NOTE

Evolution du comportement saprophytique de souches de *Trichoderma* spp. dans les sols - Technique d'étude

Pierre CAMPOROTA

avec la collaboration technique de Reine CAMPOROTA

I.N.R.A., Station de Recherches sur la Flore pathogène dans le sol, 17, rue Sully - 21034 Dijon Cedex

RÉSUMÉ

Le comportement saprophytique de souches de *Trichoderma* spp. dans un sol est apprécié par l'utilisation d'une technique de piégeage sélectif au moyen de rondelles de papier filtre imprégnées de milieu sélectif enfouies dans le sol. Après 3 j de mise en contact des pièges avec le sol, les rondelles sont retirées et déposées sur le milieu gélosé sélectif préconisé par DAVET (1979). Le pourcentage de pièges colonisés par le champignon est déterminé après 8 j. La technique est quantifiée en faisant varier la concentration de terre à analyser par dilution avec un sol désinfecté. Une relation linéaire est calculée entre les pourcentages de pièges colonisés et les concentrations de terre. L'évolution de l'aptitude à la compétition saprophytique de 6 souches de *Trichoderma* a été étudiée pendant une période de 3 mois. Les résultats obtenus et l'utilisation de la méthode sont discutés.

Mots clés additionnels : Piégeage, Compétition saprophytique, Antagonisme.

SUMMARY

Saprophytic behaviour of strains of Trichoderma spp. in soils. Method of study.

The saprophytic behaviour of strains of *Trichoderma* spp. in soil was estimated by means of a selective trapping method. Paper discs, previously soaked in a selective solution, were buried in soil. After 3 days incubation, discs were placed on DAVET'S selective agar medium (1979) and, after 8 days, the percentage of colonized discs was determined. To quantify the method, analysed soil was diluted with disinfected soil. Linear regression of the percentage of colonized discs versus soil concentrations was calculated. The saprophytic behaviour of 6 *Trichoderma* strains was studied during 3 months. Results and utilization of the method are discussed.

Additional key words : Trapping, Competitive saprophytic ability, Antagonism.

I. INTRODUCTION

La lutte biologique contre les champignons phytopathogènes telluriques fait souvent appel à l'antagonisme de plusieurs espèces du genre *Trichoderma*. Pour être efficace cette lutte doit tenir compte de l'influence qu'exerce le milieu sol sur les diverses souches de *Trichoderma*, influence qui conditionne une utilisation rationnelle de leurs propriétés antagonistes.

Le but de cette note est, d'une part, de décrire une technique de piégeage sélectif et quantitatif de *Trichoderma* dans les sols, d'autre part, de présenter les résultats de l'étude comparée, pendant une période de 3 mois, du comportement saprophytique de 6 souches de ce champignon introduites dans un sol.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

La méthode de mesure de la capacité saprophytique en compétition de *Rhizoctonia solani* (CAMPOROTA, 1981) a servi de base à la mise au point de la technique.

A. Description de la technique

1. Piégeage

Des rondelles de papier filtre stériles de 10 mm de diamètre, sont placées pendant 30 mn dans un milieu de Richards (RAPILLY, 1968) additionné de : rose bengale (0,1 p. 1 000), sulfate de streptomycine (0,1 p. 1 000), benomyl (0,005 p. 1 000), sulfate de cuivre (0,005 p. 1 000),

prothiocarbe (0,05 p. 1 000), pentachloronitrobenzène (0,05 p. 1 000). Elles sont ensuite essorées et séchées pendant 2 h à 45 °C.

Dans des boîtes de Petri en matière plastique de 60 mm de diamètre, on dépose la terre à analyser sur une épaisseur de 1 cm après l'avoir préalablement séchée à l'air, broyée et tamisée (tamis de maille 1 mm). L'humidité est ajustée à 60 p. 100 de la capacité de rétention au moyen d'eau distillée. Chaque boîte reçoit 5 rondelles enfoncées verticalement jusqu'à la moitié de leur hauteur et disposées régulièrement sur la surface. Les boîtes sont alors recouvertes et placées pendant 3 j dans une étuve réglée à 25 °C.

