UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2019 N° d'ordre : 201905

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présentée par :

M. Ndiogou GUEYE

Caractérisation de *Trichoderma* spp. indigènes et évaluation de leurs potentialités antagonistes sur deux agents pathogènes de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) au Sénégal : *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*

Soutenue le 30 mars 2019 devant le jury composé de :

Président :	**M. Ibrahima Ndoye**	**Professeur Titulaire**	**UCAD**
Rapporteurs :	**M. Diégane Diouf**	**Professeur Titulaire**	**UCAD**
	M. Anicet Manga	**Maître de Conférences**	**UGB**
	Mme Mame Arama Fall Ndiaye	**Maître de Conférences**	**UCAD**
Examinateurs:	**M. Tahir Abdoulaye Diop**	**Professeur Titulaire**	**UAM**
	Mme Diénaba Sall Sy	**Chargée de Recherche**	**ISRA**

Directeur de thèse : **M. Tahir Abdoulaye Diop**	**Professeur Titulaire**	**UAM**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies végétales et microbiennes et amélioration des plantes

Prénom et Nom du candidat : Ndiogou Gueye

Titre de la thèse: Caractérisation de *Trichoderma* spp. indigènes et évaluation de leurs potentialités antagonistes sur deux agents pathogènes de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) au Sénégal: *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii.*

Date et lieu de soutenance : 30/03/2019

Composition du jury :

M. Ibrahima Ndoye	Professeur Titulaire	UCAD	Président
M. Diégane Diouf	Professeur Titulaire	UCAD	Rapporteur
M. Anicet Manga	Maître de Conférences	UGB	Rapporteur
Mme Mame Arama Fall Ndiaye	Maître de Conférences	UCAD	Rapporteur
M. Tahir Abdoulaye Diop	Professeur Titulaire	UAM	Examinateur
Mme Diénaba Sall Sy	Chargée de Recherche	ISRA	Examinatrice

Résumé : Au Sénégal, la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constitue le légume le plus consommé aprés l'oignon. Cependant, sa culture est aujourd'hui dépréciée par de nombreux agents pathogènes dont *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii* qui causent des pertes économiques importantes. Ainsi, dans la recherche de nouvelles méthodes de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement, notre étude se fixe comme objectif général de caractériser puis d'évaluer les potentialités antagonistes des souches de *Trichoderma* indigènes sur deux agents pathogènes de la tomate: *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii.* Suivant les caractéristiques morphologiques, un isolement de 20 souches de *Trichoderma* est réalisé à partir de différents sites de la zone des Niayes. Parmi ces isolats, 10 souches montrent une activité enzymatique importante liée à la production de chitinase, cellulase, pectinase et protéase et 8 souches de *Trichoderma* produisent de l'Acide Indole Acétique (AIA). L'identification des isolats basée sur le séquençage des régions ITS1 et ITS4 atteste que 7 souches appartiennent à l'espèce *Trichoderma asperellum* et une à *Trichoderma virens*. L'étude de la diversité génétique des isolats par RAPD révèle un pourcentage de polymorphisme élevé (98.2%) avec 5 primers. Pour l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance des 8 isolats de *Trichoderma* choisis, les résultats obtenus prouvent que le milieu PDA est plus adéquat pour la culture des souches. Les pH acides à neutres (pH 5 à pH 7) ainsi que les températures d'incubations se situant entre 25 et 30 °C sont plus favorables pour la croissance mycélienne des souches. Pour l'étude des propriétés antagonistes, une inhibition de la croissance mycélienne des deux pathogènes est notée pour les tests de confrontations directe et indirecte. Le pourcentage d'inhibition obtenu lors du test de confrontation directe est plus important que celui du test de confrontation indirecte. La souche de *Fusaium oxysporum* est plus sensible aux différentes souches de *Trichoderma* que *Sclerotinia rolfsii*. Les cinq isolats présentant les meilleures propriétés antagonistes (TM1, TS1, TG4, TN1 et TU1) montrent une réduction importante de l'incidence des deux maladies après traitement des semences et inoculation directe au sol en serre. Une amélioration significative des paramètres de croissance (hauteur, diamètre au collet, biomasse aérienne et racinaire) par rapport aux plants inoculés avec les pathogènes seuls est aussi observée. Ces souches pourraient donc être proposées comme agent de lutte biologique comme alternative aux fongicides chimiques.

Mots clés : *Trichoderma*, champignons pathogènes, tomate, lutte biologique

Fisrt and last name: Ndiogou GUEYE

Title: Characterization of indigenous *Trichoderma* spp and evaluation of their antagonistic potentialities against two pathogens of tomato (*Solanum lycopersicum*) in Senegal: *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii*.

Abstract:

In Senegal, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most consumed vegetable behind onion. However, its cultivation is now depreciated by many pathogens including *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii* which cause significant economic losses. Thus, in the search for new efficient and environmentally friendly methods of control, our study sets the general objective of characterizing and evaluating the antagonistic potential of indigenous *Trichoderma* strains against two tomato pathogenic fungus: *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii*. According to morphological characteristics, 20 strains of *Trichoderma* are isolated from different sites in Niayes zone. Among theses isolates, 10 strains show significant enzymatic activity related to the production of chitinase, cellulase, pectinase and protease and 8 strains of *Trichoderma* are postive to AIA production. Based on the sequencing of ITS1 and ITS4 regions, 7 strains are identify as *Trichoderma asperellum* and one as *Trichoderma virens*. The study of the genetic diversity of isolates by RAPD show a high percentage of polymorphism (98.2%) with 5 primers. Studies on effect of abiotic factors on the growth of the 8 selected *Trichoderma* isolates, reveal that PDA medium is more suitable for strain culture. Acid to neutral pH's (pH 5 to pH 7) as well as the incubation temperatures between 25 and 30 °C are more favorable for the mycelial growth of the isolates. Antagonistic studies by direct and indirect confrontation tests reveal the mycelial growth inhibition of the two pathogens. The percentage of inhibition obtained in the direct confrontation test is greater than that of the indirect confrontation test. The strain of *Fusaium oxysporum* is more sensitive to different strains of *Trichoderma* than *Sclerotnia rolfsii*. The five isolates (TM1, TS1, TG4, TN1 and TU1) with the best antagonistic properties show a significant reduction in the incidence of both diseases after seed treatment and direct soil inoculation in greenhouse. A significant improvement of growth parameters (plant height, collar diameter, shoot and root biomass) compared to inoculated plants with pathogens alone is also observe. These strains could therefore be proposed as a biocontrol agent against fungal pathogens in vegetable crops in Senegal.

.

Key words: *Trichoderma*, pathogenic fungi, tomato, biological control

DEDICACES

Louange à ALLAH, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Que la Paix et le Salut soient sur son Messager Mouhamed, sa famille et ses compagnons.

Je dédie ce travail à :

Mon père qui n'a ménagé aucun effort pour la réussite de ses enfants et qui m'a toujours encouragé dans mes études. Que le tout puissant vous accorde une longue vie et une santé de fer.

Ma très chère mère, ma vie, la meilleure des mamans, toujours présente pour moi et qui a consacré toute sa vie à la réussite de ses enfants. Je ne te remercierai jamais assez. Que Dieu te garde aussi longtemps et t'accorde une santé de fer pour que tu continues à m'accompagner dans toutes mes entreprises. Merci pour l'amour que tu m'as toujours couvert.

Feu ma tante Maimouna Diouf, que dieu ai pitié de son ame et l'acceuil en son paradis.

Mes grands frères Malick et Pape cheikh ainsi qu'à leurs épouses respectives Astou et Mbossé de m'avoir toujours soutenu financièrement et moralement durant tout mon cursus.

Mes sœurs Nabou, Ndèye Coumba, Fatou, Olimata et à leurs maris respectifs.

Mes petits frères Mandoye, Ibou et Alioune Badara. Je vous exhorte à faire mieux que moi.

Mes oncles et tantes, neveux et nièces

Mes cousins et cousines

Tonton Doudou Faye de m'avoir toujours soutenu et conseillé ainsi qu'à toute sa famille

La famille Kouyaté du côté de grand Dakar

Mes amis : Siré, Aly, Saliou, Lamine, Adama, Basse, Amacodou, Kholé, Amdy, Ckeikh, Ansou, Kassé

Toutes les personnes qui m'ont soutenu et conseillé durant mon coursus particulièrement : Aliou Mbobji, Mame Fatou, Mame Birame, Père Malick.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

*A **M. Ibrahima Ndoye**, Je vous exprime ma profonde reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider la commission d'examen de ma soutenance. Vos qualités intellectuelles et humaines imposent le respect et l'admiration. Je vous adresse mes vifs remerciements.*

*A **M. Diégane Diouf**, c'est une fierté et un grand privilège pour moi de bénéficier de votre disponibilité pour avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.*

*A **M. Anicet Manga**, c'est un honneur que vous me faites de vous avoir dans mon jury pour profiter de votre pertinence scientifique. Je vous remercie très sincèrement.*

*A **Mme Mame Arama Fall Ndiaye**, je vous remercie pour l'opportunité que vous m'offrez à profiter de vos compétences avérées pour l'évaluation de ce travail.*

*A **Mme Diénaba Sall Sy**, je vous exprime toute ma gratitude pour m'avoir acceuilli au CDH et participé à l'encadrement de ce travail. Soyez assuré de mon profond respect et recevez toute ma reconnaissance d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon encadreur **M. Tahir Abdoulaye Diop** qui a guidé ce travail malgré ses nombreux engagements. Sa rigueur et sa pertinence scientifique m'ont permis de mener à bien ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité et son sens elevé des relations humaines. Vos conseils et votre soutien moral m'ont été d'une importance capitale pour la réalisation de ce travail. Soyez assuré de ma très haute considération.*

Je remercie tout le personnel du département de botanique et de microbiologie de l'Université d'Acharya Nagajua particulièrement mon supervisuer Dr. Raghuram et ses étudiants: Kranthi, Ravi, Nagaraju, Anil et Jalaja.

Je remercie également tout le personnel du Centre pour le Développement de l'Horticulture (CDH) particulièrement les techniciens Ndour, Thiao Diagne et Pa Cissé.

Je remercie sincérement tous les membres du Laboratoire de Biotechnologies de Champignons (LBC). Merci à Dr Malick Ndiaye, Dr Bathie Sarr et Dr Idy Carras Saré pour avoir pleinement contribué à la correction de ce manuscrit et des articles. Mention spéciale à tous mes collègues : Demba Diaw, Adiouma Dangue, Oubeidillah Youssouf Ali, Assane Diop, Ndéye Fatou Déme, Diégane wade, Baye Mamadou Mbaye et Seydina Oumar Ndiaye.

Tous nos remerciements au PPAAO/WAAPP et au gouvernement indien à travers leur programme CV Raman Fellowship for African Researcher pour le soutien financier de ce travail.

LISTE DES FIGURES

***Figure 1**: Plant de tomate* 6
***Figure 2**: Evolution de la production de tomate au Sénégal entre 2007 et 2016* 7
***Figure 3:** Caractéristiques morphologiques de Fusarium sp.* 16
***Figure 4:** Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par F.oxysporum sp. lycopersici chez la tomate* 20
***Figure 5**: Aspect des hyphes de Sclerotinia rolfsii* 22
***Figure 6:** Cycle de vie de Sclerotinia rolfsii* 24
***Figure 7**: Aspect morphologique d'un conidiophore de Trichoderma* 32
***Figure 8**: Cycle de vie de Trichoderma* 35
***Figure 9**: Sites d'échantillonnage* 43
***Figure 10**: Aspect macroscopique des isolats de Trichoderma* 54
***Figure 11**: Aspect des souches positives* 56
***Figure 12**: Production d'AIA par les souches de Trichoderma* 58
***Figure 13**: Profil RAPD amplifié avec le marqueur OPA 15* 61
***Figure 14**: Dendrogramme montrant la relation entre les Trichoderma basée sur le profil RAPD* 61
***Figure 15**: Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TG4)* 79
***Figure 16**: Effet des pH sur la biomasse mycélienne des Trichoderma (souche TG4)* 79
***Figure 17**: Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TN1)* 79
***Figure 18**: Effet des différentes sources de carbone sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TS1)* 79
***Figure 19**: Confrontation directe entre Trichoderma et souche de Fusarium* 87
***Figure 20**: Confrontation à distance entre Trichoderma et souche de Fusarium* 88
***Figure 21**: Aspect morphologique des isolats de Fusarium : a : aspect du mycélium, b : aspect des microconidies* 92
***Figure 22**: Aspect morphologique de Sclerotinia rolfsii : aspect du mycelium avec les sclerotes* 92
***Figure 23**: Symptômes respectivement de fusariose et de Sclerotiniose observées après ré-inoculation des pathogènes (A : Fusarium oxysporum, B : Sclerotinia rolfsii)* 93
***Figure 24**: Tests d'antagonisme entre isolats de Trichoderma et souches pathogène* 97

***Figure 25**: Effet du traitement des semences par les isolats de Trichoderma sur l'incidence de Fusarium oxysporum (FO1)* *98*
***Figure 26**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur l'incidence de Sclerotinia rolfsii (SR1)* *100*
***Figure 27:** Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur l'incidence de Fusarium oxysporum (FO1)* *101*
***Figure 28**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur l'incidence de Sclerotinia rolfsii (SR1)* *103*
***Figure 29**: Aspect de l'appareil végétatif et racinaire des plants de tomate lors du test sur la virulence de Sclerotinia rolfsi* *104*
***Figure 30:** Aspect de l'appareil végétatif et racinaire des plants de tomate lors du test sur la virulence de Fusarium oxysporum* *104*

LISTE DES TABLEAUX

***Tableau 1**: Composition nutritionnelle pour 100 g de matière fraiche 8*

***Tableau 2**: Principales maladies fongiques, bactériennes et virales de la tomate au Sénégal avec les principaux symptômes 9*

***Tableau 3**: Principaux ravageurs d'importance économique de la tomate au Sénégal..... 12*

***Tableau 4:** Nombre d'isolats de Trichoderma par site..... 52*

***Tableau 5**: Screening de la production d'enzyme par Trichoderma 56*

***Tableau 6**: Quantité d'enzymes produites par les différentes souches de Trichoderma 58*

***Tableau 7**: Numéro des accessions des isolats de Trichoderma dans GENBANK 59*

***Tableau 8:** Liste des primers avec leurs séquences et le pourcentage de polymorphisme..... 60*

***Tableau 9**: Effet du milieu de culture et du temps d'incubation sur la croissance des souches de Trichoderma sp.... 73*

***Tableau 10**: Effet de la température et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des souches de Trichoderma sp. 74*

***Tableau 11**: Effet du pH sur la biomasse mycélienne des souches de Trichoderma sp. 75*

***Tableau 12** : Effet de la salinité sur la croissance mycelienne des Trichoderma (souche TG4) 76*

***Tableau 13**: Effet de la source de carbone et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des Trichoderma sp. 77*

***Tableau 14**: Effet de la source d'azote et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des Trichoderma sp. 78*

***Tableau 15**: Modèle d'évaluation des maladies 91*

***Tableau 16**: Confrontation directe entre Trichoderma et souches pathogènes de Fusarium et de Sclerotinia..... 95*

***Tableau 17**: Confrontation à distance entre souche de Trichoderma et pathogènes 96*

***Tableau 18**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate 99*

***Tableau 19**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate 100*

***Tableau 20**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate 102*

***Tableau 21**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate 103*

LISTE DES SIGLES, ABREVIATIONS ET UNITES INTERNATIONALES

Abréviations courantes :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AIA : Acide Indole 3-Acetique

ALB: Agents de Lutte Biologique

ANOVA: Analysis Of Variance

ANSD : Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie

ARNr: ARN ribosomique

CDH : Centre pour le Développement de l'Horticulture

CO_2: Dioxyde de carbone

DHORT : Direction de l'Horticulture

FAO: Food and Agriculture Organisation

ISRA: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles

ITS: International Transcibed Sequence

LMR : Limites de Tolérance pour les Résidus de pesticides

PADEN : Programme d'Aménagement et de Développement Economique des Niayes

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDA: Patato Dextrose Agar

pH: potential hydrogène

PIP : Programme Initiative Pesticide

PPAAO : Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

UAM: Université Amadou Mahtar Mbow

UCAD: Université Cheikh Anta Diop

UGB: Université Gaston Berger

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV: Ultra-violet

WAAPP: West Africa Agricultural Productivity Program

Produits chimiques

BET: Bromure d'Ethidium

CMS: Carboxymethyle cellulose

CTAB: N-céthyl-N, N, N-triméthyl-ammonium bromide

DNS: Acide 3, 5- dinitrosalicylique

DNTS: Désoxyribonucluoside 5'triphosphate

EDTA: Ethylène-Diamine-tétra-Acétique

HCl: acide chlorhydrique

NaCL: Chlorure de sodium

P-DMAB: P-Dimethyl Amino Benzaldehyde

SDS: Dodécylsulfate de sodium

TAE: Tris Acétate EDTA

TBE: Tris, Borate, EDTA

TE : Tris EDTA

Tris: Tris-hydroxyméthyle-aminoéthane

Unité Internationale

% : Pourcentage

°C : degrés Celsius

ha: Hectare

KDA: Kilo daltone

Kg, g, mg, ng, µg: kilogramme, gramme, milligramme, nanogramme, microgramme

L, l : Longueur, largeur

l, ml, Ul: litre, millilitre, microlitre

m, cm, mm, µm: mètre, centimètre, millimètre, micromètre

m, h : minute, heure

M, mM, µmole: Molaire, millimolaire, micro mole

nm : nanomètre

TABLE DES MATIERES

Introduction générale ***1***

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique ***4***

I. Généralités sur la tomate *4*

I.1 Origine et classification *4*

I.2 Description Botanique *4*

I.2.1 Appareil végétatif *4*

I.2.2 Appareil reproducteur *5*

I.3 Exigences écologiques de la culture de la tomate *6*

I.4 Importance de la tomate *6*

I.4.1 Importance économique *6*

I.4.2 Importance alimentaire et nutritionnelle *7*

I.5 Ennemis de la tomate *8*

II. Généralités sur Fusarium oxysporum de la tomate *15*

II.1 Biologie des champignons du genre Fusarium *15*

II.1.1 Caractéristiques morphologiques *15*

II.1.2 Conservation et source d'inoculum *17*

II.1.3 Pénétration et invasion *17*

II.2 Principaux symptômes de la fusariose *17*

II.2.1 Le flétrissement fusarien classique (Fusarium wilt) *18*

II.2.2 La pourriture des racines et du collet (Fusarium crown and root rot) *18*

III. Généralités sur Sclerotinia rolfsii de la tomate *21*

III.1 Biologie des champignons du genre Sclerotinia *21*

III.1.1 Caractéristiques morphologiques *21*

III.1.2 Conservation et source d'inoculum *22*

III.1.3 Pénétration et invasion *22*

III.2 Principaux symptômes de la sclerotiniose *23*

IV. Méthodes de lutte contre les maladies de la tomate 25
IV.1 Lutte physique 25
IV.2 Lutte culturale 25
IV.3 Lutte chimique 26
IV.4 Lutte génétique 27
IV.5 Lutte biologique 27
V. Généralités sur Trichoderma 28
V.1 Classification 29
V.2 Morphologie 30
V.2.1 Les conidiophores 31
V.2.2 Les phialides 31
V.2.3 Les conidies 31
V.2.4 Les chlamydospores 32
V.3 Ecologie 32
V.4 Cycle de vie de Trichoderma 34
V.5 Aspect de Trichoderma en culture 35
V.5.1 Milieu Patato Dextrose Agar (PDA) 35
V.5.2 Milieu Malt Extract Agar (MEA) 36
V.5.3 Milieu Czapek Dox (Dox) 36
V.5.4 Milieu Sabouraud (SB) 36
V.6 Importance de Trichoderma 36
V.6.1 Pouvoir antagoniste de Trichoderma 36
V.6.2 Compétition 37
V.6.3 Antibiose 37
V.6.4 Mycoparasitisme 38
V.7 Induction de la résistance des plantes 38
V.8 Stimulation de la croissance de la plante 39

Chapitre 2 : Caractérisation morphogénétique et biochimique des isolats des Trichoderma 41

Introduction 41

I. Matériel et Méthodes 42

I.1 Isolement des Trichoderma 42

I.1.1 Présentation du site d'échantillonnage 42

I.1.2 Echantillonnage 43

I.1.3 Technique d'isolement 44

I.1.4 Caractérisation morphologique des Trichoderma 44

I.1.4.1 Caractéristiques macroscopiques 44

I.1.4.2 Caractéristiques microscopiques 45

I.1.5 Conservation des souches de Trichoderma 45

I.2 Caractérisation biochimique des souches de Trichoderma 45

I.2.1 Criblage des souches productrices d'enzymes 45

I.2.1.1 Pectinase 45

I.2.1.2 Chitinase 46

I.2.1.3 Cellulase 46

I.2.1.4 Protéase 46

I.2.2 Estimation de la production des différentes enzymes 46

I.2.2.1 Estimation de la production de pectinase 47

I.2.2.2 Estimation de la production de chitinase 47

I.2.2.3 Estimation production de cellulase 47

I.2.2.4 Estimation production de protéase. 48

I.2.3 Screening et estimation de la production d'AIA 48

I.3 Caractérisation moléculaire des souches de Trichoderma 49

I.3.1 Extraction de l'ADN génomique des isolats fongiques 49

I.3.2 Amplification PCR du gène de l'ARNr 18s 49

I.3.3 Vérification des produits PCR sur gel d'agarose *50*

I.3.4 Purification du produit PCR sur gel d'agarose *50*

I.3.5 Séquençage du produit purifié et identification des souches *51*

I.3.6 Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD) *51*

I.3.6.1 Optimisation de la réaction en chaîne de la polymérase *51*

I.3.6.2 Sélection des marqueurs *52*

I.3.6.3 Notation des bandes et analyse des données *52*

II. Résultats *52*

II.1 Identification des Trichoderma *52*

II.1.1 Caractérisation morphologique *53*

II.1.2 Screening production d'enzyme *55*

II.1.3 Estimation de la production d'enzyme *57*

II.1.4 Screening et production d'AIA par les isolats de Trichoderma *58*

II.1.5 Caractérisation moléculaire des isolats de Trichoderma *59*

II.1.5.1 Séquençage des régions ITS1 et ITS4 ..... *59*

II.1.5.2 Analyse de la diversité génétique des souches sélectionnées (RAPD) *59*

III. Discussion *62*

III.1 Caractérisation morphologique *62*

III.2 Caractérisation biochimique *63*

III.3 Caractérisation moléculaire des isolats de Trichoderma *66*

Conclusion *68*

Chapitre 3 : Influence in vitro de divers facteurs abiotiques (milieux de culture, T°, pH, salinité, source de carbone et d'azote) sur la croissance mycélienne des isolats de Trichoderma sp. ***69***

Introduction *69*

I. Matériels et Méthodes *70*

I.1 Matériel fongique *70*

I.2 Effet des milieux de culture *70*

I.3 Effet de la température d'incubation 70

I.4 Effet du pH 71

I.5 Effet du NaCl 71

I.6 Effet de la source de carbone 71

I.7 Effet de la source d'azote 71

I.8 Paramètres mesurés 72

I.9 Analyse statistique 72

II. Résultats 72

II.1 Effet des milieux de culture 72

II.2 Effet de la température d'incubation 73

II.3 Effet du pH 74

II.4 Effet de la salinité 75

II.5 Effet de la source de carbone 76

II.6 Effet de la source d'azote 77

III. Discussion 80

Conclusion 83

Chapitre 4 : Evaluation de l'activité antagoniste des isolats de Trichoderma sur deux agents pathogènes de la tomate : Fusarium oxysporum et Sclerotinia rolfsii 84

Introduction 84

I. Matériel et méthodes 85

I.1 Isolement et identification des souches pathogènes (Fusarium et Sclerotinia) 85

I.1.1 Prélèvement des échantillons 85

I.1.2 Isolement et purification des pathogènes 85

I.1.3 Identification des pathogènes 85

I.1.4 Conservation des isolats 86

I.2 Vérification du pouvoir pathogène des souches de Fusarium et de Sclerotinia 86

I.2.1 Matériel végétal 86

I.2.2 Inoculation des plantules 86

I.2.3 Ré-isolement des agents pathogènes 86

I.3 Etude in vitro des propriétés antagonistes des Trichoderma sur Fusarium oxysporum et Sclerotinia rolfsii 87

I.3.1 Tests de confrontation directe 87

I.3.2 Tests de confrontation indirecte (confrontation à distance) 87

I.3.3 Paramètres mesurés 88

I.4 Effet des souches de Trichoderma sur la virulence de Fusarium oxysporum et Sclerotinia Rolfsii sur culture de tomate en serre 88

I.4.1 Traitement des semences 89

I.4.1.1 Production des inocula 89

I.4.1.2 Inoculation et semis 89

I.4.2 Traitement du sol 89

I.4.2.1 Production des inocula 89

I.4.2.2 Inoculation et repiquage 90

I.4.3 Dispositif expérimental 90

I.4.4 Paramètres mesurés 90

I.5 Analyse statistique 91

II. Résultats 91

II.1 Isolement des pathogènes 91

II.1.1 Aspects morphologiques des souches de Fusarium oxysporum 91

II.1.2 Aspects morphologiques des isolats de Sclerotinia rolfsii 92

II.2 Vérification du pouvoir pathogène des souches de Fusarium et de Sclerotinia 93

II.3 Etudes in vitro des propriétés antagonistes 94

II.3.1 Tests de confrontation directe 94

II.3.2 Tests de confrontation indirecte (distance) 95

II.4 Effet des Trichoderma sur la virulence des champignons pathogènes en serre 98

II.4.1 Traitement des semences 98

II.4.1.1 Effets des isolats de Trichoderma sur la virulence Fusarium oxysporum 98

II.4.1.2 Effets des isolats de Trichoderma sur la virulence Sclerotinia rolfsii 99

II.4.2 Traitement du sol..... 101

II.4.2.1 Effet des isolats de Trichoderma sur la virulence de Fusarium oxysporum 101

II.4.2.2 Effets des isolats de Trichoderma sur la virulence Sclerotinia rolfsii 102

III. Discussion 105

III.1 Etudes in vitro des propriétés antagonistes..... 105

III.2 Effet in vivo des Trichoderma sur la virulence des pathogènes (Fusarium oxysporum et Sclerotinia rolfsii)..... 107

Conclusion..... 109

Conclusion générale et perspectives 110

Références bibliographiques..... 112

Annexes..... i

Annexe 1 : Rapport MACROGEN sur la caractérisation moléculaire des isolats i

Annexe 2 : Composition des milieux de culture ix

Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique..... xi

Annexe 3 : Profils RAPD des 5 marqueurs polymorphes xiii

Annexe 4 : Articles publiés..... xiv

Annexes 5 : Communications affichées..... xvii

Poster, 3eme journée du LAPSE, 1-2 Avril 2015, UCAD2, Dakar, Sénégal. xvii

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Au Sénégal, l'horticulture joue un rôle important dans la sécurité alimentaire, la lutte contre la malnutrition et la pauvreté, ainsi que dans l'équilibre de la balance commerciale. Les politiques horticoles fixent comme objectif l'autosuffisance du Sénégal en produits horticoles de grande consommation particulièrement en Pomme de terre, Oignon, Carotte et Tomate mais également la nécessité de dégager des surplus exportables en fruits et légumes afin d'améliorer la balance commerciale du secteur agricole (DHORT, 2013)**.** La zone des Niayes, constitue aujourd'hui la principale zone de production horticole du pays, malgré la part très importante de la vallée du fleuve Sénégal, des régions de Thiès, Tambacounda, Kolda et Ziguinchor. En effet, la zone des Niayes compte pour environ 60 % de la production maraîchère nationale et 50 % des exportations horticoles (PADEN, 2013). La production de légumes bien que très importante pendant la contre-saison est insuffisante pendant l'hivernage où des situations de pénurie sont constatées dans les principaux marchés de légumes.

Parmi les principaux légumes consommés au Sénégal, la tomate occupe la deuxième position après l'oignon (ANSD, 2015; DHORT, 2014; Camara *et al*., 2013). Au niveau mondial, la tomate est aussi le deuxième légume le plus consommé après la pomme de terre (Planetoscope, 2012; Ladet et Leveillé, 2013). Elle joue aussi un rôle socio-économique important tant par les devises qu'elle génère, que par l'opportunité d'emplois qu'elle procure.

Cependant cette filière est aujourd'hui très menacée. La production locale ne couvre pas l'intégralité de la demande du fait de plusieurs contraintes dont la mauvaise qualité des semences utilisées, la pauvreté des sols due à la surexploitation et à la pollution de la nappe phréatique, le manque d'eau et l'inaccessibilité des producteurs aux engrais organiques (PADEN, 2013). A cela s'ajoute les nombreux problèmes liés à la pression parasitaire (Camara *et al*., 2013; Diarra *et al*., 2010; Huat, 2006) et particulièrement à l'accroissement des maladies fongiques qui impactent négativement les rendements.

Parmi les principales maladies fongiques d'importances économiques de la tomate rencontrées au Sénégal figure la fusariose et la sclérotiniose (PIP, 2014). La tomate est sujette à deux maladies fusariennes: le flétrissement fusarien classique (fusarium wilt) causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder et Hansen) et la pourriture des racines et du collet (Fusarium crown and root rot) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis et Shoemaker (Katan *et al.*, 1997) qui sont parmi les maladies les plus dévastatrices de la tomate dans le monde (Hanaa *et al*., 2011; Haas et Défago, 2005). La sclérotiniose de la tomate due à *Sclerotinia rolfsii* Sacc. (*Athela rolfsii*) peut entrainer la fonte des semis et la pourriture des

racines et du collet (Abada, 2003) avec des pertes économiques très importantes pouvant aller jusqu'à 50% dans certains cas (Fidah, 1995; Ezzahiri, 2000).

Ces maladies sont complexes et difficiles à combattre parce que souvent initiées par des blessures qui facilitent l'entrée et la progression des champignons pathogènes (Caron *et al*., 2006). Cette situation conduit à une utilisation abusive des pesticides de synthèse par les agriculteurs avec des effets néfastes sur l'environnement et les microorganismes utiles. La quantité de pesticide et de composés organiques est estimée à environ 3 millions de tonnes par an dans le monde pour lutter contre les agents phytopathogènes dans de nombreux pays (Monirul Islam, 2016). Ces produits chimiques entrainent une pollution des eaux de surfaces et souterraines, soit directement par infiltration des eaux de pluies et d'arrosage ou bien indirectement par ruissellement et lessivage des sols contenant les résidus de pesticide. Au Sénégal, par exemple dans la zone périurbaine des Niayes, les concentrations de résidus mesurées dans la nappe phréatique dépassent les normes de potabilité de l'eau (Cissé *et al*., 2003). Ce même phénomène a été observé dans d'autres pays comme la Côte d'Ivoire où une contamination de l'eau souterraine par les pesticides organophosphorés a été démontrée dans les régions agricoles où sont cultivées le cacao, le café, la banane et les légumes (Traoré *et al*., 2006). Un autre phénomène accroissant la contamination de l'espace rural par les pesticides est lié à la création des conditions favorables au développement de la résistance des ennemis (insecte, bactéries, champignons) et la destruction des organismes utiles (Harman, 1992). L'utilisation abusive des pesticides a aussi de nombreuses conséquences sur la santé humaine. Ainsi, il a été observé après l'application des pesticides, des cas d'irritation de la peau, des céphalées, un rhume, des bouffées de chaleur ou des vertiges (Ahouangninou *et al*., 2011). Il a été également constaté un lien entre la présence de produits chimiques « perturbateurs endocriniens » et un taux accru de cancers du sein, de la prostate, des testicules, de malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin et de réductions du nombre de spermatozoïdes (Hielman, 1994). Certaines pratiques telles que le non-respect des dosages recommandés et des délais avant récolte constituent également des facteurs de risque pour le consommateur qui sont souvent à l'origine de nombreux cas d'intoxication alimentaire.

Ainsi, dans un contexte où les attentes sociétales sur la durabilité des systèmes agricoles sont de plus en plus fortes et face aux nombreux problèmes liés à l'usage des pesticides, il est nécessaire de trouver de nouvelles méthodes de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement. Dans ce cadre, la lutte biologique à l'aide des agents de bio-contrôle pourrait offrir des opportunités à développer et à privilégier pour limiter l'impact des fongicides sur l'environnement, la qualité de l'eau et la biodiversité. Les techniques de lutte biologique

reposant sur l'exploitation des potentialités antagonistes des microorganismes pourraient devenir une alternative réelle et respectueuse de l'environnement pour la lutte contre les maladies fongiques des plantes (Eziashi *et al*., 2007; Shalini et Kotasthane, 2007). Parmi les champignons antagonistes qui ont démontré un bon potentiel de lutte biologique figure les, *Trichoderma spp.* (Elad *et al.,* 1982; Harman, 2000). Les espèces de *Trichoderma* ont été utilisées dans la lutte biologique contre différents champignons pathogènes qui causent d'importants dégâts dans les cultures fruitières, légumières, serricoles et ornementales tels que *Phytophthora palmivora* (Kebe *et al.,* 2009*)*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici, Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum et Verticillium dahliae* (Caron *et al*., 2002). Bien que plusieurs bio fongicides à base de formulations de *Trichoderma* aient été commercialisés au cours des décennies, il existe toujours un besoin immense de découvrir des espèces de *Trichoderma* présentant des activités antimicrobiennes potentielles contre un large éventail d'agents pathogènes. Notre étude s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif général d'évaluer les potentialités antagonistes des souches de *Trichoderma* isolées à partir de différents sites de la zone des Niayes sur deux agents pathogènes de la tomate: *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*. Les objectifs spécifiques suivants ont été fixés:

- Caractériser les souches de *Trichoderma* indigènes ;
- Evaluer l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*;
- Déterminer l'activité antagoniste des *Trichoderma* sur *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*.

Ce mémoire comprend quatre chapitres :

Le chapitre 1 est consacré à la synthése bibliographique et traite des généralités sur: la tomate, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia rofsii* et *Trichoderma*. Le Chapitre 2 est conscaré à l'isolement des souches de *Trichoderma*, leur caractérisation morphologique et biochimique ainsi qu'à l'étude de la diversité génétique des souches sélectionnées. Le chapitre 3 présente l'effet des différents facteurs abiotiques affectant la croissance mycelienne des *Trichoderma*. Et le chapitre 4 est consacré à l'étude des potentialités antagonistes des *Trichoderma* contre les deux agents pathogènes de la tomate: *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*. Ces quatres chapitres sont précédés d'une introduction générale et suivis d'une conclusion générale et des références bibliographiques.

CHAPITRE 1 :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la tomate

I.1 Origine et classification

Etymologiquement, le mot tomate est une déformation du mot Inca Tomatl. Le mot *Lycopersicum* signifiant « Peche de loup » (de *lucos* : loup, et *persica* : pêche) en latin est une appellation peu alléchante à laquelle on a ajouté l'adjectif *esculentum* au 18^{e} siècle à cause des propriétés gustatives de ce légume fruit.

Originaire des régions andines côtières du Nord-Ouest de l'Amérique (Colombie, Chili, Equateurs, Perou), la tomate fut domestiquée au Mexique puis introduite en Europe en 1544. Ensuite, sa culture s'est propagée en Asie du Sud et de l'Est, en Afrique et en Moyen Orient (Naika *et al*., 2005). En 1753, Linné donna à la tomate le nom scientifique «*Solanum lycopersicum»* et proposa la classification suivante :

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Trachiobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Solanales
- Famille : Solanaceae
- Genre : Solanum
- Espèce : *Solanum lycopersicum*

I.2 Description Botanique

La tomate est une plante vivace, cultivée comme annuelle et classée parmi les légumes fruits. Elle présente un appareil végétatif différencié en racine, tige, feuille et un appareil reproducteur constitué de fleurs et de fruits (Figure 1).

I.2.1 Appareil végétatif

Vigoureuse et ramifiée comme chez les autres solanacées, la tige de la tomate est naturellement rampante si elle n'est pas soutenue avec un tuteur (Messiaen, 1989). La tige est pubescente ou glabre, avec une taille pouvant varier de 4 cm à 5 m selon les variétés. La tige est aussi pleine, fortement poilue et glandulaire (Naika *et al.*, 2005). Les poils glanduleux sont couronnés par

quatre cellules contenant la solanine, une huile essentielle qui répand une odeur caractéristique lorsqu'on froisse la plante (Chibane, 1999). Les poils portés par les tiges sont glanduleux ou simples et contiennent une huile essentielle qui donne son odeur caractéristique à la plante (Kolev, 1976)

La tomate présente un système racinaire pivotant avec une forte racine principale pouvant atteindre 25 à 35 cm et ramifiée en plusieurs racines latérales et adventives (Van Der Vossen *et al.*, 2004).

Les feuilles de la tomate sont composées, imparipennées et velues, indispensables à la photosynthèse avec des folioles ovées à oblongues un peu dentées (Blancard, 2009). Après la mise en place des feuilles cotylédonaires de forme ovales et foliacées, la plante produit 7 à 14 feuilles avant de développer sa première inflorescence.

I.2.2 Appareil reproducteur

Chez la tomate, la fleur est hermaphrodite et la fécondation verticale est plus récurrente. Les abeilles et bourdons constituent les pollinisateurs principaux en cas de fécondation horizontale (Naika *et al.,* 2005). La fleur de la tomate est en général constituée de 5 pétales au moins. Les fleurs sont de couleurs jaunâtres et regroupées en grappes florales. Elles sont actinomorphes et à symétrie pentamère (Duffé, 2003). Les fleurs de la tomate sont composées de 5 à 8 sépales qui constituent le calice et 5 à 8 pétales qui forment la corolle et un ovaire supère comprenant 2 à 10 carpelles (Blancard *et al*., 2009; Padapoulous, 1991). Les fleurs s'ouvrent par des fentes intenses et tombent directement sur le stigmate qui généralement n'émerge pas du cône staminal (Messiaen, 1989).

Le fruit de la tomate est une baie de formes variées (globulaire, ronde, aplatie) et de couleur verte lorsqu'il n'est pas encore mûr et contient deux ou plusieurs loges. La couleur et la forme du fruit de la tomate varie en fonction de la variété utilisée (Blancard, 2009). Le fruit mûr est ferme et pèse jusqu'à un kg. Cette fermeté décroit fortement de par l'activité de la polygalacturonase (Costa *et al.*, 2010).

A maturité chaque fruit contient un nombre important de graines pouvant varier entre 80 et 500 (Chaux et Foury, 1994). Les graines sont recouvertes d'un mucilage qui présente à maturité un albumen et un embryon à germination épigée. Pour sa culture, la tomate exige certaines conditions écologiques.

***Figure 1**: Plant de tomate*

I.3 Exigences écologiques de la culture de la tomate

La tomate est une plante qui s'adapte à une gamme plus ou moins large de sols ayant une bonne capacité de rétention en eau et bien aérés. Toutefois, les meilleurs résultats sont obtenus avec des sols à texture sablo-limoneuse riches en humus gages d'une bonne structure. La culture tolère un pH acide à très légèrement acide mais préfère un pH compris entre 5,5 et 7,5 avec un optimum de 6,5 (Jean, 1997 in Camara, 2012).

L'intensité de la lumière affecte la couleur des feuilles et des fruits (Naika *et al*., 2005). Les fortes et faibles intensités lumineuses réduisent la taille des fruits. L'optimum de la température moyenne quotidienne pour la croissance est de 18 à 25°C avec des températures nocturnes entre 10 et 20 ºC. Les grands écarts entre les températures diurnes et nocturnes affectent négativement le rendement.

Pour les mêmes variétés, la taille des fruits en hivernage est plus réduite qu'en saison sèche. Les besoins en eau de la culture sont en fonction du stade de développement de la plante, de l'ensoleillement et du type de sol (Camara, 2012). La tomate présente plusieurs avantages.

I.4 Importance de la tomate

I.4.1 Importance économique

L'importance de sa production fait de la tomate le premier produit horticole dans le monde. En 2016, la production mondiale de la tomate a été estimée à 177, 04 millions de tonnes avec un rendement moyen de 37,01 tonnes/hectare (FAOSTAT, 2018). La Chine, l'Inde, les Etats Unis et la Turquie sont les plus grands producteurs de tomate dans le monde avec environ 70% de la production mondiale (www.hortibiz.com). La contribution de l'Afrique à la production mondiale a été évaluée à 19,79 millions de tonnes avec l'Egypte et le Maroc qui concentrent

l'essentiel de cette production. Au Sénégal, la production en 2016 a été estimée à 162700 tonnes (FAOSTAT, 2018). Les échanges de tomate représentent plus de 17% du commerce mondial de fruits et légumes frais. En effet, environ 4 millions de tonnes de tomates sont respectivement importées et exportées dans le monde chaque année (Desmas, 2005). La tomate est le légume le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. Compte tenu de son importance économique, elle est l'objet de nombreuses recherches scientifiques et est donc considérée comme une plante modèle en génétique. La tomate compte parmi les légumes les plus consommés au Sénégal. Elle est cultivée dans presque toutes les régions du Sénégal. Les Niayes, la Vallée du Fleuve Sénégal et la Falémé sont les plus grandes zones de culture (Badiate, 2013). Cette culture se caractérise par une forte variabilité du rendement et des productions selon les années (Figure 2), les exploitations et les zones. Environ 160 000 tonnes de tomate fraiche ont été produites durant la campagne agricole de 2013 avec un volume d'exportation égal à 9 934 tonnes (CDH, 2015). Elle occupe le deuxième rang des cultures horticoles après l'oignon avec environ 20% du total des surfaces horticoles du Sénégal et joue un rôle socio-économique important tant par les devises qu'elle génère, que par l'opportunité d'emplois qu'elle procure. La tomate joue aussi un rôle important dans l'alimentation et la nutrition humaine.

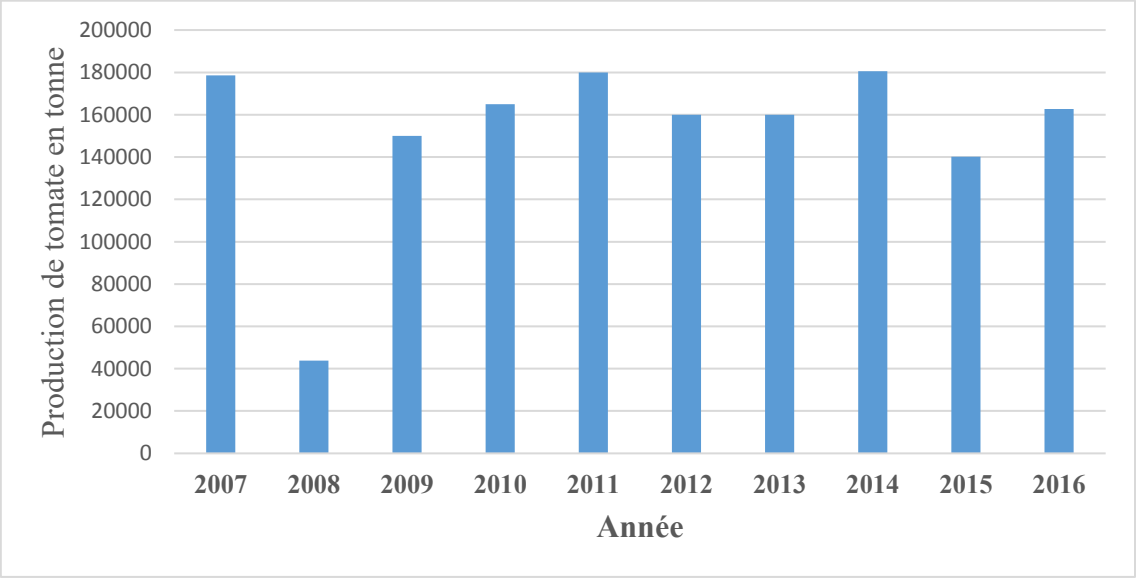


***Figure 2**: Evolution de la production de tomate au Sénégal entre 2007 et 2016 (FAOSTAT, 2018)*

I.4.2 Importance alimentaire et nutritionnelle

La tomate consommée, joue un rôle important dans l'alimentation humaine. Elle est un des légumes les plus nutritifs à cause de sa richesse en vitamines (B, C, A, E), en sels minéraux (potassium, chlore, phosphore), en acide aminés essentiels, en sucre et en fibres alimentaires

(Bernard, 2009). Les sels minéraux sont composés pour la moitié en potassium (235 mg pour 100 g de matière fraiche). La teneur en vitamine C de la tomate fraiche est comprise entre 10 à 30 mg/100 g (Ranc, 2010). A maturité, la tomate contient aussi plusieurs pigments de la famille des caroténoïdes dont les bêta-carotènes. En plus de son utilisation dans l'alimentation, la tomate a de nombreuses applications médicinales. Grace à la présence de la chlorine, la chair de la tomate permet de mieux filtrer les déchets émis dans l'organisme (Costa *et al.*, 2010). Ainsi, elle joue un rôle antitoxique important pour le foie. Cependant l'application médicale de l'usage de la tomate la plus importante et qui fait l'objet de nombreuses recherches est l'intervention des pigments caroténoïdes antioxydants plus particulièrement le lycopène dans la prévention du cancer (Di Mascio *et al*., 1989). Elle jouerait également un rôle de prévention contre les maladies cardiovasculaires. La composition de la tomate est représentée dans le tableau 1.

***Tableau 1**: Composition nutritionnelle pour 100 g de matière fraiche (CDH, 2015)*

Composition pour 100 g	
Calories	19 Kcal
Glucides	3,5 g
Proteines	0,8 g
Fibres	1,2 g
Carotènes	600 µg
Lipides	0,3g
Vitamines C	18 mg
Potassium	226 mg

I.5 Ennemis de la tomate

La tomate est une plante très sensible et peut être attaquée par divers ravageurs (insectes, acariens, nématodes) et microorganismes pathogènes (champignons, bactéries, virus) (Tableaux 2 et 3). Les ravageurs et les maladies de la tomate sont souvent communs à d'autres espèces de solanacées cultivées, comme l'aubergine et la pomme de terre.

