

ANTAGONISM OF ISOLATES OF *Trichoderma* spp. at EGARD OF *Botrytis cinerea* Pers. AGENT OF GRAY ROT OF TOMATO (*Lycopersicum esculentum* Mill.) UNDER GREENHOUSE

D. Saddek^{1,2*}, S. Messgo-Moumene¹, Z. Chemat-Djenni³, L. Bendifallah⁴, K. Bencheikh²

¹Université de Blida 1, Laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques

²Institut National de la Protection des végétaux, laboratoire régional de Boufarik-Algérie

³Université de Blida 1, Laboratoire d'analyse fonctionnelle de procédés chimiques LAFPC,
Algérie

⁴Université de Boumerdes, Laboratoire des Technologies Douces, Valorisation,
Physico-chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité-Algérie

Received: 04 December 2018 / Accepted: 15 March 2020 / Published online: 01 May 20X20

ABSTRACT

The study of the antagonistic activity of eleven isolates of *Trichoderma* spp., against four isolates of *Botrytis cinerea*, collected from diseased tomato plants cultivated in greenhouses located on the Algiers coast and in the north-east of Sahara. The in vitro antagonism was compared to the fungicidal activity of "PROLEX", widely used by farmers against this phytopathogen in Algeria. The results revealed a complete inhibition of sporulation, germination, production and germination of sclerotia as well as morphological changes in vitro. A significant reduction on their pathogenicity and a strong inhibition of their sporulation were recorded in vivo. In conclusion, the *Trichoderma* spp. antagonists in particular, the "T4, T11, T8 and T10" isolates are therefore promising for the biocontrol of grey mould of tomato.

Keywords: *Trichoderma* spp; *Botrytis cinerea*; activité antagoniste; *Lycopersicum esculentum* Mill; Prolex.

Author Correspondence, e-mail: pinoutou@gmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v12i2.5>



1. INTRODUCTION

1.1. Importance de *Botrytis cinerea*

La tomate est un produit stratégique en Algérie. Elle est classée la cinquième culture dans le pays [1-2]. Cependant, elle est sujette aux attaques de nombreuses maladies cryptogamiques ayant un impact décroissant sur le rendement et la qualité des fruits. La pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* est l'une des maladies redoutable et importante sur cette culture. Elle possède une large gamme d'hôtes et conduit à des pertes importantes de rendement [3]. Le contrôle de cette maladie est basé sur l'usage répété de fongicides, qui restent inefficaces contre cet agent pathogène [4]. Récemment, le changement dans l'attitude du public envers la lutte chimique a incité les chercheurs à rechercher des solutions alternatives préservatrices de l'environnement comme l'utilisation des biopesticides non polluants de l'environnement[5].

1.2. Problématique

Au cours des dernières années, les antagonistes du genre *Trichoderma* sont utilisés dans le biocontrôle de nombreuses maladies phytopathogènes [6-7], mais malgré les succès commerciaux de ces bio-fongicides, leur efficacité reste restreinte à cause de leur incohérence dans les conditions de terrain. Par conséquent, des souches de *Trichoderma* plus efficaces avec des capacités potentielles antagonistes élevées sont nécessaires pour une lutte biologique efficace [7]. Dans le cadre de recherche d'agents de biocontrôle de la pourriture grise de la tomate cultivée sous serre, ce travail est basé sur l'utilisation des isolats de *Trichoderma* spp. issus d'Algérie et ayant déjà montré une grande efficacité dans le biocontrôle de *Phytophthora infestans* et *Rhizoctonia solani* de la pomme de terre [8-9] dans le contexte de la lutte contre *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise de la tomate sous serre.

