



**HAL**  
open science

# Etude comparative de quelques methodes d'estimation de l'aptitude a la competion saprophytique dans le sol des *Trichoderma*

P. Davet, P. Camporota

► **To cite this version:**

P. Davet, P. Camporota. Etude comparative de quelques methodes d'estimation de l'aptitude a la competion saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. *Agronomie*, 1986, 6 (6), pp.575-581. hal-02720616

**HAL Id: hal-02720616**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02720616v1>**

Submitted on 1 Jun 2020

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

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

# Etude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*

Pierre DAVET & Pierre CAMPOROTA (\*)

avec la collaboration technique de Christine ROURE

I.N.R.A., Laboratoire de Biologie et Pathologie végétales de l'ENSAM, F 34060 Montpellier Cedex

(\*) I.N.R.A., Station de Recherches sur la Flore pathogène dans le Sol, 17, rue Sully, F 21034 Dijon Cedex

## RÉSUMÉ

On compare les avantages et les inconvénients de quatre méthodes d'appréciation de l'aptitude à la compétition saprophytique de 20 clones de *Trichoderma*. La détermination de l'activité cellulosique, qui correspond à un caractère pour lequel on sait que des travaux de sélection sont possibles, ne rend que partiellement compte du comportement saprophytique des clones. La colonisation de fragments de paille dans le sol constitue un modèle proche des conditions naturelles, mais la forte variabilité des résultats rend son emploi peu aisé. La méthode des pastilles gélosées, assez artificielle, est facile à mettre en œuvre et sa reproductibilité est satisfaisante. Elle permet une bonne discrimination entre les clones. La méthode des pièges de papier filtre est bien adaptée à des études de dynamique des populations. Les résultats de ces quatre méthodes d'appréciation sont convergents et permettent de distinguer des clones très compétitifs et des clones pourvus d'une faible aptitude à la compétition saprophytique dans les conditions de cette étude.

**Mots clés additionnels :** Clones, tri, activité cellulosique.

## SUMMARY

*Methodological study of competitive saprophytic ability of Trichoderma strains in soil.*

Four methods of appraising saprophytic competitive ability of 20 clones of *Trichoderma* were critically compared: determination of carboxymethyl cellulase activity (1), colonization of straw fragments buried in soil (2), agar disk method (3), viz. substrate colonization from gelled disks of inoculated soil, filter paper trap method (4). The 20 clones were classified according to the data obtained by each of these methods: methods 2, 3 and 4 gave classifications in good agreement (correlation coefficient  $r = 0.84$  for 2-3 and  $r = 0.73$  for 3-4), and allowed a very clear distinction between highly competitive and poorly competitive strains in the conditions of these trials. There was also a significant correlation ( $r = 0.45$ ) between classifications given by methods 1 and 2.

Method 1 was interesting for genetic studies but only partly accounted for the saprophytic behaviour of *Trichoderma* strains. Method 2 was a model rather closely related to natural conditions but results were very variable, so replication must be increased. Method 3 was furthest from natural conditions but was easy to use and reproducible; differentiation between clones obtained by this way was good. Method 4 did not disturb soil and could be adapted to long-term studies of population dynamics.

**Additional key words :** Clones, screening, cellulase activity.

## I. INTRODUCTION

Les *Trichoderma*, en particulier *T. hamatum* (Bon.) Bain. et *T. harzianum* Rifai, sont des agents possibles de lutte biologique contre des champignons parasites telluriques (PAPAVIZAS & LUMSDEN, 1980; DAVET, 1983), à condition toutefois que leurs qualités d'antagonistes puissent s'exprimer dans le milieu microbiologiquement surpeuplé que constituent les sols cultivés.

Pour être efficace, un clone de *Trichoderma* doit en effet posséder non seulement une activité mycoparasitaire spécifique, mais aussi une bonne aptitude à la compétition saprophytique. Pour choisir judicieusement les souches, il faut pouvoir apprécier ce caractère d'une manière rapide et sûre. En dehors des travaux de GARRETT et de son école, à Cambridge (GARRETT, 1950; BUTLER, 1953; LUCAS, 1955; RAO, 1959) et de quelques autres (BARTON, 1961; PAPAVI-

ZAS & DAVEY, 1961 ; DAVET, 1976 ; CAMPOROTA, 1981), il ne semble pas que les chercheurs aient accordé beaucoup d'attention à l'aptitude des champignons telluriques à coloniser un substrat en situation de compétition. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude méthodologique qui nous a amenés à comparer 4 techniques d'évaluation de la compétitivité des clones de *Trichoderma* en présence de la microflore du sol. L'une est une méthode enzymatique ; les autres s'inspirent plus ou moins de la méthode de Cambridge.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Matériel cryptogamique

Nous comparons un ensemble de 20 isollements monoconidiens de *Trichoderma*, désignés par la suite comme clones. Ces clones font partie d'une collection décrite précédemment (ARTIGUES & DAVET, 1984) et conservée à 5 °C sur milieu à la pomme de terre (PDA). Certains essais sont conduits avec des sous-ensembles de 10 à 12 de ces clones.