***Tableau 2**: Principales maladies fongiques, bactériennes et virales de la tomate au Sénégal (PIP, 2014 ; CDH, 2015) avec les principaux symptômes décrits Blancard, (2013).*

Maladies	**Responsable**	**Symptômes**	**Stade sensible**
Alternariose	*Alternaria solani, Alternaria tomatophila*	Des taches noires, circulaires, nécrotiques de 4 à 7 mm de diamètre, apparaissent sur les feuilles et s'agrandissent en cercles concentriques. Sur les tiges, les taches sont brunes ou grises, concentriques et elliptiques. Ces lésions peuvent entraîner, à la longue, la défoliation des plants. Les pétioles peuvent également être attaqués. Cette maladie peut affecter sérieusement la récolte en diminuant la surface foliaire active de la culture.	Pépinière et floraison - récolte
Anthracnose	*Collethotricum coccodes*	On note une apparition de petites taches rondes plus ou moins circulaires avec un centre noir sur les fruits murs. Lorsque ces tâches s'étendent, leur centre prend une couleur sombre ou développe des anneaux concentriques mouchetés produisant des spores.	Fructification - récolte
Fusariose	*Fusarium oxysporum f. sp. radiscis lycopersici, Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.	Un jaunissement des feuilles, un flétrissement se propageant à partir de la base de la tige et apparition de racines avortées au bas de la tige est observé. Un brunissement des racines, de leur cylindre central et des vaisseaux situés au niveau du pivot et du collet est aussi noté. Les feuilles hautes se fanent avant les feuilles basses avec une décoloration jaune où dorée.	Tous les stades
Blanc où Oïdium	*Leveillula taurica*	L'apparition de taches jaunes sur la partie supérieure des feuilles correspondant à la mise en place d'une colonie fongique sur la face inférieure des feuilles. Les taches jaunes peuvent coalescer et devenir brunes.	Repiquage - récolte

Mildiou	*Phytophthora infestant*	Lésions humides qui s'étendent rapidement pour former des tâches irrégulières de couleur noire et verdâtre similaires aux lésions causées par le gel. Des lésions duveteuses et blanchâtres sont visibles souvent sur la face inférieure des feuilles.	Repiquage - récolte
Verticilliose	*Verticillium albo-atrum, Verticillium dahlia*	Jaunissement en forme de V des feuilles de bas en haut suivi d'un flétrissement avec un léger brunissement des vaisseaux. Les symptômes se répandent sur l'ensemble des feuilles de la plante.	Tous les stades
Rhizoctoniose	*Rhizoctonia solani*	Pourritures racinaires des tiges et des fruits en contact avec le sol sont visibles lorsque la tomate est attaquée.	Période de récolte
Cladosporiose	*Fulvia fulva*	Tâches jaunes sur le dessus des feuilles et des spores de couleur chamois sur la face inférieure.	Maturation - récolte
Stemphiliose	*Stemphylium solani*	Sur le feuillage apparaissent des petites taches brun-rouge, parfois grises, rondes ou anguleuses (2-4 mm) qui peuvent confluer entre elles. Les vieilles feuilles sont d'abord attaquées mais l'infection s'etend rapidement aux jeunes feuilles. La défoliation peut devenir très grave en condition chaudes et humides (optimum 25°C)	Floraison
Sclérotiniose	*Sclerotium rolfsii*	Développement de lésions humides sur les feuilles situées au contact du sol. La pourriture s'installe et atteint progressivement le collet, certaines racines et la base des pétioles. Les tissus affectés brunissent plus ou moins intensément; des flétrissements, des jaunissements de feuilles ainsi qu'un effondrement des plantes suivi de leur décomposition progressive. Présence de structures particulières sur ou dans les tissus altérés.	Fructification à la récolte

Pourriture blanche	*Pythium aphanidermatum*	Pourriture du collet des jeunes plantes en pépinière, surtout pendant la période chaude et humide. Cette maladie est favorisée par un semis trop dense, des arrosages trop abondants et des températures élevées.	Pépinière
Flétrissement bactérien	*Ralstonia solanacearum*	La maladie se manifeste par un flétrissement des jeunes feuilles à un flétrissement généralisé de la plante. Lorsque les conditions sont favorables, la maladie peut atteindre un stade très avancé, 2 à 3 jours après l'apparition des premiers symptômes.	Tous les stades
Galle bactérienne	*Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria*	De toutes petites taches noires sont visibles sur les feuilles, entourées d'un halo de couleur jaune. Tout comme la tâche bactérienne et le chancre bactérien, les symptômes sont caractéristiques. Les mouchetures sont beaucoup plus petites que les lésions causées par la tâche bactérienne. Elles ne pénètrent pas profondément dans la peau du fruit et peuvent être ôtées par simple grattement.	Tous les stades
TYLCV	*Yellow Leaf Curl Virus*	Pourriture du collet des jeunes plantes en pépinière, surtout pendant la période chaude et humide. Les plantes ont une croissance ralentie et prennent un aspect chétif et buissonnant. La forme et/ou la coloration des folioles est altérée. Elles s'incurvent progressivement vers le haut, conférant au limbe l'apparence d'une cuillère. De plus, le limbe a tendance à durcir et parfois à prendre une coloration violacée notamment au niveau des nervures en relief sous les folioles. Dans le cas d'infections précoces, elles restent naines et ne produisent pas de fruits.	Tous les stades

***Tableau 3**: Principaux ravageurs d'importance économique de la tomate au Sénégal (PIP, 2014 ; CDH, 2015) avec les principaux symptômes décrits par Blancard, (2013)*

Ravageurs	Symptômes	Stade sensible
Bemisia tabaci (mouche blanche)	Présence de piquetures rougeâtres sur la face supérieure des feuilles, croissance ralentie des plantes, développement de fumagine sur les organes aériens, jaunissement et nécrose du limbe. La mouche blanche est vectrice de plus d'une vingtaine de virus sur cultures légumières (essentiellement les adultes).	Pépinière – Début plantation
Myzus persicae (pucerons verts)	Provoque un retard de développement de la plante suite à un prélèvement de la sève et l'injection de toxines dans les plantes (réactions allergiques). Les colonies sécrètent un miellat qui favorise l'installation de fumagine qui freine la photosynthèse des parties recouvertes. Il est aussi vecteur de virus et peut transmettre au moins 100 virus différents.	Pépinière – Début plantation
Lyriomyza trifolii (mouche mineuse)	Présence de minuscules ponctuations jaunâtres et de nombreuses galeries sinueuses sur les feuilles, celles-ci se dessèchent ultérieurement. Plus leurs tailles augmentent, plus les larves causent des dégâts importants en ne laissant derrière elles que les nervures des feuilles. Les chenilles plus âgées s'attaquent aux fleurs, aux fruits et aux zones de croissance des plantes. Les fruits ou les tiges peuvent être perforés.	Pépinière – Début plantation
Helicoverpa armigera (noctuelle – chenilles)	Les fruits sont troués, les feuilles rongées, les bouquets floraux coupés. Les fruits piqués à l'état jeune tombent généralement. Les autres pourrissent sur les plantes ou sont déformés.	Nouaison à la récolte

Aculops lycopersici (acariose bronzée)	Provoquent un dessèchement prématuré et assez rapides des plantes. Leurs piqures entrainent le noircissement et la mort des cellules épidermiques. Ce qui donne à la face inférieure des feuilles et aux tiges un aspect brillant, huileux et une coloration bronzée. Finalement, les folioles durcissent, brunissent, se nécrosent et toute la plante sèche.	Nouaison à la récolte
Tetranychus spp. (tétranyques)	De minuscules taches chlorotiques plus ou moins dispersées apparaissent sur et sous le limbe des folioles de tomate. Ce dernier jaunit progressivement et prend une teinte terne. De telles taches sont aussi visibles sur la tige et les pétioles, mais aussi sur certains fruits. Lors d'attaques sévères, certaines feuilles peuvent jaunir flétrir et se dessécher. La croissance des plantes peut être plus ou moins bloquée. De délicates toiles soyeuses sont visibles au sein du couvert végétal sur les apex dont la croissance peut être bloquée sur les feuilles et les fruits.	Nouaison la récolte
Tuta absoluta	Présence des mines et de taches blanchâtres irrégulières devenant progressivement brunes et nécrotiques. L'épiderme reste intact mais les tissus du mésophylle sont affectés. Les feuilles fortement parasitées peuvent se nécroser entièrement. Les fruits verts comme mûrs sont parasités et deviennent plus ou moins parsemés de galeries et de trous de sortie. Ces derniers permettent parfois à des envahisseurs secondaires de provoquer diverses pourritures. Des galeries peuvent apparaître sur les jeunes tiges perturbant le développement des plantes.	Tous les stades
Meloidogyne spp.	Provoquent la formation de galles sur les racines des plantes. Ces gonflements irréguliers, souvent de forme globulaire sont dus à l'hypertrophie des cellules des racines provoquées par les sécrétions enzymatiques du stylet des larves de nématodes.	

(Nématodes à galles)	Les racines principales sont déformées. Ensuite on observe une croissance ralentie, un feuillage réduit et chlorotique, une diminution de la taille des fruits et de la production. La mort de la plante peut s'ensuivre en cas d'attaque sévère.	Pépinière transplantation
Oiseaux (dégâts d'oiseaux)	Au cours de leur alimentation, les nombreux coups de bec occasionnent des lésions plus ou moins profondes dans les fruits. Ces lésions constituent des portes d'entrée pour de nombreux micro-organismes et notamment diverses moisissures qui pourront les coloniser et entraîner des foyers de pourriture. Les dégâts d'oiseaux sont parfois considérables dans les zones de production où ils pullulent.	Période de récolte

II. Généralités sur *Fusarium* o*xysporum* de la tomate

Le nom *Fusarium* vient du latin fusus à cause de la forme en fuseau de ses spores. De nombreux travaux ont été consacrés à la taxonomie du genre *Fusarium* depuis sa description par Link en 1809 et la délimitation en son état actuelle par Appel et Wollenweber en 1910 (Booth, 1984). Le genre *Fusarium* regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes. L'espèce *Fusarium oxysporum* se distingue des autres espèces par la production abondante de microconidies, rassemblées en fausse tète à partir de monophialides courtes. Plus de 120 formes spécialisées ont été décrites chez *Fusarium oxysporum* (Armstrong et Armstrong, 1981). De plus d'autres espèces sont capables de se développer sur les tissus végétaux secondaires en tant que pathogènes secondaires. La taxonomie du genre *Fusarium* est la suivante (Booth, 1971):

- Règne : fungi
- Division : Ascomycota
- Classe : Ascomycetes
- Sous classe : Sordariomycetes
- Ordre : Hypocreales
- Famille : Nectriaceae
- Genre : *Fusarium*

II.1 Biologie des champignons du genre *Fusarium*

II.1.1 Caractéristiques morphologiques

L'aspect morphologique des *Fusarium* est apprécié à partir des caractéristiques microscopiques et macroscopiques. Les champignons du genre *Fusarium* présentent un mycélium septé et incolore. Sur milieu de culture, les *Fusarium* présentent un mycélium duveteux ou cotonneux de couleur variable selon les espèces: blanche, jaune, orange, rouge, violette. Si les sporodochiums (amas de conidiophores provenant d´un stroma ou masse d´hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra de couleur crème ou orange (Smith *et al.,* 1988).

Les cellules conidiogènes se forment sur des hyphes aériens ou sur des conidiophores courts et densément branchés. Les conidies produites par *Fusarium* sont de trois types: les macroconidies, les microconidies et les blastoconidies (Figure 3).

Les microconidies peuvent être de différentes formes: ellipsoides, ovoides subphériques, pyriformes, claviformes ou allantoidiennes. Elles sont généralement unicellulaires et présentent une base arrondie ou tronquée. Elles sont produites en séries basipétales sur des mono ou

polyphialides et accumulées en petites têtes ou en chaines. Elles présentent 0 à 2 septa agglomérés en fausses têtes par de petits phialides (5-12 x 2,2-3,5Um) (Tivoli, 1988). C'est aussi le type de spore qui est observé plus fréquemment à l´intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d´une virgule ou sont ellipsoïdales (Agrios, 2005; Nelson *et al.,* 1983).

Les macroconidies falciformes avec plusieurs septas transverses, une extrémité apicale crochue et une base pédicellée sont produites en basipétale (croissance à partir de la base) par les monophialides et les sporodochia (agrégats de conidiophore) sont légèrement arquées, présentant 3 à 4 septa. La cellule basale pédicellée et la cellule apicale en crochet sont produites par des phialides sur des conidiophores ramifiés ou en sporocochine (27-46 x 3-4,5 Um) (Mesiaen et Cassini, 1968). Ces spores peuvent être observées dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été tuées par le pathogène (Agrios, 2005; Nelson *et al.,* 1983).

Les chlamydospores sont hyalins, lisses ou rugueuses, terminales ou intercalaires (5-15 µm de diamètre) (Komi, 1993). Les chlamydospores sont des organes de conservation résultant de l'accumulation de réserves dans une région qui se dilate quelque peu et s'entoure finalement d'une épaisse teinte généralement foncée (Dommergues et Mangenot, 1970; Nelson *et al*., 1923). Après, trois semaines de culture, de nombreuses chlamydospores intercalaires apparaissent sur le mycélium.

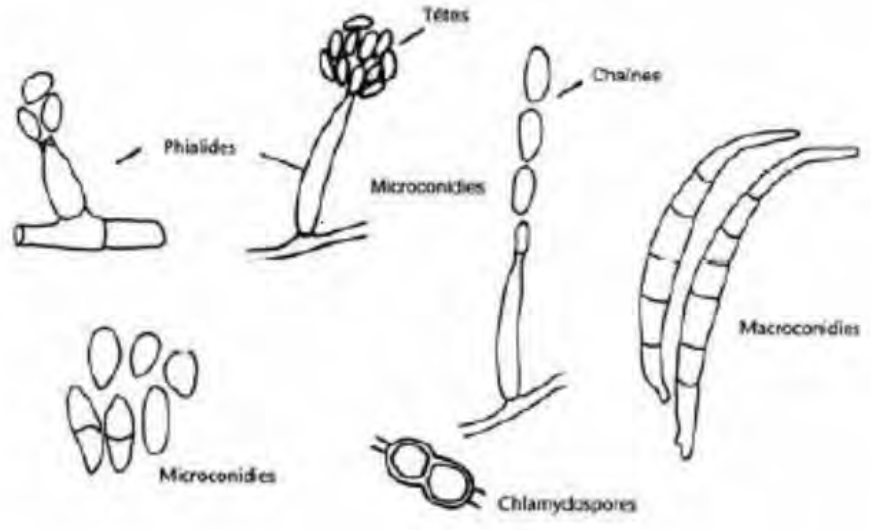


Figure 3: *Caractéristiques morphologiques de Fusarium sp. (Roquebert, 1998)*

II.1.2 Conservation et source d'inoculum

Les *Fusarium* se conservent dans le sol grâce aux débris végétaux hébergeant le mycélium, les microconidies, les macroconidies et les chlamydospores (Figure 4). Ils sont dotés d'aptitudes à la vie saprophytique qui leur permet de coloniser et de survivre sur divers composés organiques et de se maintenir dans les cultures hors sol, même en présence de variétés résistantes. Ces champignons sont susceptibles de se développer sur de nombreuses plantes appartenant à des familles botaniques différentes sans qu'elles expriment toujours les mêmes symptômes (Blancard, 2013).

II.1.3 Pénétration et invasion

Lorsque les conditions sont favorables, une germination des chlamydospores est observée puis le mycélium pénètre dans les racines de la tomate par l'intermédiaire de blessures naturelles (point d'émission des racines secondaires) ou accidentelles de l'extrémité des racines. La pénétration directe dans les cellules épidermiques serait également possible. Le mycélium du champignon peut entrer en contact avec le chevelu racinaire, s'entremêler avec lui et finir par se fixer aux radicelles. Le site préférentiel de colonisation de la surface racinaire semble se situer au niveau des sillons présents à la jonction des cellules de l'épiderme (Beckman et Roberts, 1995). Le champignon envahit les tissus et finit par coloniser l'ensemble du système racinaire puis les symptômes de la maladie apparaissent chez la plante (Stover, 1970). A côté des souches pathogènes, ils existent des isolats non pathogènes qui colonisent les racines des plantes sans induire des symptômes de maladie.

II.2 Principaux symptômes de la fusariose

La tomate est sujette à deux maladies fusariennes: le flétrissement fusarien classique (Fusarium wilt) causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder et Hansen) et la pourriture des racines et du collet (Fusarium crown and root rot) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis et Shoemaker (Katan *et al*., 1997) qui sont les maladies les plus dévastatrices de la tomate dans le monde (Haas et Défago, 2005).

Ce sont deux champignons telluriques dotés d'une spécificité d'hôtes stricts capables d'envahir l'ensemble du système vasculaire de la plante provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par mourir (Snissi *et al*., 2006).

La flétrissure fusarienne et la pourriture des racines et du collet présentent différents symptômes internes et externes sur les différentes parties de la plante et pendant les différents stades de développement.

II.2.1 Le flétrissement fusarien classique (Fusarium wilt)

Le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder et Hansen est une des maladies les plus dévastatrice de la culture de la tomate dans le monde. Le champignon provoque un jaunissement, une flétrissure puis la mort de la plante suite à une pénétration dans la plante et un envahissement des tissus ligneux (Blancard, 1997).

La maladie évolue ensuite rapidement puis les parties du limbe touchées flétrissement par manque d'eau: c'est le flétrissement rapide (Quick wilt). Les feuilles asséchées gardent leur chlorophylle et apparaissent avec un aspect gris verdâtre (Laterrot *et al*., 1978). Il apparait ensuite un jaunissement d'une partie ou de la totalité du limbe avec des éclaircissements au niveau des nervures. Au début, les symptômes (jaunissement et flétrissement) ne sont visibles que sur une seule partie avant de s'étendre sur l'ensemble de la plante. L'atteinte des feuilles s'effectue progressivement de bas en haut, ce qui fait que les feuilles se trouvant à la base de la plante sont déjà mortes (Messiaen, 1981).

Au niveau des tiges des plantes atteintes, apparaissent une dépression longitudinale (avec des tissus devenant bruns) qui part du collet puis remonte unilatéralement (Boubot, 1972). Une inclinaison progressive vers le sol des pétioles et des limbes (épinastie), le ralentissement de la croissance et la formation de bourrelets adventifs sur la tige peuvent être notés (Laterrot *et al*., 1978).

Une coupe longitudinale de la tige des plantes atteintes présente dans la partie ligneuse et adjacente au cortex vert, une coloration brune sombre des tissus conducteurs. Une coupe transversale montre des tissus brun foncé contenant des fragments mycéliens du champignon.

II.2.2 La pourriture des racines et du collet (Fusarium crown and root rot)

Causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Jarvis et Shoemaker, 1978), la pourriture des racines et du collet est une maladie découverte pour la première fois au Japon en 1969 (Menzies et Javis, 1994) puis s'est propagée à travers le monde en 1970 (Yamamoto *et al*., 1974). La pourriture des racines encore appelée pourriture commune apparaît chez les plantes âgées et se manifeste par une infection des parties souterraines. Elle est causée par la présence de l'inoculum dans le sol, les débris végétaux infectés ou les semences contaminées.

Contrairement aux maladies vasculaires, des flétrissements plus ou moins importants apparaissent sur les folioles du sommet de la tige.

Les flétrissements peuvent soudainement évoluer très rapidement vers la nécrose et le dessèchement des folioles et des feuilles pouvant aussi conduire à la mort de la plante.

L'apparition de jaunissements foliaires à la périphérie du limbe des vieilles feuilles suivie de la nécrose des pétioles et de la chute des feuilles a été également signalée. Certaines plantes affectées voient leur croissance réduite.

Quelle que soit la gravité des flétrissements, les symptômes primaires sont à rechercher sur les racines et le collet des plantes. Sur les racines apparaissent de nombreuses lésions brunes rougeâtre, humides, évoluant rapidement en pourriture. Plus le diamètre des racines est faible, plus le pourrissement et la décomposition est rapide. Bien que ne s'agissant pas d'une maladie uniquement vasculaire, le système vasculaire peut présenter aussi quelques symptômes. D'une manière générale, le cylindre central des grosses racines, les tissus vasculaires du pivot et ceux situés de part et d'autre de ces derniers révèlent des brunissements assez marqués. Le brunissement peut s'étendre jusqu'à la tige sur plusieurs dizaines de centimètres au-dessus du collet. Pour faire face à l'attaque des champignons, des racines adventives se développent parfois sur la tige (Blancard, 1997).

Figure 4: *Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par F.oxysporum sp. lycopersici chez la tomate (Agrios, 2005)*

III. Généralités sur *Sclerotinia rolfsii* de la tomate

Sclerotium rolfsii (Télomorphe*: Athelia rolfsii*) est un basidiomycète tellurique, très polyphage, qui sévit particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales. Le champignon *Sclerotinia roflsii* peut infecter plus de 500 espèces dans environ 100 familles de plantes. Parmi les légumes susceptibles d'être attaqués par ce pathogène nous pouvons citer l'oignon, le poivron, la pomme de terre, la patate douce, la tomate et le melon (Blancard, 2013). La maladie est présente dans le monde entier mais principalement dans les climats chauds (Mullen, 2001). La taxonomie du genre *Sclerotinia* est la suivante (Garrett et Barbara, 2014).

- Règne: Fungi
- Division: Basidiomycota
- Classe: Agaricomycetes
- Sous classe: Agaricomycetidae
- Ordre : Agaricales
- Famille: Typhulaceae
- Genre: Sclerotium

III.1 Biologie des champignons du genre *Sclerotinia*

III.1.1 Caractéristiques morphologiques

L'aspect morphologique de *Sclerotinia* est apprécié à partir des caractéristiques microscopiques et macroscopiques. Sur milieu PDA, la croissance de *Sclerotinia rolfsii* est très rapide et peut atteindre environ 9 cm après 72h d'incubation. Il présente un mycélium de couleur blanchâtre à croissance radiale avec des hyphes hyalins, minces et septés (Blancard, 2013).

Les hyphes présentent des ramifications dispersées et des fibules caractéristiques. Les hyphes de la branche principale sont relativement grands (diamètre compris entre 5 et 9 microns) comparés à de nombreux autres champignons dont le diamètre de leurs hyphes est situé entre 2 à 4 microns (Figure 5). Ces hyphes de la branche principale sont hyalins à paroi mince avec des ramifications secondaires peu fréquentes. Des cellules hyphales de plus petit diamètre (2 à 4 microns), appelées branches d'alimentation se forment à partir de la branche principale et pénètrent dans les tissus végétaux (Mullen, 2001). Sur le mycélium du champignon se forment des structures lisses, plutôt sphériques (1 à 3 mm de diamètre). Ce sont des sclérotes de couleur d'abord blanche puis brun clair à brun foncé et ayant un aspect comparable à celui de graines de moutarde (Nagamani *et al*., 2006).

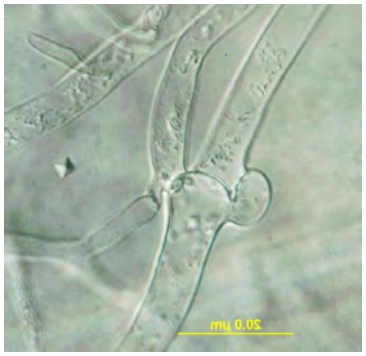


***Figure 5**: Aspect des hyphes de Sclerotinia rolfsii (Mullen, 2001)*

III.1.2 Conservation et source d'inoculum

Sclerotium rolfsii peut se conserver pendant plusieurs années dans le sol où sur les débris des végétaux sous la forme de mycélium agrégé ou de sclérotes qui constituent l'inoculum primaire. Les sclérotes se retrouvent libres dans le sol ou associés aux débris végétaux et leur persistance est plus importante dans les premiers centimètres qu'en profondeur. *Sclerotinia* est aussi capable de se maintenir sur différents substrats organiques sous sa forme mycélienne à l'état de saprophyte (Figure 6). Ce champignon est un pathogène très polyphage qui peut s'attaquer et persister sur plusieurs plantes, cultivées ou non, appartenant à une centaine de familles botaniques. Parmi les légumes sensibles à *Sclerotinia* nous avons: le piment, l'aubergine, diverses salades, le melon, le concombre, la pastèque, le haricot, l'artichaut, la betterave, la carotte, le chou-fleur, le céleri, l'ail, l'oignon, le radis, le navet, la patate douce (Blancard, 2013).

III.1.3 Pénétration et invasion

Les premières contaminations ont lieu par l'intermédiaire du mycélium déjà présent dans le sol ou issu des sclérotes. Elles sont souvent localisées sur les parties des plantes situées au niveau de la surface, à proximité ou en contact du sol. *Sclerotinia rolfsii* produit, lorsqu'il est à proximité d'un hôte potentiel, des enzymes lytiques comme des polygalacturonases ainsi que de l'acide oxalique**,** des substances pouvant entrainer la mort cellulaire. Après décomposition des tissus végétaux, il peut les pénétrer directement et les envahir grâce à l'action conjuguée des composés précédents. Son évolution inter et intracellulaire est très rapide quand les conditions climatiques sont favorables. Ce processus parasitaire qui peut durer entre 2 et 10 jours (en fonction des conditions climatiques) est à l'origine des altérations humides et des pourritures observées sur les différents organes. Sur les tissus lésés, la présence d'un mycélium et des sclérotes sont observés. Ces sclérotes peuvent germer rapidement car ils n'ont pas besoin d'une

phase de dormance. Ils sont cependant capables de se conserver plusieurs années dans le sol sans germer (Blancard, 2013).

III.2 Principaux symptômes de la sclerotiniose

Sclerotium rolfsii est un phytopathogène qui peut infecter plus de 500 espèces de plantes (Punja, 1988; Aycock, 1966). Ce phytopathogène peut causer plusieurs symptômes dont la fonte des semis et la pourriture des racines et du collet (Abada, 2003). Il peut attaquer tous les organes de la tomate situés dans le sol ou à proximité au cours des différents stades de développement des plants (pépinière à maturité).

Le plus souvent, *Sclerotinia* infecte les tiges inférieures situées près ou à la surface du sol mais il peut aussi infecter n'importe quelle partie de la plante tant que les conditions environnementales sont favorables (Figure 6).

Au niveau du collet, une lésion se transformant rapidement en pourriture s'y installe et le ceinture progressivement sur plusieurs centimètres. Les tissus atteints sont humides et brunissent plus ou moins intensément. Un dense mycélium blanchâtre recouvre les parties malades assez rapidement. Par la suite, le champignon envahit aussi les racines qu'il fait pourrir assez rapidement (Mullen, 2001). La destruction du collet et du système racinaire des plantes est à l'origine d'un flétrissement secondaire qui est plus ou moins réversible. Certains pieds de tomate peuvent retrouver leur turgescence habituelle durant la nuit. Dans d'autres cas, ce rétablissement n'est qu'éphémère et les plantes flétrissent de nouveau dès que les températures dans la journée s'élèvent (Blancard, 2013).

Sclerotinia rolfsii est aussi capable d'altérer les fruits et les feuilles qui entrent en contact avec le sol ou des organes déjà infectés. Les fruits révèlent des altérations légèrement jaunâtres qui deviennent rapidement humides et molles. Des formes de creux sont observées puis l'épiderme se fend. De larges taches humides sont parfois constatées sur les folioles en contact avec le sol qui s'étendent rapidement sur la feuille entièrement. Comme sur le collet, du mycélium et de nombreux sclérotes recouvrent progressivement les tissus pourris.

Le mycélium de ce champignon basidiomycète est capable de progresser activement à la surface du sol et de passer ainsi d'une plante à l'autre. Il le fait de façon saprophytique à partir des bases nutritives que constituent les débris végétaux. Ce mycélium est relativement caractéristique car il comporte des anses d'anastomose (Mullen, 2001).

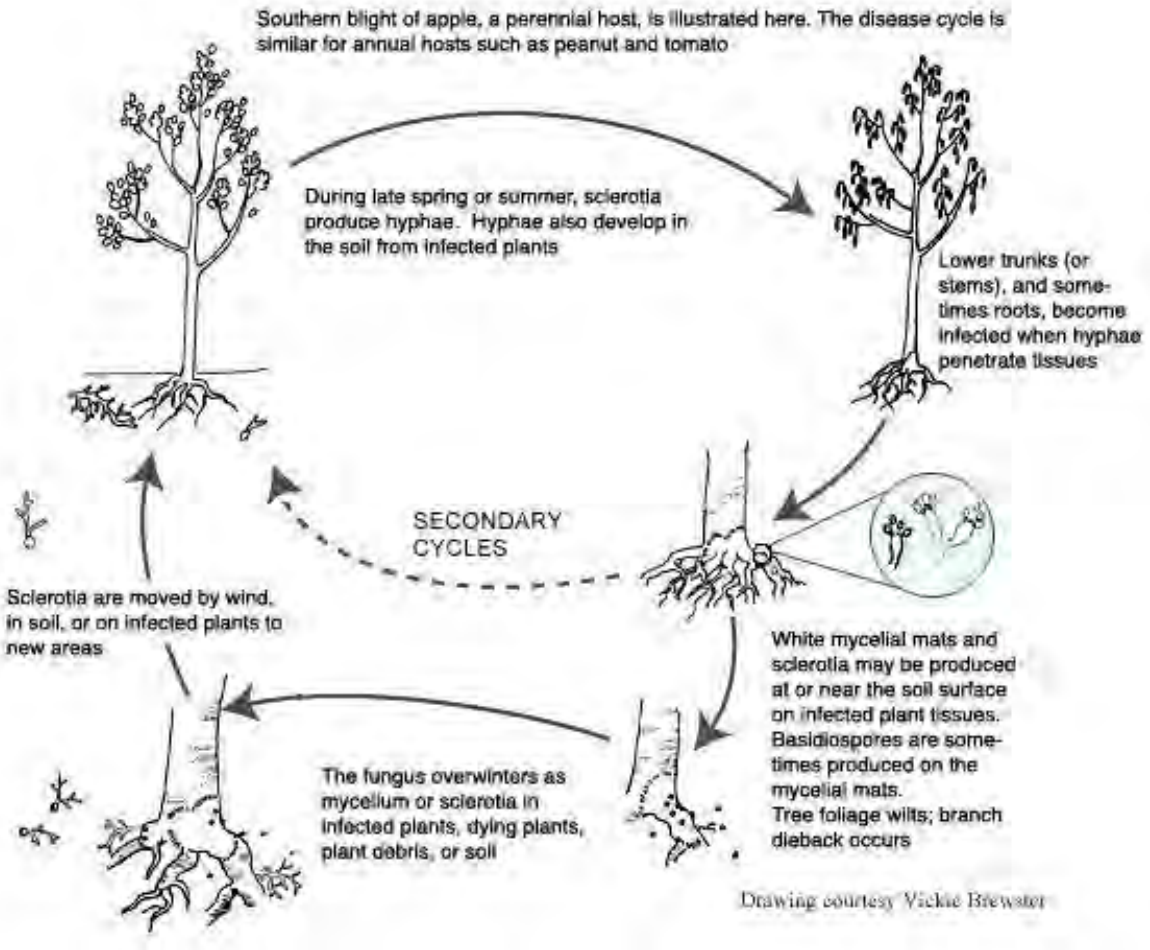


Figure 6: *Cycle de vie de Sclerotinia rolfsii (Mullen, 2001)*

IV. Méthodes de lutte contre les maladies de la tomate

Les méthodes de lutte pour le contrôle des maladies fongiques sont généralement limitées. Il n'existe en ce moment aucun moyen réellement efficace pour contrôler totalement ces maladies. Pour lutter contre les pathogènes fongiques de la tomate divers moyens sont utilisés: lutte culturale, physique, mécanique, lutte chimique, lutte génétique et lutte biologique. Les mesures de contrôle demeurent globalement d'ordre préventif (Rouxel *et al*., 1979)

IV.1 Lutte physique

Il convient cependant de distinguer deux types fondamentaux de méthodes en lutte physique: les méthodes actives et les méthodes passives. Les méthodes actives utilisent de l'énergie au moment de l'application pour détruire, blesser ou stresser les ennemis des cultures ou pour les enlever du milieu. Ces méthodes n'agissent qu'au moment de l'application et ne présentent pratiquement pas de rémanence. Les méthodes passives procèdent par une modification du milieu et ont un caractère plus durable.

En phytopathologie, moins de travaux scientifiques concernant la lutte physique sont disponibles. Le traitement des semences de blé à l'aide de micro-ondes pour le contrôle de *Fusarium gramineaum* a été évalué. Anchisi *et al.,* (1985) ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans un sol où la maladie est présente. La méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau à 48-49 °C pendant 30 secondes avant le repiquage des plants. Cela stimule la croissance des racines. La taille des racines amène aussi une protection contre la fusariose pour la même raison. La stérilisation ou la solarisation ne sont pas des solutions à long terme.

La solarisation présenterait aussi une certaine efficacité. Elle serait parfois assez partielle, car *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* est moins sensible à la chaleur que d'autres bioagresseurs telluriques comme *Pythium* spp. et *Sclerotium rolfsii* par exemple.

L'ozone également employée par ionisation d'eau et associée à *Trichoderma* sp., réduirait les attaques de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. L'incorporation de certaines plantes entières dans le sol, comme du riz, du soja ou de la laitue réduirait l'incidence de ce *Fusarium* sur la tomate (Blancard, 2013).

IV.2 Lutte culturale

Les mesures de lutte culturale contre les maladies de la tomate consistent à éviter les conditions favorables à son développement: sol léger et acide, manque d'azote et de calcium, températures

élevées supérieures à 28°C. Une des méthodes les plus courantes consiste aussi à chauler afin de maintenir le pH entre 6,4 et 7 (Scott, 1923). Une rotation de culture permet aussi de diminuer la densité de l'inoculum dans le sol mais n'élimine pas complétement la maladie. Par exemple on peut cultiver la laitue en rotation avec la tomate et enfouir les résidus de laitue. Une pratique commune en Ontario pour lutter contre par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) consiste à faire une culture de tomate au printemps, stériliser à la vapeur en août, semer de la laitue comme culture d'automne ou comme engrais vert et commencer une culture de tomate en janvier sans stérilisation.

Plusieurs mesures de prévention peuvent être utilisées :

- Transplanter en sol chaud (+ de 20 °C);
- Pailler le plus tard possible de façon à garder le sol chaud;
- Éviter d'arroser à l'eau froide;
- Butter les plants attaqués;
- Enlever les plants morts au complet, racines et collets compris;
- Enlever la première grappe de fruit pour réduire les symptômes par la suite.

IV.3 Lutte chimique

Actuellement, la méthode la plus répandue pour lutter contre les maladies des plantes en général est la lutte chimique. Les avantages de cette pratique sont liés à son faible coût, à sa facilité de mise en œuvre et à la durée de la protection qui se prolonge plusieurs mois, jusqu'à ce que le niveau de résidus encore actifs ne devienne inférieur au seuil létal pour les espèces cibles. Cependant, l'usage régulier des pesticides comporte de sérieux inconvénients, comme la possibilité de créer des races résistantes et des risques de dépassement des limites de tolérance pour les résidus de pesticides (LMR) à cause d'applications multiples par différents opérateurs de la chaîne commerciale. Cette situation est difficilement acceptée car les résidus de pesticides issus d'usages mal maîtrisés ont une très mauvaise image dans l'opinion du consommateur. Il en résulte, tant de la part de l'industrie de transformation utilisatrice des grains traités, que des consommateurs avertis, une pression pour que le recours à ce type de moyens de protection soit limité à l'indispensable et pour une absence de résidus dans les produits finis.

La lutte chimique se fait par une désinfection du sol à l'aide de fongicides. De nos jours, de nombreux fongicides sont homologués pour la lutte contre les maladies de la tomate en générale. Le fongicide le plus utilisé reste le triazole et ces dérivés qui sont des composés actifs

grâce à leur noyau qui possède une activité pharmacologique, antibactérienne, antifongique et hypoglycémique (Hamoir *et al*., 2001).

IV.4 Lutte génétique

La lutte génétique consiste à introduire des gènes de résistance au niveau des plantes. Ces gènes de résistances sont responsables de la production de protéines capables d'éliminer les parasites. Cependant, cette technique a été à l'origine de l'apparition de souches pathogènes plus résistantes (Henni, 1998). La méthode de loin la plus efficace pour contrôler les maladies telluriques dont la fusariose et la sclérotiniose consistera à utiliser des variétés résistantes.

IV.5 Lutte biologique

Cette méthode consiste à déposer différents organismes ou leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les bio-agresseurs. Il s'agit donc d'utiliser les bio-agresseurs et les ennemis naturels des espèces nuisibles (Fernandes, 2005).

Parmi les méthodes de lutte biologique, signalons que l'utilisation d'extrait aqueux d'*Oxalis articulata* apporté en arrosage au pied des plantes contrôlerait la fusariose. D'autres extraits de plantes auraient les mêmes effets (par exemple *Citrus paradisi*). Plusieurs huile**s** volatiles et substances non volatiles influenceraient aussi négativement le développement des champignons pathogènes de la tomate (Blancard, 2013).

La lutte biologique par l'utilisation des microorganismes antagonistes apparait comme une alternative ou un complément prometteur à l'utilisation des fongicides synthétiques. Toutefois, par rapport au nombre de molécules de synthèse homologuées dans le monde, le nombre d'agents de lutte biologique homologués pour le contrôle des maladies reste insignifiant (1 à 2% de marché) (Jijakli et Lepoivre, 1995). Les limites qui freinent le développement de la lutte biologique quelle que soit la culture à protéger sont: l'efficacité ou le maintien de celle-ci pendant une période suffisamment longue, la possibilité d'une production à grande échelle et la rentabilité économique d'une telle lutte. Ainsi, les marchés ciblés pour le développement de la lutte biologique doivent être bien définis, privilégiant ceux ou la réglementation en matière de lutte chimique est plus restrictive.

V. Généralités sur *Trichoderma*

Le terme *Trichoderma* a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos, 1985; Bissett, 1991). Il désigne des microorganismes cosmopolites appartenant à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Roquebert, 1996 ; Genilloud *et al.*, 1994). Le genre *Trichoderma* regroupe de nombreuses espèces réparties dans différents écosystèmes (terrestre ou aquatique). En milieu terrestre, il joue un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et est une matière de choix pour l'exploitation industrielle de manière générale. Il possède une capacité de production d'enzymes, de substances bioactives, d'acides aminés et un développement rapide (Prieto *et al.,* 1997).

Dans la lutte biologique contre les pathogènes fongiques, les *Trichoderma* utilisent différents mécanismes dont le mycoparasitisme, la compétition pour l'espace et les nutriments, l'antibiose, l'inactivation des enzymes du pathogène et la sécrétion d'antibiotiques (Renio *et al*., 2008; Harman *et al*., 2004; Howell, 2003). De plus, *Trichoderma* produit des enzymes lytiques extracellulaires, telles que les chitinases, les glucanases et les protéases (Viterbo *et al*., 2002). Certaines souches de *Trichoderma* peuvent favoriser aussi une stimulation de la croissance des plantes (Mouria *et al.,* 2007; Roquebert, 1996; Grondona *et al*., 1997; Kubicek *et al*., 2003). De plus, les *Trichoderma* peuvent coloniser les racines de plantes, décomposer les résidus de plantes et participer à la biodégradation des engrais et des pesticides (Anand *et al*., 2006). Ces propriétés de *Trichoderma* pourraient contribuer à réduire l'utilisation abusive des traitements chimiques contre les champignons pathogènes pour une agriculture durable.

Dans ce contexte de nombreuses espèces de *Trichoderma* ont été isolées partout dans le monde notamment en Afrique dans des pays comme la Cote d'ivoire (Kebe *et al.,* 2009), la Tunisie (Daami-Remadi et El Mahjoud, 2001; Hibar *et al*., 2005), le Kenya (Okoth *et al*., 2009), la Lybie (Attitalla *et al*., 2012), le Cameroun (Tondje *et al*., 2007).

Les espèces de *Trichoderma* ont été utilisées en lutte biologique pour la protection de certaines cultures comme la tomate, le concombre (Caron *et al*., 2002, Mouria *et al*., 2007) l'oignon, l'aubergine (Caron *et al*., 2006). Les espèces de *Trichoderma* les plus utilisées comme agents de lutte biologique sont *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum* et surtout *Trichoderma harzianum* (Jeger *et al*., 2009; Grondona *et al*., 1997).

V.1 Classification

Les champignons du genre *Trichoderma* sont des espèces anamorphes et n'ont pas de mode de reproduction sexuée connu. Ainsi leur classification est basée les aspects culturaux, la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaire (Gams et Bissett, 1998). L'histoire de la classification des *Trichoderma* est caractérisée par de nombreuses controverses. Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma* sp.

C'est en 1963, que les travaux de Gutter et Monbasher ont mis fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales. Conscient de toute cette polémique à propos de la classification des *Trichoderma*, Rifai propose une classification utilisable avec le concept d'«espèces agrégées», basé sur les caractères microscopiques. «Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer». Ainsi, neuf espèces agrégées ont été crées (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain*, T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai, 1969).

En comparaison avec les nombreux critères précédents, ce système semble être plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré par Bissett (1984, 1991a et b).

Pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp*., sans rapport avec les espèces agrégées, la notion de «section» a été proposée par Bisset en 1991. Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections: *Trichoderma, Pachybasium, Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* (Leuchtmann, 1996).

Des approches de biologie moléculaire ont aussi appuyé le système taxonomique de Bissett pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement.

Plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes (Gams and Bisset, 1998). Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea sp.* (téléomorphes) se transforment définitivement en *Trichoderma*

sp. (anamorphes). Il a été suggéré que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996).

Au cours des dernières années, l'identification sûre des nouvelles espèces de *Trichoderma* a été considérablement facilitée par l'élaboration d'un code à barres oligonucléotide (TrichOKEY) et un outil de recherche personnalisé (Tricho BLAST), tous deux disponibles en ligne à www.is+th.info (Druzhinina *et al.,* 2005).

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent. C'est ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma sp.* (Cournut, 1984; Sugiyama, 1987).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma.* La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.* se présente comme suit (Bissett, 2004) :

- Embranchement : *Amastigomycota* et/ou *Eumycètes*
- Sous embranchement : *Ascomycotina*
- Classe : *Sordariomycètes*
- Ordre : *Hypocréales*
- Famille : *Hypocraceae*
- Genre : *Trichoderma*

Les *Trichoderma* présentent des caractéristiques morphologiques spécifiques.

V.2 Morphologie

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp.* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Petri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Trois jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile. Deux jours plus tard, une couleur verte en forme de cercle est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes,

septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale (Figure 7). Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001).

V.2.1 Les conidiophores

Les conidiophores sont très ramifiés et donc difficiles à définir ou à mesurer. Lâches ou compacts, ils sont souvent formés dans différents cercles concentriques ou au niveau de longs hyphes. Les branches principales des conidiophores produisent des branches latérales qui peuvent être appariées ou non. Les plus longues branches éloignées de la pointe et les phialides sont souvent insérés directement à l'axe principal près de la pointe. Les branches principales peuvent être ramifiées à nouveau en branches secondaires. Les branches principales et secondaires forment un angle de près de 90 degrés par rapport à l'axe principal. Le conidiophore typique du genre *Trichoderma* est donc ramifié et formé de branches ayant un aspect pyramidal ou conique. En général, le conidiophore se termine par une ou quelques phialides. Chez certaines espèces (par exemple T. *polysporum*), les ramifications principales sont terminées par de longs crochets simples ou ramifiés, droites ou sinueuses avec des cloisonnements à paroi mince et terminés par des allongements stériles ou fertiles. L'axe principal peut être de même largeur que la base de la phialide ou il peut être beaucoup plus large. Les conidiophores portent les phialides en formes de flasques ou de quilles (Samuel *et al*., 2013).

V.2.2 Les phialides

Les phialides hyalins sont généralement élargis au milieu en forme de bouteilles renflées à la base mais peuvent être cylindriques ou presque subglobuleuses. Elles sont souvent disposées en verticilles suivant un angle de 90 degrés par rapport aux autres membres de la spire ou diversement pénicilliées. Les phialides peuvent être solitaires (par exemple T. *longibrachiatum*) ou disposées en grappes denses sur l'axe principal (par exemple, *T. polysporum*, *T. hamatum*). Elles portent à leurs extrémités les spores encore appelées conidies ou phialospores (Samuel *et al*., 2013).

V.2.3 Les conidies

Les conidies apparaissent généralement sèches, mais chez certaines espèces, elles peuvent être détenues dans des gouttes de liquide vert ou jaune clair (par exemple, *T. virens*, *T. flavofuscum*). Les conidies de la plupart des espèces sont unicellulaires, ellipsoïdales de dimensions 3-5 x 2-4 um (L / l => 1,3). Il existe aussi des conidies de formes globuleuses mais qui sont rares. Les

conidies sont généralement lisses, mais finement verruqueuses. Cependant on peut observer aussi des conidies qui ont une forme tuberculée chez certaines espèces de *Trichoderma*. Elles ont une couleur verte et une paroi lisse ou rugueuse regroupées dans des têtes collantes à l'extrémité des phialides (Samuel *et al*., 2013).

V.2.4 Les chlamydospores

Les chlamydospores peuvent être produites par toutes les espèces de *Trichoderma* lorsque les conditions du milieu le permettent. Les chlamydospores sont généralement subglobuleuses, unicellulaires et situées souvent en position intercalaire ou terminale. Elles peuvent également être formées dans les cellules des hyphes. Chez certaines espèces de *Trichoderma,* les chlamydospores sont multicellulaires (par exemple *Trichoderma stromaticum*) (Samuel *et al*., 2013).

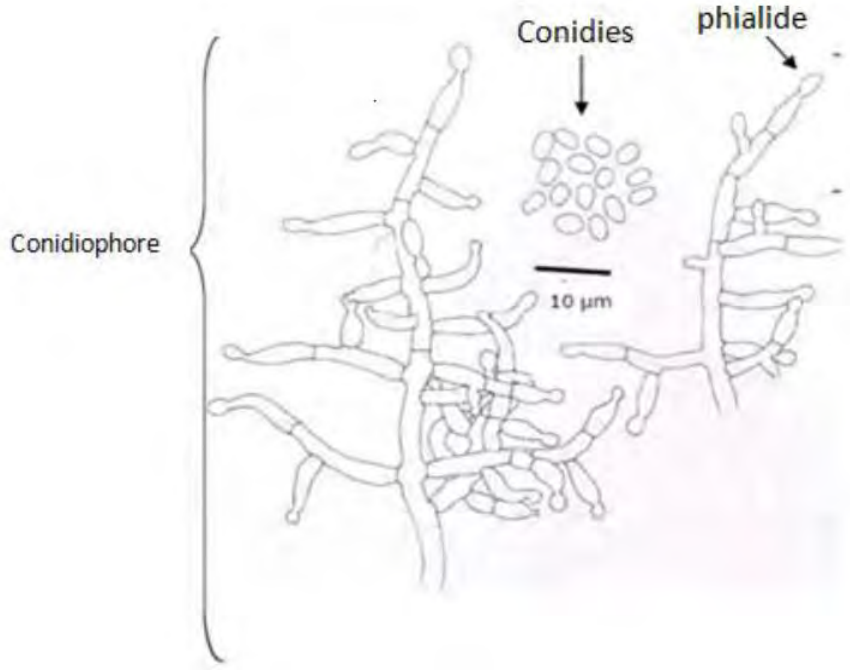


Figure 7*: Aspect morphologique d'un conidiophore de Trichoderma (Samuels et al., 1994)*

Les *Trichoderma* présentent une certaine plasticité écologique et se retrouvent donc dans différents écosystèmes.

V.3 Ecologie

Plusieurs facteurs écologiques affectent la distribution de *Trichoderma* dans leurs habitats naturels. La maitrise de ces facteurs peut conduire à une meilleure compréhension de la dynamique, de la survie et de la prolifération des populations de ce champignon antagoniste

dans le sol et la rhizosphère. Pour cette raison, une analyse minutieuse du comportement de ce champignon dans l'écosystème du sol est nécessaire.

Le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques. Les *Trichoderma sp.* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.

Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés), en particulier dans ceux contenant une importante quantité en matière organique et sur les végétaux en décomposition. Il semble être un colonisateur secondaire à cause de son isolement fréquent dans la matière organique bien décomposée (Danielson *et al.*, 1973). *Trichoderma* se trouve également sur la surface des racines de diverses plantes; écorce en décomposition, surtout quand elle est endommagée par d'autres champignons (Danielson *et al*., 1973) et sur les sclérotes ou autres propagules d'autres champignons (Davet, 1979). Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes.

La répartition de *Trichoderma* dans les écosystèmes varie en fonction des contraintes biotiques et abiotiques. Lorsque les conditions sèches du sol sont maintenues pendant une longue période, les populations de *Trichoderma* diminuent (Davet, 1979). Danielson et Davey, (1973) également ont conclu que certaines souches de *T. hamatum* et *T. pseudokoningii* sont adaptées à des conditions d'humidité excessive du sol et que *T. viride* et *T. polysporum* sont restreints à des zones où les températures sont basses. *T. harzianum* est plus souvent présent dans les régions chaudes tandis que *T. hamatum* et *T. koningii* sont largement distribués dans les zones de conditions climatiques variées. Les déterminants supplémentaires physiques et chimiques qui agissent sur la répartition de *Trichoderma* sont le pH du sol, le gaz carbonique (CO_2), l'acide carbonique (HCO_3), le contenu en sel, en matière organique et la présence ou l'absence d'autres micro-organismes dans le sol. La teneur en fer du sol peut aussi être un élément déterminant de la micro préférence du site de *Trichoderma* (Papavizas, 1985).

Le genre *Trichoderma* est l'une des espèces fongiques prédominantes. Il vient à la 3ème position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau, 2001). L'abondance des *Trichoderma sp.* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances

bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Mohamed-Benkada, 2006).

V.4 Cycle de vie de *Trichoderma*

Trichoderma est un champignon asexué. Les Conidiospores (Figure 8) représentent la phase dominante de la multiplication. Dans des conditions optimales, les spores germent et l'observation microscopique après 11 h d'incubation montre la formation d'un tube germinatif. Puis une multiplication active du mycélium et la formation de nombreuses ramifications sont notées. Quelques jours plus tard, la formation d'un conidiophore portant à ses extrémités des phialides et de nombreuses conidies est observée (Roussos, 1985).

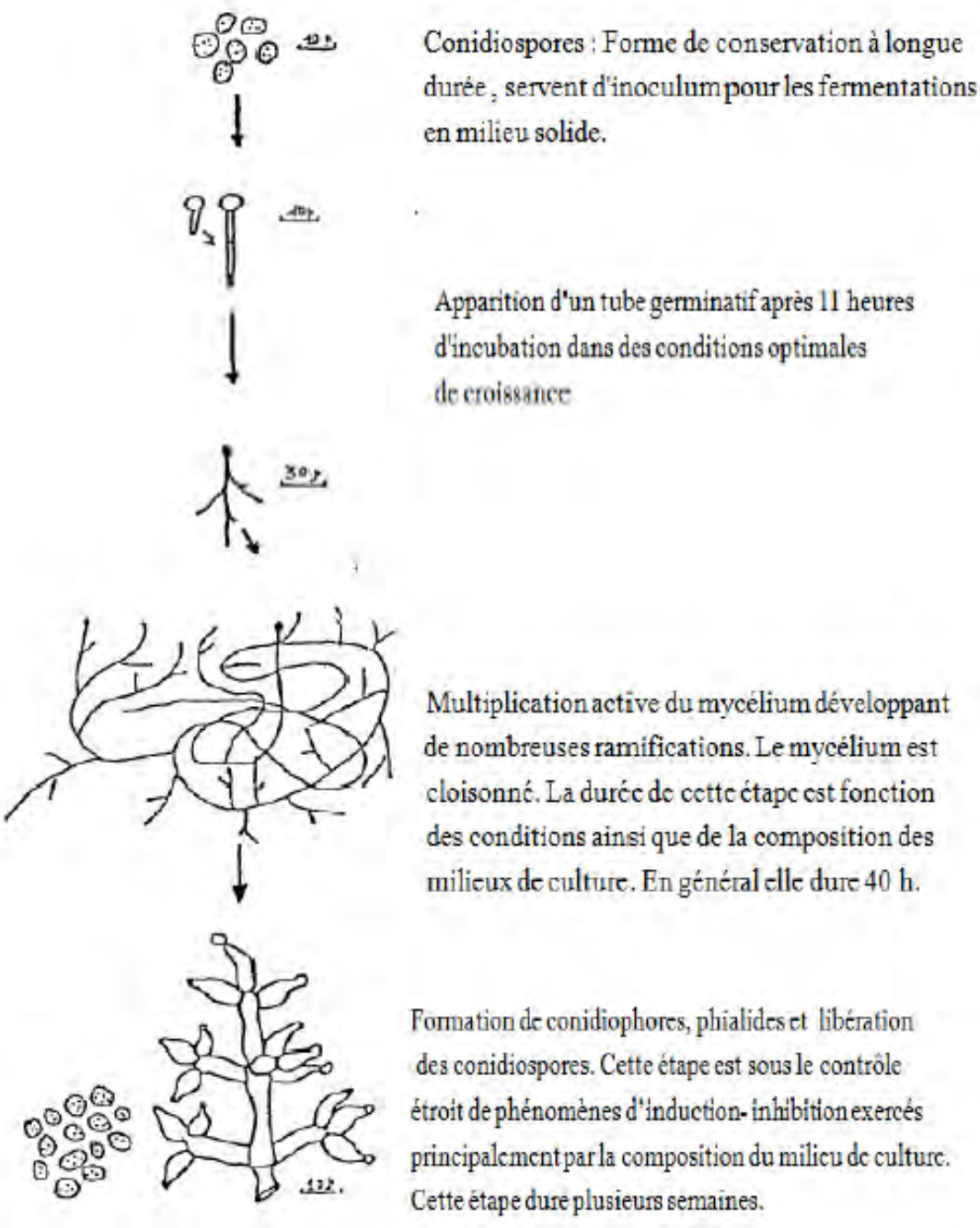


***Figure 8**: Cycle de vie de Trichoderma (Roussos, 1985)*

V.5 Aspect de *Trichoderma* en culture

V.5.1 Milieu Patato Dextrose Agar (PDA)

Sur milieu PDA, les colonies sont à croissance très rapide et peuvent envahir la boite de Petri dans les 48h. Le mycélium est de couleur blanche au départ et devient verte plus tard marquant le début de la conidiation. Le revers de la culture est incolore. Un ou plusieurs cercles concentriques de couleur verte peuvent se former autour du point d'inoculation. La conidiation peut se faire du centre vers la périphérie de la boite et les conidies sont ensuite dispersées dans

toute la boite. Chez certaines espèces, par exemple T. *pseudokoningui*, il peut y avoir la formation d'une zone irrégulière sans formation de conidies autour du point d'inoculation (Shah et *al*., 2012). La présence d'un pigment jaune secrété typiquement sur milieu PDA peut être observée (Samuels et *al*., 2002).