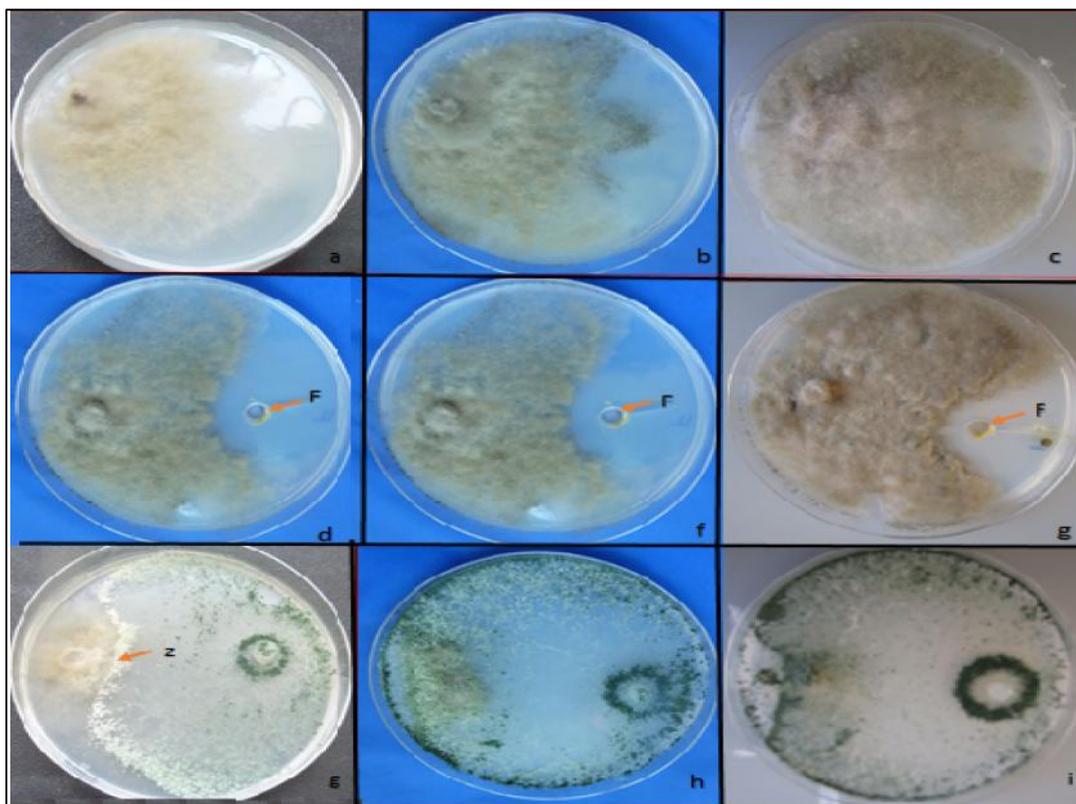
2. RÉSULTATS et DISCUSSION

2.1. Activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp.

2.1.1. Inhibition de la croissance mycélienne

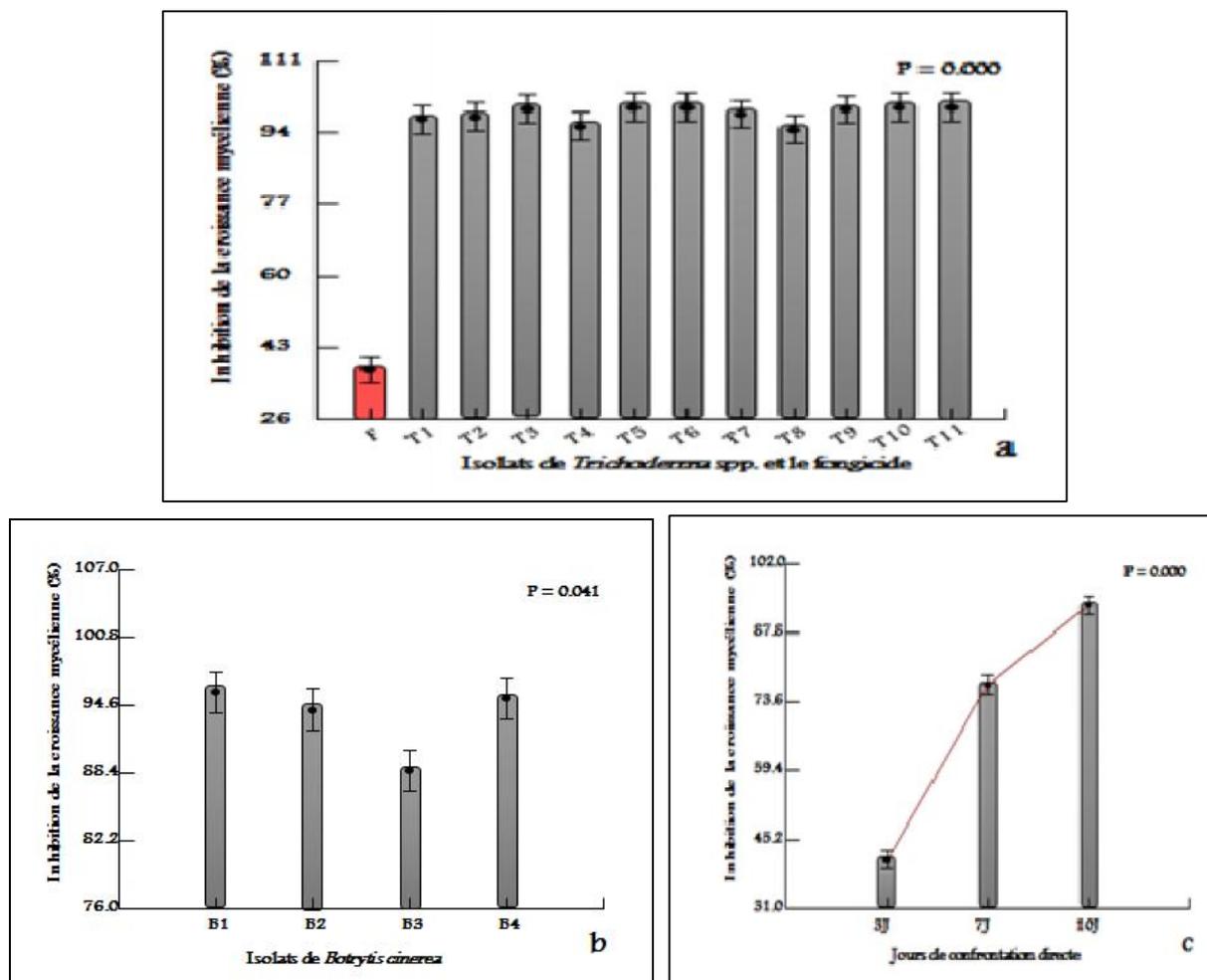
L'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. a montré une inhibition très importante de la croissance mycélienne et cela pour les quatre isolats de *B. cinerea* (Figure 1a). L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne a montré une

différence hautement significative entre les isolats phytopathogènes et antagonistes étudiées. En modèle GLM, les taux d'inhibition ont dépassé 94% pour tous les *Trichoderma* antagonistes, contrairement au traitement fongicide qui n'a pas dépassé 30% (Figure 2a) ; une faible croissance des isolats de *B. cinerea* a été observé après trois jours d'incubation (Figure 2c).



a: Témoin B1 âgé de 3 jours, b : Témoin B1 âgé de 7 jours, c : Témoin B1 âgé de 10 jours, d : souche B1 confrontée au fongicide après 3 jours, e : souche B1 confrontée au fongicide après 7 jours, f : souche B1 confrontée au fongicide après 10 jours, g : souche B1 confrontée à l'isolat T8 après 3 jours, h : souche B1 confrontée à l'isolat T8 après 7 jours, i : souche B1 confrontée à l'isolat T8 après 10 jours, F : puit du fongicide , z :zone d'inhibition.

Fig.1. Activité antagoniste de l'isolat T8 de *Trichoderma* sp. et activité fongicide du « Prolex » sur l'isolat B1 de *B.cinerea*, cultivés sur milieu PDA a 25°C



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : Fongicide, B1, B2, B3, B4 : isolat de *Botrytis cinerea*

Fig.2. Inhibition de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* selon les isolats de *Trichoderma* spp. et les isolats pathogènes cultivés sur milieu PDA à 25°C (isolats antagonistes : $P=0.000 < 0,05$, ratio $F=79.255$; isolats pathogènes : $P=0.004 < 0,05$,ratio $F=5.420$)

Plusieurs chercheurs ont signalé que les espèces de *Trichoderma* étaient caractérisées par leur mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des phytopathogènes, et disposer d'une activité mycoparasitaire et d'une bonne aptitude à la compétition. Le haut pouvoir inhibiteur des isolats de *Trichoderma* spp. sur les champignons phytopathogènes a été rapporté dans de nombreuses études [8]. Des résultats très intéressants ont été obtenus avec *Trichoderma harzianum* vis-à-vis de la fusariose [9] ; avec *Trichoderma stromaticum* dans le contrôle de la maladie du balai des sorcières et avec *Trichoderma virens* contre la pourriture

brune [10].

Notre étude a prouvé une variabilité remarquable sur l'inhibition de la croissance mycélienne des quatre isolats de *B. cinerea* confrontés suite à la confrontation directe aux isolats de *Trichoderma* spp à partir du troisième jour pour arriver à une inhibition totale depuis le septième jour jusqu'au dixième jour. Ces résultats coïncident avec ceux des travaux d'Osman et al. [11] sur l'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* et *T. hamatum*, vis-à-vis des isolats de *Rhizoctonia solani* de plusieurs régions d'Égypte.

Par ailleurs, *Trichoderma viride* a également montré son important pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne de nombreux isolats fongiques pathogènes tels que *Monilia* sp. *Absidia* sp. *Phoma* sp. *Penicillium* sp. au troisième jour de confrontation de *Cladosporium* sp. *Geotrichum* sp., *Ulocladium* sp. et *Verticillium* sp. au cours du quatrième jour.

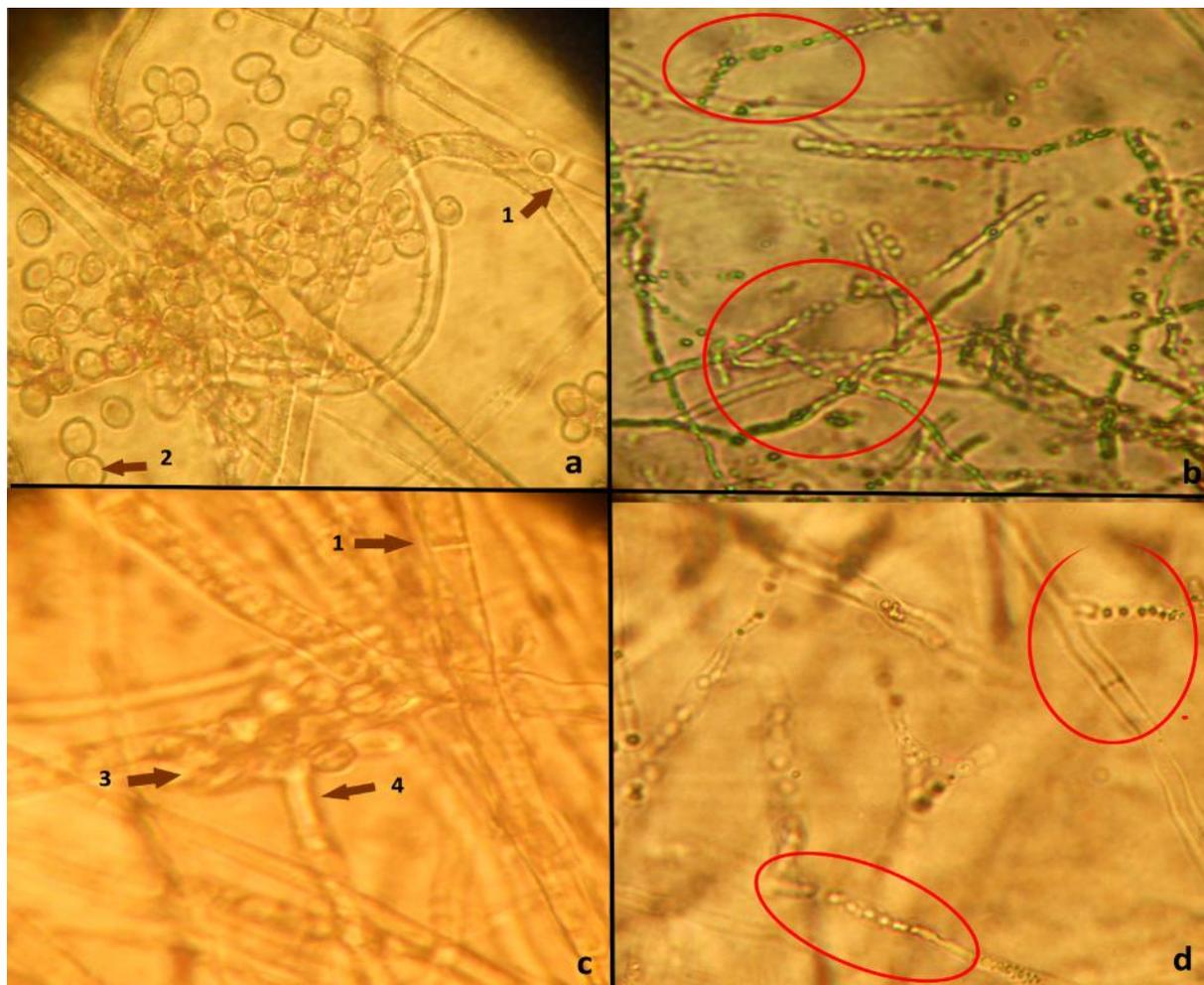
Au bout du sixième jour, la colonie de *Trichoderma viride* recouvre complètement les colonies de ces parasites [12]. Les mêmes constatations ont été relevées par Léopold et al. [13] sur la capacité de multiplication très élevée de *T. harzianum* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* et dans le biocontrôle du *Verticillium* sp. de la culture de tomate [14].