### B. Sol

La terre utilisée dans tous les essais provient d'un jardin de Montpellier. C'est un sol sablo-limoneux de pH (CaCl<sub>2</sub>) = 6,7 contenant 1,94 p. 100 de carbone organique.

### C. Multiplication des *Trichoderma*

— Pour les essais de colonisation saprophytique, les clones sont ensemencés dans des fioles de Roux sur un milieu constitué d'un mélange de sable et de farine d'avoine, humidifié (200 g de sable, 6 g de farine d'avoine et 30 ml d'eau distillée ; 2 autoclavages à 24 h d'intervalle). Ces cultures sont maintenues à 28 °C pendant 12 j, puis elles sont laissées pendant une période équivalente dans les conditions du laboratoire et à la lumière. Les fioles sont alors vidées, leur contenu est homogénéisé puis séché à l'air dans des conditions aseptiques pendant 2 à 3 j. Les poudres ainsi obtenues sont conservées à 5 °C dans des boîtes étanches et constituent ce que nous appellerons par la suite l'inoculum.

— Pour les essais enzymatiques, les clones sont cultivés en milieu liquide dans des fioles de Roux contenant un disque de filtre cellulosique de 12,5 cm de diamètre, découpé en 8 secteurs égaux, et 80 ml de solution minérale (pour 1 l : Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 g ; KNO<sub>3</sub>, 250 mg ; MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 250 mg ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125 mg ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mg). Les flacons sont mis en incubation pendant 9 j à 28 °C.

### D. Colonisation saprophytique de la paille

L'inoculum est mélangé à la terre tamisée à raison de 0,1 p. 100 (vol./vol.). En pratique, cette propor-

tion est obtenue par pesée, en tenant compte des densités apparentes de la terre et de l'inoculum. Le mélange est homogénéisé à sec pendant 8 mn dans un homogénéiseur mécanique (Turbula). A 200 ml de sol ainsi inoculé, on ajoute 2 g de paille de blé hachée en fragments de 2 cm environ, puis de l'eau de façon à atteindre 60 à 70 p. 100 de la capacité de rétention. Après brassage à l'aide d'une cuillère, l'ensemble est introduit dans un sac de polyéthylène dont l'ouverture est scellée avec un ruban adhésif. Les sacs sont mis en incubation à l'étuve à 28 °C, à l'obscurité. Quatre jours plus tard, la paille est recueillie, lavée sous un courant d'eau, désinfectée superficiellement à l'hypochlorite de sodium pendant 2 mn, rincée et découpée en fragments de 5 mm de long. Pour chaque sac, 100 de ces fragments sont mis en culture sur un milieu sélectif pour les *Trichoderma* (DAVET, 1979). Après une semaine d'incubation à 28 °C, on compte le nombre de fragments de paille colonisés. Pour chaque clone, il est fait au moins 4 répétitions.

### E. Estimation du développement des *Trichoderma* en compétition par la méthode des pastilles gélosées

#### 1. Principe

Cette méthode consiste à mélanger des proportions croissantes d'inoculum à de la terre. Un échantillon de 12 g de chaque mélange est réparti au fond d'une boîte de Petri. On verse par-dessus 20 ml d'eau gélosée en surfusion et l'on imprime à la boîte un mouvement circulaire rapide de façon à bien homogénéiser l'ensemble. Après refroidissement et solidification, des pastilles de 8 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce et déposées sur du milieu PDA, à raison de 4, disposées en croix, par boîte de Petri. Les boîtes sont mises en incubation à l'obscurité à 22 ou 28 °C pendant 5 j puis restent 2 j à la lumière à la température du laboratoire avant d'être notées. Cinq boîtes de 4 pastilles sont ensemencées pour chaque traitement. Les essais sont répétés 2 à 5 fois, selon les séries.