V.5.2 Milieu Malt Extract Agar (MEA)

Sur milieu MEA**,** des colonies à croissance rapide d'aspect grumeleux, de couleur blanche au départ et devenant vert foncé par endroit sont observées. Le champignon se répartit de façon hétérogène sur la boîte de Petri. Le revers est jaune-orange. La présence de chlamydospore est possible et leur taille peut aller jusqu'à 14 µm. Des cercles concentriques peuvent se former ou non au niveau du mycélium cotonneux de couleur blanche et des conidies vertes d'aspect lumineux ou non peuvent se former sur toute la boite. Le pH du milieu augmente légèrement mais reste acide (Shah et *al*., 2012).

V.5.3 Milieu Czapek Dox (Dox)

Sur milieu Czapek Dox**,** les colonies sont à croissance un peu plus lente que sur les autres milieux, d'aspect gélatineux presque transparent (légèrement blanche). Le revers est de couleur crème. Les conidies peuvent se former dans toute la boite de Petri au niveau des cercles concentriques. On peut observer aussi des grappes jaunes formées de conidies autour du point d'inoculation (Shah et *al*., 2012). La croissance de l'espèce basidifie le pH du milieu.

V.5.4 Milieu Sabouraud (SB)

Sur milieu SB, les colonies compactées en touffes sont à croissance rapide. Le mycélium est cotonneux de couleur blanche tandis que le revers de la culture est crémeux. Des conidies peuvent se former dans toute la boite avec la présence de cercles concentriques blanchâtres autour du point d'inoculation (Shah et *al*., 2012).

V.6 Importance de *Trichoderma*

V.6.1 Pouvoir antagoniste de *Trichoderma*

Trichoderma possède plusieurs mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Le déploiement des modes d'action varie également selon les microorganismes associés et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc.…). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer

avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Caron, 2002). Pour *Trichoderma*, les mécanismes d'action les plus couramment étudiés sont la compétition pour l'espace et pour les éléments nutritifs, le mycoparasitisme (avec entre autres la production d'enzymes lytiques) et l'antibiose.

V.6.2 Compétition

La compétition pour l'espace et les nutriments entre les agents de lutte biologique et les pathogènes végétaux est importante pour la colonisation efficace de la rhizosphère et ainsi pour protéger les plantes contre les pathogènes. Il a été suggéré que la compétition jouerait un rôle dans le contrôle biologique des espèces de *Fusarium* et de *Pythium* par certaines souches de *Trichoderma*. Chez *Trichoderma*, la compétition se manifeste par son aptitude à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes. Toutefois, T*richoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables.

Pour être un compétiteur efficace, l'antagoniste doit posséder les caractères spécifiques suivants (Droby et Chalutz, 1994).

- ✓ Coloniser rapidement les sites blessés;
- ✓ Utiliser les éléments nutritifs présents en faible quantité dans le milieu plus rapidement et plus efficacement que le pathogène;
- ✓ S'adapter aux conditions environnementales et nutritionnelles du site;
- ✓ Etre capable de survivre et de se développer sur la surface des fruits et sur le site d'infection sous des conditions de température, de pH et d'osmose extrêmes.

V.6.3 Antibiose

L'antibiose résulte de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène (Benitez *et al*., 2004).

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire produits dans des conditions limitant pour les nutriments. Les espèces de *Trichoderma* produisent plus de 43 métabolites secondaires qui présentent une activité antibiotique. Parmi ces composés, les alkylpyrones, les isonitriles, les polycétides, les petaibols, les dicétopipérazines, la viridine, la gliovirine, les glisoprénines, la 6-penthyl-α-pyrone, les sesquiterpènes et les stéroïdes se sont

souvent révélés être associés à l'activité de lutte biologique (Vey *et al*., 2001; Raaijmakers *et al*., 2009). L'antibiotique volatil produit par *Trichoderma harzanium* inhibe *Rhizoctonia solani* et *Macrophomina phaseolina (*Denis et Webster, 1971). Les souches de *Trichoderma virens* capables de produire de la gliovirine impliquées dans l'antibiose sont des agents de biocontrôle efficace (Howell, 1998). Un mutant d'une souche de *Trichoderma harzianum* produisant des taux élevés d'enzymes extracellulaires et d'α-pyrone augmentait son efficaité contre *Rhizoctonia solani* et *Botritis cinerea* dans différentes conditions environnementales (Rey *et al*., 2001). L'application exogène de peptaibols sur des plants de tabac a activé les gènes sensibles à la défense et a montré une sensibilité réduite au virus de la mosaïque du tabac (Wiest *et al*., 2002).

V.6.4 Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme survient lorsque l'antagoniste envahit le pathogène en sécrétant des enzymes telles que les chitinases, les cellulases, les glucanases, les protéases et d'autres enzymes lytiques. Le mycoparasitisme est un phénomène d'un champignon parasite appelé hyperparasite sur un autre champignon appelé hypoparasite. Le mécanisme de mycoparasitisme est impliqué par l'interaction des hyphes ou la destruction des propagules. À la suite de l'interaction entre les champignons se produisent plusieurs événements qui conduisent à l'enroulement, à la pénétration, à la sporulation, à la formation de barrière et à la lyse du champignon pathogène (Zeilinger *et al*., 1999). La reconnaissance du pathogène par *Trichoderma* est en partie due à la production séquentielle de protéines liées à la pathogenèse, principalement les protéases, les glucanases et les chitinases (Harman *et al*., 2004). La sécrétion d'exochitinases qui dégradent les parois des cellules fongiques libérant des oligomères joue un rôle central dans l'inhibition de la croissance de souches fongiques pathogènes (Gajera *et al.*, 2013). *Trichoderma* spp. peuvent s'attacher aux pathogènes (S*clerotinia rofsii* ou *Rhizoctonia solani*) par le mycelium, les crochets ou l'appressoria. Des sites lysés et des trous de pénétration ont été trouvés dans les hyphes du pathogène après l'élimination des hyphes parasites (Elad *et al*., 1983). *Trichoderma* peut s'enrouler sur *Pythium* entraînant la lyse de la paroi cellulaire, la vacuolisation et la coagulation du protoplasme (Lifshitz *et al*., 1986).

V.7 Induction de la résistance des plantes

La présence de *Trichoderma* spp. peut stimuler chez les plantes l'induction de la réponse hypersensible, de la résistance acquise systémique (SAR) et de la résistance systémique induite (ISR) (Benitez *et al*., 2004; Vinale *et al*., 2008). La résistance acquise systémique (SAR) est induite par la voie de l'acide salicylique (SA voie) et la résistance systémique induite (ISR) par

celle de l'acide jasmonique et de l'éthylène (voie JA / Et) (Harman *et al*., 2008). Les métabolites produites par *Trichoderma* induisent la résistance des plantes en stimulant la synthèse de différentes molécules et l'expression des gènes des protéines telles que les chitinases, les glucanases et les peroxydases contre les microorganismes pathogènes (Yedidia et *al*., 2003; Hanson et Howell*,* 2004; Harman, 2004b).

Des plants de tomate colonisés par *Trichoderma hamatum* ont activement induits des changements systémiques dans la physiologie des plantes et la résistance aux maladies (Alfano *et al.,* 2007). De même, l'inoculation de *Trichoderma asperellum* chez des plants de concombre a induit une réponse systémique par l'expression des deux gènes de défense codant pour la phénylalanine et l'hydroperoxidase lyase mais aussi par l'accumulation de phytoalexines contre *Pseudomonas syringae pv. Lacrymans* (Yedidia *et al*., 2003). Une résistance induite des feuilles de haricot aux maladies causées par *Botritis cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum* a été également observée avec l'isolat de *Trichoderma harzianum* T-39 (Bigirimana *et al.,* 1997). L'utilisation de *Trichoderma* spp. dans la lutte contre les maladies implique ainsi une interaction complexe entre la plante hôte, l'agent pathogène, l'agent de bio contrôle et plusieurs facteurs environnementaux (Harman, 2004a; Hoitink *et al*., 2006; Alfano *et al.,* 2007).

V.8 Stimulation de la croissance de la plante

La production d'Agents de Lutte Biologique (ALB) à base de *Trichoderma* date depuis longtemps et a été révisée au cours des dernières décennies par plusieurs scientifiques qui lui ont attribuée une importance en agriculture pour la lutte contre les maladies causées par les pathogènes. Les *Trichoderma* sont caractérisés par une croissance rapide, une grande capacité à la compétition saprophytique et parasite le mycélium d'autres champignons (Mouria *et al.,* 2005). Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies telluriques et pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation (Harman, 2000). En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles à la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman *et al.,* 2004; Singh *et al.,* 2007). Il a été prouvé que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines chez le maïs et chez d'autres plantes (Harman, 2000; Harman *et al.,* 2004). Cet effet peut durer toute la vie des plantes annuelles et peut être induit par l'ajout de petites quantités

de bioinoculants à base de *Trichoderma* appliqués sur les semences. Les recherches récentes ont prouvé que les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes autant qu'ils sont des parasites pour quelques champignons. Certaines souches de *Trichoderma* peuvent établir une colonisation robuste et durable au niveau des surfaces racinaires des plantes; ce qui permet une amélioration de la croissance racinaire, de la productivité, de la résistance au stress abiotique et l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.,* 2004).

Trichoderma a été connu comme producteur de substances antibiotiques et parasite d'autres champignons (Chang *et al.,* 1986). Le parasitisme de *Trichoderma viride*, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme incluant les cellulases, les chitinases et des antibiotiques comme les gliotoxines, les thrichodermin et les viridin (Haran *et al.,* 1996, Vyas et Mathur, 2002 ; Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998). Des récentes recherches ont montré que *T. viride* est un améliorateur de croissance chez le soja (Harman, 2001), il protège la tomate, le piment (Verma, 2007) et quelques cucurbitacées contre les phytopathogènes. Harman *et al.,* (2004) ont ajouté que la colonisation des racines par *Trichoderma* améliore la croissance et le développement de ces derniers, la productivité, la résistance au stress abiotique et le prélèvement et l'utilisation des nutriments.

CHAPITRE 2 :
Caractérisation morphogénétique et biochimique des isolats des *Trichoderma*

Une partie de ce chapitre à fait l'objet de trois articles dont deux déjà publiés et d'un article soumis dans *Indian Journal of Phythopathology* (**Annexe 4**):

Ndiogou Gueye, Dienaba Sall Sy, Tahir A. Diop, M Raghu Ram. 2018. Screening for multiple enzymes activities of *Trichoderma* strains isolated from agriculture field soil in Senegal. *International Journal of Current Research.* Vol. 10, Issue, 07, pp.71895-71897.

Ndiogou Gueye, Kranthi Kumar G., Adiouma Dangue, Mame Arama Fall Ndiaye, Tahir A. Diop and M. Raghu Ram. 2018. Bioproduction of Indole 3-acetic acid by *Trichoderma* strains agriculture isolated from agriculture field soils in Senegal. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Volume 7, Issue 17, 817-825.

Ndiogou Gueye, Kranthi Kumar G., Malick Ndiaye, Dienaba Sall Sy, Mame Arama Fall Ndiaye, Tahir A. Diop and M. Raghu Ram. Factors affecting chitinase production by *Trichoderma asperellum* isolated from agriculture field soil. **Soumis** dans *Indian Journal of Phytopathology.*

Chapitre 2 : Caractérisation morphogénétique et biochimique des isolats des *Trichoderma*

Introduction

Les *Trichoderma* sont des champignons cosmopolites caractérisés par leur croissance rapide et leur capacité d'utiliser divers substrats (Klein et Eveleigh, 1998). Ils constituent les éléments prédominants de la microflore des sols de divers écosystèmes (Danielson et Davey, 1973; Roiger *et al*., 1991; Smith, 1995). Le genre *Trichoderma* renferme les espèces les plus utilisées comme agents de lutte biologique et comme source d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêts biotechnologiques (Kubicek et Penttilä, 1998; Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998). De nombreuses espèces de *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique efficaces contre de nombreux champignons pathogènes (Abo-Elyousr *et al*., 2014; Kim et Knudsen, 2013; Saber *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2013). La capacité de *Trichoderma* spp. à lutter contre les maladies des plantes est généralement attribuée à leurs effets antagonistes sur le pathogène fongique et en particulier leur capacité à produire des enzymes lytiques comme les chitinases, les β-1,3-glucanases, les protéases et les pectinases (Benítez *et al*., 2004; Viterbo *et al*., 2002). Ces enzymes hydrolysent la paroi cellulaire de l'agent pathogène pour limiter leur croissance. Depuis quelques années, de nombreuses formulations à base de *Trichoderma* sont commercialisées (biopesticides et biofertilisants). Ces formulations ont permis de lutter contre les pathogènes des cultures et contribuer à l'augmentation des rendements (Harman *et al*., 2004; Mukherjee *et al*., 2012). Cependant quelques limites ont été notées sur leur efficacité en conditions naturelles. Par conséquent, la recherche de nouvelles souches de *Trichoderma* plus efficaces avec des potentialités antagonistes élevées sont nécessaires pour des systèmes de contrôle biologique plus efficients. Toutes fois, la majorité des espèces de *Trichoderma* étant morphologiquement très semblables et difficiles à distinguer, il est nécessaire d'étudier la variabilité génétique des isolats ainsi que leurs activités biologique et biochimique (Consolo *et al*., 2012; Sharma *et al*., 2009). Les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN se sont montrées très utiles dans la caractérisation des isolats de ce genre, tant dans des études d'identification (Hjeljord et Tronsmo, 1998) que dans l'élaboration de classifications phylogénétiques (Kullnig-Gradinger *et al*., 2002). L'analyse des séquences ITS de l'ADNr a été utile dans des études taxonomiques de plusieurs espèces de *Trichoderma* (Gams et Meyer, 1998; Lieckfeldt *et al*., 1999; Samuels *et al.*, 2002).

A notre connaissance aucune étude rapportant la diversité des espèces de *Trichoderma* isolées du Sénégal n'a été jusque-là effectuée. Ainsi l'objectif de cette étude est de faire la

caractérisation des souches indigènes de *Trichoderma* pour sélectionner des isolats potentiellement utilisables dans la lutte contre les champignons pathogènes des cultures maraichères en particulier la tomate.

Il s'agira plus spécifiquement de :

- Isoler des souches de *Trichoderma* à partir de différents sites de la zone des Niayes;
- Faire la caractérisation morphologique et biochimique des souches;
- Etudier la diversité génétique des souches sélectionnées.

I. Matériel et Méthodes

I.1 Isolement des *Trichoderma*

I.1.1 Présentation du site d'échantillonnage

Les Niayes constituent une zone agro-écologique qui joue un rôle très important dans l'économie du Sénégal. Cette zone, située le long du littoral nord du Sénégal s'étend sur une longueur de 181 Km du sud au nord (de Dakar à St-Louis) et sur 10 à 30 Km d'Ouest en Est. Elle fournit l'essentiel de la production maraîchère du Sénégal (60% de la production nationale et 50% des exportations horticoles) pour un chiffre d'affaire d'environ 215 milliards de francs (PADEN, 2013). Cette zone est caractérisée par une succession de série de dunes d'âges, de textures et de couleurs différentes depuis la côte jusqu'à l'intérieur des terres (Gueye *et al.,* 2005). On distingue les dunes littorales; les dunes semi-fixées et les dunes continentales. Entre ces dunes se trouvent des dépressions et des couloirs inter dunaires (où affleure la nappe phréatique) qui sont des vestiges d'anciennes vallées. Les sols sont à texture dominante sablonneuse variant des types Dior, Deck Dior à Deck avec un degré dégressif de lessivage des argiles et une teneur en matières organiques et minérales généralement faible (PADEN, 2013). Ainsi on distingue :

- des sols «dior» sablonneux, brun-jaune, ferrugineux non lessivés, localisés au sommet des dunes. Ils sont perméables mais faiblement structurés car leur teneur en argile est quasiment nulle;
- des sols «deck-dior» argileux, bruns sur les versants. Ces sols sont constitués d'un mélange d'argile et de sable et sont localisés en bas de pente. Ils sont saisonnièrement marécageux et peuvent être assez riches en éléments minéraux avec une faible profondeur;
- des sols «deck» constitués de terres légèrement argileuses, hydromorphes et noires. La teneur en matières organiques de ces sols est variable.

Les Niayes sont caractérisées par leur hydromorphie permanente ou temporaire et par des sols très propices pour la production maraîchère (Gueye *et al.,* 2005).

Elle bénéficie d'un microclimat assez particulier caractérisé par des températures modérées du fait de la circulation des alizés maritimes soufflés par les courants froids des Açores. Les températures moyennes dépassent rarement 30 °C. Cependant, la présence de l'harmattan faiblement ressentie dans cette partie du pays, élève la température à un maximum de 31 °C en mai et juin.

I.1.2 Echantillonnage

Les prélèvements de sol ont été effectués au niveau de 5 sites différents dans cette zone des Niayes (jardin botanique UCAD, Sangalkam, Gorom, Notto Gouye Diama et Mboro) (Figure 9). L'échantillonnage a été effectué au niveau de la rhizosphère des plants sains de tomate. Ainsi, la surface du sol a été d'abord débarrassée des feuilles mortes et des débris des végétaux. Puis à l'aide de spatules préalablement désinfectées à l'alcool, le sol a été prélevé à des profondeurs allant de 10 à 30 cm correspondant à la rhizosphère. Pour chaque parcelle, un échantillon composite a été prélevé à partir de 5 endroits différents. Ensuite le sol ainsi prélevé a été mis dans des sachets en plastique stériles puis ramenés au laboratoire. Le sol a été ensuite séché puis immédiatement utilisé pour l'isolement des champignons du genre *Trichoderma.*

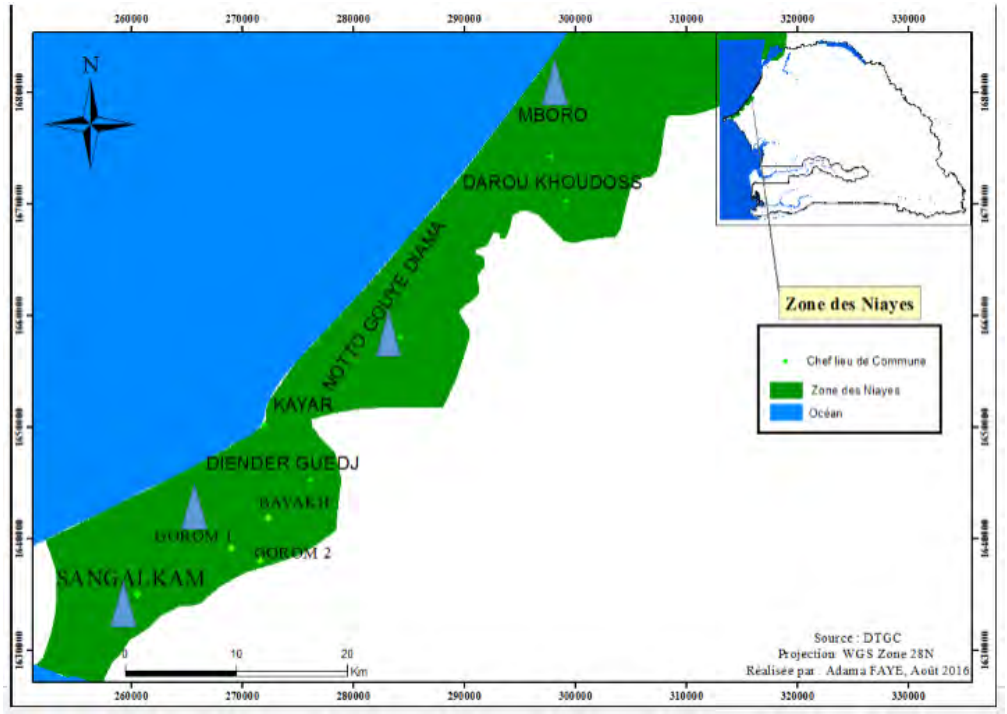


Figure 9*: Sites d'échantillonnage*

I.1.3 Technique d'isolement

La technique utilisée pour l'isolement des *Trichoderma* est celle dite de «suspension dilution». Le principe consiste à mettre le sol en suspension dans de l'eau physiologique stérile, puis à effectuer une série de dilutions de cette suspension qui seront incorporées dans le milieu d'isolement. Cette technique comprend plusieurs étapes, allant de la préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly, 1968). La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 10g de sol à 90 ml d'eau physiologique stérile, puis à agiter pendant 30 mn. L'agitation permet d'homogénéiser le milieu et de libérer les microorganismes des différentes particules. Des prélèvements successifs de 10 ml de cette suspension, puis dans les suivantes ont été ajoutés chaque fois à 90 ml d'eau stérile et ont constitué les dilutions 10^{-2}, 10^{-3}, ... jusqu'à 10^{-6}. Au moment de l'analyse, 0,5 ml de chacune des dilutions 10^{-3} à 10^{-6} a été étalé à la surface des boites de Petri préalablement coulées avec du PDA supplémenté avec du sulfate de streptomycine préalablement stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 mn. Les boites ont été ensuite recouvertes de parafilm puis incubées dans une étuve à 28 °C. Trois boites ont été ensemencées pour chaque dilution. Après 2 à 4 jours d'incubation, les colonies individuelles présentant une couleur verdâtre et un aspect circulaire ont été repiquées dans de nouvelles boites.

I.1.4 Caractérisation morphologique des *Trichoderma*

Après purification, nous avons procédé à l'identification des différentes souches par une observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques avec l'aide des clés de détermination de Samuel *et al*., (2004) et de Nagamani *et al*., (2006). L'identification est basée sur les structures du mycélium notamment les conidiophores et les phialides, les éléments de la reproduction asexuée, (conidies: forme, cloisons, couleur, taille…) et sur les formes de résistance (chlamydospores solitaires, en paires ou en chaines),

I.1.4.1 Caractéristiques macroscopiques.

Les souches ont été cultivées sur milieu PDA et incubées à 28 °C. Les critères utilisés pour identifier les *Trichoderma* des autres espèces fongiques au plan macroscopique sont: la couleur des colonies recto et verso, la vitesse de croissance du mycélium et l'aspect du mycélium aérien. Les colonies présentant les caractéristiques suivantes ont été retenues: vitesse de croissance mycélienne très rapide, croissance cyclique du mycélium sous forme de cercles réguliers, colonies légèrement floconneuses ou compactées en touffes (ou bien présentant les 2 aspects précités en même temps), couleur des colonies qui varie du blanc au vert foncé ou au jaune.

I.1.4.2 Caractéristiques microscopiques

Un échantillon du mycélium aérien a été prélevé superficiellement d'une boite de Petri après trois jours d'incubation à la température ambiante, à l'aide de l'anse de platine. L'échantillon a été ensuite déposé sur une lame de verre, puis une goutte de lactophénol est ajoutée à la préparation et le tout est bien homogénéisé afin d'éviter la formation d'un précipité dense et inobservable. Puis la lame est couverte par une lamelle sans laisser des bulles d'air. Ensuite des observations microscopiques des différentes préparations ont été réalisées sous différents grossissements (Botton *et al.*, 1990). Les observations ont été faites sur la structure et la morphologie des conidiophores, des conidies et des phialides.

I.1.5 Conservation des souches de *Trichoderma*

Une suspension sporale de chaque culture pure de *Trichoderma* a été préparée après raclage des spores en présence d'eau distillée stérile. Après une série de dilutions et étalement sur milieu PDA puis incubation pendant 48h à 28 °C, les conidies germées sont repiquées individuellement sur milieu PDA et incubées pendant une semaine. Les souches obtenues sont cultivées dans des tubes inclinés contenant du PDA et incubées 4 °C jusqu'à utilisation.

I.2 Caractérisation biochimique des souches de *Trichoderma*

La caractérisation biochimique des *Trichoderma* sp. a consisté d'abord à faire un screening des souches possédant la capacité à produire des enzymes (pectinase, protéase, cellulase et chitinase) et de l'Acide Indole Acétique (AIA). Ensuite, une estimation de la quantité d'AIA et d'enzymes produites par les souches présentant un diamètre d'inhibition très important a été effectuée.

I.2.1 Criblage des souches productrices d'enzymes

La sélection des souches de *Trichoderma* productrices d'enzymes a été réalisée sur des milieux solides spécifiques à chacune des 4 enzymes extracellulaires étudiées (cellulase, protéase, pectinase et chitinase).

I.2.1.1 Pectinase

La sélection des souches possédant une activité pectinolytique a été réalisée sur milieu Pectine Agar Medium (PAM). Après 4 jours d'incubation, les boites de Petri ont été inondées avec une solution contenant de l'iodine (1g) et de l'iodine de potassium (5g) dans 330 ml d'eau distillée.

L'apparition d'une zone d'inhibition au revers de la boite de Petri traduit une réaction positive à la production de pectinase (Figure 11).

I.2.1.2 Chitinase

La recherche de l'activité chitinolytique des isolats de *Trichoderma* a été effectuée sur milieu Chitine Agar Medium modifié (Agrawal et Kotasthane, 2012). Après 4 jours d'incubation, une zone d'inhibition autour du mycélium traduit une réaction positive à la production de chitinase (Figure 11). La chitine colloïdale utilisée a été préparée selon la méthode décrite par Roberts and Seletrenikoff, (1988). Pour cela, 175 ml de HCl concentré ont été ajoutés dans un flacon contenant 10 g de chitine commerciale. Après 3h d'incubation la solution a été filtrée puis le filtrat complété à 2 l avec de l'eau distillée. La solution a été ensuite bien mélangée puis laissée au repos pour la formation d'un précipité blanc. Ce dernier a été ensuite recueilli après centrifugation à 1000 tr/min pendant 10 minutes à 4 °C. Une série de lavage a été réalisée sur ce précipité constituant la chitine afin d'aboutir à un pH neutre. La chitine ainsi obtenue est séchée à l'étuve à 50 °C puis conservée au frais jusqu'à utilisation.

I.2.1.3 Cellulase

Pour la recherche de l'activité cellulolytique des souches de *Trichoderma*, le milieu Czapek-Mineral Salt Agar Medium (Hankin et Anagnostakis, 1975) a été utilisé. Après 4 jours d'incubation, une solution d'iodine (1 g) et d'iodine de potassium (5 g) dans 330 ml d'eau distillée a été versée dans chaque boite de Petri. L'apparition d'une zone d'inhibition au revers de la boite de Petri traduit une réaction positive à la production de cellulase (Figure 11).

I.2.1.4 Protéase

La recherche de l'activité protéolytique des souches de *Trichoderma* a été réalisée sur milieu Casein Agar Medium (Vijayaraghavan et Samuel, 2013). Après 4 jours d'incubation, du Bromo Cresol Green dye a été versé au niveau des différentes boites de Petri. L'apparition d'une zone d'inhibition indique une réaction positive à la production de protéase (Figure 11).

I.2.2 Estimation de la production des différentes enzymes

Les 10 souches de *Trichoderma* ayant un diamètre d'inhibition plus important ont été sélectionnées pour l'évaluation de la quantité d'enzyme produite. Les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance avec le logiciel Xlstat (version 2016) à l'aide du test de student Newman Keuls au seuil de 5%.

I.2.2.1 Estimation de la production de pectinase

L'activité pectinolytique a été déterminée en utilisant de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) avec de la pectine comme substrat (Jonaina *et al*., 2010). Les différentes souches de *Trichoderma* ont été inoculées dans des flacons de 250 ml contenant chacun 100 ml du milieu Pectine Both. Après 6 jours d'incubation, le filtrat a été recueilli et utilisé pour l'évaluation de l'activité pectinase. 1 ml d'enzyme brute (filtrat) a été ajouté dans une solution contenant 1 ml de pectine à 1% préparé dans du tampon d'acétate de sodium (0,1 M; pH 5,5). L'ensemble a été incubé à 40 °C dans un bain marie pendant 20 mn. La réaction a été arrêtée par ajout de 3 ml d'une solution d'acide 3, 5- dinitrosalicylique (DNS). Elle a été ensuite chauffée pendant 5 mn puis 1 ml de tartarate de sodium potassium ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) a été ajouté à cette dernière. L'absorbance a été mesurée à 540 nm grâce à un spectrophotomètre. La quantité de pectinase produite par chacune des souches de *Trichoderma* a été ensuite estimée à l'aide d'une courbe standard.

I.2.2.2 Estimation de la production de chitinase

La production de chitinase a été estimée par la méthode décrite par Vyas et Desh Pande, (1989). Après fermentation dans du milieu Chitine Both Medium pendant 6 jours, l'activité enzymatique a été déterminée en incubant 1 ml d'enzyme brute avec 1 ml de chitine colloidale à 1 % dans 0, 05 M d'une solution tampon phosphate à 35 °C pendant 1 h. Après centrifugation, 1 ml d'eau distillée a été ajouté à 1 ml de la solution de départ et chauffé dans un tube de centrifugeuse recouvert de billes de verre pendant 10 minutes. Le surnageant a été recueilli et 0,1 ml de tetraborate de potassium a été ajouté à 0,3 ml de la réaction et chauffé pendant 3 mn dans un bain Marie. Après refroidissement, 3 ml du réactif Dimethyl Amino Benzaldehyde (P-DMAB) ont été enfin ajoutés à la solution. L'absorbance du mélange réactionnel a été déterminée grâce au spectrophotomètre à 585 nm en utilisant comme blanc une solution préparée sans chitine. La quantité de N-Acetyl D-Glucose Amine libérée dans le surnagent a été déterminée en utilisant du N-Acetyl D-Glucosamine comme standard. Une unité (U/ml) de l'activité chitinolytique est définie comme la quantité d'enzyme produite par 1 µmole de N-Acetate glucosamine dans 1 ml de la réaction dans des conditions standard (Mathirannan *et al*., 1998).

I.2.2.3 Estimation production de cellulase

Les différentes souches de *Trichoderma* ont été inoculées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml du milieu Mendel's Salt Both. Les erlenmeyers ont été incubés dans

un agitateur à 30 °C pendant 6 jours. Après incubation, le contenu des erlenmeyers a été filtré et le filtrat centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes a été utilisé comme enzyme brute.
L'activité cellulolytique a été déterminée par la méthode 3-5, dinitrosalicytic acid (DNS) de Miller, (1959). Pour cela 0,5 ml d'une solution de carboxymethyle cellulose (CMC) à 1% contenu dans 0,05 M d'une solution tampon citrate a été ajoutée dans 0,5 ml d'enzyme (filtrat) puis incubée à 50 °C pendant 15 mn. Ensuite, 3 ml du réactif DNS ont été ajoutés à la réaction puis chauffés pendant 5 mn. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 600 nm à partir du spectrophotomètre. L'activité enzymatique de cellulase est exprimée en International Units/ml (U/ml) qui définit la quantité d'enzyme. Une unité d'enzyme est définie par la quantité d'enzyme que libéré 1 µmol de sucre réduite par ml et par minute.

I.2.2.4 Estimation production de protéase.

Les souches sélectionnées ont été d'abord fermentées dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml du milieu Casein Both Medium. Après 6 jours d'incubation, les contenus ont été filtrés avec du papier filtre whatmann N°1 puis les filtrats ont été centrifugés à 8 000 rpm à 4°C pendant 10 mn. Le surnageant recueilli a été utilisé comme source d'enzyme brute (Manczinger *et al*., 2001).
Pour la détermination de l'activité protéolytique, 0,2 ml d'extrait d'enzyme a été mélangé avec 0,5 ml d'une solution de 1% de caséine et 0,3 ml d'un Tampon phosphate (0,2 M ; pH 7) suivi d'une incubation à 30 °C pendant 10 mn. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 ml d'une solution de 10% d'acide trichloroacétique. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 30 °C pendant 30 minutes afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non hydrolysée (Sandhya *et al*., 2005). Par la suite, une filtration est réalisée avec du papier whatman N°1 pour enlever le précipité de caséine non hydrolysé. Une mesure directe de l'absorbance est réalisée à 275 nm. L'activité protéolytique est déterminée par référence à une courbe étalon de la tyrosine comme standard. Une unité (U) de protéase correspond à 1 µg de tyrosine libérée pendant 1h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme (Gajera et Vakharia, 2012).

I.2.3 Screening et estimation de la production d'AIA

La production d'AIA par les différentes souches de *Trichoderma* a été réalisée selon la méthode décrite par Patten et Glick, (2002). Pour cela, 100 µl d'une suspension sporale de chacune des souches ont été inoculés sur milieu PDB supplémenté avec 0,2% du filtrat de L-Trypthophane. L'ensemble a été incubé à 28 °C sous agitation à 120 rmp. Après 7 jours d'incubation, le filtrat obtenu a été centrifugé à 1000 rmp pendant 15 min. 1 ml du surnageant receuilli a été mixé avec

2 ml du réactif de Salkowski (1ml de 0.5M $FeCl_3$ dans 50ml de 35% $HClO_4$) et l'ensemble a été incubé pendant 1h. L'apparition d'une couleur orange est un indicateur de la production d'AIA. L'absorbance a été mesurée à 540 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Vis. La quantité d'AIA produite par chacune des souches de *Trichoderma* a été ensuite estimée à l'aide d'une courbe standard. Cette quantité d'AIA produite a été exprimée en µg/ml (Gordon et Weber, 1951).

I.3 Caractérisation moléculaire des souches de *Trichoderma*

L'identification moléculaire et l'étude de la diversité génétique des souches de *Trichoderma* sélectionnées pour l'estimation de leurs activités enzymatiques ont été faites en se basant sur le séquençage des régions ITS1 et ITS4 et par la RAPD. Pour l'identification moléculaire, les souches ont été envoyées à MACROGEN (Corée du Sud).

I.3.1 Extraction de l'ADN génomique des isolats fongiques

Les différentes souches de *Trichoderma* ont été cultivées sur milieu PDB pendant 3 jours. Ensuite le mycélium a été récolté après filtration avec du papier whatman N°1. L'ADN génomique a été extrait du mycélium fongique avec le protocole de Raeder et Broda, (1985) (**annexe 3**).

I.3.2 Amplification PCR du gène de l'ARNr 18s

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une réaction biochimique catalysée par une enzyme dans laquelle une petite quantité de séquence d'ADN spécifique est amplifiée en de grandes quantités d'ADN linéaire double brin; ceci entre deux séquences connues. Le gène de l'ARNr 18S des *Trichoderma* a été ainsi amplifié en utilisant des amorces (amorces directes et inverses) complémentaires des séquences connues ajoutées à la solution mère d'ADN et placées dans un Thermocycleur. Cette amplification se fait en plusieurs cycles et chaque cycle comprend les étapes suivantes:

- La dénaturation (1 mn à 95 °C) : c'est la phase où les brins d'ADN se séparent pour former des ADN simples brins.
- L'hybridation (1 mn à une température généralement située de 2 degrés en dessous du Tm (température de fusion) le plus faible des deux amorces): cette phase est marquée par la fixation des deux amorces spécifiques. La première se fixe sur l'un des brins d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire. Les sites de reconnaissance des amorces sont choisis pour initier la synthèse d'ADN dans la région d'intérêt pendant l'élongation.

- L'élongation (environ 1 mn 30 s à 72 °C): c'est la phase de synthèse de

l'ADN par l'incorporation de nucléotides grâce à l'ADN polymérase (Taq polymérase) en respectant la règle de complémentarité des bases azotées.

Environ 30 cycles d'amplification de l'ADN ont été effectués et cela a entraîné une très grande amplification de l'ADN. La composition du mélange réactionnel de PCR est la suivante: 100 ng d'ADN fongique, 10X Taq tampon, 10 mM dNTPs, 25 mM de MgCl2, 1U d'ADN polymérase Taq, 1,5 µl d'amorce directe, 1,5 µl d'amorce reverse et de l'eau dé-ionisée pour aboutir à un volume final à 20 µl.

Le programme PCR est le suivant :

Etapes	Température (°C)	Durée
Pré dénaturation	94 °C	2 mn
Dénaturation	94 °C	1 mn
Hybridation	56 °C	1 mn
Elongation	72 °C	1mn 30 s
Extension	72 °C	10 mn
Extension finale	4 °C	-

Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose.

I.3.3 Vérification des produits PCR sur gel d'agarose

Environ 2 µl des produits de PCR ont été chargés sur un gel d'agarose à 1,2% avec une échelle pour confirmer l'amplification du gène de l'ARNr 18S. Pour ce faire, 0,8 g d'agarose a été mélangé avec 100 ml de tampon TBE 1X puis chauffé dans un four à micro-ondes jusqu'à dissolution complète et 1 µl de bromure d'éthidium y a été ajouté. La solution d'agarose a été ensuite versée dans une cuve à électrophorèse en présence d'un peigne approprié. Après la polymérisation du gel, le peigne a été retiré puis la cuve a été immergée avec le gel dans du Tampon TAE 0,5X. Ensuite un mélange constitué de 2 µl de bleu de charge et 2 µl des produits de PCR a été déposé au niveau des puits. Puis la migration a été effectuée pendant une à deux heures à 90 volts après ajout de 5 µl d'un marqueur de poids moléculaire dans l'un des puits dont le rôle est d'étalonner le gel d'agarose.

I.3.4 Purification du produit PCR sur gel d'agarose

La purification du produit de PCR sur gel d'agarose a été effectuée en utilisant la méthode du thiocyanate de guanidine. La bande du produit PCR correspondant à la taille du gène ciblé a été excisée du gel sous fluorescence UV et transférée dans un tube Eppendorf de 2 ml. 500 µl de la

solution de fixation ont été ajoutés et le tout a été incubé à 45 °C pendant 10 minutes. Le mélange a été centrifugé 10.000 tr/min pendant 5 secondes puis transféré dans des mini-colonnes placées dans des tubes collecteurs. 500 µl d'une solution de thiocyanate de guanidine ont été ajoutés au précipité puis l'échantillon a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 secondes et 1 ml de propanol a été ajouté au culot pour lavage. L'échantillon a été de nouveau centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 secondes suivi d'un ajout de 1 ml d'éthanol au culot et d'une nouvelle centrifugation pendant 10 secondes à 10 000 tr/min. Le surnageant a été jeté et le culot a été séché afin d'éliminer toute trace d'éthanol. 50 µl de tampon TE ont été ajoutés et le mélange a été maintenu à 65 °C pendant 10 minutes. L'échantillon a été centrifugé à nouveau à 10 000 tr/min pendant 10 secondes pour obtenir de l'ADN pur. Le surnageant a été pris comme échantillon et chargé sur un gel d'agarose à 1,2 % contre une échelle de 100 pb pour analyser l'ADN.

I.3.5 Séquençage du produit purifié et identification des souches

Le séquençage d'ADN a pour but de déterminer l'ordre des nucléotides dans la séquence. Le séquençage des produits purifiés a été réalisé avec des analyseurs génétiques Applied Biosystems série 3500 en utilisant le kit Big-Dye Terminator et les amorces appropriées suivantes.

Forward Primer- 5'-CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC-3'

Reverse primer- 5'-ACCCCCCTGAGCCAGTCCG-3'

Pour l'identification des souches, leurs séquences nucléotidiques ont été comparées par alignement à l'aide du programmeur BLAST à celles de séquences d'ARNr 18S fongiques disponibles dans la base GENBANK.

I.3.6 Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD)

I.3.6.1 Optimisation de la réaction en chaîne de la polymérase

Le mélange réactionnel utilisé pour la PCR a été optimisé en prenant différentes quantités ou concentrations des différents composants : ADN matrice (25, 50, 75 et 100 ng), ADN polymérase taq (0,5, 1,0 et 1,5 unité) et concentration de $MgCl_2$ (3,5 et 7,5 mM).

Le test d'amplification normalisé était le suivant: 25 ng d'ADN matrice, 0,5 unités de taq ADN polymérase (Genei); 3,5 mM de $MgCl_2$; 100 µl de dNTP (Genei) chacun; 1µm d'amorce (technologie d'opéron), 1X de tampon (Genei) dans un volume de réaction de 25 µl.

I.3.6.2 Sélection des marqueurs

20 marqueurs de 10 pb chacun de la série OPA (technologie Operon) ont été préalablement testés pour l'amplification de l'ADN génomique des isolats. Les marqueurs qui ont donné une meilleure amplification et reproductible ont été utilisés dans l'analyse de la variabilité génétique des souches de *Trichoderma*.

I.3.6.3 Notation des bandes et analyse des données

Chaque produit d'amplification a été considéré comme marqueur RAPD et enregistré dans tous les échantillons. Les données ont été saisies à l'aide d'une matrice dans laquelle toutes les bandes ou tous les caractères observés ont été répertoriés. Une notation a été réalisée pour les produits amplifiés de chaque isolat, en attribuant le caractère «1» à toutes les bandes pouvant être détectées dans le gel et «O» pour l'absence de bande. La matrice de données ainsi générée a été utilisée pour calculer le coefficient de similarité de Jaccard pour chaque comparaison par paire basée sur la proportion de bandes partagées produites par les amorces. Les coefficients ont été calculés en utilisant la formule de Jaccard (1908) :

Coefficient de similarité = a / n

a = nombre de bandes correspondantes pour chaque paire de comparaisons

n = nombre total de bandes observées sur deux échantillons

Les coefficients de similarité ont été soumis à une analyse par groupes de méthodes de moyennes arithmétiques (UPGMA) afin de regrouper les isolats en fonction de leurs similitudes globales. Les paquets SPSS 10.0 ont été utilisés pour l'analyse et la préparation du dendrogramme.

II. Résultats

II.1 Identification des *Trichoderma*

Une collection de 20 isolats de *Trichoderma* (Tableau 4) a été établie à partir des échantillons de sol collectés dans différents sites de la zone des Niayes du Sénégal.

Tableau 4: *Nombre d'isolats de Trichoderma par site*

Site	**souches isolées**
UCAD (jardin botanique)	TU1, TU2, TU3
Sangalkam	TS1, TS2, TS3, TS4
Gorom	TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7
Notto Gouye Diama	TN1, TN2, TN3
Mboro	TM1, TM2, TM3

II.1.1 Caractérisation morphologique

L'identification préliminaire du genre est effectuée par l'analyse des caractères morphologiques (aspects macroscopiques et microscopiques) basés sur la vitesse de croissance de la colonie, la pigmentation et l'aspect du conidiophore, des phialides et des conidies.

Cette analyse a permis de subdiviser la collection des 20 souches de *Trichoderma* en 3 groupes (Figure 10).

- Le groupe 1 : présente une croissance rapide sur milieu PDA avec un mycélium blanchâtre au départ et devenant vert foncé très compact. Ce groupe est constitué par les souches TU1, TU2, TU3, TS1, TS2, TS3, TS4, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TN1, TN2 et TN3. Les souches présentent des conidiophores larges, droites, très ramifiés et ayant une structure pyramidale au sommet. Il porte à leurs extrémités des phialides insérés directement sur l'axe principal du conidiophore formant des angles de 90 °C avec ces derniers. De très nombreuses conidies vert clair de forme arrondie sont aussi observées.
- Le groupe 2 : constitué des souches TG1, TG7 et TM2 présente un mycélium blanchâtre au début puis devient vert clair plus ou moins compact. Ces souches présentent un conidiophore flexueux et très ramifié. Il porte de très nombreuses phialides insérées directement sur l'axe principal du conidiophore à intervalle régulier. Ces phialides ont la forme de quilles ou de bouteilles renflées à la base et portent à leurs extrémités des conides de couleur vert-claire ayant une forme subglobuleuse.
- Le groupe 3 : constitué des 2 souches TM1 et TM3 présentant un mycélium blanchâtre de couleur verdâtre aux extrémités des boites de Petri après 5 à 7 jours d'incubation. Les souches présentent de long conidiophores flexueux avec quelques ramifications secondaires. Des phialides sont insérées sur l'axe principal du conidiophore et formant à ses extrémités une structure pyramidale. Les phialides portent à leurs extrémités des conidies de formes globuleuses

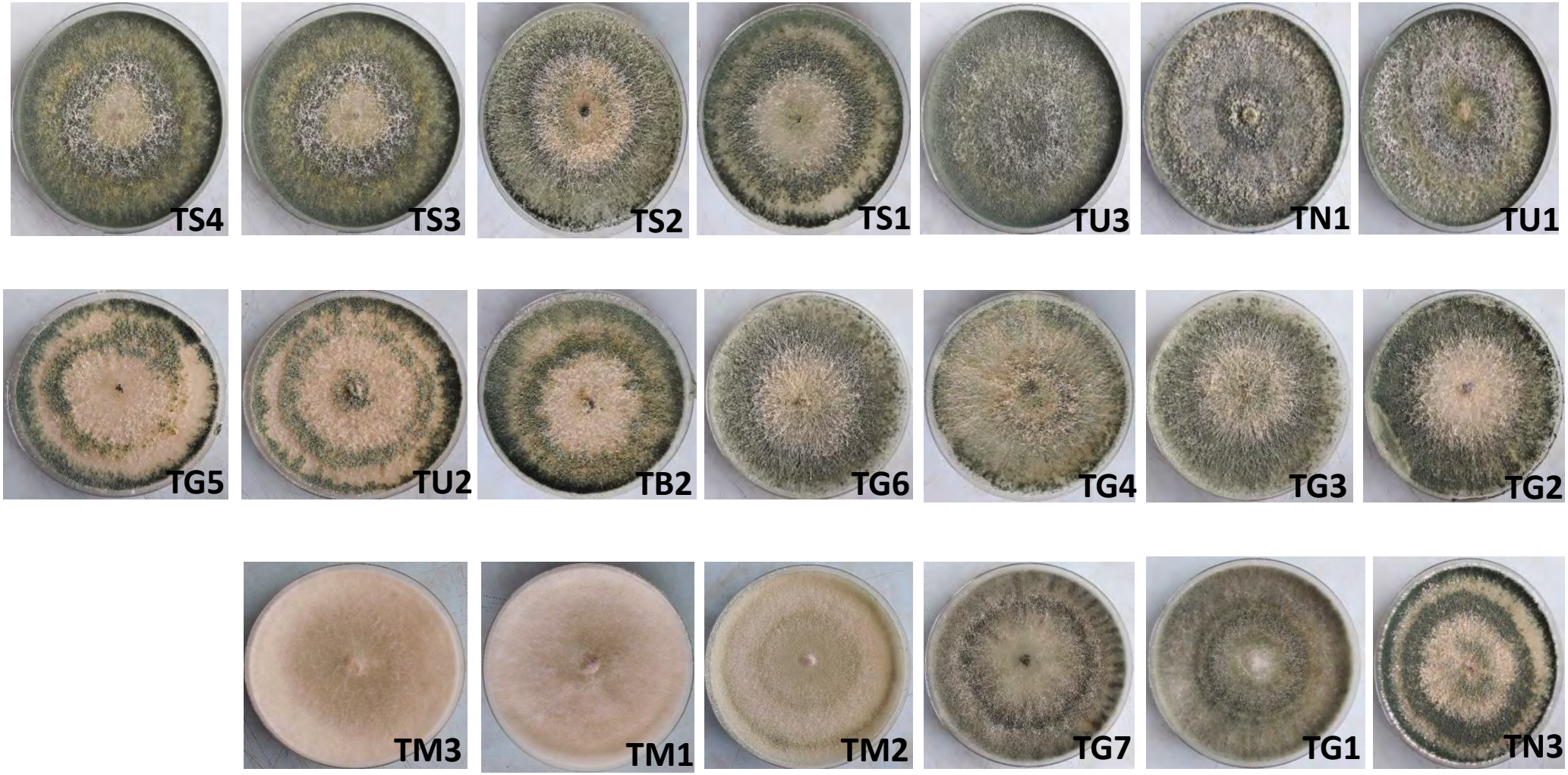


***Figure 10**: Aspect macroscopique des isolats de Trichoderma*

II.1.2 Screening production d'enzyme

Le tableau 5 représente la réaction des différentes souches de *Trichoderma* à la production d'enzyme. Après 5 jours d'incubation, 15 souches ont été positives pour la production de pectinase, 17 souches pour cellulase, 5 souches pour la chitinase et 15 pour la production de protéase. Pour l'activité pectinolytique, 5 souches (TS4, TU2, TN3, TM2, TG7) ont montré un diamètre d'inhibition inférieur à 25 mm et 3 isolats (TM1, TM3, TG4) un diamètre supérieur à 50 mm. Parmi les souches positives à la production de cellulase, 6 isolats (TS1, TG3, TM3, TN1, TS2) ont montré un diamètre d'inhibition supérieur à 50 mm. Concernant le screening pour la production de protéase, 3 souches ont présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 50 mm et 7 avec un diamètre compris entre 25 et 50 mm. Parmi les 5 souches de *Trichoderma* positive à la production de chitinase, les isolats TS1 et TG4 ont présenté un diamètre d'inhibition supérieur 50 mm. L'analyse de ce tableau montre également que 5 isolats (TS1, TG3, TU1, TN1, TG4) ont été positifs à l'ensemble des enzymes testées. En plus de ces 5 souches, 5 autres isolats de *Trichoderma* ont été positifs à la production de pectinase, de cellulase et de protéase en présentant un diamètre d'inhibition supérieur ou égale à 25 mm. L'estimation de la quantité d'enzyme produite a été réalisée sur ces 10 souches puis elles ont été envoyées à MACROGEN (Corée du Sud) pour identification.