En effet, L'importante inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis cinerea* (supérieure 94%) développée sous l'effet antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. testés se rapproche de celle montrée par Jaejung et al., [15] sous l'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* et *T. viride* (100%) vis-à-vis des trois champignons responsables de la décomposition du bois *Fomitopsis palustris*, *Gloeophyllum trabeum* et *Trametes versicolor*. Boumaaza et al. [16] ont démontré à leur tour l'excellent pouvoir inhibiteur de la même espèce d'antagoniste sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*. Il en est de même pour les travaux d'Ajith et Lakshmidévi [17] et, Amin et al. [18] sur la croissance mycélienne de *Colletotrichum capsici*.

2.1.2. Événements structuraux du mycoparasitisme

L'inhibition de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* est traduite par l'effet antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. provoquant la lyse et la vésiculation du mycélium présentant parfois un diamètre plus réduit, ainsi que l'absence des spores. Ces modifications

morphologiques ont été observées au niveau de la zone de confrontation entre *Trichoderma* spp. et le champignon pathogène et cela pour les onze isolats antagonistes et les quatre isolats de *B. cinerea* alors qu'aucun changement morphologique n'a été observé pour les phytopathogènes témoins et ceux confrontés au fongicide (Figure.3).



a-b : l'isolat B1 de *Botrytis cinerea* témoin ; c : lyse du mycélium de l'isolat B1 de *Botrytis cinerea* confronté à l'isolat T4 de *Trichoderma* spp ; d : digestion et vésiculation du mycélium de l'isolats B1 *Botrytis cinerea* et absence des conidies confronté à l'isolat T4 de *Trichoderma* ; 1 : mycélium cloisonné, 2 : conidies, 3 : conidies en grappe, 4 : conidiophores.

Fig.3. Morphologie de l'isolat B1 de *Botrytis cinerea* témoin et sous l'effet antagoniste de l'isolat T4 de *Trichoderma* sp. cultivés sur milieu PDA à 25°C au Grossissement : X40

Les mécanismes mis en évidence par les *Trichoderma* pour le contrôle des champignons phytopathogènes, sont le mycoparasitisme, la sécrétion des substances volatiles et diffusibles et la compétition pour l'espace et les nutriments [19].

Dans ce sens, les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre

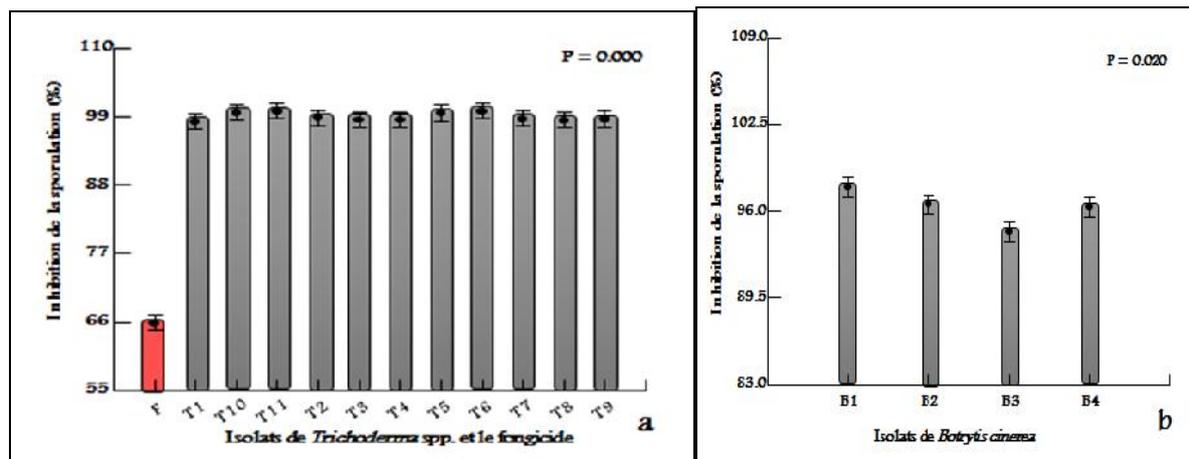
la souche antagoniste et les pathogènes, montrent une lyse, vésiculation du mycélium et absence des conidies du phytopathogène. Cette action est expliquée selon Moumene et al. [8], par un pouvoir hautement mycoparasitaire de la souche antagoniste *Trichoderma* sp. Cette espèce antagoniste entraînerait une altération du mycélium, qui se traduira par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme [9], ce phénomène est illustré aussi par une importante lyse au niveau du mycélium ou une dissolution du cytoplasme [20],

Le mycoparasitisme est un important trait de biocontrôle du genre *Trichoderma*. Une enquête récente portant sur plus de 1100 souches de *Trichoderma* provenant de 75 espèces définies au niveau moléculaire a révélé que toutes les espèces testées possédaient un potentiel mycoparasitique contre *B. cinerea*. [9-10]. *Trichoderma* spp. semble donc avoir un équipement enzymatique idéal pour cibler les parois cellulaires de *B. cinerea*, dans lesquelles la chitine et le β -glucane non cellulosique sont les principaux polysaccharides squelettiques [9].

2.1.3. Inhibition de la sporulation et de la germination

La sporulation, ainsi que la germination des quatre isolats de *Botrytis cinerea* étudiés ont été très affectées par les isolats antagonistes du genre *Trichoderma*, une différence hautement significative a été révélée sous l'effet du fongicide et celui des onze isolats antagonistes étudiés. D'importants taux d'inhibition avoisinant les 100%, ont été enregistrés sur la sporulation des isolats de *B. cinerea* sous l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp; alors qu'ils n'ont pas dépassé les 66% sous l'effet du fongicide (Figure 4a).

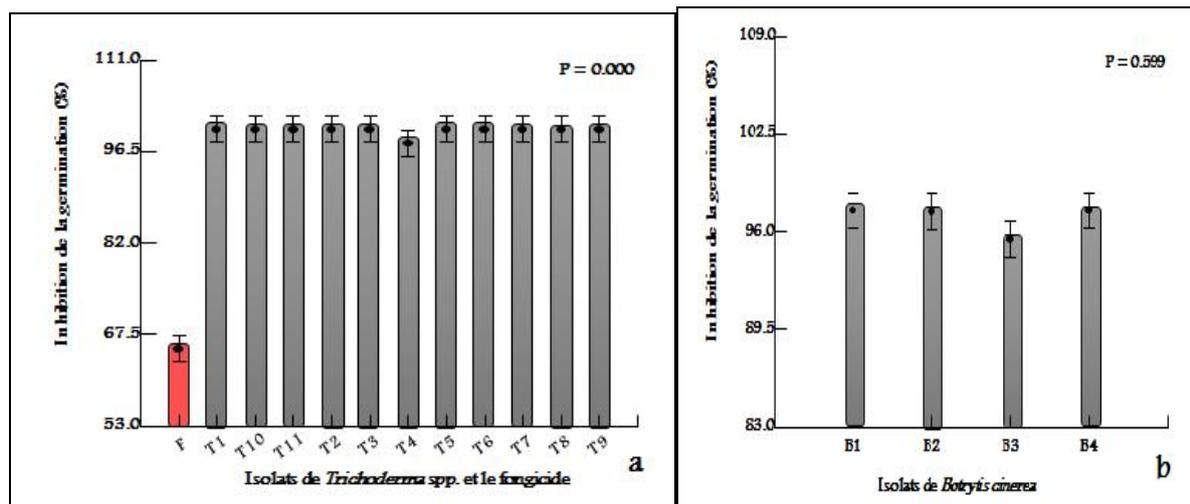
L'inhibition de la sporulation a été plus marquée sur l'isolat B1 (de 99 à 100%) et par degré moindre dans l'ordre décroissant sur les isolats B2, B4 et B3 respectivement des isolats de *B. cinerea* (entre 95% à 98%) (Figure 4b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp. F : Fongicide, B1, B2, B3, B4 : isolats de *Botrytis cinerea*

