 °C. On peut secouer à nouveau les sacs 5 à 6 j après l'ensemencement, lorsque les premières colonies sont bien apparentes, de façon à accélérer l'occupation du milieu par le champignon.

L'inoculum est utilisable 20 à 30 j après l'ensemencement, mais il peut être conservé plus longtemps sans inconvénient.

B. Conditions de l'essai

Nous avons éprouvé l'aptitude d'un inoculum du type précédent à protéger une culture de laitues des attaques de *Sclerotinia minor*.

1. Terrain

La culture est réalisée en plein air, à Montpellier, dans un sol maraîcher sablo-limoneux de pH (CaCl₂) = 6,7, contenant 1,94 g p. 100 de carbone organique. Des parcelles de 1 × 2 m sont délimitées au moyen de tôles enfoncées verticalement de façon à empêcher les mélanges de terre.

2. Infection par *Sclerotinia minor*

Le champignon est cultivé sur milieu PDA dans des boîtes de Petri maintenues à 20 °C. Les sclérotés sont récoltés à la surface des boîtes puis mélangés à de la terre de jardin dans un sac de matière plastique et ainsi conservés à 4 °C jusqu'au moment de l'emploi. Ils sont épandus sur les parcelles le 16 septembre et enfouis superficiellement par

griffage du sol. La quantité est ajustée de façon à avoir environ 5 sclérotés pour 100 g de terre dans les 10 premiers cm de sol.

3. Apport de *Trichoderma*

Nous utilisons un clone de *T. harzianum*, choisi dans une population provenant d'un sol de Villelongue de la Salanque (Roussillon). La paille colonisée par *T. harzianum* est mélangée au sol, à la bêche, sur une profondeur de 15 cm, à raison de 500 g de paille imbibée par m² (un sac permet de traiter 5 m²). L'enfouissement est réalisé le 22 septembre.

4. Culture

Les laitues (variété « Trocadéro à graines noires ») sont semées sous abri le 24 septembre et repiquées en godets le 8 octobre. Deux traitements au thirame sont pratiqués pendant la période d'élevage. Les plants sont mis en place le 12 novembre, à raison de 20 par parcelle, répartis en quinconce sur 3 rangs.

5. Traitements

Une partie des parcelles seulement reçoit *T. harzianum*. Une autre partie ne subit aucun traitement. Dans un troisième lot, les laitues et la surface du sol sont traitées à la vinchlozoline (0,75 g de m.a./l de bouillie), selon la méthode préconisée par MARTIN (1978) ; 3 pulvérisations sont effectuées avant le stade 18 feuilles, à des dates très espacées en raison du très lent développement des plantes, dû au froid (le 24/11, le 15/12 et le 16/1). Chaque type de traitement comprend 6 répétitions. Trois parcelles non contaminées, non traitées, servent de témoins d'inoculation.

On compte le nombre de plantes mortes à divers moments de la culture qui est arrêtée le 6 mars. A cette date, des prélèvements de sol sont effectués dans les parcelles enrichies en *T. harzianum*. Pour chaque parcelle élémentaire, 5 sous-échantillons sont prélevés dans les 5 à 6 cm superficiels et mélangés. On obtient ainsi 6 échantillons, dont le nombre est finalement ramené à 3 par mélange des prises de 2 parcelles. Des prélèvements de sol sont faits de la même façon dans les parcelles non traitées. La teneur en *Trichoderma* de ces sols est évaluée après isolement sur un milieu sélectif (DAVET, 1979).

III. RÉSULTATS

A. Milieu de culture

1. Production

Diverses souches de *T. harzianum* provenant de sols maraîchers ont été cultivées sans difficulté sur ce milieu non stérile. La production, évaluée en nombre de spores par g de paille, est de l'ordre de 200 à 300 × 10⁶ spores/g après une dizaine de jours d'incubation à 24 °C. Nous avons prélevé, à diverses reprises en cours d'incubation, des fragments de paille que nous avons déposés dans des boîtes de Petri contenant du milieu PDA : nous avons obtenu le plus souvent des cultures pures de *T. harzianum*. Les colonies bactériennes que l'on observe parfois sont rapidement recouvertes par le champignon et ne paraissent pas gêner sa croissance, même lorsqu'elles sont abondantes.

2. Sélectivité

Pour éprouver la sélectivité du milieu vis-à-vis d'éventuels contaminants fongiques, nous avons ensemencé simultanément *T. harzianum* et *Aspergillus niger* ou un *Mucor sp.* Les suspensions étaient ajustées de façon à avoir une spore d'*A. niger* ou de *Mucor sp.* pour 20 conidies de *T. harzianum* dans un premier essai, et une spore de contaminant pour 10 conidies de *T. harzianum* dans un second essai. Dans tous les cas, l'inoculum de *T. harzianum* était de 10^9 spores par sac. *T. harzianum* s'est toujours bien développé. On pouvait observer quelques colonies d'*A. niger* ou de *Mucor sp.* pour le taux de contaminants le plus élevé.