***Tableau 5**: Screening de la production d'enzyme par Trichoderma*

Souches de *Trichoderma*	Enzymes			
	Pectinase	**Cellulase**	**Protéase**	**Chitinase**
TS1	++	+++	++	+++
TS4	+	++	-	-
TG6	-	+	-	-
TU2	+	-	+	-
TB2	++	++	++	-
TM1	+++	++	+++	-
TG3	++	+++	++	++
TN3	+	+	-	-
TM3	+++	+++	++	-
TU1	++	++	++	++
TN1	++	+++	+++	++
TG4	+++	++	++	+++
TS2	++	+++	+++	-
TU3	-	++	-	-
TS3	-	+	+	-
TM2	+	++	-	-
TG1	++	+++	++	-
TG2	-	-	+	-
TG5	-	+	-	-
TG7	+	-	+	-

- : absence de production d'enzyme, + : diamètre d'inhibition inférieur à 25mm ; ++ : diamètre d'inhibition comprise entre 25 et 50mm ; +++ : diamètre d'inhibition supérieur à 50mm

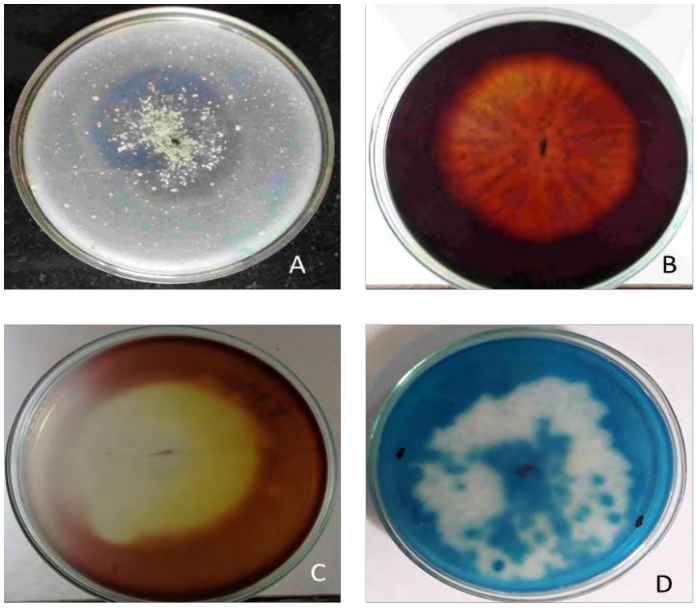


***Figure 11**: Aspect des souches positives : A : positive à chitinase, B : positive à pectinase, C : positive à la cellulase et D : positive à la protéase*

II.1.3 Estimation de la production d'enzyme

L'analyse du tableau 6 montre un effet hautement significatif de la production d'enzyme par les différents isolats de *Trichoderma*. Cette production d'enzyme est variable en fonction des souches.

L'activité pectinolytique par les différentes souches de *Trichoderma* varie entre 0,75 et 2,52 U/ml. Les souches TU1, TM3 et TG4 ont montré les plus importantes activités liée à la production de pectinase avec des valeurs respectives de 2,50; 2,52 et 2,67 U/ml. La souche TG4 présente une activité pectinolytique environ 3 fois plus importante que celles des souches TB2 et TG1 ayant les activités les plus faibles avec des teneurs respectives de 0,75 et 0,80 U/ml. Aucune différence significative n'a été notée pour la production de pectinase par les souches TN1 et TG3 de même que les isolats TS1 et TS2.

La variation de l'activité cellulolytique se trouve entre 0,96 et 3,07 U/ml. Une importante activité de la production de cellulase par toutes les souches de *Trichoderma* a été observée. La souche TN1 montre une plus importante activité cellulolytique suivie des souches TS1, TU1 où aucune différence significative n'a été notée. La plus faible activité cellulolytique a été notée avec la souche de *Trichoderma* TG1 comme pour l'activité pectinolytique.

Les isolats TG4, TS1, TN1 et TM1 ont montré une activité protéolytique très élevée avec respectivement 12,13 U/ml, 11,17 U/ml, 7,01 U/ml et 6,78 U/ml. Les souches TB2 et TG1 présentent les activités protéolytiques les plus faibles.

Pour l'estimation de la production de chitinase, la plus importante activité a été obtenue avec la souche de *Trichoderma* TG3 (3,67 U/ml) suivie de la souche TN1 (3,62 U/ml) où aucune différence significative n'a été notée. De même aucune différence n'a été observée avec les souches TS1 (2,22 U/ml) et TG4 (2,29 U/ml). La souche de *Trichoderma* TU1 présente la plus faible activité chitinolytique.

***Tableau 6**: Quantité d'enzymes produites par les différentes souches de Trichoderma*

Souches de *Trichoderma*	Enzyme (U/ml)			
	Pectinase	**Cellulase**	**Protéase**	**Chitinase**
TS1	1,84cd	**2,84b**	**11,17b**	2,22b
TS2	1,80d	2,54c	4,10e	-
TM1	1,89c	1,05f	**6,78c**	-
TM3	**2,52b**	2,53c	5,82d	-
TG1	0,80f	0,96f	3,85e	-
TG3	1,27e	**2,67c**	5,67d	**3,67a**
TG4	**2,67a**	2,50d	**12,13a**	2,29b
TN1	1,34^{e}	**3,07a**	**7,01c**	**3,62a**
TB2	0,75f	1,78^{e}	3,51f	-
TU1	**2,50b**	**2,78b**	5,91d	1,91c
Ddl	20	20	20	10
F	871,20	307,63	964,08	1059,11
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Newman Keuls au seuil de 5%

II.1.4 Screening et production d'AIA par les isolats de *Trichoderma*

Après 7 jours d'incubation, 8 isolats de *Trichoderma* (TS1, TS2, TB2, TUI, TN1, TM1, TG4, TG1) ont été positifs à la production d'AIA. La variation de cette production d'AIA par les souches de *Trichoderma* se situe entre 50 et 90 µg/ml (Figure 12). La souche TG4 présente la plus importante production d'AIA (90 µg/ml) suivie des souches TS1 (78 µg/ml), TS2 (76µg/ml) et TU1 (72 µg/ml). Les isoltas TS1, TS2 et TU1 n'ont présenté aucune différence significative pour la production d'AIA; de même que les isolats TB2 et TN1. La production d'AIA la plus faible a été observée avec la souche *Trichoderma* TM1 (50 µg/ml).

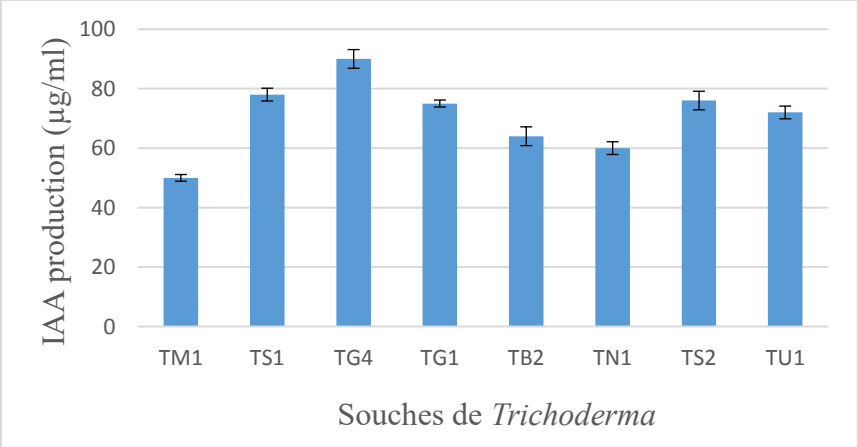


***Figure 12**: Production d'AIA par les souches de Trichoderma*

Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne

II.1.5 Caractérisation moléculaire des isolats de *Trichoderma*

II.1.5.1 Séquençage des régions ITS1 et ITS4

L'identification moléculaire des souches de *Trichoderma* basée sur l'analyse du Blast des séquences des régions ITS1 et ITS4 de l'ADN ribosomique a montré la présence de deux espèces, *Trichoderma asperellum* et *Trichoderma virens* (**annexe 1**). Parmi les 10 souches envoyées 8 isolats ont pu être identifiés dont 7 appartiendraient à l'espèce *Trichoderma asperellum* et une souche à l'espèce *Trichoderma virens.* Le pourcentage d'identité des souches par rapport aux séquences de GENBANK varie entre 99 et 100 % (Tableau 7). Les régions ITS de tous les isolats amplifiés ont donné des amplicons avec des tailles variant entre 500 et 600 pb.

***Tableau** 7: Numéro des accessions des isolats de Trichoderma dans GENBANK*

Isolats	Espèces	Numéro d'accession dans GENBANK	E value	Pourcentage de similarité
TS-1	*Trichoderma asperellum*	KF737410.1	0.0	99
TS-2	*Trichoderma asperellum*	KU896306.1	0.0	100
TB-2	*Trichoderma asperellum*	KU896306.1	0.0	100
TG-1	*Trichoderma virens*	KY225664.1	0.0	100
TG-4	*Trichoderma asperellum*	JN108925.1	0.0	99
TM-1	*Trichoderma asperellum*	KX620957.1	0.0	99
TU-1	*Trichoderma asperellum*	KF737411.1	0.0	99
TN-1	*Trichoderma asperellum*	KY225658.1	0.0	100

II.1.5.2 Analyse de la diversité génétique des souches sélectionnées (RAPD)

L'ADN a été extrait à partir de 9 isolats fongiques (8 souches identifiées + souche TG7 non identifiée) a été purifié, quantifié et stocké à 4°C en petites aliquotes dans de l'eau distillée stérile. L'ADN de chaque isolat a été soumis à une réaction de polymérisation en chaîne en utilisant 10 amorces aléatoires (Operon Technology Inc. USA). Les conditions de PCR ont été optimisées en utilisant différentes concentrations d'ADN matrice, d'ADN polymérase Taq et de $MgCl_2$. Pour la variation de la concentration de l'ADN matrice de 25 ng à 100 ng dans un volume de réaction de 25 µl; 25 ng d'ADN a donné le nombre maximum de bandes reproductibles et a donc été considéré comme idéal et utilisé dans toutes les analyses suivantes. Un dosage de différentes concentrations d'ADN polymérase de Taq et de $MgCl_2$ a montré que 0,5 unité de Taq (ADN polymérase) et 3,5 mM de $MgCl_2$ dans le mélange réactionnel final donnaient des résultats optimaux, reproductibles avec une bonne résolution. Une concentration plus élevée ou plus faible se traduit par une amplification incomplète. Le test d'amplification final contenait 25 ng d'ADN génomique, 0,5 unité d'ADN polymérase (Taq), 100 mM de chacun

des dNTp, 3,5 mM de $MgCl_2$, une amorce 0,6 µM et du tampon 1XTaq dans un volume de réaction de PCR de 25 µl.

L'étude des amorces a été réalisée en utilisant 10 amorces de la série OPA d'Operan technology Inc., USA. Après le criblage des 10 amorces, 5 ont donné des produits d'amplification sous-optimaux ou non-distincts. Par conséquent, elles ont été rejetées et les 5 restantes ont été utilisées pour l'amplification par PCR et ont donné des bandes reproductibles et évaluables avec un pourcentage élevé de polymorphisme. Ainsi, l'analyse numérique finale comprenait un nombre total de 32 bandes avec 98,2% de polymorphisme résultant de l'amplification par les 5 marqueurs.

Les profils RAPD de 9 isolats fongiques ont été comparés individuellement pour chaque amorce puis une analyse plus approfondie a été réalisée. Ces profils ont été comparés séparément pour découvrir les différences entre eux par l'apparition de bandes polymorphes. L'amplification par PCR avec ces amorces a été faite deux fois avant de valider la présence ou l'absence de chaque bande. L'amplification par PCR de l'ADN isolé à partir des 9 isolats fongiques a donné un total de 32 produits amplifiés, dont 28 étaient polymorphes et 4 étaient monomorphes (Tableau 8).

- **Pouvoir discriminatoire des amorces**:

Les valeurs du pouvoir de discrimination (%) calculées pour chaque marqueur sont présentées dans le tableau 8. Les cinq marqueurs, OPA 3, OPA5, OPA 7 et OPA 13 ont produit un pouvoir de discrimination de 100% tandis que OPA 15 à un pouvoir de discrimination de 53 %.

Tableau 8: *Liste des primers avec leurs séquences et le pourcentage de polymorphisme*

S. No	Primers	Séquences des primers	Nombre Total de bandes Polymorphiques	Nombre Total de bandes	Pourcentage de polymorphisme
1	**OPA 3**	5^1AGTCAGCCAC3^1	6	7	100.00%
2	**OPA 5**	5^1AGGGGTCTTG3^1	7	7	100.00%
3	**OPA 7**	5^1GAAACGGGTG3^1	5	7	100.00%
4	**OPA 13**	5^1CAGCACCCAC3^1	7	8	100.00%
5	**OPA 15**	5^1TTCCGAACCC3^1	3	3	53.00%
Pourcentage Total de polymorphisme	**-**	**-**	**28**	**32**	**98.2%**

- **Relation génétique entre les souches de *Trichoderma***

Les données des marqueurs RAPD à partir des 9 isolats fongiques avec les 5 marqueurs reproductibles ont été utilisées pour calculer les coefficients de similarité. L'analyse du dendrogramme (Figure 14) a montré que les isolats fongiques étaient généralement classés en groupes. Ainsi, les 9 souches de *Trichoderma* ont été regroupées en un seul groupe majeur subdivisé en 4 sous-groupes. Ainsi, la première séparation entre TG7 et le groupe formé par toutes les autres souches indique un pourcentage de similarité 77 %. Une valeur de similarité de 83% a été aussi observée entre 3 isolats fongiques à savoir TB2, TS1 et TS2. Un autre groupe constitué des souches TM1, TN1 et TU1 indique une valeur de similarité de 82% suivi de TG4 et TG1 avec 89% de similarité.

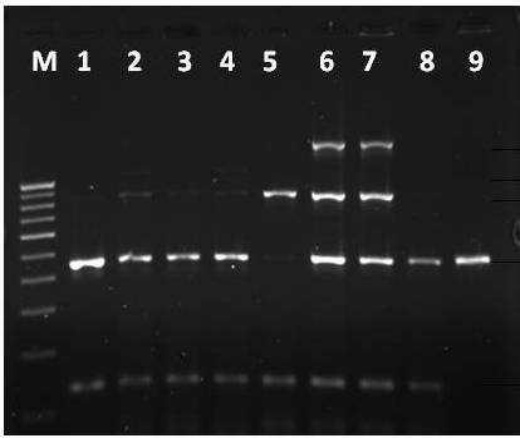


***Figure 13**: Profil RAPD amplifié avec le marqueur OPA 15 : M : marqueur moleculaire ; 1 : TG4, 2 : TG1 ; 3 : TM1 ; 4 : TN1 ; 5 : TU1 ; 6 : TS1 ; 7 : TS2 ; 8 : TB2 ; 9 : TG7*

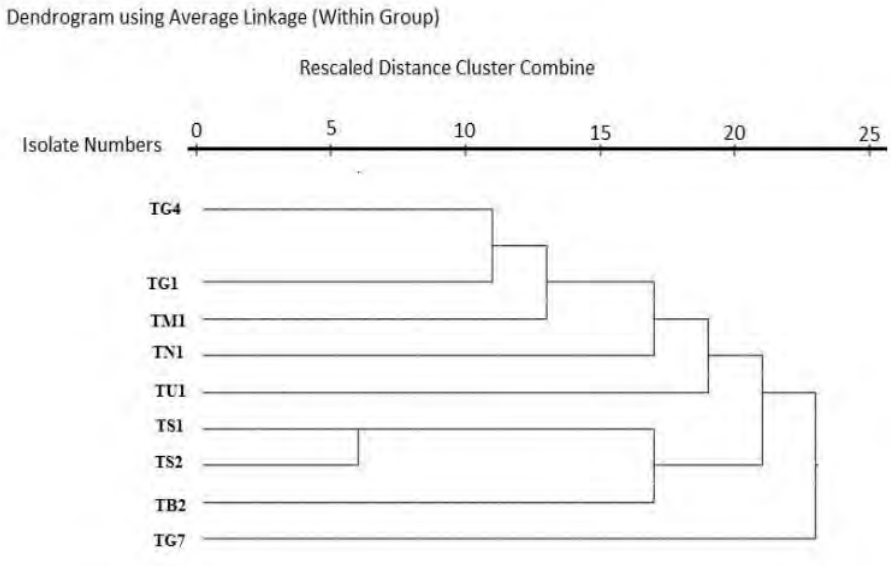


***Figure 14**: Dendrogramme montrant la relation entre les Trichoderma basée sur le profil RAPD*

III. Discussion

III.1 Caractérisation morphologique

Vingt souches de *Trichoderma* ont été isolées à partir de la rhizosphère de tomate de différents sites de la zone des Niayes. Une variabilité du nombre de souche en fonction des différents sites a été observée. Le plus grand nombre de souche a été observé au niveau du site de Gorom avec 7 isolats de *Trichoderma*. Au plan morphologique, les isolats ont été regroupés en trois groupes basés sur l'aspect du mycélium aérien. Le groupe 1 est constitué de souches à croissance rapide et d'un mycélium verdâtre très compact et d'un long condiophore très ramifié avec des phialides insérés directement sur l'axe principale du conidiophore. Le groupe 2 renferme des souches avec un mycélium vert clair légèrement compact et des condiophores flexueux avec des phialides portant à leurs extrémités des conidies vert clair de forme globuleuse. Le groupe 3 est constitué de souches à croissance rapide avec un mycélium cotonneux et des phialides insérées sur l'axe principal du conidiophore. Les résultats obtenus montrent que nos sols d'étude renferment des champignons imparfaits caractéristiques des *Trichoderma*. Ceci confirme le caractère ubiquiste décrit dans la littérature (Domsch *et al.,* 1980; Danielson et Davey*,* 1973). Le nombre de souche isolé confirme l'influence des propriétés physico chimiques sur la biologie des *Trichoderma.* En effet, leur répartition et leur abondance varient en fonction des localisations géographiques, du type de sol, du mode d'utilisation des terres (Domsch *et al.,* 1980; Muya *et al*, 2005; Garbeva *et al.,* 2004) et des techniques et milieux d'isolement (Okoth *et al.,* 2009). Hinde *et al*., (2009) ont montré que les *Trichoderma* sont plus abondants dans les milieux riches en matières organiques, à faible teneur en éléments nutritifs en particulier en phosphore et faiblement minéralisés.

L'observation des caractéristiques macroscopiques (colonies à croissance rapide sous forme de cercles concentriques réguliers, légèrement floconneuses ou compactées en touffes, à surface lisse, translucide ou blanc aqueux, de couleurs variant du vert foncé au jaunâtre ou jaune) et microscopiques (mycélium constitué d'hyphes ramifiées à parois lisses et hyalines portant des conidiospores de formes pyramidales et des phialides en forme de flasques ou de quilles portant à leurs extrémités des phialospores de formes ellipsoïdales) confirme les caractéristiques typiques des *Trichoderma* décrites par Nagamani *et al*., (2006) et Samuels *et al*., (2004). Ces caractéristiques taxonomiques sont aussi en accord avec celles obtenues par Bissett, (1984) et Cournut, (1984).

III.2 Caractérisation biochimique

Un screening a été réalisé sur les différentes souches de *Trichoderma* pour la production d'enzymes telles que les pectinases, les cellulases, les protéases et les chitinases. Les isolats ont été regroupés en fonction du diamètre d'inhibition. Après screening, une estimation de la quantité d'enzyme produite par les différentes souches de *Trichoderma* a été réalisée en utilisant des milieux spécifiques pour chacune des enzymes extracellulaires étudiées. Les résultats montrent que 15 souches ont été positives pour la production de pectinase, 17 souches pour cellulase, 5 souches pour la chitinase et 15 pour la production de protéase. Concernant l'estimation de la production de chacune des enzymes extracellulaires étudiées, nos résultats ont montré une variabilité en fonction des souches de *Trichoderma*. Cette variation de la production d'enzyme en fonction des souches de *Trichoderma* a été aussi rapportée par Satyavani and Satyaprasad, (2009) en utilisant différentes souches de *Trichoderma* (*T. harzianum, T.viride1, Tv2* and *Tv3*) pour la production de chitinase et de β-1, 3 glucanase. De même, Gajera *et al.,* (2012) ont montré une variabilité de la production de 4 enzymes extracellulaires avec différentes souches de *Trichoderma* en utilisant des cellules du pathogène *Macrophomina phaseolina* comme substrat.

Pour l'estimation de l'activité pectinolytique, les souches de *Trichoderma* TM3, TG4 et TU1 ont montré une activité élevée de la production de pectinase. Ces enzymes extracellulaires produites par les champignons dont *Trichoderma* peuvent entrainer la décomposition de la matière organique. En effet les *Trichoderma* produisent ces enzymes pour décomposer la lamelle moyenne des plantes afin d'extraire les nutriments des tissus végétaux et d'insérer des hyphes fongiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Claudia *et al*., (1997) qui ont démontré les capacités de lutte biologique des *Trichoderma* spp. contre *Aspergillus* et *Fusarium moniliforme* par la libération d'enzymes extracellulaires telles que les pectinases.

Les espèces de *Trichoderma* sont des producteurs bien connus de protéase. Les souches TS1, TM1, TG4 et TN1 ont montré une activité de protéase très élevée, tandis que les isolats TB2, TS2 et TG1 ont montré une faible activité de cette enzyme. Il a été démontré que l'activité protéolytique de *Trichoderma viride* était impliquée dans le contrôle biologique de la sclérotiniose. La sérine protéase produite par *Trichoderma harzanium* a joué un rôle important dans le mycoparasitisme des pathogènes des plantes (Geremia *et al*., 1993). La paroi cellulaire fongique filamenteuse contient également des lipides et des protéines (Hunsley *et al*., 1970). Les protéases permettent la dégradation des parois cellulaires des pathogènes et les protéines libérées par la lyse, rendent ainsi les nutriments disponibles pour la mycoparasite (Goldman *et*

al., 1994). La lutte biologique contre *Botrytis cinerea* par *T. harzianum* a été attribuée à l'action des protéases produites par l'agent de lutte biologique qui inactivent les enzymes hydrolytiques produites par le pathogène (Howell, 2003; Kapat *et al*., 1998). Les protéases fongiques jouent un rôle important dans les lyses des parois cellulaires en catalysant le clivage des liaisons peptidiques dans les protéines (Mata et *al*., 2001). Les protéases sécrétées par *T. harzianum* ont été efficaces pour réduire la sévérité de la maladie des taches brunes et la sporulation des pathogènes sur les feuilles de féveroles inoculées avec *Botrytis fabae* (Haggag *et al*., 2006).

Les souches TG3 et TN1 ont montré une activité chitinase très élevée. Les chitinases sont des protéines PR qui hydrolysent la chitine, un composant majeur de la paroi cellulaire de 3 à 10% des champignons supérieurs. La chitinase établit une liaison entre C1 et C4 de deux N-acétyl glucosamine consécutives (GlcNAc) soit par des mécanismes endolytiques ou exolytiques. Un grand nombre de chitinases végétales a été purifié et caractérisé comme étant des endochitinases avec des poids moléculaires allant de 25 à 36 KDa. La relation entre les enzymes mycolytiques, les chitinases et les β-1,3 glucanase produites par les champignons mycoparasites, leur importance dans la lyse et la dégradation des parois cellulaires fongiques ont été bien établies (Elad *et al*., 1983). La dégradation complète des parois mycéliennes des champignons pathogènes dépend en grande partie de la chitinolyse et par conséquent, la capacité de dégradation de la chitine par *Trichoderma* spp. prend une plus grande importance dans le processus antagoniste que les autres mécanismes/enzymes impliqués dans le processus. Benitez *et al*., (2004) ont démontré que les souches de *Trichoderma* qui produisent plus de chitinases se sont révélées être des agents de lutte biologique efficaces contre divers pathogènes. Comme le squelette des parois cellulaires pathogènes contient de la chitine, du glucane et des protéines, les enzymes qui hydrolysent ces composants doivent être présents chez un antagoniste efficace pour jouer un rôle significatif dans la lyse de la paroi cellulaire du pathogène. Il est bien documenté que les chitinases et les glucanases jouent un rôle clé dans l'activité mycolytique de *Trichoderma* spp. contre plusieurs pathogènes fongiques (Elad *et al*., 1982). Le rôle possible des enzymes chitinolytiques dans le contrôle biologique est soutenu par le travail de Lorito *et al*., (1998) qui ont transféré le gène codant l'endochitinase de *T. harzianum* dans le tabac et la pomme de terre et ont obtenu un haut niveau de résistance contre de nombreux pathogènes végétaux.

Les isolats TS1, TG3, TN1 et TU1 ont montré une activité cellulolytique très importante tandis que les souches TG1, TB2 et TM1 ont montré une faible production de cellulase. Le milieu spécifique a favorisé la croissance des *Trichoderma* en utilisant la cellulose comme source de carbone (Khalid *et al*., 2006). L'apparition de la zone claire autour de la colonie après l'addition

de la solution d'iodine et d'iodine de potassium était une preuve évidente de la sécrétion des enzymes cellulases. Les espèces de *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique potentiels et de puissants producteurs de cellulases (Papavizas, 1985). Baker, (1991) a trouvé une corrélation parfaite entre l'augmentation de la production de cellulase et la compétence rhizosphèrique par des mutants de *Trichoderma*. Il est suggéré que les mutants utilisent le mucigel sur les racines comme substrat. Les mutants possédant une compétence rhizosphèrique étaient des agents de lutte biologique plus efficaces et induisaient des réponses de croissance accrues du traitement des semences que les parents non irradiés (Cuevas *et al*., 1994). Les cellulases font partie des enzymes responsables du clivage des liaisons β-1,4-glycosidiques dans la cellulose. Les cellulases et les β-1,3-glucanases sont les deux enzymes qui jouent un rôle important dans la dégradation enzymatique des parois cellulaires des champignons phytopathogènes tels que *Pythium ultimum* au cours de l'interaction mycoparasitaire (Kamala et Indira, 2014). Benhamou et Chet, (1997) ont rapporté que de grandes quantités d'enzymes cellulolytique sont produites et jouent un rôle clé dans la rupture des parois cellulaires hôtes au niveau des sites de tentative de pénétration de *Trichoderma* dans les parois cellulaires des pathogènes. Vinit Kumar Mishra, (2010) a observé une souche de *T. viride* qui présentait une activité de cellulase élevée (3,6 U/ml) s'est avéré inhiber la croissance mycélienne de *Pythium aphanidermatum*.

Parmi les 20 isoltas de *Trichoderma* testés, 8 souches ont été positives à la production d'AIA. Une varaition de la quantité d'AIA produite en fonction des isolats de *Trichoderma* a été également notée. La souche TG4 a montré une production d'AIA plus importante (90 µg/ml). La capacité des *Trichoderma* à produire de l'AIA a été aussi rapportée par Nieto-Jacobo *et al.,* (2017). Comparativement à nos résultats, Kumar *et al*., (2017) de même que Wesam et *al*., (2017) ont obtenu une production d'AIA plus importante en utilisant respectivement des isolats de *Trichoderma viride* et de *Trichoderma harzanium.* Contrairement à Gravel *et al*., (2007) qui ont obtenu une production d'AIA très faible (6,2 µg/ml) par des souches de *Trichoderma atroviride*. Les hormones telles que l'AIA produites par les *Trichoderma* étaient impliquées dans l'amélioration de croissance des racines et du développement des plantes (Harman *et al*., 2004; Gravel *et al*., 2007; Shayakhmetov, 2001) mais aussi dans la modification du mécanisme de défense des plantes (Fu *et al*., 2015).

III.3 Caractérisation moléculaire des isolats de *Trichoderma*

Après isolement et caractérisation biochimique des souches de *Trichoderma*, 10 isolats ont été envoyés à MACROGEN (Corée du Sud) pour une identification basée sur le séquençage des régions ITS1 et ITS4. Ensuite une étude de la diversité génétique par RAPD a été réalisée sur les souches identifiées. Parmi les 10 souches envoyées, 8 ont été identifiées dont 7 appartiendraient à l'espèce *Trichoderma asperellum* et une souche à l'espèce *Trichoderma virens*. Le pourcentage d'identité des souches par rapport aux séquences de GENBANK varie entre 99 et 100% et les régions ITS de tous les isolats amplifiés ont donné des amplicons avec des tailles variant entre 500 et 600 pb. Des résultats similaires ont été obtenu par plusieurs auteurs dont Monirul Islam, (2016) qui a isolé 30 souches de *Trichoderma* à partir de différentes zones du Bengladesh et a noté la présence de 3 espèces dont 14 souches appartenant à l'espèce *Trichoderma asperellum*, 3 à *Trichoderma virens* et 3 à *Trichoderma harzanium*. Gherbawy *et al.*, (2004) ont obtenu seulement deux espèces de *Trichoderma* dans un total de 23 souches. Kullnig *et al*., (2000) ont isolé 76 isolats à partir de la Russie, du Népal et du nord de l'Inde et ont signalé la présence de 7 espèces (*T. asperellum, T.atroviride, T. ghanense, T. hamatum, T. harzianum, T. virens* et *T. oblongisporum*). De même, Migheli *et al*., (2009) ont isolé 482 souches et seules 14 espèces ont pu être identifiées dans 15 sols différents de l'île de Sardaigne.

L'identification génétique des *Trichoderma* basée sur le séquençage des régions ITS n'a pas permis une différenciation claire des espèces de *Trichoderma*. Cela peut être dû à un phénomène de variation parmi les isolats, à un faible rapport de transition / transversion et à une divergence évolutive. Un résultat similaire a été rapporté par Hoyos-Carvajal *et al*., (2009) qui ont suggéré que l'ADNr de la région ITS ne pouvait pas différencier certaines espèces en raison de la présence de copies non orthologues de la région ITS dans certains isolats de *Trichoderma*.

Pour l'étude de la diversité génétique par RAPD, 10 primers de la série OPA ont été utilisés dont 5 ont donné des résultats montrant des bandes claires et reproductibles. L'amplification par PCR de l'ADN isolé à partir des 9 isolats fongiques a donné un total de 32 produits amplifiés, dont 28 polymorphes et 4 monomorphes. Concernant le pouvoir discriminatoire des marqueurs utilisées, OPA 3, OPA 5, OPA 7 et OPA 13 ont donné un pouvoir de discrimination de 100% tandis que OPA 15 à un pouvoir de discrimination de 53 %. Une valeur de similarité de 83% a été observée entre les isolats fongiques TB2, TS1 et TS2 ; 89% entre TG1 et TG4 puis 82%, entre TM1, TN1 et TU1.

Zimand et *al.,* (1994) ont utilisé 9 marqueurs RAPD pour identifier 10 souches de *Trichoderma harzianum* présentant des similitudes. Ainsi, il a été possible de distinguer l'isolat T-39, utilisé commercialement comme agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea*. Pour une sélection des souches de *Trichoderma* à des fins taxonomiques, Fujimori et Okuda, (1993) ont examiné les profils RAPD de 74 souches et les résultats étaient conformes aux données morphologiques, physiologiques et écologiques de ces souches. Ce qui suggère que la technique peut aider à éliminer les souches dupliquées dans un programme de sélection microbienne. En utilisant la technique du RAPD, Schlick *et al*., (1994) ont analysé des souches de *T. harzianum* et des mutants induits par le rayonnement gamma pour différencier toutes les souches des mutants avec au moins une amorce. Plus récemment, Gopal *et al*., (2008) ont étudié les marqueurs RAPD pour estimer la variabilité génétique entre 17 isolats de *Trichoderma* et ont trouvé une similarité avec 91,8% de polymorphisme.

La technique RAPD a révélé un certain degré de polymorphisme pour l'étude de variation de 35 isolats de *Trichoderma* et les résultats obtenus ont montré une variation moléculaire significative entre les isolats par rapport aux caractères morphologiques. Chakraborty *et al*., (2010) aussi ont trouvé la variabilité génétique par RAPD entre 19 isolats de *T. viride* et *T. harzianum* obtenus à partir de sol rhizosphérique de plantation, de sol forestier et des champs agricoles du nord du Bengale. De même Gurumurthy *et al*., (2013) ont étudié la variation génétique par RAPD des isolats de *Trichoderma* en utilisant un ensemble de 20 amorces et ont trouvé 12 amorces montrant une variabilité génétique entre différentes souches isolées des champs de pois chiches (*Cicer arietinum*) de l'Uttar Pradesh. L'étude de la variabilité génétique entre des isolats de *Trichoderma atroviride*, par Mukesh *et al*., (2014) a montré la présence de 74 bandes amplifiées dont 65 étaient polymorphes et 19 étaient monomorphes. D'un autre côté, Chandulal et *al*., (2016) ont analysé la diversité génétique de 10 isolats de *Trichoderma* sp. obtenus à partir du sol de la rhizosphère des champs de tomate en utilisant 5 marqueurs RAPD et ont obtenu un pourcentage de polymorphisme variant entre 60,00% et 83,33% avec une variabilité intra et interspécifique parmi les isolats de *Trichoderma* examinés.

Pour l'étude de la variabilité génétique de 30 isolats de *Trichoderma asperellum*, El_Komy *et al*., (2015) ont utilisés 20 marqueurs dont 8 ont donné un niveau de polymorphisme variant entre 65 et 100%. Le niveau élevé de variation génétique obtenu par RAPD peut être dû à un phénomène de recombinaison qui pourrait se produire au cours du stade de reproduction des champignons (Chaverri *et al*., 2003; Sharma *et al*., 2009). Les marqueurs RAPD sont un outil puissant pour l'identification des *Trichoderma* car ils permettent de déceler le niveau de similarité entre les différentes souches obtenues. Par conséquent, ils peuvent être utilisés pour

éliminer des isolats en double et également surveiller la stabilité génétique des isolats de *Trichoderma* antagonistes (Avis *et al*., 2001). La technique RAPD a plusieurs avantages par rapport aux autres techniques moléculaires car elle est plus simple et nécessite de très petites quantités d'ADN radioactives En outre, il existe une grande variété d'amorces disponibles, ce qui augmente la possibilité de détecter le polymorphisme de l'ADN pour des souches très proches.

Conclusion

La présente étude a attesté de la présence des souches de *Trichoderma* au niveau de la rhizosphère des plants de tomate. Au total, 20 souches de *Trichoderma* ont été isolées à partir de différents sites de la zone des Niayes dont 3 au jardin botanique de l'UCAD, 4 à Sangalkam, 7 à Gorom, 3 à Notto Gouye Diama et 3 au niveau de la zone de Mboro. L'identification de ces souches au plan morphologique a donné trois grands groupes. Pour l'estimation de la production d'enzymes lytiques, les souches TG3, TS1, TG4, TN1 et TU1 ont montré une bonne activité enzymatique. Seuls 8 isolats ont été positfs au test de la production d'AIA. Ensuite, ces 8 souches de *Trichoderma* ont été identifiées en se basant sur le séquençage des régions IT1 et IT4 dont 7 appartenant à l'espèce *Trichoderma asperellum* et 1 à *Trichoderma virens*. L'analyse de la diversité génétique de ces isolats par RAPD en utilisant 5 primers a révélé un pourcentage de polymorphisme élevé (98.2%**).** Une combinaison de caractéristiques morphologiques, moléculaires et biochimiques est donc importante pour une identification précise des *Trichoderma* spp. Cette approche permet aussi de mieux comprendre leur rôle écologique dans la rhizosphère et leur utilisation comme agent de lutte biologique contre les pathogènes des cultures.

CHAPITRE 3 :

Influence *in vitro* de divers facteurs abiotiques (milieux de culture, T°, pH, salinité, source de carbone et d'azote) sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* sp.

Une partie de ce chapitre à fait l'objet d'une publication (**Annexe 4**) et de présentation sous forme de poster lors de la 3 eme journée du LAPSE, 1-2 Avril 2015, UCAD2, Dakar, Sénégal et des doctoriales de l'Ecole doctorale SEV, 8-9 Décembre 2015 (**Annexe 5**).

Ndiogou Gueye, Mame Arama FALL Ndiaye, Bathie SARR, Dieynaba SALL SY, Tahir A. DIOP. 2016. Influence *in vitro* de différents facteurs abiotiques (°T, pH, salinité) sur la croissance mycélienne de trois souches locales de *Trichoderma* sp. *Int. J. Biol. Chem. Sci*. 10(2): 769-778.

Chapitre 3 : Influence *in vitro* de divers facteurs abiotiques (milieux de culture, T°, pH, salinité, source de carbone et d'azote) sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* sp.

Introduction

Au Sénégal, les champignons pathogènes causent d'importantes pertes de rendements dans le domaine des cultures maraîchères. Les méthodes conventionnelles utilisées pour lutter contre ces pathogènes sont basées sur l'utilisation abusive de produits chimiques nuisibles à l'environnement. Afin de pallier à ces pratiques néfastes sur la durabilité de la fertilité des sols, les champignons antagonistes du genre *Trichoderma* peuvent être utilisés pour lutter contre ces pathogènes et réduire l'utilisation des pesticides. Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies racinaires et aériennes des plantes mais aussi pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols (Singh *et al*., 2014; Kamala et Indira Devi, 2012). La présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman et *al*., 2004; Singh *et al*., 2007). Les sols inoculés par ces champignons protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation (Harman, 2000; Mouria *et al*., 2007). En effet, diverses souches de *Trichoderma* secrètent de multiples enzymes, antibiotiques et hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes. Grâce à leurs nombreuses propriétés antagonistes vis-à-vis des champignons pathogènes (antibiose, mycoparasitisme, compétition), l'utilisation de ces microorganismes peut permettre une réduction de l'utilisation abusive des traitements chimiques pour une agriculture durable. Cependant, l'efficacité de ces agents de lutte biologique dont *Trichoderma* est parfois limitée par certaines contraintes environnementales qui limitent leur croissance (Betina et Farkas, 1998; Kubicek- Pranz, 1998). Les facteurs physico-chimiques qui agissent sur l'efficacité et la répartition des *Trichoderma* dans le sol sont: le pH, la température, la teneur en sel, en matière organique et la présence ou l'absence d'autres micro-organismes dans le sol (Landreau, 2001; Monika *et al*., 2016; Montoya-Gonzalez *et al*., 2016). La connaissance de ces facteurs environnementaux peut mener à une meilleure compréhension de la dynamique des populations de *Trichoderma* dans le sol. Ainsi, des études *in vitro* sur les facteurs affectant la croissance et la sporulation de *Trichoderma* sont nécessaires pour bien maitriser la technologie de production à grande échelle de la biomasse à des fins de lutte biologique. Plusieurs auteurs dont Harman *et al.*, (1991), Mehta *et al*., (2012), Rajput *et al*., (2014), Rajput et Shahzad, (2015) ont étudié les effets des facteurs environnementaux tels que les sources de carbone et d'azote, le pH et la

température sur la production et la viabilité des spores de certaines souches de *Trichoderma*. Cependant, pour des souches nouvelles ou locales, ces effets devraient être étudiés parce que chaque souche a ses propres caractéristiques et réponses à ces différents facteurs (Rai et Tewari, 2016). L'utilisation de ces champignons exige donc une bonne connaissance de l'écologie des souches et de leurs différents mécanismes d'action.

Ainsi, l'objectif général de cette étude a été d'évaluer *in vitro* l'effet de facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de huit isolats de *Trichoderma* sp. en vue de leur utilisation dans des itinéraires techniques agricoles. Les objectifs specifiques consistent à déterminer le milieu de culture le plus favorable pour les *Trichoderma* sp. puis d'évaluer l'effet des facteurs abiotiques (pH, T°, salinité, source de carbone et d'azote) sur la croissance mycélienne de ces souches.

I. Matériels et Méthodes

I.1 Matériel fongique

L'effet des différents facteurs abiotiques sur la croissance des *Trichoderma* a été réalisé avec les 8 souches de *Trichoderma* qui ont été sélectionnées et identifiées comme *Trichoderma asperellum* TS1-KF737410.1, TS2-KU896306.1, TB2-KU896306.1, TN1-KY225658.1, TU1-KF737411.1, TG4-JN108925.1 et TM1-KX620957.1 et de la souche de *Trichoderma virens* TG1-KY225664.1.

I.2 Effet des milieux de culture

Quatre milieux de cultures de compositions chimiques différentes ont été testés: Patato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Sabouraud (SB) et Czapek Dox (Dox).

Les différents milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 mn puis coulés dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre. Après solidification sous la hotte, un disque mycélien de 8 millimètres (mm) de diamètre provenant d'une culture pure de chacune des souches de *Trichoderma* a été déposé au centre de chaque boite de Petri. Pour chaque milieu de culture, trois boites de Petri ont été inoculées avec les huit isolats de *Trichoderma*. Les boites ainsi ensemencées ont été incubées à la température ambiante.

I.3 Effet de la température d'incubation

L'étude de l'effet de la température d'incubation sur les différentes souches de *Trichoderma* a porté sur les paramètres de croissance. Cinq températures d'incubation

différentes ont été choisies: 20, 25, 30, 35 et 40°C. Le milieu de culture PDA a été utilisé pour cette étude et un disque mycélien de 8 mm de diamètre de chaque souche de *Trichoderma* a été déposé au centre des boites de Petri. Pour chaque température d'incubation, trois répétitions ont été effectuées.

I.4 Effet du pH

L'effet du pH sur la croissance des *Trichoderma* a été étudié sur milieu liquide Patato Dextrose Both (PDB). Ainsi quatre pH différents ont été étudiés: 3, 5, 7 et 9. Après préparation du milieu, les différents pH ont été ajustés par ajout de NaOH ou de HCl (1 M). Les milieux ont été mis dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de milieu avec les différents pH. Après stérilisation chaque flacon a été inoculé avec une pastille de 8 mm de diamètre prélevé à partir de chacune des souches de *Trichoderma*. Pour chaque isolat de *Trichoderma* et pH, trois erlenmeyers ont été inoculés.

I.5 Effet du NaCl

Afin de déterminer l'effet de la salinité sur la croissance des différentes souches de *Trichoderma*, cinq concentrations de NaCl ont été utilisées : 0%, 2%, 4%, 5% et 6%. Ces concentrations ont été ajoutées au milieu PDA et l'ensemble a été autoclavé à 121°C pendant 20 mn. Le milieu a été ensuite coulé dans des boites de Petri et solidifié sous la hotte. Une pastille de 8 mm de diamètre de chaque souche de *Trichoderma* a été déposée au centre de la boite de Petri contenant le milieu de culture. Trois boites ont été ensemencées pour chaque souche et pour chaque concentration de NaCl.

I.6 Effet de la source de carbone

Quatre sources de carbone ont été utilisées pour étudier leurs effets sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*: dextrose, sucrose, mannitol et amidon. Les différentes sources de carbone ont été ajoutées au milieu PDA à raison de 20g/l. Les boites ont été inoculées avec des explants mycéliens de 8 mm de diamètre de chacune des souches de *Trichoderma* après stérilisation et coulage des milieux dans les boites de Petri.

I.7 Effet de la source d'azote

Cinq sources d'azote différentes ont été utilisées pour étudier leur effet sur la croissance mycélienne des huit souches de *Trichoderma* sélectionnées: nitrate de sodium ($NaNO_3$), sulfate

d'ammonium (NH_2SO_4), nitrate de potassium (KNO_3), urée (CH_4N_2O) et de la glycine ($C_2H_5NO_2$). Les différentes sources d'azote ont été ajoutées au milieu Czapek Dox Agar Medium à raison de 10g/l, stérilisées à l'autoclave à 120 °C pendant 20 mn et coulées dans boites de Petri stériles de 90 mm de diamètre.

I.8 Paramètres mesurés

Pour chacun des paramètres (milieu de culture, température, salinité, source de carbone et d'azote), l'évolution de la croissance mycélienne a été évaluée quotidiennement par la mesure des diamètres perpendiculaires de chaque colonie (Botton *et al*., 1990). Pour l'effet du pH sur la croissance des *Trichoderma*, la biomasse mycélienne a été évaluée après six jours de culture.

I.9 Analyse statistique

Les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel Xlstat 2016 (version 4.07 addinsoft). Le test de Fischer LSD au seuil de 5% a été réalisé afin d'identifier le niveau de probabilité de la différence observée entre les moyennes lors des différents tests.

II. Résultats

II.1 Effet des milieux de culture

Le Tableau 9 montre l'effet des 4 types de milieux de culture sur la croissance des huit isolats de *Trichoderma*. L'analyse de la variance montre un effet significatif des différents milieux de culture sur la croissance mycélienne des souches de *Trichoderma* au test de Fischer LSD. Les différents milieux (PDA, MEA, SB, DOX) permettent une bonne croissance de toutes les souches. Cependant cette croissance varie selon le milieu de culture. Ainsi, après 24h d'incubation, une croissance plus importante sur le milieu PDA pour toutes les souches de *Trichoderma* a été notée. Cependant, aucune différence n'a été observée par les souches TU1 ($P = 0,32$) et TB2 ($P = 0,06$) sur les milieux DOX et SB. Les souches TG1 ($P = 0,74$) et TS2 ($P= 0,73$) n'ont pas montré de différence significative sur les milieux MEA et SB. Pour les souches TM1, TN1 et TG4, la croissance la plus faible a été observée sur le milieu DOX. Après 48h d'incubation, un envahissement de toute la surface de chaque boite de Petri par les différentes souches sur le milieu PDA a été observée. Les souches TU1, TS1 et TG4 ont montré une croissance plus importante sur milieu MEA suivi respectivement des milieux SB et DOX tandis que les souches TN1, TS2 et TB2 n'ont pas montré une différence significative au niveau

de ces deux derniers milieux. Aucune différence n'a également pas été observée sur les milieux MEA, DOX et SB pour l'isolat TM1 (P = 0,10). Le milieu de culture à base de pomme de terre (PDA) est plus favorable pour la croissance de toutes les souches et permet un envahissement mycélien total des boites de Petri seulement après 48h d'incubation. Il est suivi du milieu MEA. La plus faible croissance a été observée sur le milieu DOX. Il est à noter aussi que la présence de pigment verdâtre plus prononcé sur milieu PDA signe d'une sporulation intense par rapport aux milieux MEA, SB et DOX (Figure 15).

Tableau 9*: Effet du milieu de culture et du temps d'incubation sur la croissance des souches de Trichoderma sp.*

Milieux de culture	Diamètre des souches de *Trichoderma* en (mm)							
	TU1	**TM1**	**TG1**	**TN1**	**TS1**	**TS2**	**TG4**	**TB2**
24h d'incubation								
PDA	**36,03a**	**41,10a**	**40,67a**	**37,17a**	**40,37a**	**34,87a**	**41,23a**	**30,10a**
MEA	30,30b	33,97b	33,03b	30,67b	34,53b	29,17b	36,07b	25,87b
SB	25,47c	32,73c	32,87b	28,13c	33,83bc	28,47b	33,73c	24,83c
DOX	25,07c	30,70d	23,13c	27,13d	33,03c	22,87c	32,23d	24,13c
48 h d'incubation								
PDA	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
MEA	76,10b	79,00b	80,33b	78,03b	80,03b	76,60b	79,80b	70,17b
SB	69,00c	78,90b	79,93b	76,43c	77,83c	64,20c	78,50c	69,27c
DOX	67,70d	78,17b	65,77c	75,47c	76,40d	63,70c	73,87d	68,80c

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

II.2 Effet de la température d'incubation

L'effet de la température sur la croissance mycélienne des différentes souches de *Trichoderma,* a été réalisé sur le milieu PDA (Tableau 10). Ainsi, une inhibition totale de la croissance mycélienne est observée à 40 °C. La croissance est ralentie à 20 et 35 °C et maximale à 25 et 30 °C pour toutes les souches et varie selon la durée d'incubation. Après 24h d'incubation, une croissance maximale a été observée à 25 et 30 °C. Ces deux températures d'incubation (25 et 30 °C) ne présentent pas de différence significative à ce niveau d'incubation (P = 0,28). De même, aucune différence significative n'a été observée aux températures de 20 °C et 35 °C (P = 0,99). Après 48 h d'incubation, un envahissement mycélien total de toutes les boites de Petri par tous les isolats de *Trichoderma* a été noté également à 25 °C et à 30 °C. Cependant, la croissance mycélienne observée à 20 °C devient significativement plus importante que celle notée à 35 °C. Ce même phénomène est observé après 72h d'incubation.