Fig.4. Inhibition de la sporulation de *B.cinerea* selon les isolats de *Trichoderma* spp. et les isolats pathogènes, cultivés sur milieu PDA à 25°C (isolats antagonistes : $P=0.000 < 0,05$; ratio $F= 59.831$; isolats pathogènes: $P=0.020 < 0,05$; ratio $F=3.749$)

En parallèle, la germination a été fortement affectée par les isolats de *Trichoderma* spp. D'importants taux d'inhibition ont été enregistrés sous l'activité antagoniste (98% pour l'isolat T4 et 100% pour le reste des isolats), tandis qu'il semblait plus faible (65%) sous l'activité du fongicide (Figure 5a). L'inhibition de la germination a été plus marquée sur les isolats phytopathogènes B1, B2 et B4 de 91 à 100% sous l'effet des isolats antagonistes et plus faible pour l'isolat B3 (Figure 5b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : Fongicide, B1, B2, B3, B4 : isolat de *Botrytis cinerea*

Fig.5. Inhibition de la germination des conidies de *B.cinerea* selon les isolats de *Trichoderma* spp. et les isolats pathogènes cultivés sur milieu PDA à 25°C (isolats antagonistes : $P=0.000 < 0,05$, ratio $F= 23.642$; isolats phytopathogènes: $P=0.599 > 0,05$, ratio $F=0.633749$)

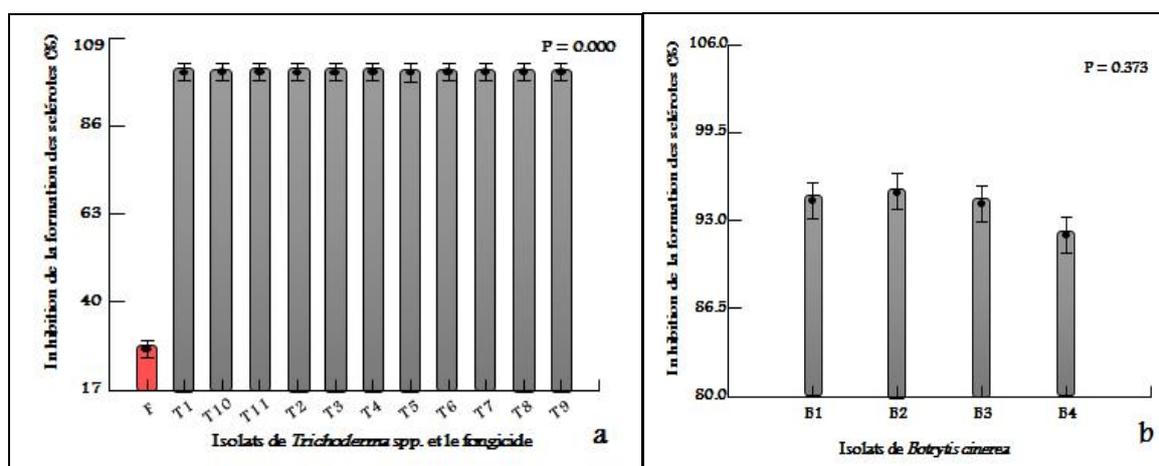
L'activité antagoniste *in vitro* a été confirmée par l'aptitude d'inhibition de nos isolats de *Trichoderma* spp de la sporulation des isolats de *Botrytis cinerea*. Ces résultats concordent avec ceux de *Trichoderma harzianum* révélés sur la sporulation de *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea* ainsi que sur celle de *Sclerotinia sclerotiorum* montrés par les travaux de Bendahmane et al. [21] et Ibarra-medina et al. [22] respectivement.

Aussi, des taux importants d'inhibition ont été enregistrés sous l'activité antagoniste, tandis qu'il semblait plus faible sous l'activité du fongicide ; cela coïncide avec des tests d'antagonisme *in vitro* en utilisant des souches de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* et *T. spirale* contre *Phytophthora palmivora* responsable de la pourriture brune des cosses de cacao ont révélé une action inhibitrice sur la croissance de la sporulation et la germination [23]. Pareillement, la germination des spores de *Bipolaris maydis*, *B. sorghicola*, *B. sorokiniana* et *B. tetramera*, à des degrés variables et par le biais de différents mécanismes [24].

2.1.4. Inhibition de la production et de la germination des sclérotés

L'inhibition de la production moyenne des sclérotés a été évaluée *in vitro* pour chaque isolat antagoniste et phytopathogènes sur milieu PDA. L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la production de sclérotés par les isolats de *B. cinerea* préalablement inhibés par les isolats

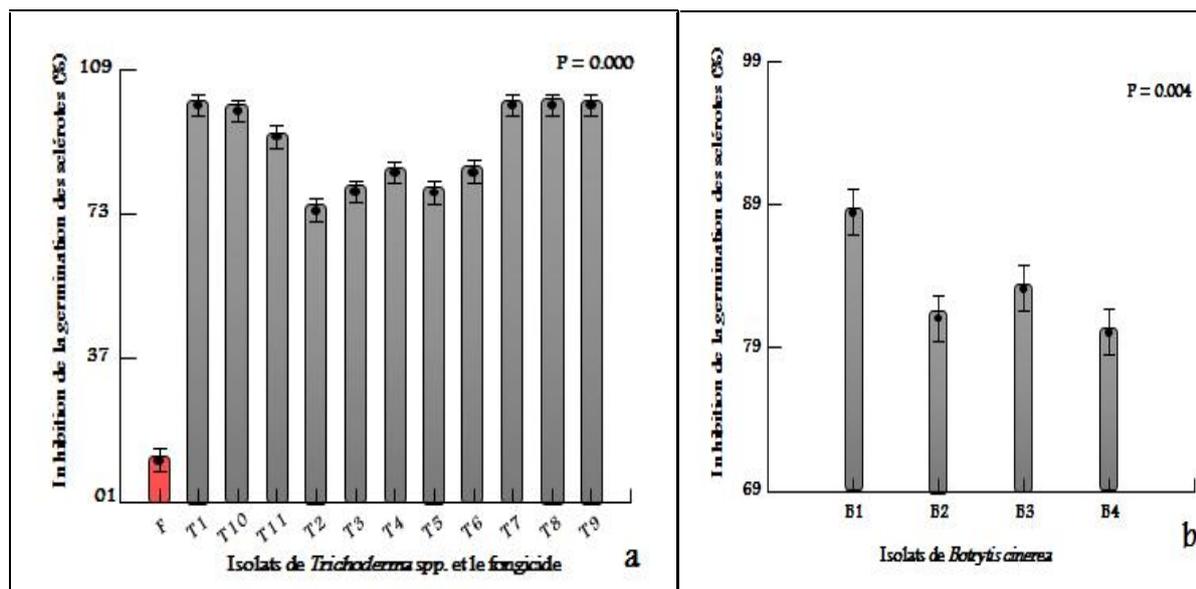
antagonistes a montré une différence hautement significative selon les isolats de *Trichoderma* spp. et non significative selon les isolats de *B. cinerea*. Cependant, une très forte inhibition a affecté la formation des sclérotos (100%) selon les isolats antagonistes et ceux pathogènes, alors qu'elle demeure plus faible (22%) sous l'effet du fongicide (Figure 6a). Parallèlement, une très forte inhibition a été enregistrée pour les quatre isolats de *Botrytis cinerea* avec une légère variation due à l'effet du fongicide 4.5% sur l'isolat B4, 30.98% sur l'isolat B3, 34% sur l'isolat B1 et 41% sur l'isolat B2 (Figure 6b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : Fongicide, B1, B2, B3, B4 : isolat de *Botrytis cinerea*