2. Lecture

Après ce laps de temps, les rondelles sont retirées, lavées sous un jet d'eau stérile pour éliminer la terre adhérente, essorées et déposées individuellement dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre contenant 5 ml du milieu gélosé sélectif préconisé par DAVET (1979). Les boîtes sont placées à 25 °C sous éclairage continu (intensité 3 000 lux) pendant 8 j., au terme desquels la présence ou l'absence du champignon sur une rondelle est déterminée par observation microscopique ($G \times 100$).

3. Quantification

La terre à analyser est diluée par mélange avec un substrat préalablement désinfecté (3 passages successifs à 100 °C) composé de sable limoneux et de tourbe en proportions égales. Le pourcentage de pièges colonisés variant en fonction du logarithme de la densité de l'inoculum (FINNEY, 1971), on a choisi une gamme de concentrations de terre analysée représentant : 100-10-1 et 0,1 p. 100 du volume du mélange. Dans la pratique, ces concentrations sont réalisées par pesée en tenant compte de la densité apparente de chacun des constituants du mélange. Les pourcentages de colonisation correspondant à chaque concentration de terre sont obtenus à partir de 4 répétitions (soit 20 pièges).

On porte sur un graphique les pourcentages de pièges colonisés en ordonnées et les concentrations de terre en abscisses. La régression liant les 2 variables est calculée sur la partie de la courbe où la relation dose-effet est effective et linéaire, puis son équation est résolue pour une valeur de piégeage de 50 p. 100. On en déduit ainsi le poids de terre nécessaire pour obtenir la colonisation de 50 p. 100 des pièges dans les conditions de la technique. Ce poids est l'Unité de Colonisation 50 (UC 50) qui est caractéristique de chaque souche de *Trichoderma* placée dans un écosystème-sol donné. Les résultats sont exprimés en nombre d'UC 50/g de sol afin de pouvoir comparer les différentes combinaisons : souche-écosystème sol.

B. Protocole expérimental

La technique décrite a été utilisée pour étudier, durant une période de 3 mois, le comportement saprophytique dans un sol de 6 souches de *Trichoderma* de provenances différentes (tabl. 1).

1. Production de l'inoculum

Des fioles de culture contenant 150 g de sable lavé, 9 g de farine de maïs et 40 ml de milieu Czapeck sans sucre et sans gélose sont stérilisées pendant 1 h à 110 °C. On ensemence une fiole par souche au moyen d'un fragment de culture sur milieu gélosé. Après 1 mois de croissance à 25 °C et à l'obscurité, le sable est séché et on détermine, pour un gramme, la quantité de grains de sable donnant naissance à

Tableau 1

Origine des souches de *Trichoderma*.
Origin of *Trichoderma* strains.

Souche n°	Espèce	Provenance
18	<i>T. viride</i> Pers.	{ Museum Histoire naturelle Paris, Ref. : 3209
19	<i>T. hamatum</i> Rifai	I.N.R.A., Montpellier (DAVET)
23	<i>T. harzianum</i> Rifai	{ I.N.R.A., Bordeaux (DUBOS) 4 clones issus de la souche de <i>Trichoderma</i> C ₂ (GROSCLAUDE)
24	<i>T. harzianum</i> Rifai	
25	<i>T. harzianum</i> Rifai	
26	<i>T. harzianum</i> Rifai	

une colonie : 50 mg de sable sont étalés dans 10 boîtes de milieu PDA (cet étalement est répété 6 fois) et on dénombre les colonies développées après 24 h à 25 °C.

2. Inoculation du sol

Le sol choisi pour l'essai est un mélange en parties égales de tourbe et de sable limoneux non stériles. Pour chaque souche, une quantité suffisante de sol est préparée dans des cuvettes de matière plastique. Ce sol est mélangé avec une dose d'inoculum de la souche telle que la concentration finale soit de l'ordre de 26 propagules/g. L'humidité du sol est amenée à 70 p. 100 de la capacité de rétention au moyen d'eau distillée, les cuvettes sont alors fermées par un film plastique percé de trous puis placées à 25 °C. Tous les 15 j. environ, l'humidité est rajustée par pesée.