***Tableau 10**: Effet de la température et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des souches de Trichoderma sp.*

Température d'incubation	Diamètre des souches de *Trichoderma* (mm)							
	TG1	**TM1**	**TN1**	**TG4**	**TS1**	**TS2**	**TB2**	**TU1**
24h d'incubation								
20 °C	14,33b	13,00b	11,33b	13,00b	11,67b	13,00b	12,67b	11,33c
25 °C	**38,33a**	**43,33a**	**33,00a**	**33,67a**	**38,67a**	**32,00a**	**35,33a**	**36,33a**
30 °C	**37,33a**	**42,67a**	**31,33a**	**32,00a**	**36,67a**	**30,33a**	**33,67a**	**28,67b**
35 °C	13,67b	12,67b	11,00b	12,67b	11,65b	12,67b	12,67b	11,00c
40 °C	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00d	0,00d
48h d'incubation								
20 °C	40,67b	41,33b	37,33b	42,33b	39,00b	41,33b	39,00b	34,33b
25 °C	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
30 °C	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
35 °C	27,67c	29,33c	23,33c	25,67c	26,33c	28,67c	28,33c	21,33c
40 °C	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d
72 h d'incubation								
20 °C	68,33b	70,33b	64,33b	63,67b	63,67b	65,67b	64,33b	62,00b
25 °C	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
30 °C	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
35 °C	58,00c	59,33c	52,00c	56,33c	53,00c	57,33c	56,33c	54,00c
40 °C	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d	0,00d

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%

II.3 Effet du pH

L'effet de différents pH sur la biomasse mycélienne des souches de *Trichoderma* a été réalisé sur milieu liquide PDB (Tableau 11, Figure 16). L'analyse de la variance au test de Fischer LSD montre un effet significatif de l'action des différents pH sur la biomasse mycélienne des huit isolats de *Trichoderma*. Après 6 jours d'incubation, la meilleure croissance a été observée au pH 5 pour toutes les souches et est suivie du pH 7. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les pH 5 et 7 pour les isolats TN1 (P = 0,12), TM1 (P = 1,16), TB2 (P = 0, 08) et TS1 (P = 0,08). Aucune différence significative de la biomasse mycélienne des souches n'a pas été observée aux pH 3 et 9 entre les souches TN1 (P = 0,73), TG1 (P = 0,16), TM1 (P = 0,64) et TS2 (P = 0, 89). La biomasse mycélienne la plus faible a été observée au pH 3 pour tous les isolats de *Trichoderma.* Les pH faiblement acide à neutre (5 et 7) permettent donc une meilleure croissance des souches de *Trichoderma*.

***Tableau 11**: Effet du pH sur la biomasse mycélienne des souches de Trichoderma sp.*

pH	Biomasse mycélienne (g)							
	TN1	**TG1**	**TG4**	**TM1**	**TU1**	**TB2**	**TS1**	**TS2**
3	3,60b	2,27c	2,53d	3,83b	2,57d	2,33c	2,13b	1,77c
5	**4,87a**	**5,13a**	**4,30a**	**6,10a**	**4,73a**	**4,00a**	**4,77a**	**3,70a**
7	**4,53a**	4,9b	3,83b	**5,77a**	4,00b	**3,77a**	**4,53a**	2,37b
9	3,53b	2,43c	3,20c	4,00b	3,60c	3,13b	2,20b	1,67c

Pour chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

II.4 Effet de la salinité

Un effet significatif de la salinité est observé sur la croissance mycélienne des différents isolats de *Trichoderma* (Tableau 12). En effet, les concentrations élevées de sel diminuent considérablement la vitesse de croissance des différentes souches obtenues de même que la pigmentation du mycélium (Figure 17). Après 24h d'incubation à 2 % de salinité, seule la souche TU1 a montré une différence significative (P = 0,007) par rapport au témoin (0%) avec une diminution de la croissance mycélienne d'environ 6 mm. Cette diminution de la croissance mycélienne s'accentue à 4 et 6% pour tous les isolats. Cependant les souches TB2, TS1, TS2, TN1 et TG1 n'ont pas montré de différence significative à 4 et 6% de NaCl. Après 48h d'incubation, un envahissement mycélien totale de toute la surface de la boite de Petri a été observé par tous les isolats de *Trichoderma* à l'absence de NaCl. Seule la souche TM1 a montré une croissance maximale avec un envahissement mycélien total de la boite de Petri à 2% de NaCl. Une diminution progressive de la croissance mycélienne est observée en fonction de l'augmentation du pourcentage de sel. Entre 4 et 6% de sel, les souches TB2 (P= 0,17) et TM1 (P = 0, 70) n'ont pas montré de différence significative. Ce phénomène de diminution de la croissance mycélienne est aussi observé après 72h d'incubation.

***Tableau 12** : Effet de la salinité sur la croissance mycelienne des Trichoderma (souche TG4)*

% de NaCL	Diamètre des souches de *Trichoderma* (mm)							
	TB2	**TU1**	**TS1**	**TG4**	**TS2**	**TM1**	**TN1**	**TG1**
24 h d'incubation								
0	**33,25a**	**30,75a**	**35,50a**	**31,50a**	**31,25a**	**40,50a**	**31,50a**	**33,50a**
2	**30,75a**	24,75b	**28,75a**	**29,75a**	**29,00a**	**39,25a**	**31,00a**	**29,25a**
4	19,50b	22,00b	17,25b	18,50b	18,25b	24,00b	25,00b	16,75b
6	17,25b	15,75c	14,00b	16,25c	16,50b	16,75c	17,00b	16,25b
48h d'incubation								
0	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
2	66,00b	59,25b	67,50b	67,25b	62,00b	**85,00a**	73,75b	81,25b
4	39,75c	48,50c	41,25c	37,75c	44,50c	46,25b	58,25c	31,00c
6	26,00c	35,25d	23,00d	28,50d	32,75d	44,75b	38,00d	21,25d
72h d'incubation								
0	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
2	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
4	64,75b	71,25b	62,00b	61,75b	67,75b	68,00b	71,25b	52,25b
6	47,50c	60,50c	35,50c	50,00c	45,75c	57,50c	56,75c	34,25c

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

II.5 Effet de la source de carbone

Le tableau 13 représente l'effet de quatre sources de carbone (dextrose, sucrose, mannitol, amidon) sur la croissance mycélienne des huit isolats de *Trichoderma*. Les différentes sources de carbone ont permis un bon développement mycélien et une bonne sporulation des différents isolats de *Trichoderma* (Figure 18). Après 24h d'incubation, la meilleure croissance a été notée avec les sources de carbone dextrose et mannitol pour toutes les souches de *Trichoderma*. Les souches TS2 (P = 0,68), TG4 (P = 0,25) et TG1 (P = 0,11) n'ont pas montré de différence significative sur dextrose et mannitol. Pour la souche TM1, aucune différence significative n'a été notée entre les trois sources de carbone: dextrose, sucrose et mannitol. La plus faible croissance a été observée avec l'amidon pour tous les isolats de *Trichoderma.* Après 48h d'incubation, un envahissement mycélien totale a été observé avec le dextrose et le mannitol comme source de carbone pour tous les isolats de *Trichoderma*. Seule la souche TM1 a montré une croissance maximale avec le sucrose. Les souches TN1 (P = 0,82), TG4 (P = 0,10), TU1 (P = 0, 40) et TS1 (P = 0, 52) n'ont pas montré de différence significative avec le sucrose et l'amidon comme source de carbone. Les sources de carbone, dextrose et mannitol permettent donc une meilleure croissance des *Trichoderma*.

***Tableau 13**: Effet de la source de carbone et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des Trichoderma sp.*

Source de carbone	Diamètre des souches de T*richoderma* en (mm)							
	TS2	**TB2**	**TM1**	**TN1**	**TG4**	**TU1**	**TG1**	**TS1**
24h d'incubation								
Dextrose	**32,00a**	**35,00a**	**44,50a**	**33,75a**	**33,25a**	**36,25a**	**38,75a**	**38,25a**
Sucrose	30,25ab	32,50ab	**40,75a**	30,75b	30,50ab	27,50bc	36,00ab	36,25ab
Mannitol	**31,75a**	33,25ab	**42,25a**	32,00ab	**31,75a**	28,75b	**37,25a**	36,25ab
Amidon	28,50b	31,75b	34,50b	30,75b	27,25b	24,75c	33,75b	34,50b
48h d'incubation								
Dextrose	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
Sucrose	65,75b	75,50b	**85,00a**	73,50b	70,25b	67,25b	81,00a	77,75b
Mannitol	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
Amidon	56,50c	68,75c	70,50b	72,25b	75,25b	63,50b	76,00b	74,75b

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

II.6 Effet de la source d'azote

L'effet de différentes sources d'azote sur la croissance mycélienne des huit isolats de *Trichoderma* est observé sur milieu Czapek Dox Agar Medium (Tableau 14). Toutes les sources d'azote testées permettent une bonne croissance des isolats de *Trichoderma* sauf l'urée où un début de croissance mycélienne est observé après 72h d'incubation. Après 24h d'incubation, seules les souches TN1 et TU1 ($P< 0, 001$) ont montré une différence significative entre les différentes sources d'azote. Pour la souche TN1, aucune différence n'a été observée entre NH_2SO_4 et $NaNO_3$ ($P = 0, 32$) de même entre la glycine et le KNO_3 ($P = 0, 15$). Pour la souche TU1, la plus faible croissance est notée avec la glycine. Après 48h d'incubation, les isolats TS1, TN1 et TG1 ont montré une différence significative entre les sources d'azote où une croissance a été observée avec une plus faible croissance notée avec la glycine. Après 72h d'incubation, une croissance maximale marquée par envahissement mycélien de toute la boite de Petri est observée pour tous les isolats avec quatre sources d'azotes: NH_2SO_4, Glycine, KNO_3, $NaNO_3$. Un début de croissance avec l'urée est aussi noté pour tous les isolats. Les différentes sources d'azote sauf l'urée ont donc permis un bon développement mycélien des différentes souches de *Trichoderma*.

***Tableau 14**: Effet de la source d'azote et du temps d'incubation sur la croissance mycélienne des Trichoderma sp.*

Source d'azote	**Diamètre des souches de T*richoderma* en (mm)**							
	TS2	**TM1**	**TG4**	**TS1**	**TB2**	**TN1**	**TU1**	**TG1**
24h d'incubation								
NH_2SO_4	**25,75a**	**29,50a**	**27,25a**	21,00ab	**20,00a**	**24,25a**	**29,75a**	**27,50a**
Glycine	21,00b	**26,50a**	20,25b	19,00b	**16,75a**	16,75b	24,00b	**24,00a**
KNO_3	23,75ab	**26,50a**	25,75ab	**24,00a**	**15,75a**	18,75b	**28,25a**	**25,50a**
$NaNO_3$	**25,25a**	**28,75a**	25,75ab	17,75b	**16,75a**	**25,50a**	**27,75a**	**25,25a**
Urée	0,00c	0,00b	0,00c	0,00c	0,00b	0,00c	0,00c	0,00b
48h d'incubation								
NH_2SO_4	**69,00a**	**75,25a**	**71,25a**	**62,00a**	**61,50a**	**71,00a**	**67,00a**	**70,00a**
Glycine	59,75b	67,75b	59,50b	48,75c	49,25b	34,25b	**65,25a**	54,00c
KNO_3	**65,75a**	73,25ab	65,75ab	55,25b	56,50ab	**61,25a**	**69,75a**	**70,25a**
$NaNO_3$	64,25ab	71,75ab	66,25ab	52,50bc	52,75ab	**64,50a**	**65,50a**	64,50b
Urée	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00b	0,00d
72h d'incubation								
NH_2SO_4	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
Glycine	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
KNO_3	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
$NaNO_3$	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**	**85,00a**
Urée	14,00b	21,25b	16,75b	16,00b	13,50b	14,00b	15,75b	11,00b

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%

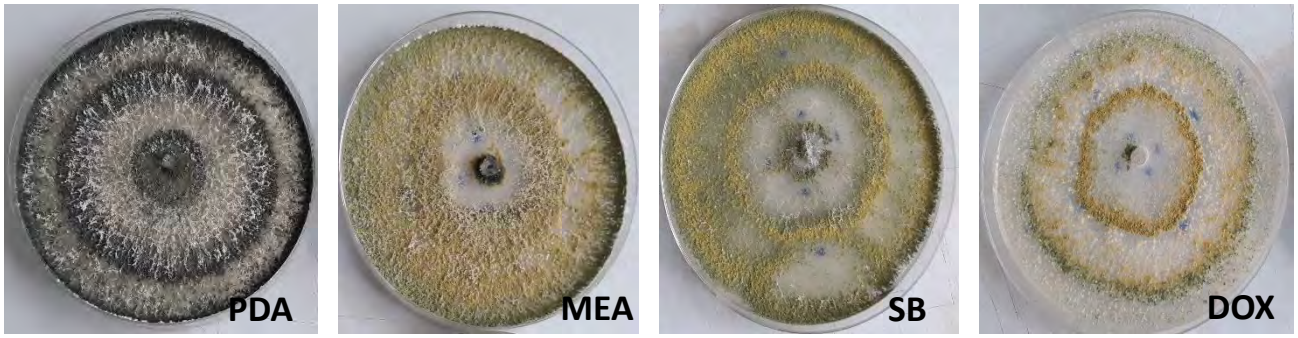


***Figure 15**: Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TG4)*

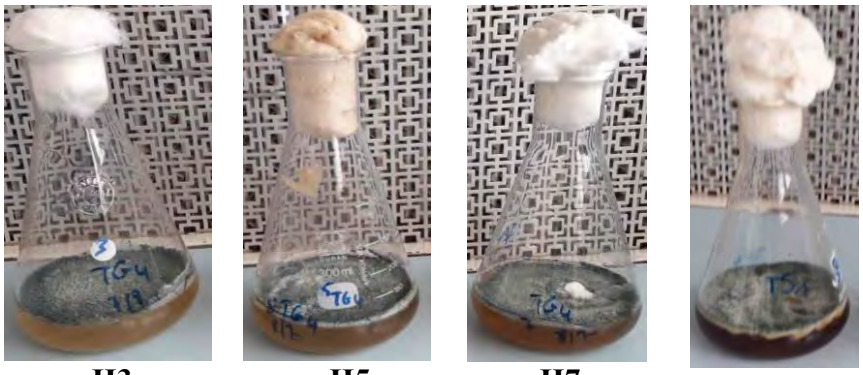


***Figure 16**: Effet des pH sur la biomasse mycélienne des Trichoderma (souche TG4)*

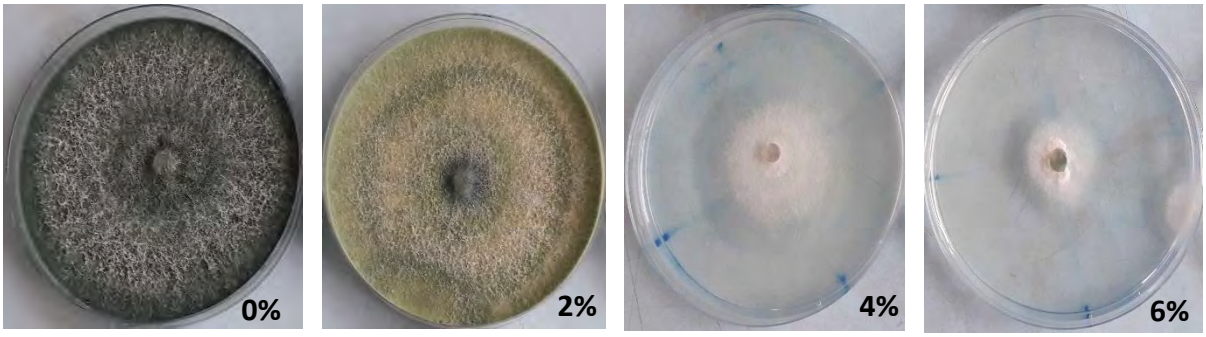


***Figure 17**: Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TN1)*

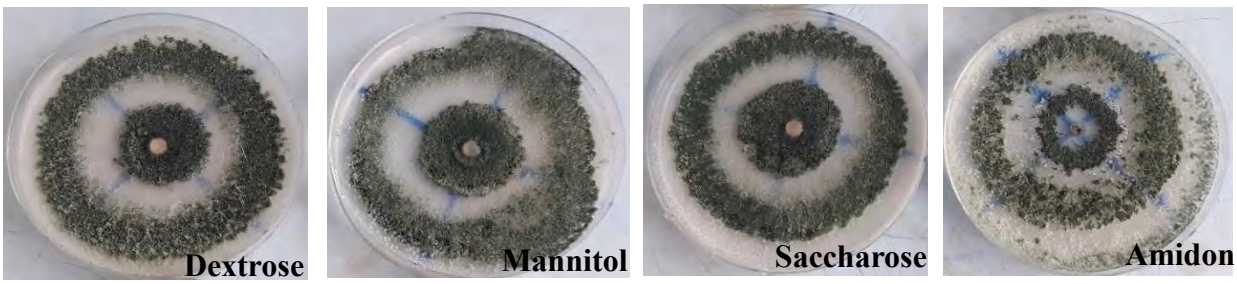


***Figure 18**: Effet des différentes sources de carbone sur la croissance mycélienne des Trichoderma (souche TS1)*

III. Discussion

L'effet de différents facteurs abiotiques a été étudié sur la croissance mycélienne de huit isolats de *Trichoderma*: milieux de culture, température d'incubation, pH, salinité, source de carbone et d'azote.

Pour l'effet des milieux de cultures sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*, les milieux PDA, MEA, DOX, SB ont été utilisés. Ces milieux sont très utilisés pour la culture des champignons et permettent le développement d'un large spectre de champignons. Les différentes souches de *Trichoderma* sp. se sont bien développées sur les différents milieux de cultures testés (PDA, MEA, DOX, SB). Toutefois l'importance de la croissance des souches a varié d'un milieu à un autre. Ainsi, la meilleure croissance a été observée sur le milieu PDA. Donc le milieu naturel à base de pomme de terre (PDA) se révèle être le milieu le plus adéquat pour la culture de *Trichoderma.* Les avantages de ce milieu sont dus aux composés complexes qui le constituent. En effet les autres milieux synthétiques (MEA, SB, DOX) qui en sont dépourvus se sont révélés moins favorables à la croissance des souches. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ubalua et OtiE, (2007); Verma, (2007); Moussaoui, (2010); Jahan *et al*., (2013); Srivastava *et al*., (2014) qui ont montré que les *Trichoderma* poussent mieux sur le PDA que les autres milieux de culture.

En plus d'un bon milieu de culture, la croissance et le développement des *Trichoderma* exigent un certain nombre de facteurs abiotiques comme le pH, la salinité, la température et la source de carbone et d'azote. En effet, l'étude de ces différents facteurs a montré un impact sur la croissance mycélienne des différentes souches de *Trichoderma* sp.

L'étude de l'effet des températures d'incubation sur la croissance des différentes souches de *Trichoderma* montrent que les souches pouvaient se développer jusqu'à une température de 35 °C avec un optimum de croissance entre 25 et 30 °C et une inhibition à 40 °C. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Moussaoui, (2010); Srivastava *et al.,* (2014) qui ont démontré que les *Trichoderma* sont des champignons filamenteux mésophiles qui tolèrent les bases températures voisines de 10 °C mais leur mycélium est très sensible à des températures supérieures à 35 °C. Nos résultats concordent aussi avec les conclusions de Sharma *et al*., (2005) et Singh *et al*., (2011) qui ont indiqué que la température avait un effet profond sur la croissance fongique et qu'aucune des espèces de *Trichoderma* ne pouvait se développer au-delà de 40 °C. Cet optimum de croissance des souches de *Trichoderma* a été précedemment constaté par Singh *et al*., (2014). Cependant, Srivastava *et al*., (2014) ont montré une croissance mycélienne et une sporulation très faible sur une souche de *Trichoderma harzianum* incubées

à 40 °C. Au Bengladesh, Monirul Islam, (2016) a trouvé sur 10 souches de *Trichoderma* testées, 4 isolats pouvant croitre et sporuler à 40 °C. Ceci confirme que les souches de *Trichoderma* présentent une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions de température (Kubicek *et al*., 2003, Zhang *et al*., 2005, Mulaw *et al*., 2010, Skoneczny *et al*., 2015).

Le pH a fortement influencé la croissance des souches de *Trichoderma* sp. Les résultats ont montré que toutes les souches se sont bien développées et la formation de conidies a été observée aux différents pH. Toutefois la meilleure croissance des souches a été observée aux pH 5 et 7. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bandyopadhyay *et al*., (2003) qui ont montré que les *Trichoderma* se développent mieux dans des pH acide à neutre (5 et 7). De même plusieurs auteurs dont Moussaoui, (2010), Srivastava *et al*., (2014), Steyart *et al*., (2010) ont montré que les souches de *Trichoderma* peuvent croitre à des pH allant de 1 à 9 mais leurs pH optimums de croissance se situent entre 4.5 et 6.5. Pour Singh *et al*., (2014) l'intervalle de pH le plus favorable pour *Trichoderma* se situe entre 5,5 et 7,5. Les études de Limón *et al*., (2004) ont montré que les pH acides favorisent mieux la croissance fongique que les pH alcalins. Bitton et Boylan, (1985) ont rapporté que la croissance de *Trichoderma* est plus efficace dans les sols acides que dans les sols alcalins. Cependant Verdin *et al*., (2004) ont signalé que la plupart des champignons ne poussent pas à des pH très faibles. El Badawy *et al*., (2016) ont montré la préférence des souches de *Trichoderma* isolées du Quatar pour un pH élevé (pH 8). Ces observations indiquent que les isolats de *Trichoderma* d'un écosystème donné peuvent avoir des exigences propres à leur survie en relation avec les conditions du milieu. Les mêmes espèces de *Trichoderma* provenant d'un milieu différent peuvent avoir des exigences différentes concernant leur performance, leur croissance et leur capacité d'inhiber les pathogènes. Joshi *et al*., (2010) ont démontré ces effets de l'écosystème, y compris le pH du sol sur la performance de 62 isolats de *Trichoderma* provenant de l'ouest de l'Himalaya.

L'effet des différentes concentrations de sel a montré un ralentissement de la croissance et une suppression de la conidiation à des doses de NaCl supérieures à 4%. Contrairement aux résultats obtenus par Regragui et Lahlou, (2005) où les souches tolèrent des concentrations élevées de NaCl (6%). Cependant, ils ont montré que ces concentrations élevées de NaCl peuvent entrainer chez certaines souches un ralentissement de l'extension mycélienne, une sporulation réduite et une absence de coloration typique du recto des colonies de *Trichoderma.*

Tous les isolats étaient capables de croître et de se sporuler sur les milieux contenant du dextrose, du saccharose, du mannitol et de l'amidon comme unique source de carbone. Cependant, le dextrose et le mannitol ont montré les meilleurs résultats avec un envahissement

mycélien total seulement après 48h d'incubation. Mehta et *al*., (2012) ont montré une croissance mycélienne plus importante en utilisant le dextrose comme source de carbone par rapport au lactose et au fructose. Monirul Islam, (2016) avec divers isolats de *Trichoderma* a montré que toutes les souches étaient capables de se développer sur le sucrose et le glucose mais seule trois isolats étaient capables de se développer et sporuler sur les milieux contenant de l'amidon et du mannitol. Chattannavar *et al*., (2006) ont rapporté que le maltose et le dextrose étaient les meilleures sources de carbone comparées au glucose, au galactose, au maltose, au saccharose, au fructose et au mannitol testé pour la croissance et la sporulation de *Trichoderma harzianum*. Pour Sebran Haida, (2008), les isolats de *Trichoderma* se développent et sporulent bien dans un milieu liquide amendé avec du dextrose, du glucose, du fructose et saccharose en tant que source carbone. Grondona *et al*., (1997) ont constaté que tous les isolats de *Trichoderma* étaient capables d'assimiler le glucose et le lactose en tant que source de carbone unique, bien que les réponses des souches à d'autres sources de carbone variaient. Ces variations pourraient être dues à des différences dans les conditions de dosage telles que le pH, la température et le milieu de culture utilisé (Manczinger et Polner, 1987).

Concernant l'effet de la source d'azote sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*, tous les isolats étaient capables de croître sur des milieux contenant du nitrate de sodium ($NaNO_3$), du sulfate d'ammonium (NH_2SO_4), du nitrate de potassium (KNO_3), de l'urée (CH_4N_2O) et de la glycine ($C_2H_5NO_2$). Mehta *et al*., (2012) en utilisant différentes sources de carbone avec une souche de *Trichoderma viride* ont obtenu une meilleure croissance avec le sulfate d'ammonium contrairement au nitrate de sodium et au nitrate de potassium. Les résultats obtenus par Monirul Islam, (2016) ont montré que toutes les souches de *Trichoderma* étaient capables de bien se développer et sporuler sur le milieu liquide Czapek Dox contenant du nitrate de potassium et du nitrate de sodium comme source d'azote. Cependant seules trois isolats pouvaient croitre sur milieu contenant de l'urée. Rain et Tewari, (2016) ont obtenu une croissance mycélienne et une sporulation plus importante sur milieu contenant du sulfate d'ammonium suivie du nitrate de sodium comme source d'azote Nos résultats rejoignent partiellement les conclusions de Jayaswal *et al*., (2003) qui ont indiqué que la croissance et la sporulation étaient grandement affectées par diverses sources d'azote; cependant, elles ont été favorisées par les formes d'azote ammoniacal par rapport aux formes nitrite ou nitrate alors que l'urée ne favorise ni la croissance ni la sporulation. Abiodun *et al.*, (2012) ont signalé que la croissance et la sporulation de *Trichoderma* étaient grandement favorisées par les milieux amendés avec $NaNO_3$, peptone et NH_4SO_4 comme source d'azote. Shirsole et Mishra, (2014)

ont signalé que le sulfate d'ammonium était la source d'azote la plus appropriée en terme de sporulation parmi les sources d'azote testées telles que l'urée, le nitrate de potassium, le chlorure d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le nitrate de sodium. Les différences de croissance des isolats de *Trichoderma* en fonction des sources d'azote peuvent s'expliquer aussi par l'augmentation du pH du milieu due à l'accumulation d'ammoniaque, ce qui suggère que les isolats sont susceptibles de souffrir d'autolyse provoquée par les composés d'ammonium (Bridge, 1985). Les résultats obtenus montrent que les *Trichoderma* sont capables d'utiliser une large gamme de sources de carbone et d'azote pour stimuler leur croissance en accord avec les travaux de Srivastava *et al*., (2014).

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que nos souches de *Trichoderma* peuvent se développer facilement en condition *in vitro.* Ce développement nécessite un milieu de culture adéquat et certaines conditions de pH, de température, de salinité et d'une bonne source de carbone et d'azote. Ces différents paramètres ont eu des effets variables sur la croissance mycélienne des souches de *Trichoderma* sp. L'effet des milieux de culture sur la croissance des *Trichoderma* a montré que le milieu de culture à base de pomme de terre (PDA) est plus adéquat pour la culture des souches à des pH basiques à neutres (pH 5 et pH 7). Parmi les différentes températures testées, l'optimum de croissance obtenu se situait aux températures de 25 et 30 °C. L'effet de salinité a montré une diminution importante de la croissance mycélienne en fonction de l'augmentation de la concentration de NaCl avec une tolérance allant jusqu'à 2% par les différentes souches testées. Concernant l'effet de la source de carbone sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*, les résultats ont montré une bonne croissance de tous les isolats sur les différentes sources de carbone testées avec un meilleur développement avec le dextrose et le mannitol. Les différentes sources d'azote testées ont permis un bon développement mycélien de tous les isolats de *Trichoderma*. Ces résultats obtenus suggèrent que les différentes souches de *Trichoderma* testées pourront être utilisées dans des itinéraires techniques agricoles.

CHAPITRE 4 :

Evaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* sur deux agents pathogènes de la tomate : *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*.

Chapitre 4 : Evaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* sur deux agents pathogènes de la tomate : *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii.*

Introduction

Au Sénégal, les cultures maraichères ont connu une forte expansion à cause de leurs importances économiques et nutritionnelles. Cependant, elles sont confrontées à plusieurs problèmes tels que la disponibilité de l'eau, les difficultés d'écoulement de la production et surtout la surveillance phytosanitaire.

Les problèmes phytosanitaires se posent avec plus d'acuité chez les espèces cultivées en saison pluvieuse. En effet, les conditions climatiques (température et humidité) favorisent la prolifération des maladies cryptogamiques sur de nombreuses espèces comme la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), l'oignon (*Allium cepa*). Parmi les maladies d'importances économiques de la tomate rencontrées au Sénégal, on note la fusariose due à *Fusarium oxysporum* et la sclérotiniose causée par *Sclerotinia rolfsii* (PIP, 2014). La fusariose et la sclérotiniose font parties des maladies les plus dévastatrices de la tomate dans le monde (Hanaa *et al*., 2011; Mullen, 2001). Pour lutter contre ces maladies de nombreux produits chimiques sont utilisés avec souvent des résultats mitigés et des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement.

Pourtant de nombreux agents biologiques peuvent induire efficacement la résistance des plantes contre divers pathogènes (Bokhari et Perveen, 2012). Les agents de bio contrôle comme *Trichoderma* spp. ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes, améliorer l'absorption des nutriments, induire la défense des plantes contre divers stress biotiques et abiotiques (Harman *et al*., 2004; Shoresh *et al*., 2010). Selon Jonathan, (2013) et Jijakli, (2003) les caractéristiques *in vitro* d'un bon agent de lutte biologique sont: une efficacité antagoniste *in vitro,* une croissance et une sporulation rapide sur milieu artificiel et une efficacité sur un grand nombre de pathogènes. L'objectif général de ces travaux est d'étudier les performances des *Trichoderma* contre *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii,* deux agents pathogènes de la tomate.

Il s'agira spécifiquement de:

- Isoler des souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* et de *Sclerotinia rolfsii* sur culture de tomate;
- Etudier *in vitro* les propriétés antagonistes des souches de *Trichoderma* contre ces deux pathogènes ;
- Evaluer l'efficacité des *Trichoderma* sur la virulence de ces deux pathogènes en serre.

I. Matériel et méthodes

I.1 Isolement et identification des souches pathogènes (*Fusarium* et *Sclerotinia*)

I.1.1 Prélèvement des échantillons

Les souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia* ont été isolées à partir des échantillons de plants infectés provenant de la station expérimentale de Sangalkam de l'ISRA/CDH sur culture de tomate. Des prélèvements ont été effectués sur des plants de tomate présentant des symptômes de fusariose et de sclerotiniose. Les échantillons ont été mis dans des sachets en plastiques stériles maintenus à une température de 4 °C jusqu'au moment de l'isolement.

I.1.2 Isolement et purification des pathogènes

Les parties infectées ont été découpées en fragments d'environ 0,5 centimètres. Les fragments ont été lavés avec de l'eau courante puis désinfectés superficiellement par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (10 %) pendant 3 minutes. Ensuite, ils ont été rincés avec de l'eau distillée stérile (3 fois) et séchés sur du papier filtre stérile. Une fois séchés, les fragments ont été déposés dans un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) à raison de 4 fragments par boite de Petri (Davet et Rouxel, 1997). Le milieu PDA a été amendé avec du sulfate de streptomycine (200 mg/l) afin d'éviter la prolifération des bactéries. Les boîtes ont été ensuite incubées à l'obscurité à une température de 25 °C pendant 2 à 4 jours. Des repiquages successifs ont été réalisés après apparition du mycélium afin d'obtenir des isolats pures de *Fusarium* sp. et de *Sclerotinia* sp.

I.1.3 Identification des pathogènes

L'identification des souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia* obtenues a été réalisée par observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques avec l'aide de la clé de détermination de Roquebert, (1998) et de Nagamani *et al*., (2006).

Au plan macroscopique les caractères culturaux suivant ont été observés: aspect des colonies recto-verso, la pigmentation, la couleur des colonies et la présence ou non de sclérotes.

Au niveau microscopique, des observations ont été faites sur la structure et la morphologie des macros et microconidies et des hyphes après montage entre lame et lamelle.

I.1.4 Conservation des isolats

Une culture monosporale a été d'abord réalisée pour chacun des isolats ensuite les souches ont été repiquées dans des tubes inclinés contenant du milieu PDA pendant 7 jours. Les souches isolées ont été conservées à 4 °C (Botton *et al*., 1990).

I.2 Vérification du pouvoir pathogène des souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia*

Après isolement des pathogènes (*Fusaium* et *Sclerotinia*), une vérification du pouvoir pathogène des différentes souches a été réalisée pour observer la capacité des souches isolées à parasiter les plantes.

I.2.1 Matériel végétal

Des plantes saines de tomate de la variété Heinz âgés de 20 à 30 jours ont été utilisées. Les graines de tomate ont été d'abord désinfectées par trempage dans une solution d'eau de javel (1%) pendant 3 mn puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Ensuite les graines ont été semées dans des plateaux placés en serre contenant du sol stérile (Bounknabel, 2002; Malick, 2008).

I.2.2 Inoculation des plantules

Les souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia* ont été cultivées sur milieu PDA pendant 10 jours. Ensuite une suspension de spores a été préparée en raclant la surface de chaque boite de Petri après ajout de 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension recueillie a été ajustée à 10^6 spores/ml par estimation de la densité sur cellule de Malassez (Cherrab *et al*., 2002; Colella *et al*., 2008). Les plants de tomate au stade vrai feuilles ont été ainsi déterrés délicatement et les racines ont été rincées avec de l'eau distillée stérile puis trempées pendant 30 mn dans les suspensions de spores des pathogènes (Henni, 1998). Ensuite les plants ont été repiqués dans des pots en plastique contenant du sol stérile. Les témoins ont subi un traitement par trempage dans de l'eau distillée stérile (Khan *et al*., 2004). Pour chacun des traitements (*Fusarium*, *Sclerotinia* et témoin), 3 pots ont été inoculés.

I.2.3 Ré-isolement des agents pathogènes

Un ré-isolement des agents pathogènes (*Fusarium et Sclérotinia*) a été réalisé sur milieu PDA 30 à 40 jours après repiquage. Les champignons pathogènes sont recherchés à partir des fragments de tige découpés à partir du collet et au niveau des racines des plants. Le protocole d'isolement est le même que celui décrit par Davet et Rouxel, (1997).

I.3 Etude *in vitro* des propriétés antagonistes des *Trichoderma* sur *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*

Pour l'étude des propriétés antagonistes des *Trichoderma* contre les souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia,* deux techniques ont été utilisées: le test de confrontation directe et le test de confrontation à distance. Les huit isolats de *Trichoderma* sélectionnés après étude de leurs propriétés biochimiques et identifiés après séquençage des régions IT1 et IT4 (chapitre 1) ont été utilisés dans cette partie. Il s'agit des souches de *Trichoderma asperellum*: TS1-KF737410.1, TS2-KU896306.1, TB2-KU896306.1, TN1-KY225658.1, TU1-KF737411.1, TG4-JN108925.1 et TM1-KX620957.1 et de la souche de *Trichoderma virens* TG1-KY225664.1. Ensuite les 5 souches présentant les meilleurs taux d'inhibition ont été utilisées pour un test d'efficacité en serre.

I.3.1 Tests de confrontation directe

Cette méthode appelée encore « technique des cultures opposées » (Figure 19), consiste à déposer dans des boites de Petri contenant 15 ml de milieu PDA à 3 cm l'un de l'autre, deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures des deux champignons (pathogène et antagoniste). Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test. Les témoins sont représentés par des boites de Petri contenant uniquement le champignon pathogène (*Fusarium* ou *Sclerotinia*). Les boites ont été incubées à 28 °C pendant 6 jours.

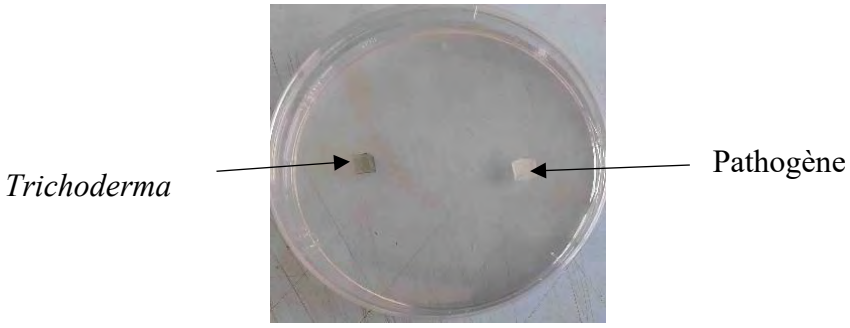


***Figure 19**: Confrontation directe entre Trichoderma et souche de Fusarium*

I.3.2 Tests de confrontation indirecte (confrontation à distance)

Le principe de cette technique consiste à déposer au centre de chaque boite de Petri contenant le milieu PDA un explant de 8mm de diamètre prélevé à partir des colonies de *Trichoderma* et des souches de *Fusarium* ou de *Sclerotinia* (Figure 20). Après 24 heures d'incubation, la partie inférieure contenant le *Trichoderma* est scellée avec une autre contenant le pathogène, par une bande de para film de façon à éviter toute contamination et toute perte de gaz. Comme pour la première expérimentation, trois répétitions ont été réalisées. Les témoins sont représentés par

des boites contenant à la face inférieure uniquement le milieu de culture et la face supérieure l'agent pathogène (*Fusarium* ou *Sclerotinia*).

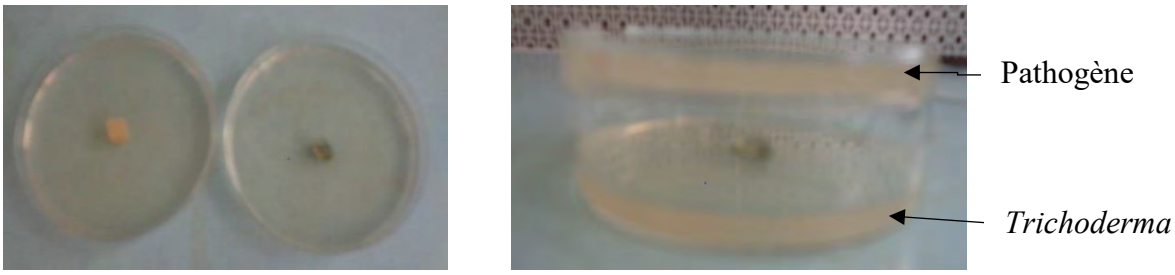


***Figure 20**: Confrontation à distance entre Trichoderma et souche de Fusarium*

I.3.3 Paramètres mesurés

L'évolution de la croissance mycélienne des pathogènes a été déterminée après 6 jours d'incubation par la mesure du diamètre du mycélium du champignon pathogène.

Ensuite, dans les deux cas de tests d'antagonisme, l'évaluation de l'inhibition exercée par le *Trichoderma* a été estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante :

I (%) = (1- Dn/Do) x 100 (Hmouni *et al.*, 1996).

Dn : diamètre moyen des colonies de *Fusarium* en présence de l'antagoniste

Do : diamètre moyen des colonies témoins.

Pour les tests de confrontation directe, l'activité mycoparasitaire des isolats de *Trichoderma* a été déterminée après 21 jours d'incubation en utilisant l'échelle de Belle *et al*., (1982) pour estimer la capacité des souches à envahir ou non les pathogènes.

1 = antagoniste a envahi le pathogène et a recouvert la totalité du milieu ;

2 = antagoniste occupe au moins 2/3 de la surface du milieu ;

3 = antagoniste et pathogène colonise chacun environ la moitié de la surface du milieu ;

4= agent pathogène colonisé au moins les 2/3 de la surface du milieu et a résisté à l'empiétement par l'antagoniste ;

5 = agent pathogène a complètement envahi l'antagoniste et a occupé toute la surface du milieu.

I.4 Effet des souches de *Trichoderma* sur la virulence de *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia Rolfsii* sur culture de tomate en serre

L'efficacité des cinq souches de *Trichoderma* sélectionnée*s* après les tests d'antagonisme contre *Sclerotinia rolfsii* et *Fusarium oxysporum* sur les plants de tomate a été testée en serre. Deux expérimentations ont été réalisées. La première a consisté à traiter les semences de tomate en les imbibant dans une suspension sporale de chacun des isolats de *Trichoderma* et la seconde

expérimentation, à faire une inoculation au sol au moment du repiquage avec les souches de *Trichoderma.*

I.4.1 Traitement des semences

I.4.1.1 Production des inocula

Les souches de *Sclerotinia* et de *Fusarium* ont été cultivées sur milieu PDA pendant 10 jours. Ensuite, 10 ml de suspension de spores ajustés 10^6 spores/ml de chaque pathogène ont été inoculés dans des sachets contenant 100 g de Sorgho bien stérilisés. Les sachets sont ensuite incubés pendant 15 à 20 jours pour permettre une bonne colonisation des graines de sorgho par les deux pathogènes.

En ce qui concerne les *Trichoderma*, les suspensions sporales ont été ajustées à 7 10^8 spores/ml de solution à l'aide d'un hémocytomètre au microscope optique après 10 jours de culture sur milieu PDA.

I.4.1.2 Inoculation et semis

Une semaine avant semis, du sable provenant du jardin botanique de l'UCAD a été stérilisé à l'étuve, mis dans des pots de 1 kg. Chacun des pots est inoculé avec 10 g de graines de sorgho colonisées avec les deux pathogènes.

Des semences de tomate de la variété Henz ont été traitées avec les 5 souches de *Trichoderma*. Les graines de tomate ont été désinfectées dans une solution d'eau de javel (1%) pendant 3 minutes et rincées soigneusement dans de l'eau distillée stérile. L'inoculation avec les souches de *Trichoderma* a ensuite été effectuée en trempant les graines dans la suspension fongique pendant 1 h. Les graines témoins ont été trempées dans un volume égal d'eau distillée stérile. Les semences traitées et témoins ont été directement semées dans des pots de 1 kg remplis de sol du jardin botanique stérile en raison de 5 graines par pot. 15 jours après germination, un démariage a été effectué afin de laisser une plante par pot.

I.4.2 Traitement du sol

I.4.2.1 Production des inocula

Comme pour le traitement des semences, l'inoculum des pathogènes (*Sclerotinia* et *Fusarium*) est constitué de graines de sorgho colonisées avec le mycélium des champignons. De même pour les *Trichoderma,* les graines de sorgho préalablement imbibées dans de l'eau puis stérilisées ont été inoculées avec les différentes souches. Après 15 jours d'incubation, les graines colonisées ont été broyées et constituent ainsi l'inoculum de *Trichoderma.*

I.4.2.2 Inoculation et repiquage

Après désinfection comme précedemment, les graines de tomate ont été semées dans des plateaux contenant du sable stérile pendant 20 jours. Une semaine avant repiquage, les pots contenant le sable stérile provenant du jardin botanique ont été inoculés chacun avec 10 g de l'inoculum de chaque pathogène.

Ensuite les plantules ont été repiquées dans des pots de 1 kg contenant du sable stérile préalablement inoculés avec les pathogènes. Au moment du repiquage, les pots ont été inoculés avec l'inoculum de *Trichoderma* constitué de la poudre des graines de sorgho colonisées avec les différentes souches à raison de 10 g par pot (Farkhondeh et Masoud, 2012**).**

I.4.3 Dispositif expérimental

Pour chaque test (traitement des semences ou traitement du sol), 7 traitements ont été effectués avec chaque pathogène: pathogène seul; pathogènes associé à chacune des souches de *Trichoderma* et Témoin absolu (sans pathogène ni *Trichoderma*). Les différents traitements sont les suivants :

- ✓ **Traitements avec *Fusarium* (FO1)** : TS1 + FO1; TG4 + FO1; TU1 + FO1; TN1 + FO1; TM1 + FO1; FO1 seule
- ✓ **Traitement avec *Sclerotinia* (SR1)** : TS1+ SR1; TG4 + SR1; TU1 + SR1; TN1 + SR1; TM1 + SR1; SR1 seule
- ✓ **Traitement sans *Fusarium* ni *Sclerotinia***: TA (témoin absolu)

Pour chaque traitement, trois répétitions ont été effectuées. Un dispositif complètement randomisé a été mis en place pour chaque test avec chacun des pathogènes.

I.4.4 Paramètres mesurés

Deux semaines après semis, le pourcentage de germination a été évalué. L'effet des souches de *Trichoderma* sur la croissance des plantes a été déterminé. Les paramètres suivants ont été mesurés: hauteur des plants, diamètre au collet, poids frais et sec des racines et des parties aériennes. L'incidence de la maladie a été déterminée 45 jours après repiquage selon le modèle d'évaluation de la maladie utilisé par Chandra *et al*., (1983) (Tableau 15). Les données ont été calculées selon la formule suivante: Incidence de la maladie en pourcentage = (nombre de plantes infectées / nombre total de plantes) × 100.

***Tableau 15**: Modèle d'évaluation des maladies (Chandra et al., 1983).*

Symptômes	% incidence de la maladie	Echelle
Plante saine	0	0
Jaunissement des anciennes feuilles	10	0
Jaunissement et flétrissement des anciennes feuilles	25	2
Flétrissements de deux ou plusieurs branches	50	3
Jaunissement de toutes les branches excepté les feuilles apicales	75	4
Flétrissement et mort de la plante	100	5

I.5 Analyse statistique

Les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel Xlstat 2016 (version 4.07 addinsoft). Le test de Newman Keuls au seuil de 5% a été réalisé afin d'identifier le niveau de probabilité de la différence observée entre les moyennes lors des différents tests.

II. Résultats

II.1 Isolement des pathogènes

Après purification et observation des caractéristiques macroscopique et microscopique, des souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* et de *Sclerotinia rolfsii* ont été isolées à partir des fragments provenant du collet et des racines des plants de tomate.

II.1.1 Aspects morphologiques des souches de *Fusarium oxysporum*

Les isolats de *Fusarium* présentent une vitesse de croissance moyenne sur milieu PDA avec un mycélium aérien blanc coloré de violet, le revers étant violet intense. Ils produisent des macroconidies et des microconidies (Figure 21). Ces derniers sont fusiformes à réniformes, présentant 0 à 2 septa, agglomèrées en fausses têtes, produites par de petites phialides lagéniformes dans le mycelium aérien. Les macroconidies sont légèrement arquées, présentant 3 septa, cellule basale pédicellée, cellule apicale en crochet, produites par des phialides sur des conidiophores ramifiés ou en sporodochies. Les caractéristiques morphologiques observées confirment les caractéristiques des *Fusarium* décrites par Roquebert, (1998).

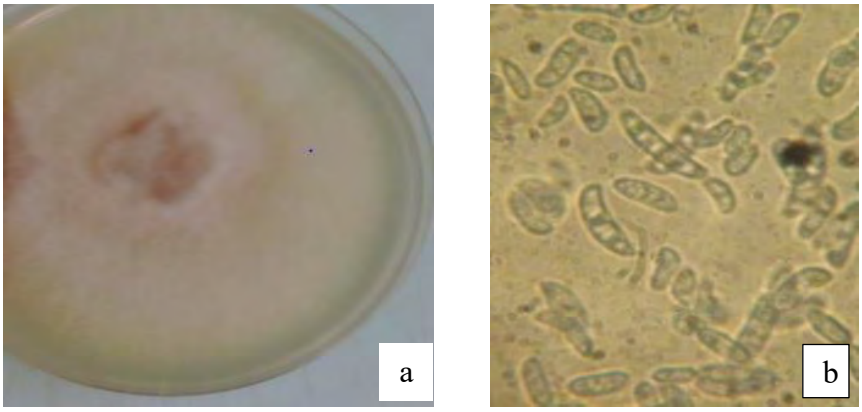


***Figure 21**: Aspect morphologique des isolats de Fusarium : a : aspect du mycélium, b : aspect des microconidies*

II.1.2 Aspects morphologiques des isolats de *Sclerotinia rolfsii*

Les isolats de *Sclerotinia* présentent une vitesse de croissance rapide sur milieu PDA. Ils ont un mycélium dense blanchâtre. Des sclérotes de structures lisses, plutôt sphériques (1 à 3 mm de diamètre) de couleur d'abord blanche, puis brun clair à brun rouge ayant un aspect comparable à ceux de graines de moutarde se forment au sein du mycélium 5 à 7 jours après repiquage (Figure 22). Au plan microscopique, des hyphes de 5 à 9 microns de diamètre sont observées. Ces hyphes de la branche principale sont hyalins (incolores) et à parois minces avec des parois transversales et des connexions peu fréquentes. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques correspondent aux descriptions de Nagamani *et al*., (2006).

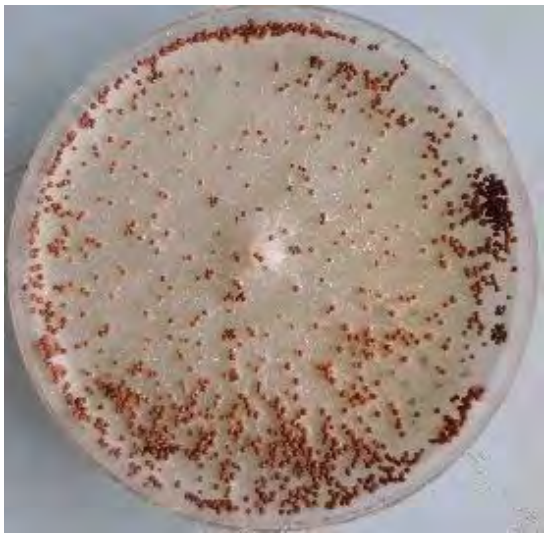


***Figure 22**: Aspect morphologique de Sclerotinia rolfsii : aspect du mycelium avec les sclerotes*

II.2 Vérification du pouvoir pathogène des souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia*

Environ 30 jours après inoculation des pathogènes, des caractéristiques typiques de la fusariose et de la sclerotiniose ont été observées au niveau des plantes de tomate inoculées avec *Fusarium oxysporum* et de *Sclerotinia rolfsii.*

Pour les plants de tomate inoculés avec *Fusarium oxysporum,* un flétrissement et un léger pourrissement du collet ont été notés (Figure 23A). Chez ces plantes, un jaunissement foliaire à la périphérie du limbe des vieilles feuilles a été aussi observé. Cet état foliare est suivi d'une nécrose des pétioles, de la chute des feuilles et d'une réduction de la croissance.