Fig.6. Inhibition de la production de sclérotos de *B.cinerea* selon les isolats de *Trichoderma* spp. et les isolats pathogènes cultivés sur milieu PDA a 25°C. (isolats antagonistes: $P=0.000 < 0,05$, le ratio $F= 81.967$; isolats phytopathogènes: $P=0.373 > 0,05$, ratio $F=1.076$)

En outre, une variabilité dans l'inhibition de la germination des sclérotos a été également enregistrée selon les isolats de *Trichoderma* spp. et les quatre isolats de *B. cinerea*. Dans ce sens, une inhibition totale (100%) a été enregistrée sous l'effet des isolats antagonistes T1, T10, T7, T8 et T9 et avec un degré moindre sous l'activité des isolats antagonistes T11, T4, T6, T3, T5 et T2 (légèrement supérieurs à 70%). Cependant, de faibles taux d'inhibition compris entre 7% et 14% ont été enregistrés sous l'activité du fongicide (Figure 7a). Par ailleurs, l'isolat B1 de *B. cinerea* a été le plus sensible (88%), suivi respectivement par B2 (83%), B3 (81%) et B4 (80%) (Figure 7b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : Fongicide, B1, B2, B3, B4 : isolat de *Botrytis cinerea*

Fig.7. Inhibition de la germination des sclérotés de *B.cinerea* selon les isolats de *Trichoderma* spp. et selon les isolats pathogènes cultivés sur milieu PDA a 25°C. (isolats antagonistes: $P=0.000<0,05$, le ratio $F= 79.255$; isolats phytopathogènes: $P=0.004<0,05$, ratio $F=5.420$)

L'activité mycoparasitaire de nos isolats de *Trichoderma* spp. a été prouvée sur la production et la germination des sclérotés du champignon phytopathogène, ceci est considéré comme un outil puissant pour la lutte biologique, puisque ces structures végétatives très résistantes, représentent la forme de survie primaire de l'agent pathogène dans le sol [25-26-27].

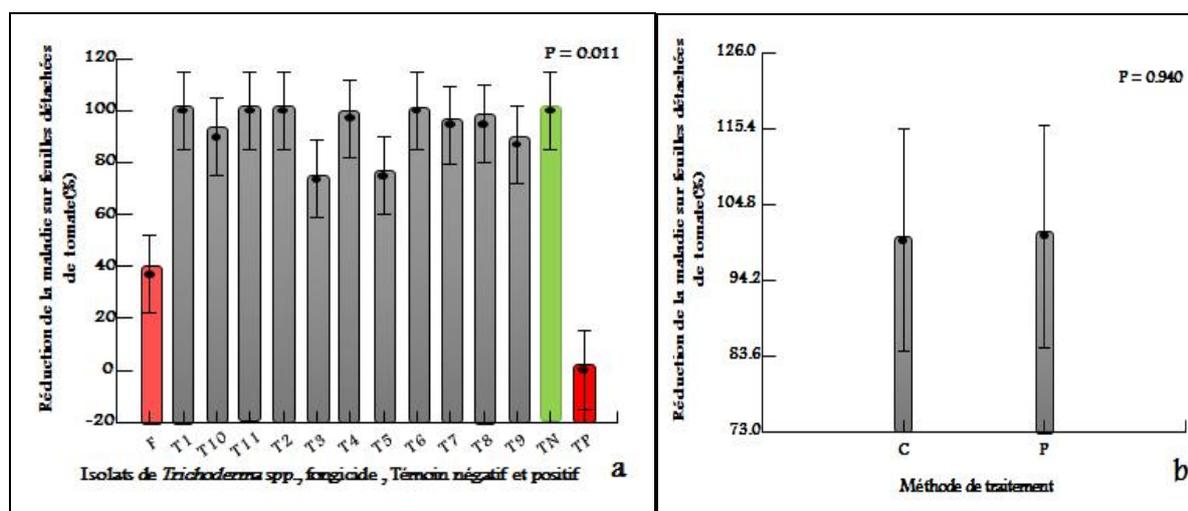
Ibarra-medina et al. [22] ont testé l'effet antagoniste de *T. harzianum* vis-à-vis *Sclerotinia sclerotiorum*, et ils ont confirmé son pouvoir envahissant sur la sporulation et la formation et germination des sclérotés. Ces résultats sont similaires à ceux démontrée par Soares de Melo et Faull [19]. Sous l'activité de *T. harzianum* Th-9 et de *T. koningii* sur *Rhizoctonia solani* après 30 jours d'incubation.

2.2. Activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp.

2.2.1. Réduction de la maladie et du pouvoir de sporulation des isolats de *Botrytis cinerea* sur feuilles détachées de tomate

La réduction des symptômes de la pourriture grise de la tomate par les isolats de *Trichoderma* spp. a été déterminée *in vivo* sur disques foliaires de la variété Kawa de la tomate. L'analyse de

la variance des taux de la réduction de la maladie ont montré une différence significative entre les isolats antagonistes. Selon le modèle GLM, une réduction totale des symptômes a été enregistrée sous l'activité antagoniste des isolats T1, T2, T6 et T11, et mais, elle demeure toujours importante sous l'effet des isolats antagonistes T4 (97.5%), T7 (94.87), T8 (94.73), T10 (89.73%), T9 (86.84%), T5 (75%) et T3 (73.68) comparée à la faible inhibition engendrée sous l'effet du fongicide (avoisinant 37%) (Figure 8a). Cependant, une différence non significative a été enregistrée entre les modes de traitement préventif et curatif (Figure 8b).

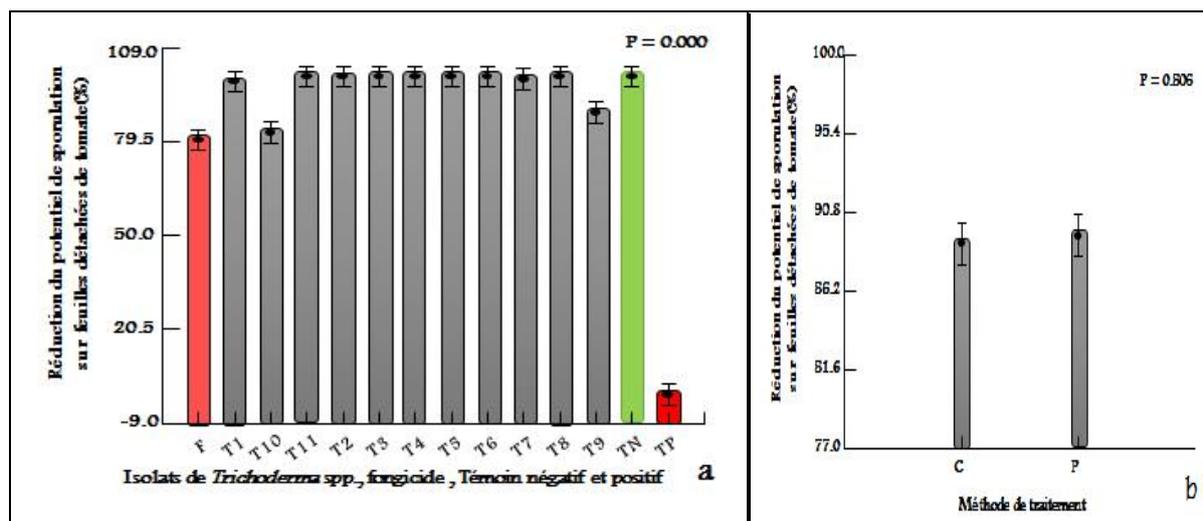


T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp., F : fongicide, TN : Témoin négatif, TP : Témoin positif, C : mode de traitement curatif, P : mode de traitement préventif

Fig.8. Réduction de la maladie sur feuilles détachées de la variété de tomate Kawa selon les isolats de *Trichoderma* spp. et selon les modes de traitements (isolats antagonistes:

$P=0.011 < 0,05$, ratio $F= 3.819$; modes d'application des traitements: $P=0.940 > 0,05$,
 $F=0.006$)