3. Dates d'analyse

Cinq dates ont été retenues : au moment de la mise en place (J 0) puis 8, 15, 30 et 100 j après (J 8, J 15, J 30, J 100). A chacune de ces dates, un échantillon de sol est prélevé dans chaque cuvette et traité par la technique décrite.

III. RÉSULTATS

La figure 1 présente les résultats obtenus pour chacune des souches de *Trichoderma* : l'axe des ordonnées porte le logarithme des nombres d'UC 50/g calculés à chaque date, l'axe des abscisses le temps exprimé en jours.

On peut constater un comportement sensiblement analogue de l'ensemble des souches : une forte augmentation puis une chute du nombre d'UC 50/g pendant les 30 premiers jours d'incubation. De 30 à 100 j, sauf pour la souche 18, une baisse progressive de ces mêmes nombres.

Par contre, les souches se différencient par leur aptitude à la compétition saprophytique à l'intérieur du sol, matérialisée par la position en hauteur des courbes sur le graphique : faible pour la souche 18, relativement forte pour le groupe des souches 23, 24, 25 et 26 et très forte pour la souche 19.

IV. DISCUSSION

Nous n'avons pas évoqué, dans cette brève note, la sélectivité du piégeage : elle est très bonne comme nous avons pu le constater lors d'essais effectués dans des sols

Figure 1
Comportement saprophytique de 6 souches de *Trichoderma* en fonction du temps.
Saprophytic behaviour of 6 *Trichoderma* strains with time.

naturels. Les résultats obtenus pour la souche 18 montrent que la technique permet de révéler de très faibles activités saprophytiques tandis que le regroupement des valeurs d'UC 50/g obtenues durant toute l'expérimentation pour les souches 23, 24, 25, 26 (4 clones issus d'une même souche) prouve la fidélité de la méthode.

La technique décrite a permis d'effectuer un classement des différentes souches de *Trichoderma* par leur aptitude à coloniser un sol en compétition avec sa microflore. Il faut remarquer que ce classement est obtenu dès la mesure des UC 50/g à J 0 et que les différences entre souches demeurent inchangées durant toute l'expérimentation.

Cependant, l'évolution générale de la forme des courbes, semblerait indiquer que 2 phénomènes écologiques se succèdent dans le temps : une 1^{re} phase dynamique de colonisation, matérialisée par l'augmentation des nombres d'UC 50/g de 0 à 30 j, puis une 2^e phase de conservation de 30 à 100 j, révélée par la très faible variation de ces mêmes nombres. Il faut maintenant répéter cette étude en utilisant d'autres sols de façon à savoir s'il s'agit là d'un phénomène général.

Le choix de souches de *Trichoderma* spp. utilisables pour la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes telluriques peut être envisagée selon le schéma suivant :

a) Etudes *in vitro* pour apprécier la valeur antagoniste de souches de *Trichoderma* (mycoparasitisme, antagonisme par émission de substances ou de gaz).

b) Test de l'aptitude à la colonisation saprophytique en compétition des souches retenues, par confrontation avec une série d'écosystèmes — sols différents afin de savoir si elles peuvent être utilisées de façon généralisée, partielle ou ponctuelle.

Reçu le 11 octobre 1982.
Accepté le 18 février 1983.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Camporota P., 1981. Mesure de la colonisation saprophytique en compétition de *Rhizoctonia solani* dans des sols et substrats. *Agronomie*, **1** (6), 513-517.
Davet P., 1979. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann. Phytopathol.*, **11** (4), 529-533.

Finney D. J., 1971. *Statistical method in biological assay*. Charles Griffin & Cie, London, 688 p.
Rapilly F., 1968. Les techniques de mycologie en Pathologie végétale, *Ann. Epiphyt.*, **19**, n° hors série 97 p.