Concernant les plants inoculés avec *Sclerotinia rofsii*, une masse d'hyphes apparaît blanche et les grosses cellules hyphales épaisses sont abondantes sur les tissus infectés pour former un tapis fongique blanc sur les tiges inférieures et à la surface du sol. Ensuite, une lésion qui s'est transformée rapidement en pourriture a été progressivement notée sur plusieurs centimètres au niveau du collet (Figure 23B). Les tissus atteints deviennent humides et brunissent plus ou moins intensément. Un mycélium dense blanchâtre recouvre rapidement les tissus malades. Des sclérotes de couleur brun rouge ont été aussi observés au sein du mycélium.

Le ré-isolement des pathogènes au niveau du collet des plants infectés a encore montré les caractéristiques typiques de *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii* d'écrites par Roquebert, (1998) et Nagamani *et al*., (2006).

Figure 23*: Symptômes respectivement de fusariose et de Sclerotiniose observées après ré-inoculation des pathogènes (A : Fusarium oxysporum, B : Sclerotinia rolfsii)*

II.3 Etudes *in vitro* des propriétés antagonistes

II.3.1 Tests de confrontation directe

L'activité antagoniste des différentes souches de *Trichoderma* sur la croissance et l'inhibition des souches *Fusarium oxysporum* (FO1) et de *Sclerotinia roflsii* (SR1) est représentée au niveau du Tableau 16. L'analyse des résultats montre que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante que celle obtenue avec les différentes confrontations (Figure 24). Après 6 jours d'incubation, une action inhibitrice exercée par les différentes souches de *Trichoderma* vis-à-vis de la croissance mycélienne des pathogènes a été observée. L'analyse statistique avec le test de Student Newman Keuls montre une différence significative au seuil de 5% et confirment ces résultats.

- **Confrontation directe *Trichoderma-Sclerotinia***

Le test de confrontation directe entre les isolats de *Sclerotinia* (SR1) et de *Trichoderma* révèle une croissance mycélienne significative entre les traitements. Le témoin (SR1 seul) présente une croissance mycélienne deux fois plus importante que les traitements associant *Trichoderma* et SR1. Il faut aussi noter que c'est en confrontation directe avec la souche de *Trichoderma* TB2 que l'isolat SR1 a présenté une croissance mycélienne plus importante (4,13 cm). La croissance la plus faible de SR1 a été obtenue avec la souche TN1 (3,43 cm). Le calcul du pourcentage d'inhibition entre *Trichoderma* et *Sclerotinia* montre un pourcentage d'inhibition allant de 51,07% à 59,26%. La souche de *Trichoderma* TN1 présente une capacité d'inhibition plus importante (59,26%) suivie respectivement des isolats TU1, TG4 et TM1. Les souches TG1, TB2 et TS2 présentent les pourcentages d'inhibition les plus faibles ne dépassant pas 55% avec des valeurs respectives de 52,63%, 51,07% et 53,80%.

- **Confrontation directe *Trichoderma-Fusarium***

Le test de confrontation directe entre *Trichoderma* et *Fusarium* (FO1), révèle également une croissance mycélienne plus importante chez le témoin (7,67 cm) deux fois supérieure à celle des autres traitements. En confrontation directe avec TS2, l'isolat FO1 a présenté la croissance mycélienne la plus importante (3,00 cm). Le calcul du pourcentage d'inhibition montre que la souche TM1 présente une capacité d'inhibition plus importante (73,49%) suivie respectivement des isolats TS1 (70,45%) et TN1 (70,01%). Ces trois isolats ont inhibé à plus de 70% la souche FO1. Les souches TS2 et TB2 présentent les capacités d'inhibition les plus faibles. Il est à noter que tous les isolats de *Trichoderma* ont inhibé à plus de 60% FO1.

***Tableau 16**: Confrontation directe entre Trichoderma et souches pathogènes de Fusarium et de Sclerotinia*

Souches de *Trichoderma*	**Pathogènes**			
	***Sclerotinia rolfsii* (SR1)**		***Fusarium oxysporum* (FO1)**	
	Croissance mycélienne (cm)	**% d'inhibition**	**Croissance mycélienne (cm)**	**% d'inhibition**
TB2	4,13b	51,07c	2,97b	61,32b
TG1	4,00bc	52,63bc	2,73bc	64,36ab
TS2	3,90bc	53,80abc	3,00b	60,89b
TS1	3,83cd	54,58abc	2,27bc	70,45ab
TM1	3,60de	57,31ab	**2,03c**	**73,49a**
TG4	3,57de	57,70ab	2,47bc	67,84ab
TU1	**3,53e**	58,09ab	2,53bc	66,97ab
TN1	**3,43e**	**59,26a**	2,30bc	70,01ab
Témoin	8,50a	-	7,67a	-

Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

II.3.2 Tests de confrontation indirecte (distance)

Les résultats du test de confrontation indirecte (Tableau 17) montrent un ralentissement de la croissance des souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia* exercé par *Trichoderma* comparativement au témoin (Figure 24). Contrairement au test de confrontation directe, l'inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes est moins importante que pour le test de confrontation à distance.

- **Confrontation indirecte *Trichoderma-Sclerotinia***

Pour la confrontation à distance entre *Trichoderma* et *Sclerotinia* (SR1), la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante que celle des traitements. En confrontation avec les souches TM1 et TG4, SR1 présente la croissance mycélienne la plus faible respectivement de 5,97 cm et 5,83 cm. Les souches TN1, TG1, TS1, TB2, TS2 et TU1 ne présentent aucune différence significative en présence de SR1 en confrontation indirecte. Le pourcentage d'inhibition obtenu varie entre 13,73 et 31,37 % (Tableau 17). Aucune des souches de *Trichoderma* n'a inhibé à plus de 50% la souche de *Sclerotinia*. Les souches TM1 (29,80%) et TG4 (31,37%) présentent la capacité d'inhibition la plus importante et ne présentent pas de différence significative.

- **Confrontation indirecte *Trichoderma-Fusarium***

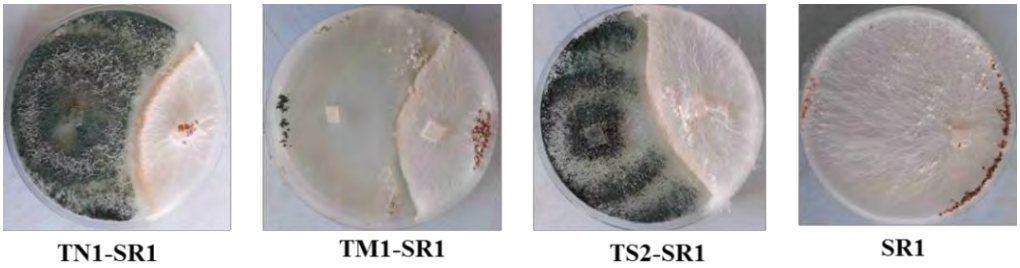
En confrontation indirecte entre les isolats de *Trichoderma* et de *Fusarium oxysporum* (FO1), les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante que celle en présence de *Trichoderma.* Avec la souche TM1, l'isolat FO1 présente la croissance la plus faible (4,57 cm) en confrontation indirecte. Concernant le calcul du pourcentage d'inhibition, une différence significative a été notée entre les différents traitements. La souche TM1 (39,11%) présentant le pourcentage d'inhibition le plus important est suivie respectivement par les souches TN1 (30,67%) et TU1 (30,22%) avec un pourcentage d'inhibition qui tourne autour de 30% (Tableau 17). Aucune des souches de *Trichoderma* n'a inhibé à plus de 50% la souche FO1 lors du test de confrontation indirecte.

***Tableau 17**: Confrontation à distance entre souche de Trichoderma et pathogènes*

Souches de *Trichoderma*	**Pathogènes**			
	***Sclerotinia rolfsii* (SR1)**		***Fusarium oxysporum* (FO1)**	
	Croissance mycélienne (cm)	**% d'inhibition**	**Croissance mycélienne (cm)**	**% d'inhibition**
TN1	7,33b	13,73c	5,20cd	30,67b
TG1	7,07b	16,86bc	5,93b	20,89d
TS1	7,00b	17,65bc	5,50bc	26,67bc
TB2	6,80b	20,00bc	5,77bc	23,11cd
TS2	6,67b	21,57b	5,67bc	24,44cd
TU1	6,63b	21,96b	5,23cd	30,22b
TM1	**5,97c**	**29,80a**	**4,57d**	**39,11a**
TG4	**5,83c**	**31,37a**	5,40bc	28,00bc
Témoin	8,50a	-	7,50a	-

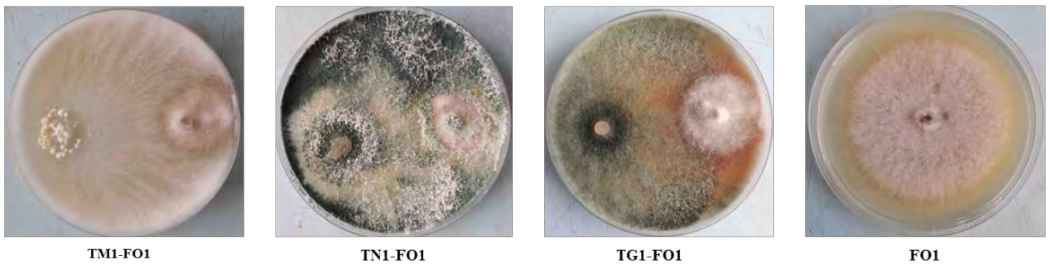
Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD au seuil de 5%.

Ces résultats montrent que le test de confrontation directe permet une inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes plus importante que le test de confrontation à distance. Les souches de *Trichoderma* TM1, TN1, TS1, TG4 et TU1 sont les plus performantes pour les deux tests d'antagoniste.

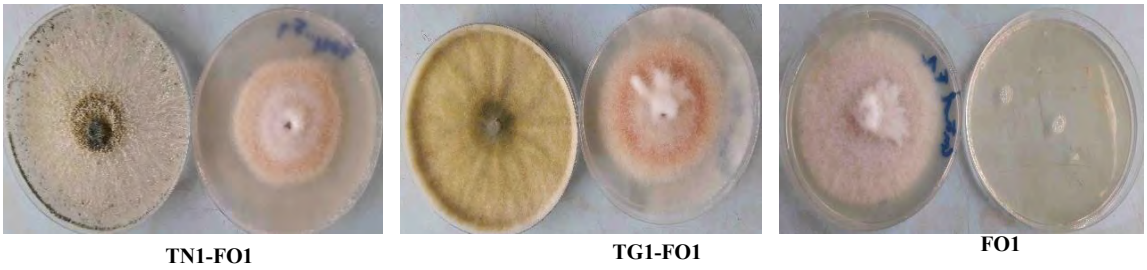


Tests de confrontation directe *Trichoderma-Sclerotinia rolfsii* (SR1)

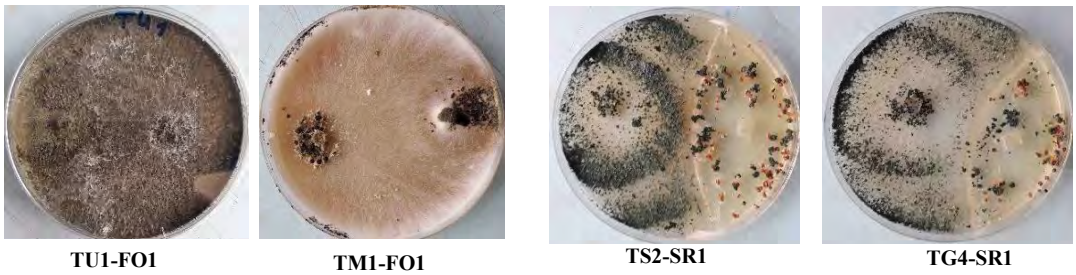
Tests de confrontation indirecte *Trichoderma- Sclerotinia rolfsii* (SR1)



Tests de confrontation *Trichoderma-Fusarium oxysporum* (FO1)



Tests de confrontation indirecte *Trichoderma-Fusarium oxysporum* (FO1)



Activité mycoparasitaire avec *Fusarium oxysporum* *Activité mycoparasitaire avec Sclerotinia rolfsii*

***Figure 24**: Tests d'antagonisme entre isolats de Trichoderma et souches pathogène*

II.4 Effet des *Trichoderma* sur la virulence des champignons pathogènes en serre

Après les tests d'antagonisme, cinq isolats de *Trichoderma* ont été sélectionnées pour étudier leurs effets sur la virulence de *Fusarium oxysporum* et de *Sclerotinia rolfsii* en serre: il s'agit des souches de *Trichoderma asperellum* TS1, TG4, TU1, TM1 et TN1. L'étude a été effectuée par traitement des semences et par inoculation directe du sol au moment du repiquage.

II.4.1 Traitement des semences

II.4.1.1 Effets des isolats de *Trichoderma* sur la virulence *Fusarium oxysporum*

- **Effet sur l'incidence de la maladie**

L'effet des différents isolats de *Trichoderma* sur l'incidence de la souche de *Fusarium oxysporum* FO1 est représenté par la Figure 25. Les résultats obtenus montrent un effet hautement significatif de l'impact des *Trichoderma* sur la virulence du pathogène. Le traitement avec FO1 seul présente une incidence plus importante que les autres traitements. Le témoin absolu n'a présenté aucun symptôme de la maladie. Parmi les traitements avec les différents isolats de *Trichoderma*, la souche TM1 (10%) a présenté l'incidence la plus faible suivie de la souche TN1 (13,33%). Comparés aux plants inoculés avec FO1 seul, tous les isolats de *Trichoderma* ont permis une réduction significative de l'incidence de la fusariose des plants de tomate.

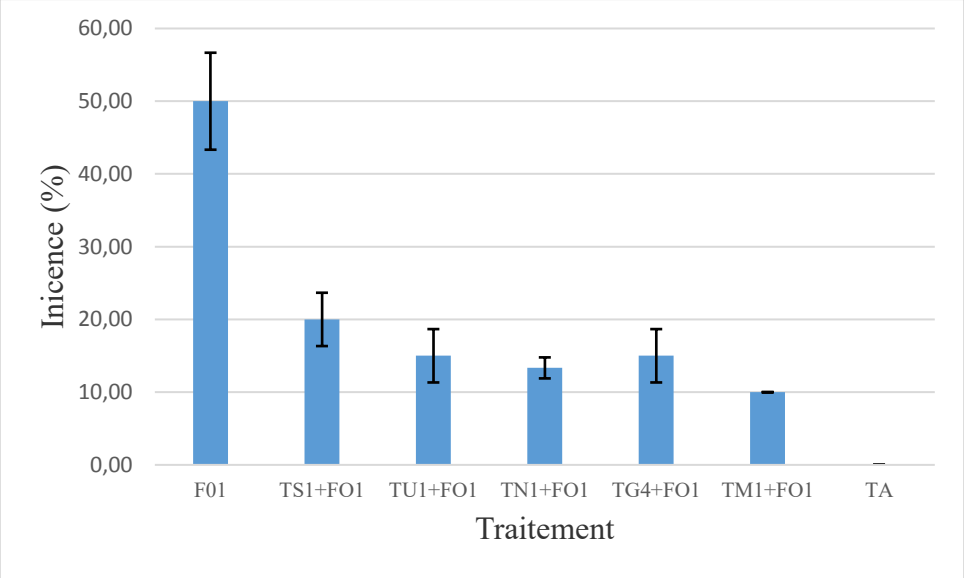


***Figure 25**: Effet du traitement des semences par les isolats de Trichoderma sur l'incidence de Fusarium oxysporum (FO1)*

Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne

- **Effet sur la croissance des plants de tomate**

Les résultats obtenus ont montré une variation des différents paramètres de croissance des plants de tomate en fonction des traitements. Pour les plants inoculés avec FO1 seul, une réduction importante de la hauteur de 20,07 cm; du diamètre au collet de 2,8 mm; de la biomasse aérienne de 17,67 g et racinaire de 10,87 g est notée par rapport au témoin non inoculé (TA) (Tableau 18). Pour les plants traités avec les différents isolats de *Trichoderma*, la hauteur et la biomasse racinaire n'ont pas montré de différences significatives.

***Tableau 18**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate*

Traitements	Hauteur des plants (cm)	Diamètre au collet (mm)	Biomasse aérienne (g)	Biomasse racinaire (g)
FO1	34,83b	4,57b	19,13c	6,90b
TS1+FO1	47,83a	5,85ab	23,37bc	11,97ab
TU1+FO1	49,33a	6,18ab	28,23abc	12,67ab
TN1+FO1	54,67a	6,46ab	31,33ab	15,90ab
TG4+FO1	49,83a	5,91ab	21,57bc	12,60ab
TM1+FO1	52,33a	7,57a	29,80ab	14,70ab
TA	54,90a	7,37a	36,80a	17,47a

Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Newman Keuls au seuil de 5%.

II.4.1.2 Effets des isolats de *Trichoderma* sur la virulence *Sclerotinia rolfsii*

- **Effet sur l'incidence de la maladie**

Les résultats obtenus montrent que l'inoculation avec les *Trichoderma* a significativement réduit l'incidence de la sclérotiniose sur les plants de tomate (Figure 26). Le traitement avec SR1 seule présente l'incidence la plus élevée (83,33%) au moment où cette incidence est nulle pour les plants non inoculés (témoins absolus). La différence de l'incidence entre les plants inoculés avec les différentes souches de *Trichoderma* et celle de SR1 seule est de 60% pour TN1; 55% pour TM1; 46,67% pour TG4; 41,67 pour TU1 et 16,67% pour TS1 (Figure 26). Les différentes souches de *Trichoderma* ont donc permis une réduction significative de l'incidence de la sclérotiniose. Toutefois cette réduction est variable en fonction des isolats.

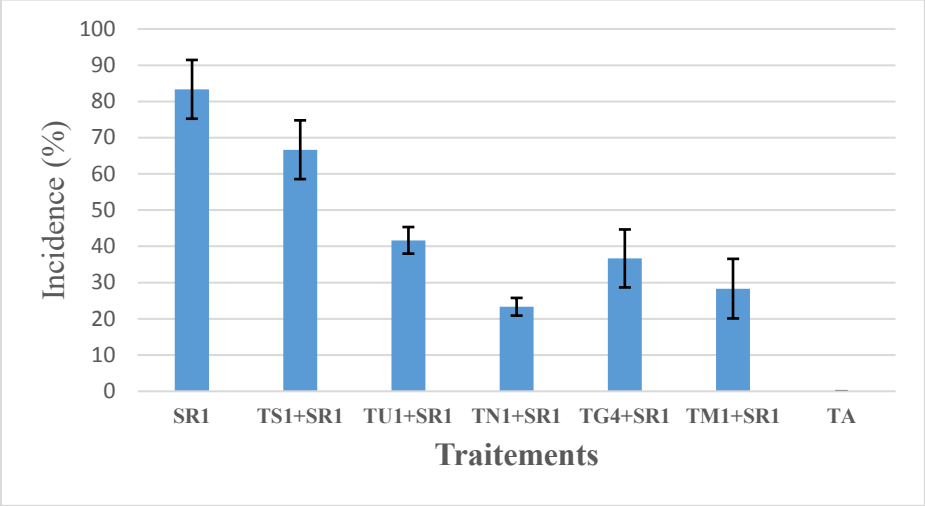


***Figure 26**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur l'incidence de Sclerotinia rolfsii (SR1)*

Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne

- **Effet sur la croissance des plants de tomate**

L'inoculation avec *Sclerotinia rolfsii* (SR1) a entrainé une réduction importante de la croissance des plantes par rapport aux témoins non inoculés (TA). Cette réduction par rapport TA est de 28,55 cm pour la hauteur ; 4,79 mm pour le diamètre au collet, 28,34 g pour la biomasse aérienne et 10 g pour la biomasse racinaire (Tableau 19). L'application des *Trichoderma* a considérablement réduit cette diminution des paramètres de croissance due à la présence de SR1 dans le sol. En présence de l'isolat de *Trichoderma* TN1, la réduction des paramètres de croissance la plus faible due à la présence de SR1 par rapport au TA a été obtenue (la hauteur de 0,9 cm, le diamètre au collet de 1,13 cm; la biomasse aérienne de 10,6 g et la biomasse racinaire 0,3 g).

***Tableau 19**: Effet du traitement des semences avec les isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate*

Traitements	Hauteur des plants (cm)	Diamètre au collet (mm)	Biomasse aérienne (g)	Biomasse racinaire (g)
SR1	26,33b	2,50b	6,83b	2,17b
TS1+SR1	34,00ab	4,01ab	11,93b	5,37ab
TU1+SR1	39,50ab	4,59ab	14,50ab	5,47ab
TN1+SR1	54,00a	6,46a	24,57ab	11,87ab
TG4+SR1	36,17ab	4,77ab	19,13ab	6,90ab
TM1+SR1	42,83ab	6,24a	19,67ab	7,60ab
TA	54,90a	7,59a	35,17a	12,17a

Pour chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Newman Keuls au seuil de 5%.

II.4.2 Traitement du sol

II.4.2.1 Effet des isolats de *Trichoderma* sur la virulence de *Fusarium oxysporum*

- **Effet sur l'incidence de la maladie**

L'impact des différentes souches de *Trichoderma* après inoculation au sol sur l'incidence de *Fusarium oxysporum* (FO1) est représenté par la Figure 27. Une réduction significative de l'incidence de la fusariose sur les plants de tomate a été observée par l'inoculation des différents isolats de *Trichoderma*. Le traitement avec FO1 seul a montré l'incidence la plus importante (66,67%). Concernant les plants inoculés avec les différents isolats de *Trichoderma*, les souches TN1 et TM1 ont présenté la plus faible incidence (6,66%) de la maladie sur les plants de tomate suivie respectivement des isolats TS1 (11,67%), TU1 et TG4 (15% chacun). Comme pour les autres tests aucun symptôme n'a été observé pour les plants non inoculés (TA).

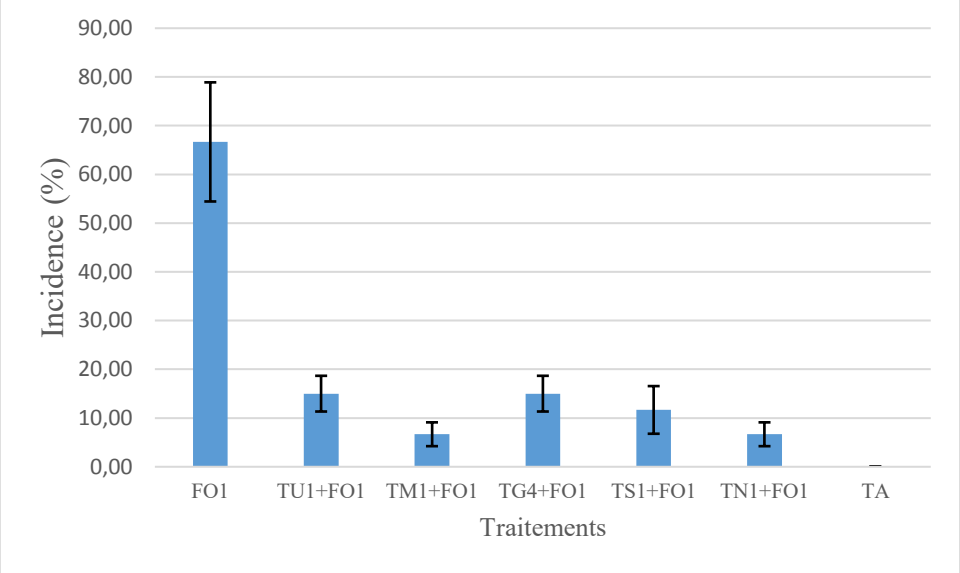


Figure 27: *Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur l'incidence de Fusarium oxysporum (FO1)*

Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne

- **Effet sur la croissance des plants de tomate**

L'inoculation de *Fusarium oxysporum* (FO1) a entrainé une réduction importante des paramètres de croissance des plants par rapport aux témoins non inoculés (TA) (Tableau 20). Cette réduction est de 24,5 cm pour la hauteur; 3,73 mm pour le diamètre au collet; 23,63 g pour la biomasse aérienne et 15,47 g pour la biomasse racinaire. Cette réduction des paramètres de croissance due à l'inoculation de FO1 est très faible pour les plants inoculés avec les différents isolats de *Trichoderma.* Aucune différence significative n'a été notée entre les

traitements avec différentes souches de *Trichoderma* par rapport au TA. Parmi les différents traitements avec *Trichoderma*, l'isolat TM1 a donné les meilleurs résultats pour tous les paramètres de croissance (hauteur 58,83cm, diamètre au collet 7,08 mm, biomasse aérienne 42,07 g et biomasse racinaire 21 g) suivi de la souche TN1.

***Tableau 20**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate*

Traitements	Hauteur des plants (cm)	Diamètre au collet (mm)	Biomasse aérienne (g)	Biomasse racinaire (g)
FO1	34,50b	4,15c	20,10b	6,90b
TS1+FO1	55,67a	6,39ab	36,27ab	16,80ab
TU1+FO1	56,83a	6,33ab	33,90ab	16,73ab
TN1+FO1	58,33a	6,37ab	38,67ab	17,03ab
TG4+FO1	53,00a	5,15bc	25,87ab	15,30ab
TM1+FO1	58,83a	7,08a	42,07ab	21,00a
TA	59,00a	7,88a	43,73a	22,37a

Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Newman Keuls au seuil de 5%.

II.4.2.2 Effets des isolats de *Trichoderma* sur la virulence *Sclerotinia rolfsii*

- **Effet sur l'incidence de la maladie**

Les résultats obtenus de l'effet des isolats de *Trichoderma* après inoculation au sol sur l'incidence de *Sclerotinia rolfsii* (SR1) a montré une différence hautement significative (Figure 28). L'incidence de la sclerotiniose est nulle pour les plants non inoculés (TA) et très élevée avec SR1 seule (75%). Pour les plants inoculés avec les différentes souches de *Trichoderma,* TM1 a présenté l'incidence la plus faible (10%) suivi respectivement de TN1 (15%), TU1 et TN1 (31,67%) et TS1 (58,33%).

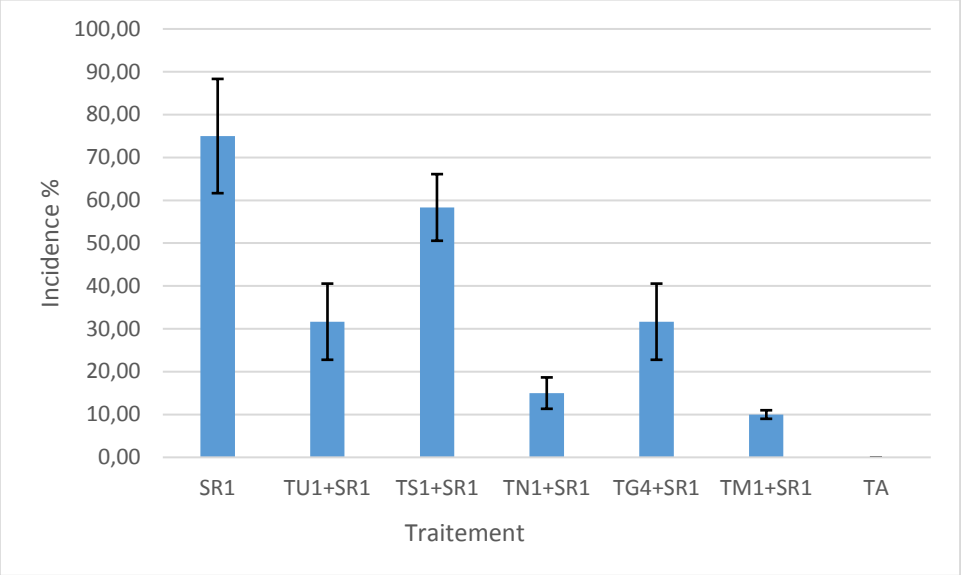


***Figure 28**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur l'incidence de Sclerotinia rolfsii (SR1)*

Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne

- **Effet sur la croissance des plants de tomate**

L'inoculation des plants avec *Sclerotinia rolfsii* (SR1) a entrainé une réduction importante des paramètres de croissance par rapport au témoin non inoculé (TA) (Tableau 21). Avec l'application des différentes souches de *Trichoderma*, la réduction des paramètres de croissance est très faible. Bien que n'ayant pas de différence significative, les isolats TN1 et TM1 ont présenté les plus importantes valeurs pour tous les paramètres de croissance concernant les différents traitements avec *Trichoderma*.

***Tableau 21**: Effet de l'inoculation au sol des isolats de Trichoderma sur la croissance des plants de tomate*

Traitements	Hauteur des plants (cm)	Diamètre au collet (mm)	Biomasse aérienne (g)	Biomasse racinaire (g)
SR1	18,67b	2,16c	11,27b	4,87b
TS1+SR1	28,33ab	3,09bc	12,03b	6,57ab
TU1+SR1	42,00ab	3,70abc	24,67ab	6,90ab
TN1+SR1	54,90ab	6,46ab	28,23ab	14,47ab
TG4+SR1	40,50ab	4,63abc	20,10b	10,80ab
TM1+SR1	51,00ab	6,24ab	29,83ab	15,30ab
TA	61,00a	7,41a	44,27a	18,83a

Pour chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Newman Keuls au seuil de 5%.

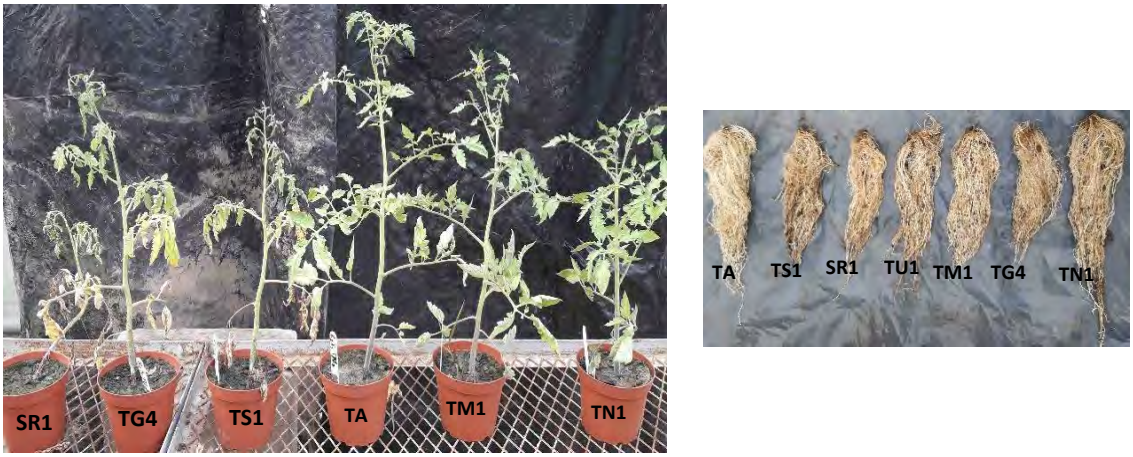


***Figure 29**: Aspect de l'appareil végétatif et racinaire des plants de tomate lors du test sur la virulence de Sclerotinia rolfsi*

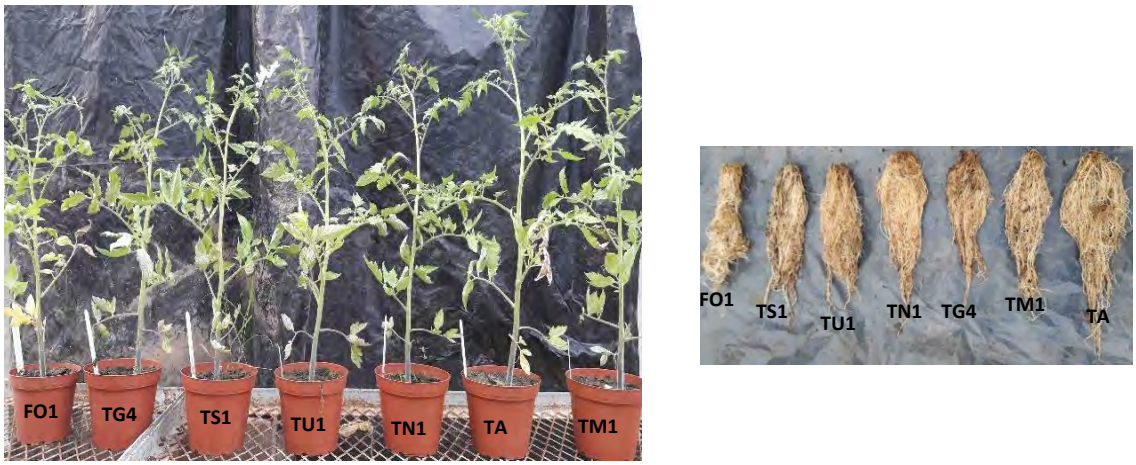


***Figure 30:** Aspect de l'appareil végétatif et racinaire des plants de tomate lors du test sur la virulence de Fusarium oxysporum*

III. Discussion

III.1 Etudes *in vitro* des propriétés antagonistes

Les tests de confrontation directe et indirecte ont montré la capacité des *Trichoderma* à inhiber le développement de *Fusarium oxyporum* (FO1) et de *Sclerotinia rolfsii* (SR1). Cette capacité d'inhibition varie en fonction des souches de *Trichoderma* et du pathogène en présence. Les résultats obtenus ont montré une capacité d'inhibition plus importante sur *Fusarium oxysporum* que sur *Sclerotinia rolfsii* lors des différents tests d'antagonisme.

Des résultats similaires montrant l'effet antagoniste des espèces de *Trichoderma* contre plusieurs agents pathogènes ont été rapportés par Reddy *et al*., (2013); Sundara Moorthy et Balabaskar, (2013); Hanan et Mohamed (2014) avec des pourcentages d'inhibition variant d'une souche à l'autre. Conformément à nos résultats, Pakkala et Harison, (2018) ont montré un pourcentage d'inhibition qui varie entre 64 et 71 % lors des tests de confrontation directe et 14 à 45 % pour le test de confrontation à distance entre des souches de *Trichoderma viride* et de *Fusarium oxysporum.* De même Hasan et Nada, (2016) ont montré que des isolats de *Trichoderma asperellum* présentaient une inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata* et de *Fusarium semitectum* avec des moyennes pouvant aller respectivement jusqu'à 69,23 et 64%. Les résultats de Amin *et al*., (2010) ont montré une activité volatile des isolats de *Trichoderma* spp. contre différents phytopathogènes fongiques et ont obtenu des résultats similaires avec une inhibition de la croissance mycélienne de 41,8% pour *Fusarium oxysporum*, 40,68 % pour *Sclerotinia rolfsii* et 30,58% pour *Rhizoctonia solani*. En utilisant différents isolats de *Trichoderma harzanium* et de *Trichoderma viride*, Rehman *et al*., (2013) et Cherkupally *et al*., (2017) ont obtenu des pourcentages d'inhibition plus importants qui tournent autour de 80% en confrontation directe avec différentes espèces de *Fusarium oxyporum.* De même, Monirul islam, (2016) a montré une capacité d'inhibition de *Trichoderma* plus importante contre des isolats de *Sclerotinia rolfsii a*vec des pourcentages d'inhibition pouvant aller jusqu'à 76,9%. Comparativement à nos résultats, Bardia et Rai, (2007) ont obtenu des pourcentages d'inhibition plus faibles des *Trichoderma* contre des isolats de *Fusarium oxyporum* (inférieurs à 60%).

Cette inhibition observée lors des tests d'antagonisme peut s'expliquer par plusieurs mécanismes dont: le mycoparasitisme (Howell, 2003), la compétition pour l'espace et les nutriments (Elad *et al*., 1999), l'antibiose (Howell, 1998), l'inactivation des enzymes du pathogène (Roco et Perez, 2001), la sécrétion de certains antibiotiques non volatils diffusibles

par les espèces de *Trichoderma* (Hajieghrari *et al*., 2008) et/ou la sécrétion de la paroi cellulaire des enzymes dégradantes (Harman *et al*., 2004).

Pour le mycoparasitisme, *Trichoderma* attaque directement le phytopathogène en excrétant des enzymes lytiques, telles que les chitinases, les β-1,3 glucanases et les protéases (Haran *et al*., 1996). Les squelettes des parois cellulaires des pathogènes fongiques contiennent de la chitine, du glucane et des protéines. Les enzymes qui hydrolysent ces composants doivent être présentes dans un antagoniste efficace pour qu'elles jouent un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire du pathogène (Lorito *et al*., 1994; Carsolio *et al*., 1999). L'envahissement des souches de *Fusarium sp.* par *Trichoderma* et la sporulation très abondante de ce dernier traduit son pouvoir hautement mycoparasitaire (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001). L'envahissement du mycélium du pathogène par *T. harzianum* a également été observé par Benhamou et Chet, (1997) en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre une souche de *Trichoderm*a et un autre champignon tellurique *Pythium ultimum* et ce au bout de quatre à cinq jours après inoculation. Des observations microscopiques réalisées par Hibar *et al*., (2005) au niveau de la zone de contact entre *T. harzianum* et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, montrent une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se traduisant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium de *T. harzianum* autour du pathogène.

Le phénomène de compétition se manifeste par une croissance importante et très rapide des *Trichoderma* qui leur permet de coloniser rapidement le milieu de culture et de mobiliser tous les éléments nutritifs à leur profit (Alabouvette *et al*., 1983; Davet, 1996). Ce phénomène réduit considérablement la croissance de l'agent pathogène.

Cette inhibition de la croissance des souches peut être aussi due à la capacité des *Trichoderma* de produire des antibiotiques empêchant la croissance des pathogènes. Ce qui explique la présence des zones d'inhibition et l'arrêt de la croissance des souches de *Fusarium* et de *Sclerotinia*. Dennis et Webster, (1971) ont mis en évidence des antibiotiques secrétés par les *Trichoderma*, solubles dans le chloroforme et extractibles à partir du milieu de culture qui permettent une inhibition à distance de la croissance des pathogènes. Meslouhi, (1989) et Davet (1983a et 1983b) ont montré que l'action inhibitrice observée avec les tests de confrontation à distance est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma* (phénomène d'antibiose). La capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèces différentes. Vey *et al*., (2001) et Bhagat *et al*., (2014) ont signalé que de grandes variétés de métabolites secondaires volatils produits par *Trichoderma*,

tels que l'éthylène, le cyanure d'hydrogène, les aldéhydes et les cétones, jouent un rôle important dans le contrôle des agents phytopathogènes .

III.2 Effet *in vivo* des *Trichoderma* sur la virulence des pathogènes (*Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii*)

Cette étude a montré une réduction de l'incidence de la fusariose et de la sclérotiniose en serre après traitement des semences de tomate. L'inoculation avec les isolats de *Trichoderma* a aussi entrainé une amélioration significative des paramètres de croissance (hauteur, diamètre au collet, biomasse aérienne et racinaire des plants) par rapport aux plants inoculés avec les pathogènes seuls. Les isolats de *Trichoderma asperellum* TN1 et TM1 étaient plus efficaces pour contrôler les maladies testées et ont permis une réduction de l'incidence de la fusariose respectivement de 36, 67 et 40% et de la sclérotiniose de 60 et 55%. Des résultats similaires montrant l'effet des *Trichoderma* sur la réduction de l'incidence des maladies fongiques et l'amélioration de la croissance des plantes ont été obtenus par plusieurs auteurs. Des souches de *Trichoderma viride* et *Trichoderma harzianum* ont été signalées comme les meilleurs antagonistes de plusieurs agents pathogènes des plantes transmis par le sol et les semences (Poddar *et al*., 2004). Certains chercheurs ont signalé que *Trichoderma* pouvaient augmenter la croissance et la productivité des plantes (Harman, 2006; Manju et Mall, 2008). Des applications de *Trichoderma viride* et T*richoderma harzianum* se sont révélées très efficaces dans la gestion de *Fusarium oxysporum* dans différentes cultures telles que la tomate et le coton (Sharma, 2011; Linda, 2000). Différentes études ont montré l'efficacité des *Trichoderma* spp. sur de nombreuses cultures comme la laitue, l'oignon, le coton, le raisin, le pois, la pomme de terre, la tomate, la carotte pour contrôler divers agents pathogènes appartenant aux genres *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Colletotricum*, *Fusarium*, etc. (Benitez *et al*., 2004; Nirupama Devi *et al*., 2013). Les travaux de Monirul Islam, (2016) ont montré que les inoculations avec les isolats de *Trichoderma asperellum* TR05, TR06 et TR08 non seulement suppriment les maladies de pourriture du collet due à *Sclerotinia rolfsii*, mais augmentent également le pourcentage de germination, la croissance des racines et des pousses, le poids sec et la vigueur des plants de tomates par rapport au contrôle infecté. Dans une étude similaire, Lo et Lin, (2002) ont également étudié différentes souches de *Trichoderma* pour la croissance de la courge amère, du luffa et du concombre et ont constaté que les isolats augmentaient de manière significative la hauteur des plantules de 26 à 61%, la surface foliaire de 27 à 38% et le poids sec de 38 à 62%. Comparativement à nos résultats, une réduction plus importante de l'incidence de la fusariose par *T. harzianum* a été obtenue par Sivan *et al.,* (1987) après

enrobage des semences de tomate avec des pourcentages qui tournent autour de 80%. De même, Hjeljord *et al.* (2001) ont montré que l'application de *T. harzianum* sur le fraisier permettait une réduction de plus de 85% des attaques de *Botrytis cinerea*. Contrairement à ces résultats, Ghazalibiglar *et al*., (2016) a obtenu sur 11 souches de *Trichoderma*, un seul isolat qui permet une réduction significative de l'incidence de *Fusarium oxysporum* et une augmentation significative des paramètres de croissance comme la hauteur des plants et la longueur des racines.

Cette réduction de l'incidence des maladies et de l'amélioration de la croissance des plantes est due à la capacité des *Trichoderma* à produire pour les plantes des molécules utiles, telles que le glucose oxydase et des composés stimulant la croissance et pouvant entraîner une résistance contre les agents pathogènes (Brunner *et al*., 2005). *Trichoderma* peut également produire des antibiotiques, tels que la gliotoxine, la viridine et des enzymes dégradant les parois cellulaires, ainsi que des métabolites biologiquement actifs thermostables, tels que l'acétate d'éthyle qui sont des substances impliquées dans la suppression des pathogènes fongicides.

L'inoculation directe au sol au moment du repiquage des plants, est basée sur le développement d'une stratégie de gestion pour l'élimination ou la réduction des inocula des pathogènes fongiques. Les résultats obtenus ont montré que les formulations de traitement du sol par les isolats TN1 et TM1 réduisent significativement l'incidence de la fusariose et de la sclérotiniose et permettent une amélioration des paramètres de croissance par rapport aux traitements individuels avec les pathogènes seuls. Des résultats similaires ont été obtenus par Monirul Islam, (2016) lors de l'inoculation au sol de différents isolats de *Trichoderma asperellum* en présence de *Sclerotinia rolfsii*. Ils ont ainsi montré que l'inoculation au sol par les isolats de *Trichoderma* permettrait une meilleure colonisation de la rhizosphère en inhibant la communauté des microorganismes pathogènes (Bennett et Whipps, 2008). En outre, de nombreux mécanismes pourraient aussi expliquer le rôle des champignons antagonistes dans la suppression de la croissance des agents pathogènes et dans le contrôle des maladies fongiques. Cette capacité de contrôle biologique pourrait être due au mycoparasitisme (Haran *et al*., 1996), à l'antibiose (Ghisalberti et Rowland, 1993), à l'induction d'une résistance chez les plantes (Yedidia *et al*., 1999) ou à la compétition pour les nutriments et/ou l'espace (Inbar *et al*., 1994). Ces mécanismes peuvent avoir un effet stimulant sur la croissance des plantes car ils modifient les conditions du sol. En plus de fournir des actions antimicrobiennes, ils stimulent également l'activité biologique des populations microbiennes antagonistes résidentes, favorisant ainsi la croissance des plantes (Harman *et al*., 2004).

Conclusion

L'effet nettement antagoniste des isolats de *Trichoderma* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et de *Sclerotinia rolfsii* a été montré. En effet, les tests de confrontations directe et indirecte ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne des deux pathogènes. Pour le test de confrontation directe, une importante inhibition de la croissance allant de 60,89% à 73,49% pour *Fusarium* et 51,07% à 59,26% pour *Sclerotinia* a été obtenue. Une diminution du pourcentage d'inhibition a été constatée lors du test de confrontation indirecte avec des valeurs d'inhibition plus faibles et comprises entre 20,89 et 39,11% pour *Fusarium* et 13,73 à 31,37% pour *Sclerotinia*. Les cinq isolats présentant les meilleurs propriétés antagonistes (TM1, TS1, TG4, TN1 et TU1) ont été sélectionnés pour étudier en serre leurs effets sur la virulence des pathogènes. Les résultats obtenus ont montré une réduction importante de l'incidence des deux maladies après traitement des semences et inoculation directe au sol. Une amélioration significative des paramètres de croissance (hauteur, diamètre au collet, biomasse aérienne et racinaire) a été obtenue avec les plants traités avec les isolats sélectionnés comparativement aux plants inoculés avec les pathogènes seuls. Toutefois cet effet varie d'un isolat à un autre. En effet, les deux isolats de *Trichoderma asperellum* TN1 et TM1 ont donné des pourcentages d'inhibition plus importants lors des tests d'antagonisme et une meilleure réduction de l'incidence des deux maladies sur les plants de tomate en serre. Ces souches pourraient donc être proposées comme agent de lutte biologique contre les pathogènes fongiques des cultures maraîchères au Sénégal aussi bien pour le traitement des semences dans le cadre de la production des pépinières ou bien pour une inoculation directe au sol.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

La caractérisation des souches de *Trichoderma* indigènes et l'évaluation de leurs potentialités antagonistes contre deux pathogènes fongiques de la tomate à savoir *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia Rolfsii* ont été menées au laboratoire et en serre. 20 souches de *Trichoderma* ont été isolées à partir du sol de différents sites de la zone des Niayes dont 3 à partir du jardin botanique de l'UCAD, 4 à Sangalkam, 7 à Gorom, 3 à Notto Gouye Diama et 3 au niveau de la zone de Mboro. Le screening pour la production d'enzymes extracellulaires (pectinase, protéase, chitinase et cellulase) et d'AIA a permis de sélectionner 10 souches de *Trichoderma*. L'estimation de la production des enzymes lytiques des souches a montré une importante activité enzymatique élevée par les isolats de *Trichoderma*. Ensuite, 8 de ces isolats ont été identifiés en se basant sur le séquençage des régions IT1 et IT4 dont 7 souches appartenant à l'espèce *Trichoderma asperellum* et 1 à *Trichoderma virens*. L'analyse de la diversité génétique de ces isolats par RAPD en utilisant 5 primers a révélé un pourcentage de polymorphisme élevé (98.2%**).**

Ensuite plusieurs facteurs abiotiques dont le milieu de culture, le pH, la température d'incubation, la teneur en sel, la source de carbone et d'azote ont été évalués sur la croissance mycélienne des 8 isolats de *Trichoderma* identifiés. A la suite de ces expériences, il est apparu que le milieu de culture à base de pomme de terre PDA est plus adéquat pour la culture des souches à des pH acides à neutres (pH 5 et pH 7). Parmi les différentes températures testées, l'optimum de croissance obtenu se situait aux températures de 25 et 30 °C. L'effet de salinité a montré une diminution importante de la croissance mycélienne en fonction de l'augmentation de la concentration de NaCl avec une tolérance allant jusqu'à 2% par les différentes souches testées. Concernant l'effet de la source de carbone sur la croissance mycélienne des *Trichoderma*, les résultats ont montré une bonne croissance de tous les isolats sur les différentes sources de carbone testées avec un meilleur développement pour le dextrose et le mannitol. Les différentes sources d'azote testées ont aussi permis un bon développement mycélien de tous les isolats de *Trichoderma.*

Enfin l'étude des propriétés antagonistes des *Trichoderma* a été réalisée à travers des tests d'antagonistes *in vitro* et de virulence en serre contre *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia Rolfsii*. Les deux champignons pathogènes utilisés ont été isolés au niveau de la station expérimentale de Sangalkam de l'ISRA/CDH sur culture de tomate. Les résultats obtenus ont montré un effet antagoniste net des isolats de *Trichoderma* vis-à-vis des deux pathogènes. En effet, les tests de confrontation directe et indirecte ont révélé une inhibition de la croissance

mycélienne des deux pathogènes. Pour le test de confrontation directe, une importante inhibition de la croissance allant de 60,89 à 73,49 % pour *Fusarium* et 51,07 à 59,26 % pour *Sclerotinia* a été obtenue. Une diminution du pourcentage d'inhibition a été constatée lors du test de confrontation indirecte. Cette diminution tourne entre 20,89 et 39,11 % pour *Fusarium* et 13,73 à 31,37 % pour *Sclerotinia*. Ensuite les cinq isolats présentant les meilleurs propriétés antagonistes (TM1, TS1, TG4, TN1 et TU1) ont été sélectionnés pour étudier en serre leurs effets sur la virulence des pathogènes. Le traitement des semences et l'inoculation directe au sol semblent donc réduire de façon significative l'incidence des deux maladies. Une amélioration significative des paramètres de croissance (hauteur, diamètre au collet, biomasse aérienne et racinaire) par rapport aux plants inoculés avec les pathogènes seuls a été notée. Les deux isolats de *Trichoderma asperellum* TN1 et TM1 ont donné des pourcentages d'inhibition plus importante lors des tests d'antagonisme et une meilleure réduction de l'incidence des deux maladies

Les résultats obtenus dans le cadre de ces études *in vitro* et en serre ne sont pas suffisants, car en milieu réel les conditions expérimentales sont sous l'influence des facteurs du milieu, du comportement de la plante-hôte et des interactions multiples avec les autres micro-organismes du sol. En conséquence, il est parfois difficile de répéter une expérience dans des conditions réelles et à grande échelle. Pour cette raison, il est donc indispensable de poursuivre les recherches pour aboutir à l'utilisation de ces souches de *Trichoderma* contre plusieurs agents pathogènes fongiques des cultures maraichères transmis par le sol. Il devrait être possible de réaliser des essais à plus grande échelle dans de véritables conditions naturelles. Ces études pourraient ainsi participer à la préservation des sols de cultures et à la valorisation des microorganismes telluriques comme les *Trichoderma*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abada K. A. 2003. Fungi causing damping-off and root-412 rot on sugar-beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. *Agric. Ecosyst. Environ*. 51, 333–337.