Aussi, d'importants taux d'inhibition de la sporulation des isolats de *B. cinerea* ont été enregistrés *in vivo*, dépassant 80% sous l'effet du fongicide et ceux des isolats T9 et T10 et atteignant même les 100% pour le reste des isolats antagonistes (Figure 9a). Il est important de rappeler une efficacité plus marquée des isolats antagonistes selon le mode d'application préventif 89 % (Figure 9b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : fongicide, TN : Témoin négatif, TP : Témoin positif, C : mode de traitement curatif, P : mode de traitement préventif

Fig.9. Réduction de la sporulation de *Botrytis cinerea* sur feuilles détachées de la variété de tomate Kawa selon les isolats de *Trichoderma* spp. et selon le mode de traitements (isolats antagonistes: $P=0.000 < 0,05$, ratio $F= 66.279$; les modes d'application des traitements: $P=0.806 > 0,05$, ratio $F=0.063$)

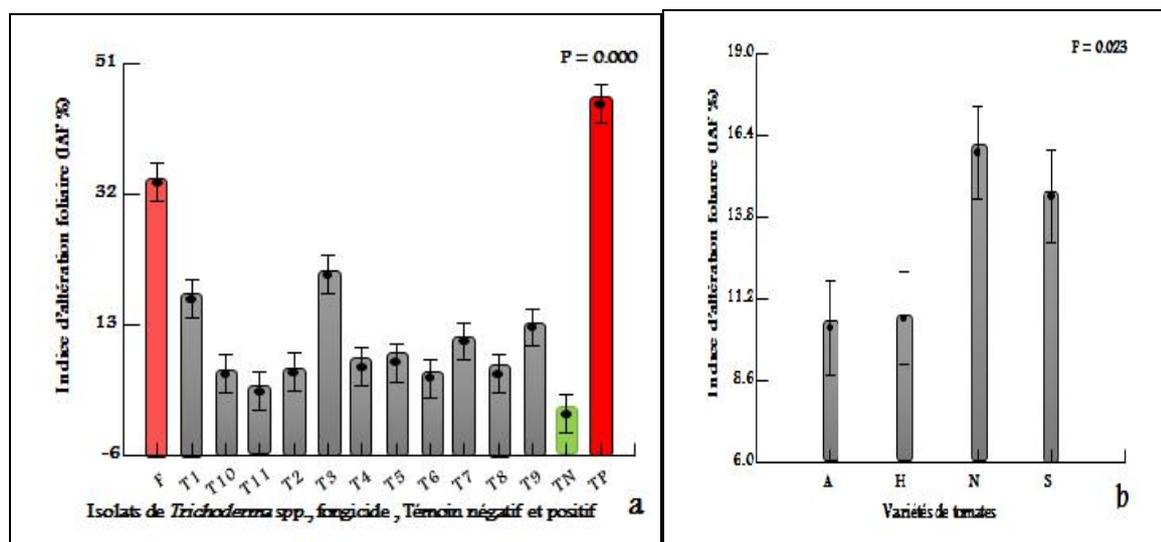
Une forte réduction de symptômes enregistrée sous l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. notamment les isolats T1, T2, T6 et T11. a été comparable à celle démontrée par Yael et al. [28] sur feuilles détachées et sur plant de tomate sous l'effet de l'isolat antagoniste *T. harzianum* T39.

Des taux importants d'inhibition de la sporulation des isolats de *B. cinerea* ont été enregistrés *in vivo*, dépassant 80% sous l'effet du fongicide et atteignant même les 100% pour les isolats antagonistes, en effet, O'Neill et al., [29], ont montré une importante réduction de la sévérité des symptômes (68 à 71%) et une diminution de l'intensité de la sporulation (87%) sous l'effet des souches de *Trichoderma harzianum*. Aussi Al Masri [30] a également souligné le même résultat en étudiant l'effet *in vivo* de sept isolats de *Trichoderma harzianum* sur la sporulation du *Botrytis cinerea* sur les feuilles de tomate et d' haricot.

2.2.2. Réduction de la maladie sur plants de tomate en pots

L'analyse de la variance des indices d'infection des plantes de tomate par les isolats de *B. cinerea* ont montré une différence significative entre les isolats antagonistes $P=0.000 < 0,05$ et

les variétés testées de tomates $P= 0.023 < 0.05$ (Figures 10). De faibles indices d'infection compris entre 5.54 et 20.25 ont été enregistrés sous l'effet des isolats antagonistes. L'isolat T11 a montré le meilleur effet inhibiteur du pouvoir pathogène, contrairement à l'effet du fongicide qui a révélé une remarquable infection dépassant les 32% (Figure 10a) et du témoin positif ou l'infection à atteint une moyenne de 45.08%. Aussi, les symptômes ont été plus marqués sur la variété Nedjma (16%) suivie respectivement par les autres variétés Saint Pierre (14%), Aicha et Heintz (11%) (Figure 10b).



T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 : isolats de *Trichoderma* spp, F : fongicide, TN : Témoin négatif, TP : Témoin positif, A : variété Aicha de tomate, H : variété Heintz de tomate, N : variété Nedjma de tomate, S : variété Saint Pierre de tomate

Fig.10. Réduction de l'infection des plants de tomate cultivés en pots par la maladie de la pourriture grise selon les isolats de *Trichoderma* spp. et selon les variétés (isolats antagonistes: $P=0.000 < 0,05$, ratio $F= 20.850$; variétés : $P=0.023 < 0.05$ et ratio $F=3.556$)

Une réduction importante des infections par *Botrytis cinerea* ont été enregistrés sous l'effet des isolats antagonistes notamment l'isolat T11 contrairement à l'effet du fongicide qui a révélé une remarquable infection dépassant les 32% et du témoin positif ou l'infection à atteint une moyenne de 45.08%. Ces résultats coïncident avec ceux d'O'Neill et al. [29] où Une forte réduction de la pourriture grise a été notée sous l'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* (84%) sur des plants de tomate sous serre.

Par ailleurs, une réduction de l'infection par *Botrytis cinerea* de plus de 50% a été révélée

sous l'activité antagoniste de *T. harzianum* par rapport au témoin non traité et de plus de 70% par rapport aux fongicides Iprodione 50% et Procymidone 50% [2].

3. EXPERIMENTATION

Cette étude repose sur l'utilisation d'un matériel biologique composé d'un matériel végétal représenté par les variétés de semences de tomate, un matériel fongique antagoniste, un matériel fongique phytopathogène et un fongicide contre le *Botrytis cinerea*.

3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de semences certifiées de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) appartenant aux quatre variétés les plus utilisées en Algérie, deux variétés fixées Saint pierre et Aïcha et une variété de tomate industrielle hybride Heintz, ainsi qu'une variété hybride Nedjma, reconnue par la faculté de réunir plusieurs caractères d'intérêt (bonne précocité et bonne qualité de résistance aux maladies et aux attaques parasitaires). Ainsi que des disques foliaires à partir de plants de tomate sains âgés de deux mois de la variété hybride Kawa largement utilisée dans la région du littoral de la wilaya de Tipaza [31].

3.2. Matériel fongique antagoniste

Onze isolats (T1 à T11) de *Trichoderma* spp. proviennent de la mycothèque de Dr S. Moumene, enseignante à la faculté Science de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida 1. Ils sont issus de la rhizosphère des zones de production de la pomme de terre et de la tomate en Algérie et ont fait objet des travaux de l'activité antagoniste à l'égard de *Phytophthora infestans* agent responsable du mildiou et de *Rhizoctonia solani* agent responsable du rhizoctone brun de la pomme de terre en Algérie [8]. Ces isolats antagonistes purifiés et conservés à l'abri des contaminations ont été produits en masse sur milieu de pomme de terre-dextrose-agar (PDA) et incubés à une température de 25°C.

3.3. Matériel Fongique phytopathogène

Durant la période allant de mars à juin 2014, quatre isolats de *Botrytis cinerea* (B1, B2, B3, B4) ont été collectés à partir de fruits de tomate infectés, provenant de serres de quatre exploitations situées respectivement dans des zones productrices de la tomate Douaouda, Sidi Ghiles et Damous de la wilaya de Tipaza et la Wilaya d'El Oued. Ces isolats ont été purifiés et

soumis aux cultures monosporales pour être entretenus par repiquage sur milieu à base de pomme de terre- Dextrose- agar (PDA) et incubées à 25°C pendant 20 jours. Leur identification a été basée sur leurs caractéristiques culturales et morphologiques, en se référant à la clé de détermination de Barnett [21].