#### 2. Gammes de concentrations

Dans une 1<sup>re</sup> série d'essais portant sur toute la collection, on a mélangé à la terre des quantités d'inoculum identiques quels que soient les clones, dans des proportions de 6, 24 et 90 p. 100 en poids, sans tenir compte de leur richesse réelle en propagules.

Dans une 2<sup>e</sup> série, on a d'abord évalué la teneur en propagules de chaque inoculum, selon la technique de DAVET (1979), puis on a mélangé à la terre des quantités ajustées de façon à avoir les mêmes teneurs en propagules pour chaque clone. Nous avons utilisé pour ces essais une douzaine de clones seulement, ce qui nous a permis d'améliorer la précision en travaillant avec 4 taux d'inoculum au lieu de 3, à savoir : 63 000, 316 000, 912 000 et 24 × 10<sup>6</sup> propagules/g.

#### 3. Notation

Chaque pastille est notée de 0 (aucun développement) à 4 (toute la surface autour de la pastille est colonisée par le *Trichoderma*). Les notes des 20 pastilles correspondant à chaque traitement sont ensuite

additionnées, la note maximum étant donc 80. Il est alors possible de calculer la proportion théorique d'inoculum (ou la quantité de propagules/g de sol) nécessaire pour obtenir la note 40, moitié de la note maximum. Ces valeurs, appelées C 40, peuvent être déterminées graphiquement, en construisant les courbes représentant les notes obtenues en fonction des concentrations. On peut aussi linéariser les courbes, après avoir exprimé les concentrations en logarithmes et obtenir par le calcul les valeurs recherchées. Dans les 2 cas, on aboutit à un classement des clones, les plus compétitifs étant ceux dont la valeur de C 40 est la plus basse. On peut encore classer les clones d'une 3<sup>e</sup> manière, en attribuant à chacun d'eux une note égale au total des différentes notes obtenues pour chacune des concentrations essayées.

## F. Estimation du développement saprophytique en compétition par la méthode des pièges de papier-filtre

### 1. Principe

La méthode a été décrite en détail antérieurement (CAMPOROTA, 1983). Elle consiste à enfouir dans le sol, humidifié à 70 p. 100 de sa capacité de rétention, des pièges constitués de rondelles de papier filtre de 10 mm de diamètre, imprégnées de milieu de RICHARDS (pour 1 l :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g ;  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g ;  $\text{FeSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg ;  $\text{ZnSO}_4$ , 5 mg ;  $\text{MnCl}_2$ , 2 mg ; galactose, 20 g ; glyco-colle, 2,25 g) additionné de fongicides (rose bengale, 100 mg ; sulfate de streptomycine, 100 mg ; bénomyl, 5 mg ; sulfate de cuivre, 5 mg ; prothiocarbe, 50 mg ; pentachloronitrobenzène, 50 mg). Pour chacune des concentrations, on remplit 4 boîtes de Petri de 90 mm de diamètre avec une quantité constante de mélange dans lequel, après humidification, on place verticalement 10 pièges par boîte, espacés de 20 mm en tous sens. Après une incubation de 5 j à 25 °C, ces pièges sont rincés, essorés et déposés sur le milieu sélectif de DAVET (1979). La colonisation des pièges par les *Trichoderma* est notée après 48 h d'incubation à 25 °C.

### 2. Quantification

Le sol analysé est dilué par mélange avec de la terre de serre désinfectée à 3 reprises à 100 °C, de façon à avoir des concentrations de 100, 10, 1, 0,1 et 0,01 p. 100. On calcule la droite de régression liant le pourcentage de colonisation des pièges et les concentrations correspondantes. On résout ensuite l'équation de la droite pour une colonisation de 50 p. 100 : ceci permet de déterminer le poids de sol nécessaire pour que 50 p. 100 des pièges soient colonisés dans les conditions du test. Ce poids est appelé « Unité de Colonisation 50 » (UC 50) que l'on exprime, afin de pouvoir comparer différents échantillons de sol entre eux, en nombre d'UC 50/g de terre.

### 3. Protocole expérimental

On compare le comportement saprophytique, dans le sol de Montpellier, de 10 des clones de la collection. Deux dates d'analyse ont été retenues : au moment de l'introduction de l'inoculum dans le sol (J 0) et après

30 j d'incubation du sol inoculé (J 30). La richesse en propagules de l'inoculum produit sur sable est déterminée ici après étalement de 10 mg dans 10 boîtes de Petri contenant du milieu au malt gélosé, en 4 répétitions. Le sol est inoculé à raison de 15 « grains fertiles »/g et constitue le stock initial qui sera ensuite dilué avec de la terre stérile. Après humidification, chaque lot est divisé en 2 parties : l'une est analysée aussitôt, l'autre est conservée à 28 °C dans un cristalliseur fermé par un film plastique perforé pour être analysée après 30 j.