Abiodun A. O., Tayo B. C. A., Odeniyi A. O., Banjo, Garuba E. O. 2012. Comparative mycelial and spore yield by *Trichoderma viride* in batch and fed-batch cultures. *Ann. Microbiol*. 10:10-12.

Abo-Elyousr K. A. M., Sobhy I., Abdel-Hafez I. and Abdel-Rahim I. 2014. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri. J. Phytpathol.* 162:567- 574.

Agrawal T., Kotasthane AS. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus*; 1(1): 73.

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495. pp. 524-525.

Ahouangninou C., Fayomi E., Benjamin and Martin T. 2011. Evaluation des risques sanitaires et environnementaux des pratiques phytosaniataires des producteurs maraichers dans la commune rurale de Tori-Bossito (Sud-Benin). *Cah Agric.* Vol 20, num. 3, 216-222.

Alabouvette C., Couteaudieur Y., and Lotjvert J. 1983. Importance de la compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16 XXIV colloque de la société Française de phytophatologie, N°34, Bordeaux (FR).

Alfano G., Lewis I. L. M., Cakir C., Bos J. I. B., Miller S. A., Madden K. V. L. and Hoitink J. A. H. 2007. Systemic modulation of gene S. expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Biolog Control*, 97: 429-437.

Amin F., Razdan V. K., Mohiddin F. A., Bhatt K. A., and Sheikh P. A. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro. Journal of Phytology* 2(10): 34–37.

Anand P., Isar J., Savan S., Saxena PK. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresour Technol*. 97:1018–1025.

Anchisi L. J., Gennari M. and Matta A. **1985.** Retardation of Fusarium wilt symptoms in tomato by pre-and post-inoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water. *Physiological Plant Pathology*. 26:175-183.

ANSD. 2015. Bulletin mensuel des statistiques économiques d'Avril 2015. 103p.

Armstrong G. M., Armstrong J. K. 1981. Forme speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. P. 391-399. In Nelson, P.E., Toussoun, T.A. et Cook, R.J. (Eds.): *Fusarium*: Diseases, Biology, and Taxonomy. Pennsylvania State University Press, University Park. 474p.

Attitalla H. I., Abdelrawaf S., Suliman O. S. K., El-Komy M.A.H and Muhammed S. 2012. Occurrence and Microbiological characteristic of *Trichoderma* in Al-Jabal Al –Akhdar Region, Libya. *Journal of Biological Sciences* 12 (4). pp. 209-2017.

Avis T. J., Hamelin R. C. and Bélanger R. R. 2001. Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. *Can. J. Plant Pathol*. 23:8-12.

Aycock R. 1966. Stem rots and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. North Carolina *Agri. Exp. St. Tech*. Bulletin.174: 202.

Bandyopadhyay S., Jash S., Dutta S. 2003. Effect of different pH and temperature levels on growth and sporulation of *Trichoderma, Environ. Ecol*. 21, 770-773.

Bardia P. K., Rai PK. 2007. *In vitro* and field evaluation of biocontrol agents and fungicides against wilt of cumin caused by *Fusarium oxysporum f*. Sp. *Cumini*. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 16(2): 88-92.

Beckman C.H. and Roberts E.M. 1995. On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to fungal wilt diseases of plant. *Adv. Bot. Res*. 21:35–77.

Bell D. K., Walls H. D. and Markham C. R. 1982. The *in vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathol,* 72:379-382.

Benhamou N. et Chet I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2095–2099.

Benitez T., Rincon M.A., Limon M.C. and Codon C.A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol*., 7: 249-260.

Bennett A. J, Whipps J. M. 2008. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. *Appl soil Ecol*. 38: 83–89.

Bernard C. 2009. Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate thèse de Doctorat de l'INPL Sciences Agronomiques, UMR 1121 Nancy Université – INRA. 265pp.

Betina V. and Farkas V. 1998. Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*, pp. 131-151. *In*: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics Vol. I. Taylor & Francis, Bristol, U.S.A. 293p.

Bhagat S., Birah A., Kumar R., Yadav M.S. and Chatto-padhyay C. 2014. Plant disease management: pro-spects of pesticides of plant origin. *Advances in Plant Biopesticides*. 119-129.

Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y., H€ofte M. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med Fac Landbouww Univ Gent*. 62:1001–1007

Bisset J. **1991.** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Pachybiasium. (a) *Revue canadienne de botanique*, 69 (11): 2373-2417.

Bisset J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. (b) *Revue canadienne de botanique*, 69 (11): 2357-2372

Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma.* I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Revue canadienne de botanique*, 62 (5):924-93

Bitton G., Boylan R. A. 1985. Effect of acid precipitation on soil microbial activity: I. Soil core studies, *J. Environ. Qual*. 14, 66-69.

Blancard D. 1997. Les maladies de la tomate. Edition INRA, Paris, 212 p.

Blancard D. 2009. Les maladies de la tomate. Identifier, connaître, maitriser. Editions Quae. 690p.

Bokhari anajat and Perveen kahkashan. 2012. *In vitro* inhibition potential of *Phoenix dactylifera* extracts on the growth of pathogenic fungi. *Journal of Medicine Plants Research*; 6(6)114-123.

Booth C., 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237p.

Booth C. 1984. The *Fusarium* problem: Historical, economic and taxonomic aspects. InThe applied Mycology of *Fusarium*, Moss, M.O. and Smith, J. E. Ed. Cambridge University Press, 1-13.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthir S., Larpent J. P., Gay P. H., Reymond P.,

Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P.,Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2nd Edition, Masson, Paris, Milan, Barcelone, Mexico, 511p.

Bouhot D., Rouxel F. et Louvet J. 1972. Observation de la fusariose vasculaire de la tomate en France. *Ann. Phytopathol*. 4: 187-191.

Bounknabel F. 2002. Contribution à l'étude de *Verticillium dahlia* agent de la verticiliose de l'olivier. Mémoire de Magister, Univ. Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algerie, 103p.

Bridge P. D. 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* Subsection *Fasciculata*. *J. Gen. Microbiol*.131:1887–1895.

Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Woo SL., Lorito M., Kubicek C. P., Robert L. M. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7): 3959-3965.

Camara M. 2012. Contribution à l'étude de la maladie virale du jaunissement et de l'enroulement en cuillère des feuilles de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), causée par le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), dans la zone maraîchère des Niayes de Dakar. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles, Université de Cheikh Anta Diop de Dakar. 177p.

Camara M., Mbaye A., Samba S.A.N., Gueye T., Noba K., Diao S., and Cilas C. 2013. Etude de la productivité et de la Sensibilité de diverses variétés de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) à la virose du jaunissement et de l'enroulement en cuillère des feuilles au Sénégal. *Int. J. Biol. Chem. Sci*. 7(6), 2504-2512.

Caron J., Laverdière J., Venne J., Bélanger R. R. 2006. Recherche et développement de bio pesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement – Rapport final – Volet Phytopathologie. 278p.

Caron J., Laverdière L., Thibodeau O. P. et Bélanger R. R. 2002. Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*; 83: 73-87.

Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortés C., Gutiérrez A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, *in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol*. 65: 929-935.

CDH. 2015. Guide maraichage au Sénégal : Carotte, Oignon, Haricot vert, Tomate, Chou, Pomme de terre et Bissap. ISRA/CDH, Coopération coréenne-KOPIA, 56p.

Chakraborty B. N., Chakraborty U., Saha A., Dey P.L., Sunar K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA Markers and analysis of Their PCR-RAPD profiles. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 5: 55 61.

Chandra S., Raisada M. and Gaur A. K. S. 1983. Pathological variability in *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Indian Phytopathology*. 36 (1): 36-40.

Chandulal K., Priya J., and Chopada G. 2016. Genetic diversity of *Trichoderma* sp. obtained from tomato rhizosphere using rapd. *Int. J. Sci. Environ. Technol.,* 5(4): 2101 – 2108.

Chang Y. C., Baker R., Kleifeld O. and Chet I. **1986**. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum. Plant Disease*, 70: 145-148.

Chattannavar S. N., Srikant K., Khadi B. M. 2006. Effect of growth period and carbon sources on *Trichoderma harzianum.* Karnataka *J. Agric. Sci*. 19:158-160.

Chaux C. L. et Foury C. L. 1994. Cultures légumières et maraichères. Tome III : légumineuses potagères, légumes fruits. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 563p.

Chaverri P., Castlebury L. A., Samuels C. J. and Geiser D. M. 2003. Multi locus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27:302-313.

Cherkupally R., Amballa H,, Reddy B. N. 2017. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melongenae. International Journal of Applied Agricultural Research.* (12):87-95.

Cherrab M., Bennani A., Charest P. M., Serrhini M. N. 2002. Pathogenicity and vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* Kleb. Isolates from olive in Morocco. *J. Phytopath*. 150: 703-709.

Chibane A. 1999. Fiche technique tomate sous serre. Bulletin mensuel d'information et de liaison du Programme National de Transfert de Technologies en Agriculture (PNTTA) N° 57, 1-4.

Cissé I., Tandia A. A., Fall S. T., and Diop E. H. S. 2003. Usage incontrôlé des pesticides en agriculture périurbaine: cas de la zone des Niayes au Sénégal. *Cah. Agric*. 12: 181.

Claudia Calistru, Michelle McLean, Patricia Berjak. 1997. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137: 115–124.

Collela C., Miacola C., Amenduni M., D'Amico M., Bubici G., Cirulli M. 2008. Sources of *Verticillium* wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant pathol*. 57: 533-539.

Consolo V. F., Monaco C. I., Cordo C. A. and Salerno G. L. 2012. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 28:1389-1398.

Costa S., Céline D., Pierre D., Maude E., Maryam M., Aurore N. 2010. Biodiversité chez la tomate, stratégie de conservation et valorisation de la collection de Luis « Fichot ». Gembloux Agro Bio Tech : 7-13.

Cournut B. 1984. Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th.: Pharmacie: Marseille : 77 p.

Cuevas VC ., Culiat CT., Manaligod RL., Sajise NE. 1994. Induction of fungicide resistance for enhanced cellulase production of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Philipp J Sci* 123:177–183.

Daami- Remadi M. and El Mahjoub M. 2001. Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. L'INRAT* 74, p. 167–186.

Danielson R. M. and Davey D. E. 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 486-494.

Davet P. **1979**. Activité antagoniste et sensibilité aux pesticides de quelques champignons associes aux sclérotes du *Sclerotinia minor* Jagger. *Ann. Phytopathol*. 11:53-60.

Davet P. 1983. Introduction et conservation de *Trichoderma* dans le sol. Les antagonistes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes.. ACTA, INRA-ENSAM-Montpellier (FR). Pp. 159-168

Davet P. 1983. Les *Trichoderma*, exemple de Champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture, ACTA, INRA-ENSAM Montpellier (FR). pp. 193-2014

Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Paris. 383p.

Davet P. and Rouxel F. 1997. Détection et isolation des Champignons du Sol. (Eds) INRA. Paris. France.194 p.

Dennis C. and Webster J. 1971. Antagonist properties of species group of *Trichoderma.* Productions of Volatile Antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*; (57):41-48.

Desmas S. 2005. Analyse comparative de compétitivité: le cas de la filière tomate dans le contexte euro-méditerranéen. Thèse D.A.A., Institut Agronomique Méditerranéen de Montpellier, 68 p.

DHORT. 2013. Recensement de l'horticulture et mise en place d'un système permanent de statistiques horticoles dans la zone des Niayes. Rapport final. 51p.

DHORT. 2014. Statistique de la production de tomate: évolution de la production de tomate industrielle et de tomate cerise de 2006 à 2014. Rapport final. 2p.

Di Mascio P., Kaiser S., Sies H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1; 274(2):532-8.

Diarra K., **Mbodji I., Niang Y., Kooyman C., 2010**. Utilisation de *Paecilomyces lilacinus* (Champignon nématicide) comme méthode de remplacement pour la lutte contre les nématodes de la tomate, en vue d'une production durable dans les zones urbaines et périurbaines (Dakarn Sénégal), In : International symposium on Urban and Peri-Urban Horticulture in the Century of Cities : Lessons, Challenges, opportunities 1021. Pp, 433-444.

Dommergues Y. and Mangenot F. 1970. Ecologie du sol. Edition Masson. 40-45p.

Domsch KH., Gams W., Anderson TH. 1980. Compendium of soil fungi. London, England: *Academic Press*, p 865. 52.

Droby S. and Chalutz E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson, C.L., Wis-niewski, M.E. (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases – Theory and Practice. *CRC Press, Boca Raton, Florida*. pp. 63–75.

Druzhinina I., Koptchinski A., Komon M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol.,* 42:813–828.

Duffe P. 2003. Carctérisation de QTLs liés à la qualité de la tomate par recherche de colocalisations avec des genes de function connues. Mémoire pratique des Hautes Etudes, Paris, France, 43p.

El Badawy Noha, El Kharbotly Ali, Hassanein Mohammed and Al-Marri Masoud. 2016. Selection of *Trichoderma* spp. tolerant to abiotic stresses with antagonistic activities against date palm leaf spot diseases in Qatar. *American Journal of Research Communication.* 4(12): 85-101.

El Komy Mahmoud H., Saleh Amgad A., Eranthodi Anas and Molan Younes Y. 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents against Tomato *Fusarium* Wilt. *Plant Pathol. J.* 31(1): 50-60

Elad Y., Chet I., Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol*. 28:719–725.

Elad Y., David D. R., Levi T., Kapat A., Kirshner B. 1999. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: Modern fungicides and antifungal compounds II. Eds. H. Lyr, P.E. Russell, H.W. Dehne, and H.D. Sisler). Andover, Hants, UK: Intercept. pp. 459-467.

Elad Y., Chet 1., Boyle P. and Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning Electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73:85-88.

El-Khallal S. M. 2007. Induction and Modulation of Resistance in Tomato Plants against *Fusarium* Wilt Disease by Bioagent Fungi (Arbuscular Mycorrhiza) and/or Hormonal Elicitors (Jasmonic Acid & Salicylic Acid): 2-Changes in the Antioxidant Enzymes, Phenolic Compounds and Pathogen Related-Proteins. *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 1 (4), 717–732.

Eziashi E. I., Omamor I. B., Odigie E. E. 2007. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderm*a species and benlate solution on Ceratocystis paradoxa. *Afr. J. Biotechnol*. 6: 388-392.

Ezzahiri B. 2000. Pourriture molle de la betterave à sucre: Importance, facteurs de développement et méthodes de prévention. In: Journées Régionales sur la Qualité de la Betterave à Sucre dans les Doukkala, 24 avril 2000, El Jadida, Morocco, 96 pp.

Farkhondeh Ommati and Masoud Zaker. 2012. Evaluation of some *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium oxysporum*) under laboratory and greenhouse conditions. *J. Crop Prot. 1 (4): 279-286.*

Fernandes B. 2005. Lutte biologique. PHM-Revue horticole, 465, pp. 31-34.

Fidah A. 1995. La Pourriture de la Betterave a Sucre due à *Sclerotium rolfsii* dans les Doukkala: Epidemiologie et Essais de Lutte. Thèse de troisième cycle, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco, 123 p.

Fu S. F., Wei J. Y., Chen H. W., Liu Y. Y., Lu H. Y., and Chou J. Y. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant signaling and behavior.* 10 (8): e1048052. doi: 10.1080/15592324.2015.1048052

Fugimori F. and Okuda T. 1993. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. *The Journal of Antibiotics*, 47: 173-182.

Gajera H., Domadiya R., Patel S., Kapopara M., Golakiya B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*. 1:133-142.

Gajera H. P. and Vakharia D. N. 2012. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during *in vitro* antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Brazilian Journal of Microbiology*: 43-52

Gajera H. P., Bambharolia R. P., Patel S. V., Khatrani T. J. and Goalkiya B. A. 2012. Antagonism of *Trichoderma* spp. Against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. *J. Plant Pathology and Microbiology*. 3**:** 149.

Gams W. and Bisset J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma sp. Trichoderma & Gliocladium*, Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Londres: Kubicek, C.P; Harman, G.E. & Ondik, K.L., CRC Press, 1998, pp. 3-34, 293p.

Gams W., Meyer. W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia* 90: 940-915.

Garbeva P., Van Veen J. A., Van Elsas J. D. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review Phytopathology*, 42, 243-270.

Garrett R. and Barbara S. 2014. *Sclerotium rolfsii* (Southern blight of vegetables and melons). North Carolina State University. https://wiki.bugwood.org/*Sclerotium_rolfsii*

Genilloud O., Pelaez F., Gonzalez I. and Diez M. T. 1994. Diversity on actinomycetes and seaweeds from the Iberian coasts. *Microbiologia*, 10. P: 413-422.

Georghiou GH. 1896. The magnitude of the resistance problem. In: National Research Council, ed. Pesticide resistance – strategies and tactics for management. Washington: *Nat Acad Press*, 14-43.

Geremia R., Goldman G., Vila S., Herrera-Estrella A. 1993. Molecular characterization of proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *T. harzianum*. *Mol Microbiol*; 8: 603–13.

Ghazalibiglar H., Kandula D. R. W. and Hampton J. G. 2016. Biological control of fusarium wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection 69: 57 - 63*

Gherbawy Y., Druzhinina G. I., Shaban M., Wuczkowsky M., Yaser M., El-Naghy H. J., Prillinger R. and Kubicek C. 2004. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol. Prog.*, 3: 211-18.

Ghisalberti EL., and Rowland G. 1993. Antifungal metabolites from *T. harzianum*. *J. Nat. Prod*. 56:1799–1804.

Goldman G. H., Hayes C. and Harman G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology* 12, 478–482.

Gopal K., Sreenivasulu Y., Gopia V., Prasadbabua G., Kumar T. B., Madhusudhana P., Ahemeda S. K., and Palanivel S. G. 2008. Genetic variability and relationships among

seventeen *Trichoderma* isolates to control dry root rot disease using RAPD markers. *J. Biosci.,* 63: 740-746.

Gordon S. A. and Weber R. P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant physiology*, 26(1):192-195.

Gravel Valérie, Antoun Hani, Tweddell J. Russell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with Pseudomonas putida or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* 39 : 1968–1977.

Grondona I., Hermosa MR., Tejada M., Gomis MD., Mateos PF., Bridge PD., Monte E., Garcia-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol*. 63:3189–3198.

Gueye A., Favre-Boivin F., Dieye N., And Henzi J. 2005. Characterisation of soils exposed to intensive periurban agriculture of Dakar, Sénégal. Chez Intermed. Rep. 2006.

Gurumurthy S., Senjam Jinus S., Karthik Reddy P. and Anjan Kumar S. 2013. RAPD analysis of *Trichoderma* spp. isolated from chickpea fields of Uttar Pradesh. *Int. J. Adv. Res.,* 1(8): 335-340.

Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Review Microbiology*. 10, pp. 1038-1129.

Haggag W. M., Kansoh A. L., and Aly A. M. 2006. Proteases from *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum*: Purification, Characterization and Antifungal Activity against Brown Spot Disease on Faba Bean. *Plant Pathol Bull*. 15: 231-239.

Hajieghrari B., Torabi - giglou M., Mohamadi M. R. and Davari M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates for control of soil born plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7 (8): 967-972.

Hamoir J., Goret M., Mignon B. and Gustin P. 2001. Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses. *Ann. Med. Vet*. 145: 226-232.

Hanaa F. R.M., Abdou Z. A., Salama D. A., Ibrahim M. A. R., Sror H. A. M. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56, 1–7.

Hanan I. M. and Mohamed O. I. 2014. The efficacy of *Trichoderma* species and Bacillus isolates in the control of chickpea wilt pathogens. *Agriculture, Forestry and Fisheries*. 3(5): 346-351.

Hankin L and Anagnostakis S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*; 67: 597-607.

Hanson L. E. and C. R. Howell. 2004. Elicitors of plant defence responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathol*., 94: 171-176.

Haran S., Schickler H., Chet I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol*. 142: 2321-2331.

Harman G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol*. 96: 190- 194.

Harman G. E. **2001.** Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. In: Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century: Mode of Action and Application Technology. Tzeng, D.D.S. and J.W. Huang (éds). Taichung City, Taiwan, National Chung Hsing University, pp 71–84.

Harman G. E. 1992. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Plant Nutrition*, 15:6-7, 835-843.

Harman G. E., Björkman T., Ondik K. and Shoresh M. 2008. Changing Paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. For biocontrol. *Outlooks on Pest Management*. DOI: 10.1564/19feb00

Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol*. 2 (1):43–56.

Harmam G.E., Petzoldt R., Comis A. and Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line M017 and effects of these interactions on diseases by *Pythium ultimum* and *Collectotrichum graminicola*. *Phytopathol*., 94: 147-153.

Harman G. E., M. Lorito and J.M. Lynch. 2004. Uses of *Trichoderma spp*. to alleviate or remediate soil and water pollution*. Advances in applied microbiology,* 56: 313-330.

Harman G. E. 2000. Myths and Dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84 (4): 377 – 393.

Harman G. E., Jin X., Stasz T. E., Peruzzaoil G., Leopoid AC., Taylor A. G. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biol. Control* 1:23-38.

Hassan G. M. And Nada H. F. 2016. *In vitro* Assessment of *Trichoderma asperellum* isolated from plant rhizosphere and evaluation of their potential activity against some pathogenic fungi. *Egypt. J. Genet. Cytol., 45: 113-128.*

Henni J. E. 1998. Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici.* Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran, 171p.

Hibar Khaled, Daami-Remadi Mejda, Khiareddine Haifa, El Mahjoub Mohamed. 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (3), p. 163–171.

Hileman B. 1994. Environmental Estrogens linked to Reproductive Abnormalities, Cancer *Chem. Eng. News*, 72 (5), pp 19–23.

Hinde Boudoudou, Rachida Hassikou, Amina Ouazzani Touhami, Alain Badoc, Allal Douira. 2009. Paramètres physicochimiques et flore fongique des sols de rizières Marocaines. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, 17-44.

Hjeljord L., Tronsmo A,. 1998. *Trichoderma* and *Glicoladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma* and *Glicoladium*. Enzymes, biological control and commercial applications, Taylor and Francis Ltd, London, UK. 393p.

Hjeljord M. R., Hamza N., Gargouri S., Guermech A. 2001. Apparition en Tunisie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent de la pourriture des racines et du collet de la tomate. *OEPP/EPPO Bull.* 31, p. 505–507

Hmouni A., Hajlaoui M. R, and Mlaiki A. 1996. Resistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull*. 26p. 697-705.

Hoitink H. A. J., Madden L. V. and Dorrance A. E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathol*., 96: 186-189.

Howell C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4–10.

Howell C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol' in *Trichoderma and Gliocladium: Enz.,Biol. Cont. & Comm. Appl.*, vol. 2, ed. Gary E. Harman and Christian P Kubicek **(**London: Taylor and Francis Ltd.): 173-83.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S., Bissett J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol*. 46:615–631.

Huat J. 2006. Facteurs limitatifs du rendement de la tomate industrielle en périmètres irrigués au Nord Sénégal. *Cahiers Agricultures*, 15 (3): 293-300.

Inbar J., Abramshy D., Cohen D., Chet I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Europ. J. Plant Pathol.* 100: 337-346.

Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.

Jahan Nusrat, Sultana Sabiha, Adhikary S. K, Rahman Sanzida, Yasmin Suraiya. 2013. Evaluation of The Growth Performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) On Different Culture Media. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*. 3(4): 2319-2372.

Jarvis W. R., Shoemaker R. A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root-rot of tomato. *Phytopathology*, 68: 1678-1680.

Jayaswal R. K., Singh R., Lee Y. S. 2003. Influence of physiological and environmental factors on growth and sporulation of an antagonistic strain of *Trichoderma viride* RSR-7, *Mycology*, 31(1), 36.

Jeger M. J, Jeffries P., Elad Y., Xu X. M. 2009. A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *J. Theor. Biol*. 256:201-214.

Jijakli H. and Lepoivre P. 1995. Utilisation des biopesticides pour la protection des pommes en conservation. *Le fruit Belge*. 455, 83-88.

Jijakli H. 2003. La lutte biologique en phytopathologie. Pp : 289-311. *In* **:** Lepoivre, P. phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. 2003. Ed. Les presses agronomiques des Gembloux. 427p.

Jonaina G., Jamile Z., Karine C., Geciane T. and Helen T. 2010. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food and Bioprodusts Processing* 89 (4): 281-187.

Joshi B. B., Bhatt R. P., and Bahukhandi D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology*, 31(6), 921-928.

Kamala T., Indira Devi S., Chandradev Sharma K. and Kennedy K. 2015. Phylogeny and Taxonomical Investigation of *Trichoderma* spp. from Indian Region of Indo-Burma Biodiversity Hot Spot Region with Special Reference to Manipur., *Bio Med Research International*, Hindawi Publishing Corporation, Egypt, 1024 pp.

Kamala T. and Indira S. 2014. Molecular characterization of *Trichoderma harzianum* strains from Manipur and their biocontrol potential against *Pythium ultimum. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 3(7) 258-270.

Kamala Th. and Indira Devi S. 2012. Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani. African Journal of Biotechnology*. 11(34), 8491-8499.

Kapat A., Zimand Y. and Elad Y. 1998. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycol Res* 102: 1017–1024.

Katan T., Shlevin E., and Katan J. 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum f.* sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculums. *Phytopathology*, 87: 712-719.

Kebe Ismaël B., Mpika Joseph, N'guessan F. Kouamé, Hebbar K. Prakash, Gary S. Samuels and Severin Ake. 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature* Vol*.6 N°1: 71 – 82.*

Khalid Yang W. J., Kishwar N., Rajput Z. I., Arijo A. G. **2006**. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J. Zhejiang Univ Sci B*. 7(6): 459-466.

Khan J., Ooka J. J., Miller S. A., Madden L. V., Hoitink H. A. J. 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma* 382 in cucumber against *Phytophtora* crown rot and leaf blight. *Plant Dis.,* 88: 280-286.

Kim T. G. and Knudsen G. R. 2013. Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *Appl. Soil Ecol.* 68:57-60.

Kolev N. 1976. Les cultures maraichères en Algérie. Tome 1. Légumes fruits. Ed. Ministre de l'agriculture et des réformes Agricoles. 52p.

Komi A. 1993. Pouvoir pathogène et diversité génétique *chez Fusarium oxysporum f.* sp. *Vasinfectum* (ATK) SN. Et H : Agent de la fusariose du cotonnier. Thèse de doctorat d'Etat. Université de Montpellier II. France. 205 p.

Kubicek C. P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C and Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp*. a case studyon South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38(3): 310-319.

Kubicek C. P., Penttilä M. E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. *Trichoderma* and *Gliocladium*. vol 2, Enzymes, biological control and commercial applications. Edited by Kubicek CP, Harman GE, Taylor and Francis, London, UK. 393p.

Kubicek-Pranz E. M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*, pp. 95- 119. *In* Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics Vol. I. Taylor & Francis, Bristol, U.S.A. 293p.

Kulling C. M., Szakas G., Kubicek C. P. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research* 104: 1117-1125.

Kulling-Gradinger C. M, Szakacs G. and Kubieck C. P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus Trichoderma: a multigene approach. *Mycol. Res*. 106: 757-767.

Kumar Nathan Vinod, Rajam K. Subha and Rani Mary Esther. 2017. Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride* VKF3. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(11): 2692-2701.

Landreau A. 2001. Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii Oudemans* isolée du milieu marin: Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. Pharmacie: Nantes : 201 p.

Landreau Anne, Pouchus Yves-François, Sallenave Claire, Morel Daniel et Verbist Jean-François. 2001. Optimisation de la production de métabolites toxiques produits par un *Trichoderma koningii* isolé du milieu marin : étude des facteurs physiques et chimiques, *Acta Botanica Gallica*, 148 :3, 268-268.

Laterrot H., Rouxel F., Davet P., Mineau R., Nourrisseau J.G. et Jonan B. 1978. La fusariose vasculaire de la tomate en France. P.H.M. *Rev. Horticol* 137 : 35-40.

Leuchtmann A., Petrini O. and Samuels G. 1996. Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3): 384-394.

Lieckfeldt E., Samuels G.J., Nirenberg HI. Petrini O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Applied and Environmental Microbiology,* 65: 2418-2428.

Lifshitz R., Windham M. T. and Ralph B. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of Pea by seed Treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology,* 76: 720-725.

Limón MC., Chacón MR., Mejías R., Delgado-Jarana J., Rincón AM. 2004. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64: 675-685.

Linda E. H. 2000. Reduction of *Verticillium* wilts symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*, *J. Cotton Sci*. 4: 224-231.

Lindsey D. and Baker R. **1967.** Effect of certains fungi on dwarf tomatoes grown under gnobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.

Lo C. T. and Lin C. Y. 2002. Screening strain of *Trichoderma* spp for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathol. Bull*. 11:215-220.

Lorito M., Hayes C. K., Di Pietro A., Woo S. L., Harman G. E. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1, 3-β-glucosidase and an N-acetylglucosaminidase from *T. harzianum*. *Phytopatho*l. 84: 398–405.

Lorito M. 1998.Chitinolytic enzyme and their genes P. 73-99. In G.E. Harman and C.P. Kubicek (ed). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol.2 Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom. 393p.

Malick S. 2008. Contribution à l'étude du pouvoir pathogène de *Verticillium dahliae* (Kleb) agent de la verticilliose. Mémoire de Magister en Phytopathologie. Univ. Mustapha Strambouli, Mascara, Algérie, 88p.

Manczinger L. and Polner G. 1987. Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *Syst. Appl. Microbiol*. 9:214–217.

Manczinger L., Antal Z., Schoop A., Kredics L. 2001. Characterization of the extracellular enzyme systems of *Trichoderma Viride* AH124. *Acta Biol Hung* 52, 223-229.

Manju S., Mall TP. 2008. Efficacy of *Trichoderma* species on *Phytopthora dresceleri* f. sp. *cajani* of Pigeon pea. *Ann. Plant Prot. Sci.* 16, 162-164.

Maslouhi A. 1989. Contribution à l'étude *in vitro* des antagonistes de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis,* agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc).

Mata E., Magaldi S., Hartung D., Capriles C., Dedis L., Verde G., Perez C., Capriles C. 2001. *In vitro* antifungal activity of protease inhibitors. *Mycopathologia*, 152: 135-142.

Mathivanan N., Kabilan V., Murugesan K. 1998. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase form *Fusarium* chlamydospourm, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis. Can. J. Microbiol. 44 (7): 646-651.*

Mehta J., Jakhetia M., Choudhary S., Mirza J., Sharma D., Khatri P., Gupta P., Meenu, Nair M. 2012. Impact of carbon & nitrogen sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) *and Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi). *European J. Exp. Biol*. 2:2061-2067.

Menzies J. G. and Jarvis W. R. 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici. Plant pathol*. 43 : 378-386.

Messiaen C. M. 1981. Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes. Edition INRA. Paris. 374 p.

Messiaen C. M. 1989. Le potager tropical. In : Agence de coopération culturelle et technique (ed). Techniques vivantes. Presses Univ Fr, Paris, pp 238-257.

Messiaen C. M. and Cassini R. 1968. Recherche sur les Fusarioses IV. La systématique *Fusarium. Ann. Epiphytes*, 18 (2) : 241-247.

Migheli Q., Balmas V.,. Komoñ-Zelazowska M, Scherm B., Fiori S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. and Druzhinina I.S. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by Pan-European, invasive species of *Hypocrea*/*Trichoderma*. *Environ. Microbiol.* 11: 35-46.

Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry.* 31**:** 426-428.

Mohamed-benkada Mustapha. 2006. Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles: substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Th. Pharmacie: Nantes, 152 p.

Monika Singh, Sharma O.P., Someshwar Bhagat and Neetu Pandey. 2016. *In-Vivo* Evaluation of Competitive Parasitic Ability and Rhizosphere Colonisation of Different *Trichoderma* Isolates. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 5 (4): 32-38.

Monirul Islam. 2016. Study on Biological control of soil-born fungal pathogens using *Trichoderma* species isolated in Bangladesh. TH: Graduate School of Science and Technology, Niigata University. 74p

Montoya-Gonzalez AH., Quijano-Vicente G., Morales-Maza A., Ortiz-Uribe N., Hernandez-Martinez R. 2016. Isolation of *Trichoderma* spp. from Desert Soil, Biocontrol Potential Evaluation and Liquid Culture Production of Conidia Using Agricultural Fertilizers. *J Fertil Pestic* 7: 163.

Mouria Btissam, Touhami Ouazzani Amina et Douira Allal. 2007. Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, 88(3), p. 103-110.

Mouria Btissam, Touhami Ouazzani Amina, Badoc Alain, Douira Allal. 2005. Effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculums de trois souches de *trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144, 211-224.

Moussaoui Meriem. 2010. Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire de master. Algérie: 80p.

Mukherjee M., Mukherjee PK., Horwitz BA., Zachow C., Berg G., Zeilinger S.. 2012. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian J Microbiol*. 52:522–529.8

Mukhesh S., Singh A. and Srivastava D.K. 2014. Morphological and molecular characterization of *Trichoderma* isolates: An antagonist against soil borne pathogens. *Int. J. Sci. Res.,* 3(7): 2399-2404.

Mulaw temesgen Belayneh, Kubicek Christian P. and Druzhinina Irina S. 2010. The Rhizosphere of *Coffea Arabica* in Its Native Highland Forests of Ethiopia Privides a Niche for Distinguished Diversity of *Trichoderma. Diversity*. 2(4), 527-549.

Mullen J. 2001. Southern blight, Southern stem blight, White mold. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01. Updated 2006.

Muya E. M., Gicheru P. T. and Kariuki C. N. 2005. The current state of land degradation in SLM sites, Taita Taveta, District. Published by Kenya Soil Survey Miscellaneous Paper N° M68 Kenya.

Nagamani A., Kunwar I. K. and Manoharachary C. 2006. Handbook of soil fungi, I. K. International Private Limited, New Delhi, pp. 409- 425.

Naher Laila, Mokhtar Seri Intan Binti, Sidek Noorhazira binti. 2015. *Trichoderma harzianum* T32 Growth and Antagonistic Performance against *Ganoderma boninense* on Different Culture Media. 3rd International Conference on Biological, Chemical & Environmental Sciences (BCES-2015), Sept. 21-22, Kuala Lumpur (Malaysia).

Naika S., Jeude J., Goffau M., Hilmi M., Dam B. 2005. La culture de la tomate (Production, transformation et commercialisation). X eme Edition: Wageningen. Pays-Bas. 105p

Naseby D. C., Pascual J. A., Lynch J. M. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol*. 88:161–169.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marass W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park. 193 p.

Nieto-Jacobo M. F., Steyaert J. M., Salazar-Badillo F. B., Nguyen D.V., Rostás M., Braithwaite M., De Souza J. T., Jimenez-Bremont J. F., Ohkura M., Stewart A., andMendoza-Mendoza A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma*

spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science* 8.

Nirupama Devi T., Linthoingambi W. and Mutum, S. S. 2013. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* for biological control of tomato wilt. *Indian Phytopath*. 66: 81-87.

Okoth Shella A., Okoth P., Wachira P.M., Roimen H. **2009.** Spatial distribution of *Trichoderma spp*. In Embu and Taita regions, Kenya. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, vol. 11, Num. 2, pp.291-302.

PADEN. 2013. Etudes des filières horticoles. Rapport définitif. 54p

Pakkala Abhiram and Harison Masih. 2018. *In vitro* Antagonism of *Trichoderma viride* against *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 7(2): 2816-2819.

Papadopoulous A. P. 1991. La culture de la tomate en serre sur sol et sans sol. Ministère des approvisionnements et services/ Canada N° cat A 53/1865/1991 F.

Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biological control. *Ann. Rev. Phytopathol*. 23:23–54.

Patten C. L., and Glick B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42: 207-220.

PIP. 2014. Itinéraire technique de la tomate cerise (*Lycopersicum esculentum*), 46p.

Poddar R. K., Singh D. V., Dubey S. C. 2004. Integrated application of *Trichoderma harzianum* mutants and carbendazim to manage chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*). *Indian J. Agric. Sci.* 74: 346–348.

Prieto A., Leal J. A., Poveda A., Jimenez-Barbero J., Gomez-Miranada B., Domenech J., Ahrazem O. and Bernabe M. 1997. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. *Carbohydrate Research*. 304 (3-4): 281-291

Punja Z. K. 1988. *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, a pathogen of many plant species. In Advances in Plant Pathology Ed. Sidhu, G.S. San Diego, CA: Academic Press. pp. 523–534

Raaijmakers J. M, Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battle-field for soil-borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321:341-361.

Raeder U. and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 17-20.

Rai D. and Tewari A. K. 2016. Evaluation of different carbon and nitrogen sources for better growth and sporulation of *T. harzianum* (Th14). *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development.* Vol. 8(8), pp. 67-70.

Rajput Q., Khanzada M. A., Shahzad S. 2014. Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum. J. Agric. Sci. Technol*. 16:731-745.

Rajput Q, Shahzad S. 2015. Growth and sporulation of *Trichoderma polysporum* on organic substrates by addition of carbon and nitrogen sources. *Pakistan J. Bot*. 47(3):979-986.

Ranc N. 2010. Analyse du polymorphisme moléculaire de gènes de composantes de la qualité des fruits dans les ressources génétiques sauvages et cultivées de la tomate ; recherche d'associations gènes/QTL. Thèse de Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 261 p.

Rapilly F. 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt*., 101 p. Bruxelles

Reddy N. G., Thahir B. S. and Eswara R. N. P. 2013. Evaluation of *Trichoderma* sp. against *Rhizoctonia bataticola* Causing Dry Root Rot of Chick Pea (*Cicer arietinum* L.). *Progressive Research* 8: 572-574.

Regragui Amina and Lahlou Houria. 2005. Effect of salinity on *in vitro Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticilium dahliae*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 8(6): 872-876.

Rehman S. U., Dar W. A., Ganie S. A., Bhat J. A., Mir G. H., Lawrence R. 2013. Comparative efficacy of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* f sp. c*iceris* causing wilt of chickpea. *African Journal of Microbiology Research*; 7(50):5731-5736.

Renio J. L., Guerrero R. F., Hernandez-Galan R., Collado IG. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma. Phytochem. Rev*.7:89–123.

Rifai M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers*, 116: 1-56.

Roberts A, Selitrenkoff N. 1985. Colloidal chitin preparations. *J Gen Microbiol*. 1985; 134: 169–76.

Roco A. and Perez L. M. 2001. *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Electronic J. Biotechnol.* Vol.4 No.2, Available from http://www.ejbiotechnology.info/ ntent/vol4/issue2/full/1/1.pdf.

Roquebert M. F. 1998. Taxonomie des moisissures: Méthodes de culture et techniques d'observation; identification. In : Moisissures des aliments peu hydratés. Edition Tec et Doc. 39-95.

Roquebert M.-F 1996. Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, p. 13-15

Roussos Sevastianos. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat, Université de Provence (France), 163 p.

Rouxel F., Alabouvette C., and Louvet J. 1979. Recherches sur la résistance des spls aux maladies IV: mise en évidence du rôle des *Fusarium* vasculaire du melon. *Ann. Phytopathol*. 70:412-417.

Saber W. I. A., Abd El-Hai K. M. and Ghoneem K. M. 2009. Synergistic effect of *Trichoderma* and *Rhizobium* on Both Biocontrol of chocolate spot disease and induction of nodulation, physiological activities and productivity of *Vicia faba*. *Res. J. Microbiol.* 4:286-300.

Samuels G. J., Petrini O., Manguin S. 1994. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia,* 86(3):421-35.

Samuels G. J. 2004. *Trichoderma*: a guide to identification and biology. United States Department of Agriculture, 40 p.

Sandgren M., Stahlberg J. and Mitchinson C. 2005. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio,* 89: 246-291.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem*, 40: 2689 – 2694.

Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisible importance industrielle. 2nd Edn. Masson, Paris. Milan, Barcelone, Mexico, 512 pp.

Satyavani and Satyaprasad. 2009. Chitinase and β-1,3glucanase Production by *Trichoderma harzianum and T. viride. J. Mycology and Plant Pathology.* 39(1): 144-147.

Schlick A., Kuhls K., Meyer W., Lieckfeldt E., Börner T. and Messner K. 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetic*, 26, 74-78

Scot I. T. 1923. The influence of hydrogen-ion concentration on the growth of *Fusarium lycopersicum* and on tomato wilt. Missouri Agricultural Experiment station Research Bulletin 64p.

Sebran Haida N. 2008. Growth requirement, mass production and application of *Trichoderma harzianum* as a growth enhancer of oil palm. Masers Thesis, University Putra Malaysia, 106p.

Shah Shaiesta, Nasreen Sahera Nasera and P. A. Sheikh. **2012.** Cultural and morphological characterization of *Trichoderma spp*. Associated with green Mold disease of *Pleurotus* spp. in Kashmir. *Research journal of Microbiology* 7 (2): 139-144.

Shalini S, Kotasthane A. S. 2007. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *EJEAFChe*. 6 (8): 2272-2281.

Sharma K., Mishira A. K. and Misra R. S. 2009. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. *J. Phytopathol.* 157:51-56.

Sharma R. L., Singh B. P., Thakur M. P. and Thapak S. K. 2005. Effect of media, temperature, pH and light on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini. Ann. Pl. Protec. Sci*., 13: 172-174.

Sharma P. 2011. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of Crop Science*, 5(8):1027-1038.

Shayakhmetov I. F., 2001. Biological activity of metabolites from culture filtrate of *Cochliobolus sativus* and *Fusarium oxysporum* in connection with *in vitro* cellular selection of crop plants for resistance to phytopathogens. *Mycology and Phytopatology* 35, 66–71.

Shirsole S. S., Mishra T. 2014. Effect of nutritional sources in on *in vitro* growth and sporulation of *Trichoderma viride*. *Bioinfolet*. 11(3B): 940.

Shoresh Michal, Harman Gary E., and Mastouri Fatemeh. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology.* Vol. 48, pp 21-43

Singh A., Shahid M., Pandey N. K., Kumar S., Srivastava M. and Biswas S. K. 2011. Influence of Temperature, pH and media for growth and sporulation of *Trichoderma atroviride*and its shelf life study in different carrier based formulation. *J. Pl. Dis. Sci*. 6: 32-34.

Singh A., Srivastava S. and Singh H. B. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bio resource Technology*, 98: 470-473.

Singh S. P., Singh H. B., Singh D. K. and Rakshit. 2014. *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egyptian Journal of Biology*, 16, 29-38.

Sivan A., Ucko O., Chet I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Dis.* 71, p. 587–592.

Sivasithamparam K., and Ghisalberti EL. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Edited by Kubicek CP, Harman GE, Taylor and Francis, London, UK. pp. 1:139-191.

Skoneczny Dominik, Oskiera Michał, Szczech Magdalena, Bartoszewski Grzegorz. 2015. Genetic diversity of *Trichoderma atroviride* strains collected in Poland and identification of loci useful in detection of within-species diversity. *Folia Microbiol (Praha).* 60 (4): 297–307.

Smith W. H., 1995. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis of potential organochlorine (xenobiotic) degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 32 (2):179-183

Smith I. M., Dunez J., Phillips D. H., Lelliott R. A. and Archer S. A. 1988. (eds.): European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 1- 583.

Snissi A., Ezzouhri L., Rossi B.D., Lairini H.K. 2006. Contrôle biologique de la fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* et *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici.* Congrès International de Biochimie, pp.352-356.

Srivastava Mukesh, Singh Varunesh, Shahid Mohammad, Singh Anuradha and Kumar Vipul. 2014. Determination of Biochemical and Physiological Aspects of a Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* Th azad. *International Journal of Advanced Research*, **2(**3) 841-849.

Steyaert J. M., Weld R. J., Alison Stewart A. 2010. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal biology*, 114: 198-208.

Stover. 1970. Root diseases and soil-borne pathogens. Int. Symp. on factors determining the behavior of plant pathogens in soil (2nd), London, July 14-28, 1970 pp.197-200 pp

Sugiyama J. 1987. Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo: Elsevier, pp. 29-56, 325 p.

Sundaramoorthy S. and Balabaskar P. 2013. Biocontrol efficacy of Trichoderma spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol. 1 (03), pp. 036-040.

Tivoli B. 1988. Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre. *Agronomie,* 8(3) : 211-222.

Tondje P. R., Roberts D. P., Bon M. C., Widmer T., Samuels J. G., Ismaiel A., Begoude D. A. Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng M., Bateman R., Fontem D., Hebbar P. K. **2007**. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological control* 43. P. 202-212.

Traoré S. K., Mamadou K., Dembele A., Lafrance P., Mazelliert P. and Houenou P. 2006. Contamination de l'eau souterraine par les pesticides en régions agricoles en Côte-d'Ivoire (Centre, Sud et Sud-Ouest). *Journal Africain des Sciences de l'Environnement* 1: 1-9.

Ubalua AO. and OtiE. 2007. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post-harvest cassava root rot pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2447-2450.

Van der Vossen YAM, Nono-Womdim R, Messiaen CM, 2004. *Lycopersicon esculentum* Mill. Fiche Protabase. Gruben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa) Wageningen, Pays-Bas, pp: 419-427.

Verdin A., Sahraoui AL., Durand R. 2004 Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeter. Biodegr*, 53:65-70.

Verma M. 2007. Développements d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichoderma* spp. en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada, 424 p.

Vey A., Hoagland R. E., Butt T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as* biocontrol agents: Progress, problems and potential. Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.). CABI, Bristol, UK, pp. 311-346.

Vijayaraghavan P., Samuel G. P. V. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *J Biochem Tech, 4*(3): 628-630.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti L.E., Marra R., Woo L.S. and M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil. Biol. Biochem*., 40: 1-10.

Vinit Kumar Mishra. 2010. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum. J. Phytol*. 2(9): 28-35.

Viterbo A., Ramot O., Chermin L. Y., and Chet I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Anton Leeuw Int. J. G.* 81:549–556.

Vyas P,, Deshpande M. V. 1989. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation. *The Journal of General and Applied Microbiology,* 35 (5): 343-350.

Wesam I. A. Saber, Khalid M. Ghoneem, Younes M. Rashad and Abdulaziz A. A. (2017). *Trichoderma Harzianum* WKY1: an indole acetic acid producer for growth improvement and anthracnose disease control in sorghum. *Biocontrol Science and Techonology,* 27 (5), 654–676.

Wiest A., Grzegorski D., Xu B. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem*. 277: 20862-20868.

Yamamoto I., Komada H., Kuniyasu K., Saito M., and Ezuka A. 1974. A new race of *Fusarium oxysporum f.* sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. Proc. Kansai. *Plant Prost. Soc*. 16:17-29.

Yedidia I., Shoresh M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y. and Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol*., 69: 7343-7353.

Yedidia I., and Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.

Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M., Kubicek CP. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol*. 26:131-140.

Zhang C. L., Druzhinina I. S., Kubicek CP., Xu T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters,* 251: 251–257.

Zhang F., Zhu Z., Yang X., Ran W. and Shen Q. 2013. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. *Appl. Soil Ecol.* 72:41-48.

Zimand G., Valinsky L., Elad Y., Chet I. and Manulis S. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycol. Res.*, 98: 531-534.