3.4. Fongicide

L'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. a été comparée à celle d'un fongicide systémique largement utilisé contre le *Botrytis cinerea* en Algérie : le « PROLEX », fabriqué par la firme VAPCO dont la matière active est la Procymidone (50%) qui, agit par contact préventivement en inhibant la germination des spores et curativement la croissance mycélienne. La préparation de la solution fongicide a été effectuée par la solubilisation de la poudre du pesticide dans l'eau distillée stérile selon la dose recommandée par le fabricant (150g/hl).

3.5. Etude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp

3.5.1. Technique de confrontation directe

Cette méthode consiste à déposer dans la même boîte de Pétri contenant le milieu PDA deux disques mycéliens de 5 mm de diamètre, l'un correspondant à *Botrytis cinerea* et l'autre à *Trichoderma* spp. Ces derniers sont placés suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte. Après une période de deux jours, pour le fongicide, un puit de 5 mm a été creusé à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Pour chaque isolat phytopathogène et antagoniste, 5 répétitions ont été prises en considération. Pour le témoin, l'explant du phytopathogène a été déposé au centre de la boîte. L'incubation est réalisée à 25°C et à l'obscurité [24]. Plusieurs paramètres ont été déterminés :

3.5.2. Inhibition de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été déterminée après une période de 3, 7 et 10 jours par la mesure de 2 diamètres perpendiculaires de la colonie de l'agent phytopathogène et celle des isolats témoins. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont été calculés selon la formule de Berber et al. [24].

$$IC (\%) = (DT - DPA) / DT \times 100$$

DT : croissance diamétrale du témoin

DPA : croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste.

IC (%) : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

3.5.3. Mycoparasitisme

Pour cette étude, des préparations microscopiques ont été préparées après prélèvement dans la zone d'interpénétration entre les deux isolats confrontés, un fragment mycélien de l'agent phytopathogène pour le placer entre lame et lamelle en présence d'une goutte d'eau distillée stérile. Des observations ont été réalisées à l'aide du microscope optique réglé au grossissement X 500 afin d'estimer, pour chaque confrontation, les modifications morphologiques des isolats de *B. Cinerea* engendrés par ceux de *Trichoderma* spp. [24].

3.5.4. Inhibition de la sporulation et de la germination

Après 20 jours d'incubation à la température de 25°C les cultures d'isolats fongiques développées après confrontation et ceux des témoins, 10 ml d'eau distillée stérile ont été versés dans chaque boîte de culture puis, qui ont été raclées à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer les suspensions conidiennes de *B. cinerea* dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex.

Les suspensions conidiennes des quatre isolats de *B. cinerea* ainsi préparées ont fait l'objet de détermination de la concentration en spores et celle en spores germées à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope optique au grossissement X 125.

L'inhibition de la sporulation a été calculée selon la formule établie par Berber et al. [24] :

$$IS(\%) = (ST - St) / ST \times 100$$

- IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.
- ST : Concentration en spores de l'inoculum témoin (spores/ml).
- St : Concentration en spores de l'inoculum traité (spores/ml).

Les taux d'inhibition ont été également calculés pour la germination de chacun des isolats de *B. cinerea*, en utilisant la formule :

$$IG(\%) = (GT - Gt) / GT \times 100 \text{ [24].}$$

- IG : Taux d'inhibition de la germination en %.
- GT : Concentration en spores germés de l'inoculum témoin (nombre de spores germés/ml).

- Gt : Concentration en spores germés de l'inoculum traité (nombre de spores germées/ml).

3.5.5. Inhibition de la production et de la germination des sclérotés

Le dénombrement des sclérotés produits par les isolats de *B. cinerea* confrontés aux isolats de *Trichoderma* spp. a été fait après 20 jours d'incubation. L'étude de la germination des sclérotés a nécessité la collecte des sclérotés à partir des cultures des isolats de *B. cinerea* témoins âgées d'un mois. La technique consiste à la mise en contact des sclérotés collectés et stérilisés avec les isolats antagonistes de *Trichoderma* spp. âgés de 72 heures sur milieu PDA à 25°C et à l'obscurité.

Les taux d'inhibition de la germination des sclérotés ont été déterminés pour chaque isolat phytopathogène confronté aux isolats antagonistes selon la formule [24] :

$$IC (\%) = (DT - DPA) / DT \times 100$$

DT : croissance diamétrale du témoin

DPA : croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste.

IC (%) : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

3.6. Etude de l'activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des isolats de *B. cinerea*

3.6.1. Etude de la réduction de la maladie sur disque foliaires de tomate

Les disques foliaires utilisés dans cette étude proviennent des feuilles saines issues des plants de tomate de la variété Kawa âgés de deux mois, Ces derniers ont été désinfectés à l'alcool 90° ; ainsi, deux modes d'application des traitements antagonistes ont été retenus selon le protocole modifié de Hmouni et al. [32] :

- Le mode préventif consiste au traitement des disques foliaires de tomate par les suspensions d'antagonistes à une concentration de 10^6 spore/ml et après 24 heures 100µl de suspension conidiennes de *B. cinerea* à une concentration de 10^5 spores/ml sont déposées sur la face inférieure de chaque disque foliaire.
- Le mode curatif consiste au dépôt de 100µl de chacune des suspensions conidiennes de *B. cinerea* sur les disques foliaires, puis 50 µl des suspensions antagonistes ont été ajoutés après une période de 24 heures.

Les disques foliaires inoculés seulement par les suspensions phytopathogènes ont servi de

témoins positifs et, ceux traités par l'eau distillée stérile comme témoins négatifs [33]. L'ensemble des disques foliaires traités ainsi que les témoins ont été placés dans des chambres humides stériles, incubées à l'obscurité à 20°C pendant 4 jours [34].

L'évaluation du potentiel d'infection (PI), a été réalisée en mesurant les deux diamètres orthogonaux des lésions et en calculant ainsi la moyenne. Le potentiel de sporulation (PS) a été déterminé après introduction de chacun des disques foliaires dans un tube à essai contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Après agitation mécanique pendant 1 minute, le comptage des conidies a été réalisé par le biais de la cellule de Malassez [34].

Les taux de réduction de la maladie ont été déterminés par le calcul du potentiel d'infection (PI) et celui de sporulation (PS) respectivement selon les formules proposées par Berber et al. [24] :

$$PI (\%) = CIP - CIPE / CIP \times 100$$

- CIP: coefficient d'infection des plantes inoculées par le pathogène (surface foliaire infectée témoin).
- CIPE: Coefficient d'infection des plantes inoculées par le pathogène et traitées par l'antagoniste (surface foliaire infectée traitée).

$$PS(\%) = ST - St / ST \times 100$$

ST : Concentration en spores de l'inoculum témoin (spores/ml).

St : Concentration en spores de l'inoculum traité (spores/ml).

3.6.2 Etude de la réduction de la maladie sur plants de tomate en pots

Les quatre variétés de tomate ont été cultivées en pots, arrangés en blocs aléatoires complet avec cinq répétitions sous serre en plastique. Les pots traités sont arrosés avec 20 ml de suspension d'antagonistes de 10^6 spores/ml. Les plants témoins négatifs et positifs ont été arrosés par l'eau du robinet. L'infection a été réalisée par aspersion et arrosage des plants par 20 ml de suspension de *B. cinerea* de 10^5 spore/ml au stade apparition des premières vraies feuilles.

L'Indice d'Altération Foliaire (IAF) a été calculé pour chaque bloc (traitement) selon la formule [35] :

$$IAF = [(i \times xi)] / (NtF \times 6) \times 100$$

IAF = Indice d'altération foliaire

i : Le degré d'altération des feuilles 0-5

xi : Nombre de feuilles présentant la note i

NtF : nombre totale des feuilles

3.7. Analyse statistique

Les taux d'inhibition calculés pour chaque paramètre étudié *in vitro* ou *in vivo* ont été analysés au moyen du logiciel SYSTAT vers.7, en déterminant l'analyse de la variance par les tests : ANOVA et GLM (modèle linéaire généralisé ou General Linear Model), les différences ont été significatives pour un P = 0,05 [36].