3. Influence de la concentration de l'inoculum initial

Les suspensions de spores sont ajustées de façon à introduire par sac les quantités suivantes : 2×10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} spores. Après une semaine d'incubation à 24 °C, on ne constate aucune différence d'aspect entre les sacs. La production est la même dans tous les traitements : elle est comprise entre 150×10^6 et 300×10^6 spores/g de paille.

B. Application à une culture de laitue

L'évolution de la maladie dans le temps selon les différents traitements est représentée par les graphiques de la figure 1. A la fin de l'essai, les taux de mortalité sont respectivement de 58,3 p. 100 pour les témoins non traités, 35,8 p. 100 pour les parcelles ayant reçu *T. harzianum* et 13,3 p. 100 pour les parcelles traitées à la vinchlozoline. Ces 3 résultats sont significativement différents.

Il y a en moyenne 8 500 propagules de *T. harzianum* par g de terre dans les parcelles témoins, et 256 100 propagules/g dans les parcelles ayant reçu l'amendement à base de paille, 5 mois et demi après son incorporation.

IV. CONCLUSION

Le milieu non stérile à base de paille que nous proposons ne soulève aucune difficulté de préparation ni de mise en œuvre. Il peut être ensemencé soit à partir de tubes de culture contenant des clones de *T. harzianum* sélectionnés au laboratoire, soit à partir de préparations commerciales en poudre.

La vinchlozoline ajoutée initialement à la paille représentée, à supposer qu'elle n'ait pas été dégradée pendant le temps d'incubation, un apport insignifiant : 5 mg/m² de sol. En considérant que la paille est enfouie uniformément sur une épaisseur de 10 cm, la concentration de vinchlozoline

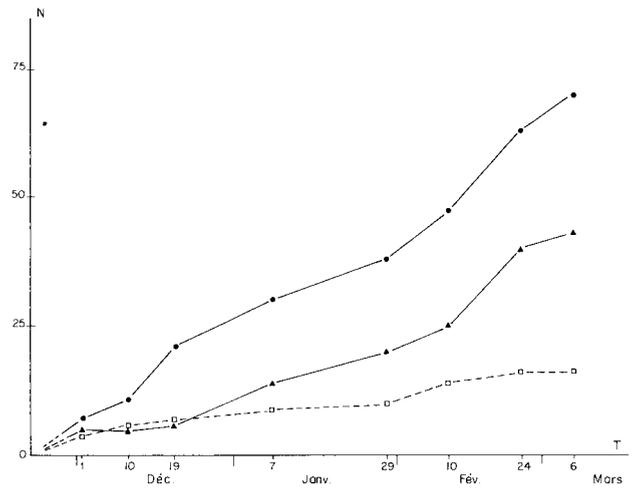


Figure 1

Progression du nombre de laitues mortes par pourriture du collet, en fonction du temps, pour chaque catégorie de traitement.

Lettuce drop progress, in relation to time, in each category of treatment.

- témoin non traité (control)
- ▲ traitement par *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum* application)
- traitement à la vinchlozoline (vinchlozolin sprays).

introduite dans le sol avec le *Trichoderma* est donc au plus de 0,05 mg/l, ce qui est nettement insuffisant pour inhiber le développement de *S. minor*. Un seul traitement fongicide en pulvérisation représente un apport de matière active 15 à 20 fois plus élevé. Nous estimons donc que la diminution de la mortalité des laitues dans les parcelles traitées est attribuable à *T. harzianum*, dont nous avons par ailleurs constaté *in vitro* l'activité parasitaire vis-à-vis de *S. minor*.

Dans cet essai, l'enfouissement de l'amendement biologique a été, pour des raisons pratiques, réalisé très tardivement (fin septembre), alors qu'il aurait été préférable d'opérer au moins un mois plus tôt. En outre, les premiers froids sont apparus dès le mois de novembre. *T. harzianum* n'a donc bénéficié que d'une courte période de chaleur favorable pour exercer son activité bénéfique. Compte tenu de ces conditions peu propices, la protection exercée par *T. harzianum* paraît intéressante, même si elle se montre ici inférieure à celle procurée par la vinchlozoline.

On constate enfin que la population de *T. harzianum* enfouie dans le sol s'est maintenue à un très haut niveau jusqu'à la fin de la culture.

Reçu le 11 mai 1981.

Accepté le 26 août 1981.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Backman P. A., Rodriguez-Kabana R., 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, **65**, 819-821.
- Davet P., 1979. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann. Phytopathol.*, **11** (4), 529-533.
- Elad Y., Katan J., Chet I., 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopathology*, **70**, 418-422.

- Lewis J. A., Papavizas G. C., 1980. Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of cucumber. *Phytopathology*, **70**, 85-89.
- Martin C., 1978. Pourriture des laitues par *Sclerotinia*. Résultats d'essais. *Bull. tech. Pyrénées orient.*, **86**, 44-50.
- Wells H. D., Bell D. K., Jaworski C., 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **62**, 442-447.