Webographie

Bissett J. 2004. Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www. Medicalglossary .org/fungi_ mitosporic _ fungi_ definitions.html. Consultée le 2015-03-09 10:03:12

Blancard D. 2013. Maladies et ravageurs de la tomate : Identifier, connaitre et maitriser. In Ephytia. [En ligne]. http://ephytia.inra.fr/fr/P/95/Tomate. Consultée le 2017-07-07 22:37:50

FAOSTAT, 2018. http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC. Consulté le 2018-08-16 13:08:22

Ladet N., Léveillé P., 2013. INRA - La tomate : histoire et amélioration http://www.inra.fr/Grand-public/Genetique/Tous-les-magazines/La-tomate-histoire et amélioration. Consultée le 2018-06-07 21:37:10

Planetoscope. 2012: Statistiques : Production mondiale de tomates http://www.planetoscope.com/fruits-legumes/1266-production-mondiale-<de-tomates.html consultée le 2018-06-19 23:13:07

Samuels G. J., Chaverri P., Farr D. F., and McCray E. B. 2002. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved April 11, 2013, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm. Consulté le 11 Avril 2015

www.hortibiz.com/item/news/tomato-production-facts-around-the-world consulté 2017-08-18 23:17:05

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Rapport MACROGEN sur la caractérisation moléculaire des isolats

Standard ID

ITS Region Sequencing — Humanizing Genomics macrogen

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TS-1_contig_1

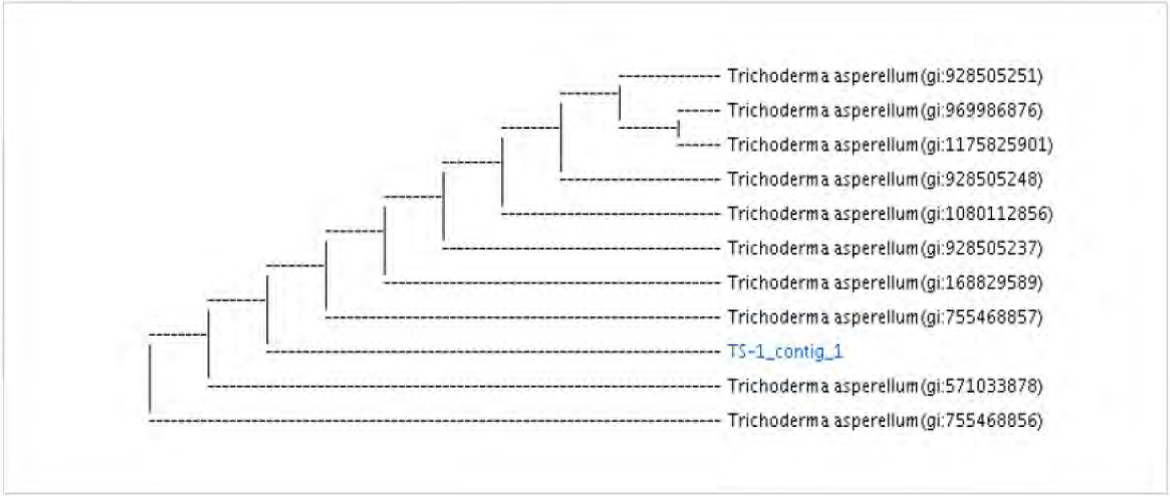
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KF737410.1	Trichoderma asperellum	625	9	625	98	1129	0.0	616/618	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TS-2_contig_1

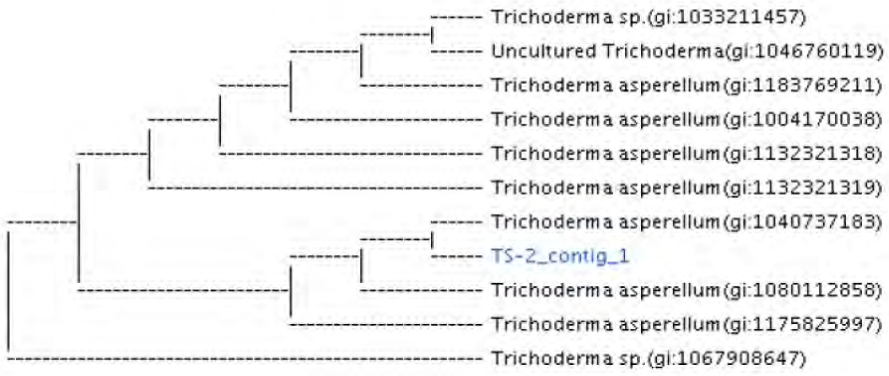
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KU896306.1	Trichoderma asperellum	604	1	599	99	1107	0.0	599/599	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS Region Sequencing — Humanizing Genomics macrogen

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TB-2_contig_1

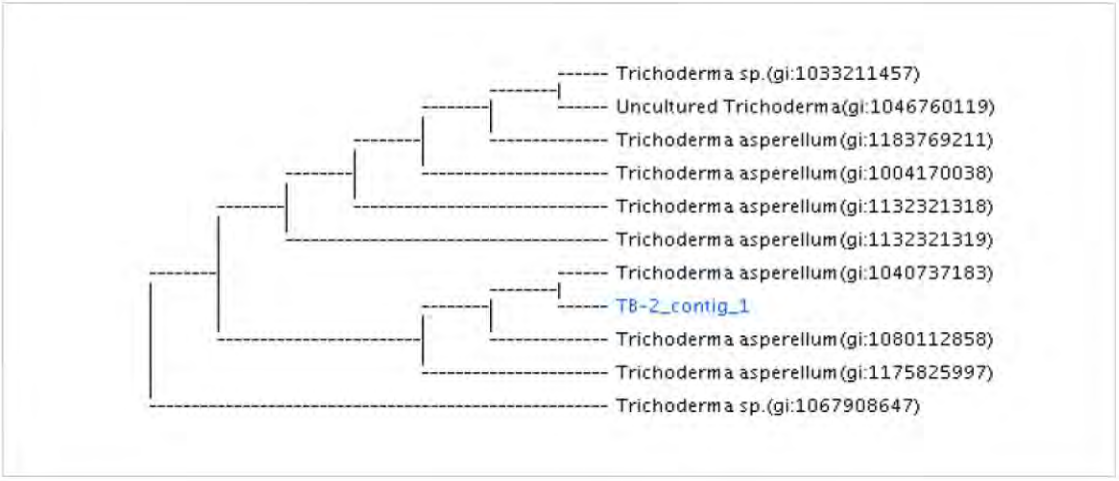
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KU896306.1	Trichoderma asperellum	604	1	600	99	1109	0.0	600/600	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TG-1_contig_1

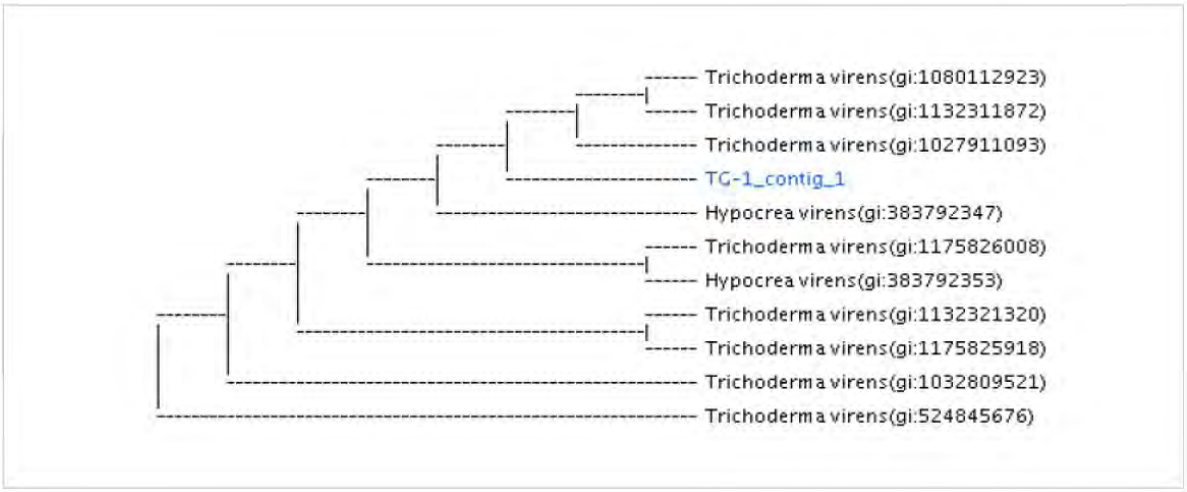
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KY225664.1	Trichoderma virens	653	32	636	92	1118	0.0	605/605	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma virens



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TG-4_contig_1

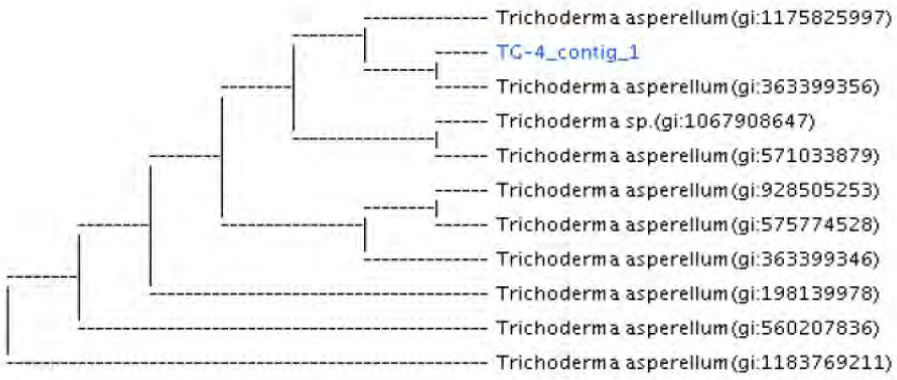
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
JN108925.1	Trichoderma asperellum	631	5	631	99	1138	0.0	624/628	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TM-1_contig_1

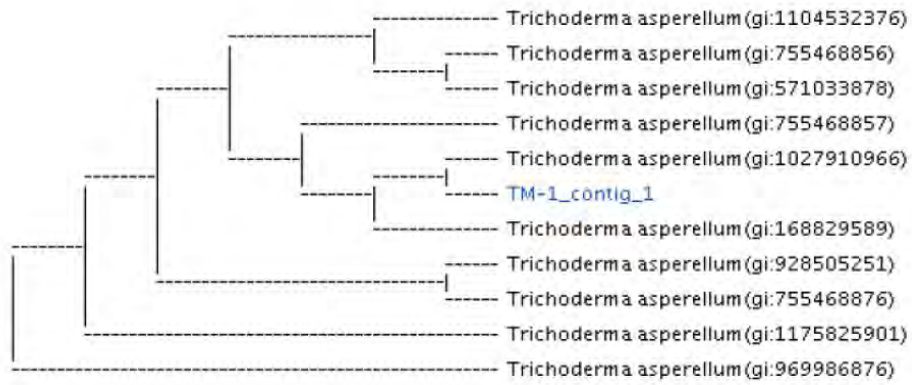
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KX620957.1	Trichoderma asperellum	618	2	615	99	1129	0.0	613/614	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TU-1_contig_1

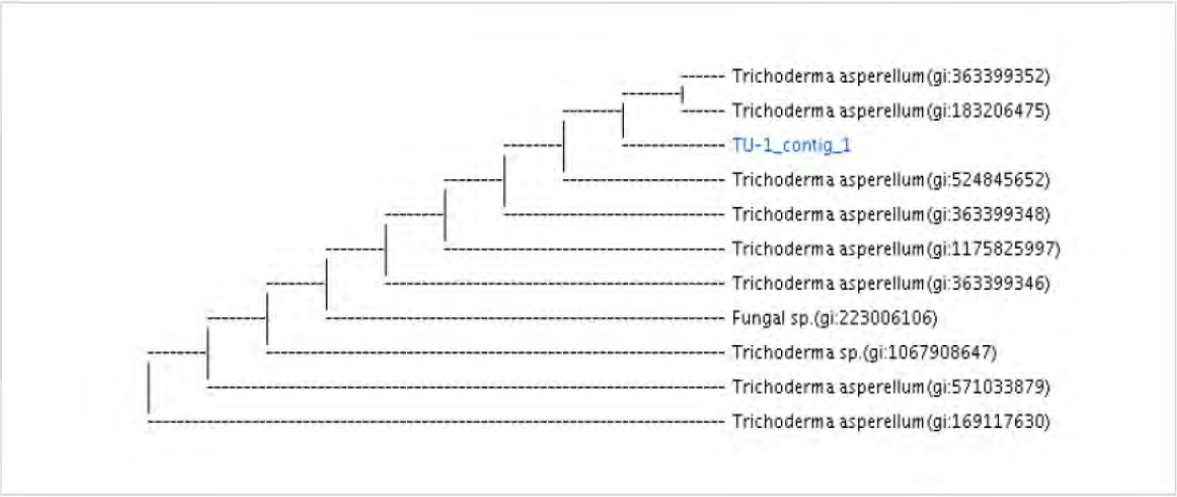
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KF737411.1	Trichoderma asperellum	637	4	613	95	1114	0.0	608/610	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Standard ID

ITS region service report

Order Number : 180306FN-168
Sample name : TN-1_contig_1

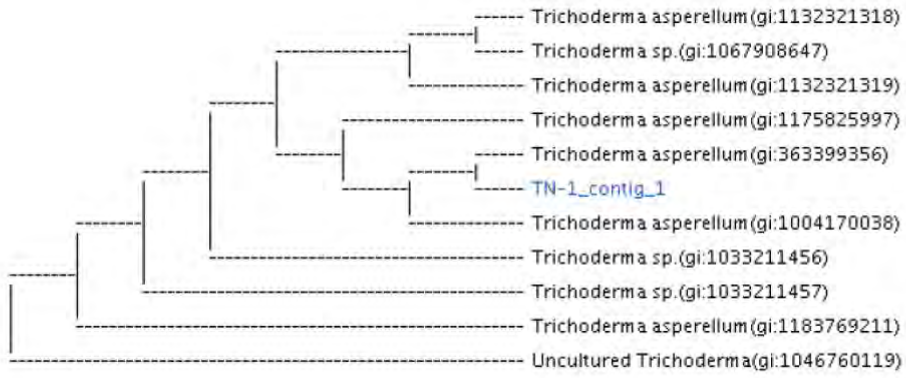
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KY225658.1	Trichoderma asperellum	628	10	613	96	1116	0.0	604/604	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Hypocreaceae	Trichoderma	Trichoderma asperellum



Characterization

Trichoderma is a genus of fungi that is present in all soils, where they are the most prevalent culturable fungi. Many species in this genus can be characterized as opportunistic avirulent plant symbionts.

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

1. Patato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	200g.
Dextrose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	5,6

2. Pectine Agar Medium (PAM)

Citrus Pectin	10.00g,
$(NH_4)_2HPO_4$	3.00g,
$MgSO_4$	0,1g,
Agar	20.00g
Eau distillée	1000 ml,
pH	5,5

3. Chitine Agar Medium

Colloidal chitin	10, 00g,
$MgSO_4$	0,3g
NH_4SO_4	3.00g
KH_2PO_4	2.00g
Agar	20.00 g
Eau distillée	1000ml

4. Czapek-Mineral Salt Agar Medium

KH_2PO_4	1.00 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.50 g
$NaNO_3$	2.00 g
KCl	0.50 g
Peptone	2.00 g
Agar	20.00g
Carboxy Methyl Cellulose (CMC)	5.00g
Eau distillée	1000ml
pH	6

5. Casein Agar Medium

Peptone	5g
Extrait de bœuf	1,5g
Extrait de levure	1,5g
NaCl	5g

Casein	10g
Agar	20g
pH	6

6. Milieu Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de Malt	20g
Glucose	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	6

7. Milieu Sabouraud (SB)

Peptone	10g
Agar	20g
Glucose	20g
Eau distillée	1000 ml

8. Milieu Czapeck Dox

NaNO3	10g
KCl	0,5g
$MgSO_4$	0,5g
KH_2PO_4	1g
$FeSO_4$, $7H_2O$	0,001g
Saccharose	30g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml
pH	6

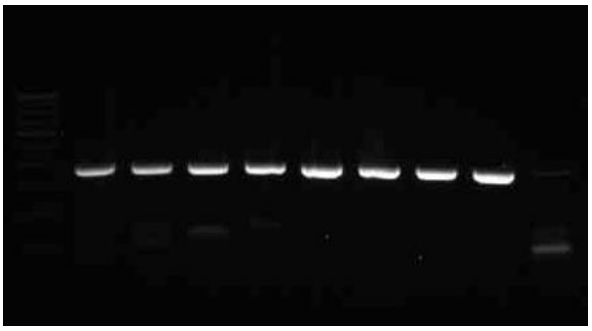
Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique

Le protocole d'extraction comporte les étapes suivantes:

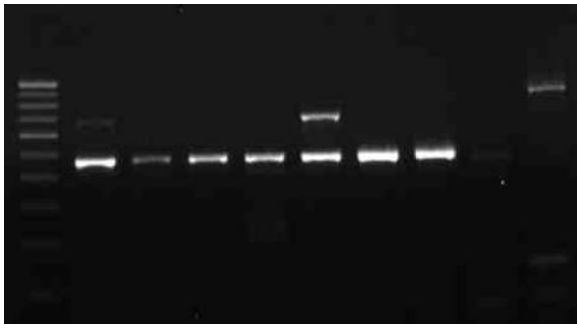
- Broyage de 5 g du mycélium dans un mortier en présence d'azote liquide. Le broyat obtenu a été recueilli dans des tubes Eppendorf. 500 µl du tampon TES (Tris-HCl 250 mM (pH 8,0), EDTA 50 mM (pH 8,0), Nacl 100 mM et SDS 2%) sont ajoutés au broyat et le mélange est incubé pendant 1 heure à 65 °C.
- 50 à 100 µg de protéinase K ont été ajoutés et le mélange est incubé pendant 30 mn à 1 h entre 55-60 °C. La concentration en sel a été ajustée à 1,4 M avec du NaCl 5 M (= 140 ul) et 1/10 volumes de CTAB à 10% (bromure de cétyltriméthylammonium) a été ajouté; le tout est incubé pendant 10 minutes à 65 °C.
- Un volume de chloroforme est ajouté [alcool isoamylique (24: 1 (v / v)] et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 0 °C avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 4 °C.
- Le surnageant est prélevé et transféré dans un tube de 1,5 ml contenant 225 µl d'acétate d'ammonium 5 M (NH4 COOCH3). L'ensemble est mélangé doucement puis placé sur de la glace pendant 30 minutes avant centrifugation à 4°C à 10000 tr/min. Il faut noter que 15 µl de ARNase ont été ajoutés au surnageant.
- Le surnageant a été transféré dans un tube frais. Puis 0,55 volume d'isopropanol (~ 510 µl) a été ajouté à l'ADN précipité et centrifugé immédiatement pendant 5 minutes à 10000 tr/min. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé deux fois avec de l'éthanol glacé à 70% puis dissous dans 50 pi de tampon TE.
- Le mélange réactionnel a été centrifugé à 12 000 tr/min pendant 15 minutes. Au surnageant recueilli, est ajouté un volume égal de phénol saturé d'eau. Une nouvelle centrifugation a été réalisée à 12 000 tr/min pendant 15 minutes.
- Le surnageant est de nouveau recueilli et un volume égal de phénol: chloroforme: alcool isoamylique a été ajouté dans un rapport de 25: 24: 1. Le mélange est de nouveau centrifugé à 12 000 tr/min pendant 15 minutes.
- La phase aqueuse prélevée est mise dans un nouveau tube auquel du chloroforme est ajouté dans le rapport de 1: 4 v/v.
- L'Ajout de l'isopropanol au mélange ci-dessus (0,7 fois le volume final) est suivi d'une centrifugation. L'ADN est alors précipité en ajoutant de l'éthanol 100% refroidi et granulé par centrifugation à 12 000 tr/min pendant 15 minutes.Une série de lavage à l'éthanol à 70% de l'ADN est effectuée par centrifugation à 12 000 tr/min pendant 15 minutes.

- Les pastilles ainsi obtenues sont séchées à l'air puis mises en suspension pour dissolution dans du tampon TE ayant un pH de 8,0. En outre, 2 µl de RNase et sans DNase (MBI, Fermentas AG) ont été ajoutés à l'ADN dissout. Le mélange est incubé dans un bain-Marie à 37 °C pendant 1 heure puis à 60 °C pendant 10 minutes pour l'inactivation des enzymes. Les échantillons d'ADN purifiés sont été conservés à -20 °C.

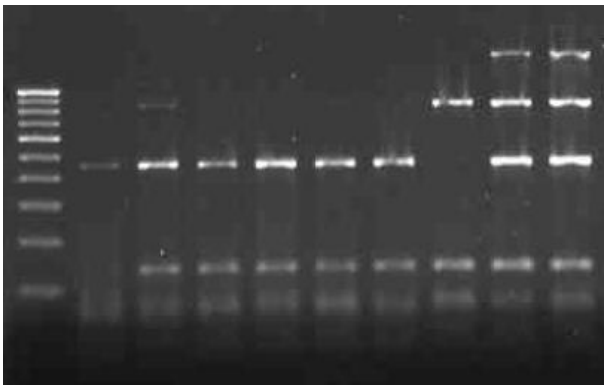
Annexe 3 : Profils RAPD des 5 marqueurs polymorphes



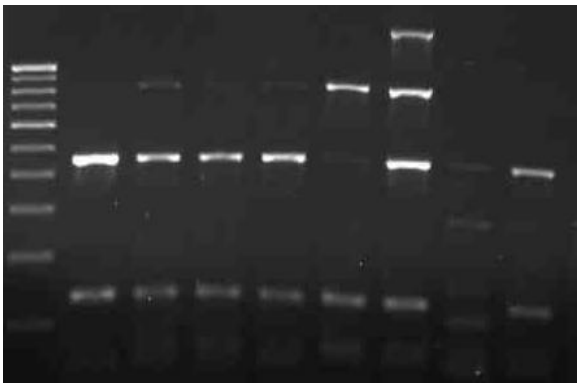
OPA 3



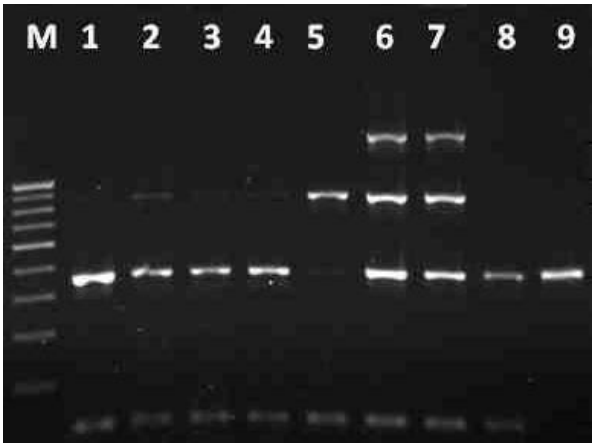
OPA 5



OPA 7



OPA 13



OPA 15

M : marqueur molécilaire ; 1 : TG4 ; 2 : TG1 ; 3 : TM1 ; 4 : TN1 ; 5 : TU1 ; 6 : TS1 ; 7 : TS2 ; 8 : TB2 ; 9 : TG7

Annexe 4 : Articles publiés

ISSN: 0975-833X

Available online at http://www.journalcra.com

International Journal of Current Research
Vol. 10, Issue, 07, pp.71895-71897, July, 2018

INTERNATIONAL JOURNAL OF CURRENT RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

SCREENING FOR MULTIPLE ENZYMES ACTIVITIES OF *TRICHODERMA* STRAINS ISOLATED FROM AGRICULTURE FIELD SOIL IN SENEGAL

[1,2]Ndiogou GUEYE, [2]Dienaba Sall, S.Y., [1]Tahir A. DIOP and [3,*]Raghu Ram, M.

[1]Biotechnology Laboratory of Fungus, Department of plant Biology, Faculty of Sciences and Technology, Cheikh Anta Diop University, BP 5005, Dakar Fann, Senegal
[2]Senegalese Institut of Agronomic Research, Center for Development of Horticulture, BP. 2619, Dakar, Senegal
[3]Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Nagarjuna Nagar, Guntur, Andhra Pradesh 522510, India

ARTICLE INFO

Article History:
Received 20th April, 2018
Received in revised form
17th May, 2018
Accepted 10th June, 2018
Published online 31st July, 2018

Key Words:

Trichoderma, Enzymes,
Potato dextrose agar

ABSTRACT

To A total of twenty *Trichoderma* strains were isolated from rhizospheric soils of tomato fields from different areas of Niaye zone, main area of horticulture production in Senegal. Identification of these *Trichoderma* isolates was based on morphological and cultural characters on potato dextrose agar medium. These strains were screened for the production of extracellular enzymes such as cellulase, L-Asparginase, chitinase and pectinase. The screening was done by following plate assay method on their respective solid media. Among the 20 strains, 14 strains showed the pectinase activity, 11 strains was positive for L- Asparginase production, 3 strains showed chitinase activity, 15 strains was positive for cellulase activity. The 2 strains (TS1 and NG4) was found to be positive for all the enzymes tested. The excretion of extracellular enzymes reveals their usefulness in the application of *Trichoderma* species as biocontrol in agricultural soils and in industrial and commercial applications.

Copyright © 2018, Ndiogou et al. *This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.*

Citation: ***Ndiogou GUEYE, Dienaba Sall, S.Y., Tahir A. DIOP and Raghu Ram, M.,*** **2018.** "Screening for multiple enzymes activities of *Trichoderma* strains isolated from agriculture field soil in Senegal.", *International Journal of Current Research*, 10, (07), 71895-71897.

INTRODUCTION

Trichoderma species are imperfect filamentous fungi that can be found all over the World. Now it has gained importance in agriculture and industrial applications. In agriculture *Trichoderma* is used for their bio control ability against several soil-borne pathogens such as *Phytophthora palmivora* (Kebe *et al*., 2009*) Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae* (Caron *et al*., 2002), *Botryodiplodia palmarum* (Tapwal and Pandey, 2016). They are used for protection of many crops such as tomato, cucumber (Caron *et al*., 2002; Mouria *et al*., 2007) onion, eggplant (Caron *et al*., 2006). Antagonistic activity by *Trichoderma* is based on many mechanisms namely antibiosis, mycoparasitism, production of cell walldegrading enzymes and competition for space and nutrients (Zeilinger et Omann, 2007, Vinale *et al.,* 2008). *Trichoderma* species are able to use a wide range of compounds as carbon and nitrogen sources and secrete a variety of enzymes to break down compound plant polymers into simple sugars for energy and growth (Cherkupally *et al*., 2017). These lytic enzymes secreted by *Trichoderma* such as cellulase, chitinase, β-1, 3 glucanase and protease can attacks directly plant pathogen (Khushwaha and Verma, 2014) or they can hydrolyse the contents of fungal cell wall skeleton (chitin, proteine, glucan) one of the main mechanisms accounting for showing antagonistic activity against plant pathogenic fungi (Lunge and Patil, 2012). Enzymes secreted by *Trichoderma* are also known to have a broad industrial and commercial applications. Cellulase enzymes is extensively used in various fields and industries such as textile and food, bioconversion of lignocellulosic waste to alcohol, animal feed, genetic ingineering, pollution traitement paper and pulp industry (Aristidou and Penttilä, 2000). Pectinases are applied in juice processing (extraction and clarification), vegetable oil extraction, alcoholic beverage processing and other food industries (Bhat *et al*., 2000; Kumar *et al*., 2011). L-asparaginase is one of the most widely studied therapeutic enzymes by researchers. It is known to be the most proper drug for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and other cancer diseases. Its production has a broader prospectus in industrial area and even in pharmaceutical industries as the microbial production of L-asparaginase is inexpensive (Alzewari *et al.,* 2010; Kalyanasundaram *et al*., 2015. The objective of this study is for screening of fungal fungal strains for enzymatic activities of most important enzymes (cellulase, chitinase, pectinase, L-Asparginase) using fast and reliable plate methodologies that allowed to process and select antagonistic potential against fungal plant pathogens or which can be used in industrial applications.

******Corresponding author:* **Raghu Ram, M.,**
Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Nagarjuna Nagar, Guntur, Andhra Pradesh 522510, India.
DOI: https://doi.org/10.24941/ijcr.31464.07.2018

WORLD JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH
SJIF Impact Factor 8.074
Volume 7, Issue 17, 817-825. Research Article ISSN 2277– 7105

BIOPRODUCTION OF INDOLE 3-ACETIC ACID BY *TRICHODERMA* STRAINS ISOLATED FROM AGRICULTURE FIELD SOILS IN SENEGAL

Ndiogou Gueye[1,2], Kranthi Kumar G.[3], Adiouma Dangue[1], Mame Arama Fall Ndiaye[1], Tahir A. Diop[1] and M. Raghu Ram[3]*

[1]Biotechnology Laboratory of Fungus, Department of plant Biology, Faculty of Sciences and Technology, Cheikh Anta Diop University, BP 5005, Dakar Fann, Senegal.

[2]Senegalese Institut of Agronomic Research, Center for Development of Horticulture, BP. 2619, Dakar, Senegal.

[3]Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Nagarjuna Nagar, Guntur, Andhra Pradesh 522510, India.

Article Received on
26 July 2018,
Revised on 16 August 2018,
Accepted on 06 Sept. 2018
DOI: 10.20959/wjpr201817-13258

***Corresponding Author**
M. Raghu Ram
Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Nagarjuna Nagar, Guntur, Andhra Pradesh 522510, India.

ABSTRACT

A total of twenty *Trichoderma* strains were isolated from rhizospheric soils of tomato fields from different areas of Niaye zone, main area of horticulture production in Senegal. Identification of these *Trichoderma* isolates was based on morphological and cultural characters on potato dextrose agar medium. Of the 20 strains, only 8 strains showed the maximum indole acetic acid production. Among the 8 strains TG 4 showed maximum (90 µg/ml) indole acetic acid production was selected for optimization studies. Optimum conditions for maximum IAA were 8 days of incubation and pH 7.0 at 37°C temperature. Among the carbon and nitrogen sources tested, Mannitol and yeast extract induced the maximum IAA production of 105µg/ml and 95µg/ml respectively. Possession of plant growth promoting traits like *Trichoderma* TG 4 strain a promising strain to be developed as multifunctional biofertilizer.

KEYWORDS: *Trichoderma,* Indole acetic acid (IAA), Potato dextrose agar (PDA).

Available online at http://www.ifg-dg.org

Int. J. Biol. Chem. Sci. 10(2): 769-778, April 2016

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal of Biological and Chemical Sciences

Original Paper http://ajol.info/index.php/ijbcs http://indexmedicus.afro.who.int

Influence *in vitro* de divers facteurs abiotiques (température, pH, salinité) sur la croissance mycélienne de trois souches locales de *Trichoderma* sp.

Ndiogou GUEYE[1,2*], Mame Arama FALL NDIAYE[1], Bathie SARR[1], Dieynaba SALL SY[2] et Tahir A. DIOP[1]

[1]*Laboratoire de Biotechnologies des Champignons, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences & Techniques, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005, Dakar Fann, Sénégal.*
[2]*Institut Sénégalais de Recherche Agricole, Centre pour le Développement de l'Horticulture BP. 2619, Dakar, Sénégal.*
[*]*Auteur correspondant, E-mail :mamendiogou@hotmail.fr; lbc@ucad.sn; Tel. : +221777130493, +221338646658;*

REMERCIEMENTS

Nous remercions le PPAAO/WAAPP pour l'allocation octroyée pour la réalisation de ce travail.

RESUME

Les *Trichoderma* sont des champignons imparfaits saprophytes que l'on retrouve dans divers milieux comme le sol, le bois mort, les débris des végétaux et les organes aériens des plantes. Ils ont un rôle phytoprotecteur et stimulateur du développement des plantes associées. L'effet de différents facteurs abiotiques (température, pH, salinité) sur la croissance mycélienne de trois souches locales de *Trichoderma* a été évalué. Ces souches ont été isolées à partir de la rhizosphère de la tomate. Une étude préliminaire a été effectuée sur quatre milieux de culture (PDA, MEA, SB et DOX) pour la sélection du milieu d'étude. Les résultats obtenus montrent que le milieu PDA permet une meilleure croissance des souches de *Trichoderma*. La température optimale de croissance des différentes souches est de 29 °C et le pH 5 se révèle être le plus adéquat pour la culture des *Trichoderma*. Cette étude montre également que les souches de *Trichoderma* résistent à des concentrations de sel (NaCl) allant jusqu'à 3%.
© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: *Trichoderma*, facteurs limitant, température, pH, salinité, milieu de culture.

In vitro influence of various abiotic factors (température, pH, salinity) on mycelium growth of three local strains of *Trichoderma* sp.

ABSTRACT

Trichoderma are saprophytic imperfect fungi that are found in various environments such as soil, dead wood, vegetable fragments and plant aerial organs. They protect and stimulate development of related plants. Effects of various abiotic factors (temperature, pH, salinity) on mycelium growth of three local *Trichoderma* strains were investigated. These strains were isolated from tomato rhizosphere. A preliminary study was performed on four culture media (PDA, MEA, SB and DOX) for the selection of the best media. The results

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved. *2651-IJBCS*
DOI : http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v10i2.26

Annexes 5 : Communications affichées

Poster, 3eme journée du LAPSE, 1-2 Avril 2015, UCAD2, Dakar, Sénégal.

Etude de la biologie et des propriétés antagonistes *in vitro* des *Trichoderma* pour la lutte contre la fusariose de la tomate (*Solanum lycopersicum*)

GUEYE N., DEME N. F., DANGUE A., SARR B., DIOP T.A.

Laboratoire de Biotechnologies Végétales, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences & Techniques, Université Cheikh Anta DIOP, B.P. 5005, Dakar-Fann, Sénégal

INTRODUCTION

Dans le sol, certains agents pathogènes sont responsables d'importantes pertes de récoltes surtout dans le domaine des culture maraichères en causant diverses maladies. La fusariose est l'une des principales maladies rencontrée chez la tomate au Sénégal (Collingwood et *al.*, 1984). Elle entraine un flétrissement et une pourriture des racines et du collet chez la tomate. Cette situation conduit à une utilisation abusive de pesticides chimiques de synthèse. Afin de pallier ces pratiques néfastes, des champignons antagonistes dont *Trichoderma* peuvent être utilisés pour lutter contre ces pathogènes et réduire l'utilisation des pesticides.
L'objectif général de notre étude est de comprendre la biologie des *Trichoderma*, champignons imparfaits en vue de leur utilisation dans les itinéraires techniques agricoles.

MATERIELS & METHODES

Matériel biologique: Les souches de *Trichoderma* utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de la rhizosphère de plants de tomate puis conservées sous les numéros de code TS1, TS2 et TS3. Pour les *Fusarium*, la première souche (F1) a été isolée à partir du collet des plantes tandis que la deuxième (F2) a été isolée à partir des feuilles de la tomate présentant des symptômes de la fusariose.

Etude de la biologie des *Trichoderma*: L'effet de quatre milieux de culture: PDA, MEA, DOX et Sabouraud, quatre pH: 3, 5, 7, 9, quatre températures d'incubation: 0°, 29 °, 35° et 40°C et cinq concentrations de Na Cl: 0%, 1%, 5%, 7% et 9% sur la croissance mycélienne des *Trichoderma* a été étudié.

Etude des propriétés antagonistes: Deux Techniques ont été utilisées:

- ✓ La méthode de confrontation directe (Hibar et *al.*,2005): deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures de *Trichoderma* et de *Fusarium* sont déposés dans une même boite de Petri à 3cm l'un de l'autre .
- ✓ La méthode de confrontation a distance: deux explants de 8 mm de diamètre prélevé à partir des colonies de *Trichoderma* et de *Fusarium* sont déposés au centre de chaque boite de Petri. Après 24 heures d'incubation, la partie inférieure contenant le *Trichoderma* est scellée avec une autre contenant le *Fusarium*, par une bande de para film (Hibar et *al.*, 2005) .

RESULTATS

➢Effet des milieux de culture sur la croissance de *Trichoderma*

Milieux de culture	Souches de *Trichoderma*		
24h d'incubation	**TS1**	**TS2**	**TS3**
PDA	**34.60a**	**43.50a**	**41.00a**
MEA	30.50 b	29.10b	33.20b
DOX	25.30 c	27.40b	22.40c
SB	25.70 c	30.50b	32.30b
48h d'incubation			
PDA	**> 85.00a**	**> 85.00a**	**> 85.00a**
MEA	50.40b	79.00b	80.60b
DOX	79.00b	79.20b	65.40d
SB	80.60b	79.20b	72.00c

Tableau 1: Croissance (mm) de différentes souches de *Trichoderma sp.* sur 4 milieux de cultures

➢Tests d'antagonisme

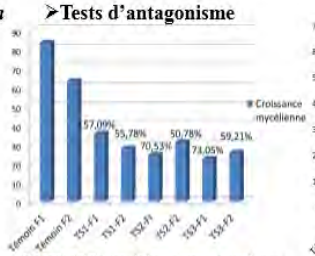


Figure1: Inhibition de la croissance mycelienne en confrontation directe

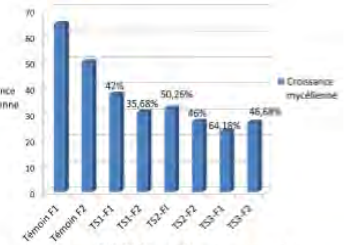


Figure 2: Inhibition de la croissance mycelienne en confrontation a distance

➢ Effet de la température d'incubation

T°C	Souches de *Trichoderma*		
24h d'incubation	**TS1**	**TS2**	**TS3**
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	**53.30a**	**55.20a**	**49.60a**
35	10.40b	15.60b	18.20b
40	00.00c	00.00c	00.00c
48h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	**>85.00a**	**> 85.00a**	**>85.00a**
35	15.00b	16.80b	24.21b
40	00.00c	00.00c	00.00c
72h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	**>85.00a**	**>85.00a**	**>85.00a**
35	36.00b	30.30b	33.60b
40	00.00c	00.00c	00.00c
96h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	**>85.00a**	**>85.00a**	**>85.00a**
35	58.40b	54.90b	59.90b
40	00.00c	00.00c	00.00c

Tableau 2: Croissance (mm) des souches des *Trichoderma* sur 4 temperatures incubation

Figure 3: Confrontation directe entre *Trichoderma sp.* souche T3 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

Figure 4: Confrontation directe entre *Trichoderma sp.* souche T2 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

Figure 5: Confrontation à distance entre T1 (B) et F2 (A)

Figure 6: Confrontation à distance entre T3 (B) et F2 (A)

Les différents milieux PDA, MEA, SB, DOX (tableau 1) permettent une bonne croissance de toutes les souches mais le milieu de culture à base de pomme de terre (PDA) est plus favorable pour la croissance de toutes les souches .
Concernant l'effet de la température d'incubation (tableau 2), une inhibition de la croissance a été observe a 0 et 40°C. Par contre la croissance est maximale à 29 et ralentie à 35°C.

Après 6 jours d'incubation (Figure 1 à 6), une action inhibitrice exercée par les souches de *Trichoderma* vis à vis de la croissance mycélienne des *Fusarium* a été observée. La souche T3 se montre la plus efficace avec un taux d'inhibition de 73.05% pour F1 et 59.21% pour F2 lors des tests de confrontation directe. Ce constat est confirmé par les tests de confrontation à distance ou une inhibition de 64.18% est observée pour F1 et 46.68% pour F2 qui est la souche la plus résistante.

CONCLUSION

Cette étude montre que les souches de *Trichoderma* sont capable d'utiliser une large gamme de substrats pour leur croissance. La température optimale pour la croissance des souches en culture est de 29°C. Cette étude a aussi montré l'effet antagoniste des trois souches de *Trichoderma* sur les isolats de *Fusarium sp.* responsable de la pourriture des racines et du collet chez la tomate. Le test de confrontation directe se révèle être plus efficace pour l'inhibition de la croissance des souches que le test de confrontation a distance.

REFERENCES

Collingwood E. F., Bourdouxhe L., Defrancq M., (1984). Les principaux ennemis des cultures maraicheres au Senegal. Centre pour le developpement de l'horticulture Camberene – Dakar. 2eme Edition.
Hibar Khaled , Daami-Remadi Mejda, Khiareddine Haifa, El Mahjoub Mohamed (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 9 (3), p. 163–171

Poster doctoriales : 8-9 Décembre 2015, UCAD2, Dakar, Sénégal

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
ECOLE DOCTORALE 'SCIENCE DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)'
UER 301; BIOTECHOLOGIES VEGETALES ET MICROBIENNES ET AMELIORATION DES PLANTES

Efficacité *in vitro* de souches locales de *Trichoderma* sp. contre deux souches de *Fusarium* sp. responsables de la pourriture des racines et du collet de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

[1,2]GUEYE N., [2]SALL-SY D., [1]DEME N. F., [1]DANGUE A., [1]SARR B. &. [1]DIOP T. A

1 Laboratoire de Biotechnologies des Champignons/Département de Biologie végétale/Faculté des Scientifiques et Techniques/UCAD
2 Institut Sénégalais de Recherche Agricole/Centre pour le Développement de l'Horticulture/BP 2619 Dakar/Sénégal

Directeur de thèse: Tahir A. DIOP ***Email: tdiop@yahoo.fr/tbc@ucad.sn*** ***Tel:***(221) 33 822 14 24/ 77 630 59 57

INTRODUCTION

Au Sénégal, les cultures maraichères ont connu une forte expansion à cause de leurs importances économiques et nutritionnelles. Cependant elles sont confrontées à plusieurs problèmes dont la surveillance phytosanitaire qui se pose avec plus d'acuité chez les espèces cultivées en saison pluvieuse. La Fusariose due au complexe *Fusarium oxysporum* est l'une des principales maladies cryptogamiques rencontrées au Sénégal (Collingwood et *al*., 1984). Pour lutter contre ces champignons pathogènes, de nombreux produits chimiques sont utilisés avec souvent des résultats mitigés et des effets néfastes sur la santé humaine et environnementale.
Cependant plusieurs microorganismes antagonistes dont les *Trichoderma* peuvent avoir des effets bénéfiques dans le contrôle des pathogènes et minimiser l'effet délétère des pesticides. L'objectif général de notre étude est d'évaluer l'efficacité antagoniste *in vitro* de trois souches locales de *Trichoderma sp.* contre deux souches de *Fusarium*.

MATERIELS & METHODES

Matériel biologique: Les souches de *Trichoderma* utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de la rhizosphère de la tomate puis conservées sous les numéros de code T1, T2 et T3. Pour les *Fusarium*, la première souche (F1) a été isolée à partir du collet des plantes tandis que la deuxième (F2) a été isolée à partir des feuilles de la tomate présentant des symptômes de la fusariose.

Etude des propriétés antagonistes: Deux Techniques ont été utilisées:

- ✓ **La méthode de confrontation directe**: deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures de *Trichoderma* et de *Fusarium* sont déposés dans une même boite de Petri à 3cm l'un de l'autre .
- ✓ **La méthode de confrontation a distance**: deux explants de 8 mm de diamètre prélevés à partir des colonies de *Trichoderma* et de *Fusarium* sont déposés au centre de chaque boite de Petri. Après 24 heures d'incubation, la partie inférieure contenant le *Trichoderma* est scellée avec une autre contenant le *Fusarium*, par une bande de para film (Hibar et *al*., 2005)

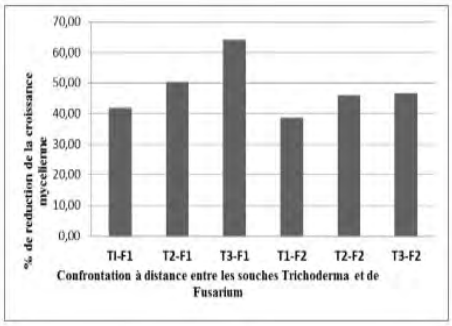


Figure 5: Confrontation à distance entre souche T1 (B) et F2 (A)

Figure 6: Confrontation à distance entre souche T3 (B) et F2 (A)

RESULTATS

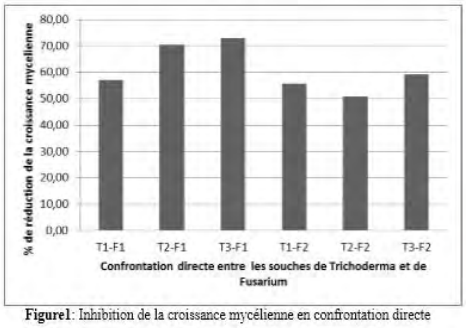


Figure1: Inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe

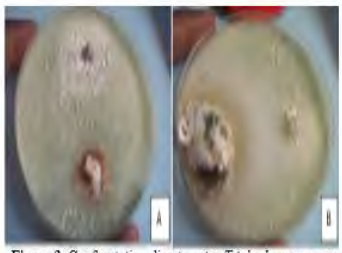


Figure 3: Confrontation directe entre *Trichoderma sp.* souche T3 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

Figure 4: Confrontation directe entre *Trichoderma sp.* souche T2 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

Figure 2: Inhibition de la croissance mycelienne en confrontation a distance

Après 6 jours d'incubation (Figure 1 et 2), une action inhibitrice exercée par les souches de *Trichoderma* vis à vis de la croissance mycélienne des *Fusarium* a été observée. La souche T3 se montre la plus efficace avec un taux d'inhibition de 73.05% pour F1 et 59.21% pour F2 lors des tests de confrontation directe. Ce résultat est confirmé par les tests de confrontation à distance ou une inhibition de 64.18% est observée pour F1 et 46.68% pour F2 qui est la souche la plus résistante.

CONCLUSION

Cette étude a montré l'effet antagoniste des trois souches de *Trichoderma* sur les isolats de *Fusarium sp.* responsable de la pourriture des racines et du collet chez la tomate. Le test de confrontation directe se révèle être plus efficace pour l'inhibition de la croissance des souches que le test de confrontation a distance.

REFERENCES

Collingwood E. F., Bourdouxhe L., Defrancq M., (1984). Les principaux ennemis des cultures maraicheres au Senegal. Centre pour le developpement de l'horticulture Camberene – Dakar. 2eme Edition.
Hibar Khaled , Daami-Remadi Mejda, Khiareddine Haifa, El Mahjoub Mohamed (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici* *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*9 (3), p. 163–171

***Retombées scientifiques*:** Connaissance des mécanismes d'action utilisés par *Trichoderma* dans la lutte contre les pathogènes, Sélection des souches performants
***Impacts socio-économiques*:** Utilisation des souches performants par les agriculteurs, réduction de l'utilisation des produits chimiques,

Auteur : Ndiogou GUEYE

Résumé :

Au Sénégal, la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constitue le légume le plus consommé aprés l'oignon. Cependant, sa culture est aujourd'hui dépréciée par de nombreux agents pathogènes dont *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii* qui causent des pertes économiques importantes. Ainsi, dans la recherche de nouvelles méthodes de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement, notre étude se fixe comme objectif général de caractériser puis d'évaluer les potentialités antagonistes des souches de *Trichoderma* indigènes contre deux agents pathogènes de la tomate: *Fusarium oxysporum* et *Sclerotinia rolfsii.* Suivant les caractéristiques morphologiques, un isolement de 20 souches de *Trichoderma* est réalisé à partir de différents sites de la zone des Niayes. Parmi ces isolats, 10 souches montrent une activité enzymatique importante liée à la production de chitinase, cellulase, pectinase et protéase et 8 souches de *Trichoderma* produisent de l'Acide Indole Acétique (AIA). L'identification des isolats basée sur le séquençage des régions ITS1 et ITS4 atteste que 7 souches appartiennent à l'espèce *Trichoderma asperellum* et une à *Trichoderma virens*. L'étude de la diversité génétique des isolats par RAPD révéle un pourcentage de polymorphisme élevé (98.2%) avec 5 primers. Pour l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance des 8 isolats de *Trichoderma* choisis, les résultats obtenus prouvent que le milieu PDA est plus adéquat pour la culture des souches. Les pH acides à neutres (pH 5 à pH 7) ainsi que les températures d'incubations se situant entre 25 et 30 °C sont plus favorables pour la croissance mycélienne des souches. Pour l'étude des propriétés antagonistes, une inhibition de la croissance mycélienne des deux pathogènes est notée pour les tests de confrontations directe et indirecte. Le pourcentage d'inhibition obtenu lors du test de confrontation directe et plus importante que celui du test de confrontation indirecte. La souche de *Fusaium oxysporum* est plus sensible aux différentes souches de *Trichoderma* que *Sclerotinia rolfsii*. Les cinq isolats présentant les meilleures propriétés antagonistes (TM1, TS1, TG4, TN1 et TU1) montrent une réduction importante de l'incidence des deux maladies après traitement des semences et inoculation directe au sol en serre. Une amélioration significative des paramètres de croissance (hauteur, diamètre au collet, biomasse aérienne et racinaire) par rapport aux plants inoculés avec les pathogènes seuls est aussi observée. Ces souches pourraient donc être proposées comme agent de lutte biologique contre les pathogènes fongiques des cultures maraichères au Sénégal.

Characterization of indigenous *Trichoderma* spp and evaluation of their antagonistic potentialities against two pathogens of tomato in Senegal: *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii*.

Abstract:

In Senegal, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most consumed vegetable behind onion. However, its cultivation is now depreciated by many pathogens including *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii* which cause significant economic losses. Thus, in the search for new efficient and environmentally friendly methods of control, our study sets the general objective of characterizing and evaluating the antagonistic potential of indigenous *Trichoderma* strains against two tomato pathogenic fungus: *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia rolfsii*. According to morphological characteristics, 20 strains of *Trichoderma* are isolated from different sites in Niayes zone. Among theses isolates, 10 strains show significant enzymatic activity related to the production of chitinase, cellulase, pectinase and protease and 8 strains of *Trichoderma* are postive to AIA production. Based on the sequencing of ITS1 and ITS4 regions, 7 strains are identify as *Trichoderma asperellum* and one as *Trichoderma virens*. The study of the genetic diversity of isolates by RAPD show a high percentage of polymorphism (98.2%) with 5 primers. Studies on effect of abiotic factors on the growth of the 8 selected *Trichoderma* isolates, reveal that PDA medium is more suitable for strain culture. Acid to neutral pH's (pH 5 to pH 7) as well as the incubation temperatures between 25 and 30 °C are more favorable for the mycelial growth of the isolates. Antagonistic studies by direct and indirect confrontation tests reveal the mycelial growth inhibition of the two pathogens. The percentage of inhibition obtained in the direct confrontation test is greater than that of the indirect confrontation test. The strain of *Fusaium oxysporum* is more sensitive to different strains of *Trichoderma* than *Sclerotnia rolfsii*. The five isolates (TM1, TS1, TG4, TN1 and TU1) with the best antagonistic properties show a significant reduction in the incidence of both diseases after seed treatment and direct soil inoculation in greenhouse. A significant improvement of growth parameters (plant height, collar diameter, shoot and root biomass) compared to inoculated plants with pathogens alone is also observe. These strains could therefore be proposed as a biocontrol agent against fungal pathogens in vegetable crops in Senegal.

Mots clés : *Trichoderma*, champignons pathogènes, tomate, lutte biologique