4. CONCLUSION

Les potentialités antagonistes vis à vis des isolats de *B. cinerea* ont été confirmées *in vitro* et *in vivo* pour l'ensemble des onze isolats étudiés, particulièrement pour les isolats T11 et T8 de *Trichoderma* spp. Ils s'avèrent donc, prometteurs pour le biocontrôle de la pourriture grise de la tomate sous serre, comme cela a été déjà par les travaux de Moumene vis-à-vis du mildiou de la pomme de terre en 2015.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Les auteurs remercient l'Institut National de la protection des végétaux pour les moyens et les facilités fournies.

6. REFERENCES

- [1] Fiume F , Fiume G. Biological control of *Botrytis* gray mould on tomato cultivated in greenhouse. Commun Agric. Appl. Biol. Sci., 2006, 71 (3), 897-908.
- [2] FAO, FAOSTAT-Crops- Tomato data., 2018, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (01/03/2018).
- [3] Elmer P A G, Reglinski T. Bio-suppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology., 2006, 55,155-177.

-
- [4] Hmouni A, Oihabi L, Badoc A, Douira A. Study of resistance of *Botrytis cinerea* to benzimidazole, dicarboximide and dithiocarbamates in sheltered tomato crops in the Western region (Morocco). Bull. Soc. Pharm. Bordeaux., 2003, 142, 79-100.
- [5] Hishkoff N, Mcgrath M T. AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. Plant Dis., 2002, 86 (8), 915-918.
- [6] Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M., *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Rev. Microbiol., 2004, 2(1), 43-56.
- [7] Mukherjee P K, Horwitz B A, Kenerley C M. Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. Microbiology, 2012, 158 (1), 35-45.
- [8] Moumene S, Zanoune S, Laidani M, Bouznad Z. Biocontrol of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, The causal agent of potato late blight, with isolates of *Trichoderma* spp., medicinal plant-based preparations and Posidonia- based preparations. In Natural products and Bio-control. Presses Universitaires de Perpignan, France, 2015, pp.108.
- [9] Messgo-Moumene S, Haddadj-Hamdi S, Saddek D, Zanoune S, Bellatreche M, Hamlaoui Y, Houmani Z. Essais de biocontrôle contre le rhizoctone brun de la pomme de terre, en Algérie : Effets antifongiques des extraits de plantes et effets antagonistes de quelques isolats du genre *Trichoderma* sur *Rhizoctonia solani* Kuhn. Séminaire International sur « Santé des Plantes au Service du Développement, Université de Chlef, Algérie. Communication Orale et Proceeding, 2016, pp. 216.
- [10] Hibar K, Daami-Remadi M, Khiareddine H, El Mahdjoub M. Inhibitory effect *in vitro* and *in vivo* of *Trichoderma harzianum* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2005, 9 (3), 163-171.
- [11] Krauss U, Soberanis W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. Biological Control, 2002, 24 (5), 82-89.
- [12] Osman M E H, El-Sheekh M M, Metwally M A, Ismail A E A, Ismail M M. Antagonistic activity of some fungi and cyanobacteria species against *R. solani*. Int. J of Plant Pathology, 2011, 2 (3), 101-114.

-
- [13] Bouziane Z, Dehimat I, Kacem N, Chaouche W, Abdel –Aziz W. La compétition de *Trichoderma viride* vis-à-vis des souches fongiques pathogènes de *Zea mays*. Sciences and Technologie, 2011, 33 (6), 31-37.
- [14] Léopold S G, Dénis H, Tonon E, Euloge M, Faton O, Kobi O, Douro K, Dannon E, Akoegninou A. Efficacité de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* agent pathogène de la tomate. Int. J. Biol. Chem. Sci. 2015, 9 (2), 770-782.
- [15] Mouria B, Ouazzani T, Douira A. Effet du compost de *Trichoderma harzianum* sur la suppression de la verticilliose de la tomate. Journal of Applied Biosciens, 2013, 70, 5531-5543.
- [16] Jaejung L, Joo-Hung H, Kim G H, Kim J J. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. Holzforschung, 2012, 66 (7), 883–887.
- [17] Boumaaza B, Benkhelifa M, Belkhoudja M. Salinity Influence upon Activity of *Trichoderma*. Asian Journal of Plant Pathology, 2015, 9 (4), 158-166.
- [18] Ajith P S, Lakshmidevi N. Effect of volatile and non-volatile compound from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. Nat. Sci., 2010, 8 (9), 265-269.
- [19] Amin F, Razdan V K., Mohiddin F A, Sheikh K A, Bhat P A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in-vitro. J. Phytol., 2010, 2 (10), 34-37.
- [20] Melo I S, Faull J, Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Sci. agric. , 2000, 57 (1) , 55-59.
- [21] Mahiout D, Benzohra I. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot. World Applied Sciences Journal, 2012, 17 (3), 278-283.
- [22] Bendahmane B S, Mahiout D, Benzohra I E, Benkada M Y. Antagonism of three Species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of Chocolate spot of Faba Bean (*Vicia fabae* L.) in Algeria. World Applied Sciences journal, 2012, 17 (3), 278-283.

-
- [23]Ibarra-Medina V A, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara Hernández M E, Valdez-Carrasco J M, Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista mexicana de micología*, 2010, 31, 53-63.
- [24]Mpika J, Kebe B I, N'Guessan K F, Isolation and identification of indigenous microorganisms of cocoa farms in Cote d'Ivoire and assessment of their antagonistic effects against *Phytophthora palmivora*, the causal agent of the black pod disease. O.Grillo (Ed.), *Biodiversity Loss in a Changing Planet*, 2011. INTECH, 303-319.
- [25]Berber F, Ouazzani-Touhami M, Badoc A, Douira A. *In vivo* antagonism of two *Trichoderma* against four species of pathogenic *Bipolaris* on sorghum. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2009,148, 93-114.
- [26]Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1), 363–370.
- [27]St Leger R J, Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (4), 901–907.
- [28]Sandhu S S, Sharma A K, Beniwal V, Boel G, Batra P., Kumar A, Jaglan S, Sharma A K, and Malhotra S. Myco-biocontrol of insect pests, factor involved, mechanism, and regulation. *Journal of Pathogen.*, 2012, Article ID 126819, pp. 10 .
- [29]Yael M H, Zeraye H M, Dalia R D, Yigal E. Systemic Resistance to Gray Mold Induced in Tomato by Benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. *J. Phytopathology*, 2014, 104 (2) , 150-177.
- [30]O'Neill T M, Niv A, Elad Y, Shtienberg D. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102 (7), 635–643.
- [31]Al Masri M I. Biological Control of Gray Mold Disease (*Botrytis cinerea*) on Tomato and Bean Plants by using local isolates of *Trichoderma harzianum*. *Dirasat, Agricultural Sciences*, 2014, 32 (2), 145-156.

- [32]FAO, Eude de base sur la tomate en Algérie. Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient. GTFS/REM/070/ITA, Rome, Italie, 2010, pp. 52.
- [33]Hmouni A, Mouria A, Douira A. Biological control of tomato grey mould with compost water extracts, *Trichoderma sp.*, and *Gliocladium sp.* *Phytopathologia Mediterranea*, 2006, 45 (2), 110-116.
- [34]Abd-El-Khair H, RKM K, Haggag K H E. Effect of *Trichoderma* species on damping off diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. *J .Am. Sci.*, 2010, 6 (9), 486-497.
- [35]Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Nicot P. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides?. *Front. Plant. Sci.*, 2015, 6 (7), 566.
- [36]Mouria B, Ouazzani TA, Douira A. *In vitro* and *in vivo* effects of compost on *Verticillium dahliae*, the causal agent of tomato Verticillium wilt. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 2014, 83,10 – 34.
- [37]Shedden K, *Generalized Linear Models*. Department of Statistics, University of Michigan. Creative Commons Attribution Share Alike 3.0 License, 2015, pp. 35.

How to cite this article:

Saddek D, Messgo-Moumene S, Chemat-Djenni Z, Bendifallah L, Bencheikh K. Antagonisme des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea* pers. agent de la pourriture grise de la tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) sous serre. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2020, 12(2), 583-606.