## G. Hydrolyse de la carboxyméthylcellulose

Les cultures en milieu liquide sont filtrées sur de la mousseline, puis sur du papier filtre, et le filtrat est immédiatement utilisé. L'activité enzymatique est appréciée par la méthode colorimétrique de NELSON-SOMOGYI (THOMAS & REYMOND, 1958). Le milieu réactionnel est constitué d'1 ml de filtrat et d'1 ml de solution de carboxyméthylcellulose à 1,2 p. 100 dans un tampon citrate 0,05 M à pH = 4. Le dosage du glucose libéré est réalisé après 6 h d'incubation à 38 °C. Chaque analyse est répétée au moins 4 fois.

## H. Calculs

Les analyses de corrélation sont faites par la méthode des corrélations de rangs de SPEARMAN.

## III. RÉSULTATS

### A. Colonisation de la paille

Le temps relativement court pendant lequel les fragments de paille restent enfouis dans le sol permet une bonne discrimination des clones, malgré une variabilité assez forte d'une répétition à une autre (tabl. 1). On peut ainsi distinguer des clones ayant une très faible activité saprophytique (taux de colonisation inférieurs à 5 p. 100 : LN3, J11, LN1) et des clones ayant une activité élevée (taux de colonisation supérieurs à 50 p. 100 : HH1, MB, 24).

### B. Activité saprophytique estimée par la méthode des pastilles gélosées

La reproductibilité de la méthode est bonne comme le montre l'exemple de la figure 1. Nous avons comparé les classements issus des 3 procédés d'interprétation des résultats décrits au chapitre précédent : détermination graphique de C 40, calcul de C 40 après linéarisation, classement selon le total des notes (tabl. 2). On peut les considérer comme identiques, les coefficients de corrélation entre classements étant compris entre 0,97 et 0,99. Nous avons comparé aussi les 2 méthodes de préparation des mélanges : apport d'inoculum en proportion déterminée, sans tenir

TABLEAU 1

Pourcentage moyen de fragments de paille colonisés par chaque clone, après 4 j d'incubation dans un sol non stérile, à 28 °C.

Mean percentage of straw pieces colonized by each clone, after a 4-day incubation at 28 °C in non-sterile soil.

Clone	Pourcentage de fragments colonisés	Ecart-type	Classement
HH1	61,8	21,17	1
MB	57,0	24,02	2
24	50,5	28,23	3
HH3	50,0	27,88	4
B140	45,7	27,87	5
B1	44,8	24,10	6
V1	43,8	19,48	7
3160	43,0	28,77	8
LR3	38,0	20,41	9
LK1	31,8	19,31	10
LX3	16,5	7,94	11
LX1	16,2	9,04	12
LR1	16,0	8,22	13
LW1	14,3	11,95	14
JE1	11,8	10,14	15
KZ1	5,8	3,27	16
MD1	5,2	7,94	17
LN1	3,5	1,00	18
J11	2,8	4,27	19
LN3	2,5	1,29	20

compte de la teneur en propagules, et ajustement des quantités d'inoculum de façon à travailler avec des taux de propagules identiques pour tous les clones. La correspondance entre les classements obtenus par ces 2 méthodes est très bonne :  $r = 0,95$ .

Dans tous les cas, on observe des différences importantes dans le comportement des clones : alors qu'il suffit d'un faible apport des clones 24 ou B1 pour atteindre la note 40, il faut au contraire des quantités très importantes d'inoculum de J11, LN1 ou LN3 pour obtenir le même résultat.

La température d'incubation (22 ou 28 °C) modifie peu le classement général des clones (tabl. 3). On peut cependant noter que les 2 clones les plus compétitifs à 22 °C ont une température optimale de croissance de 22-24 °C, alors que le clone le mieux classé à 28 °C a aussi son optimum thermique à 28 °C.

### C. Activité saprophytique estimée par la méthode des pièges de papier-filtre

A J0, les estimations des UC 50/g s'échelonnent de 0,1 à 100 selon les clones (fig. 2). On peut distinguer approximativement 2 groupes : HH3, B1, 24, 3160, MB et HH1 sont des clones montrant dans cet essai une aptitude saprophytique forte à très forte, tandis que B140, LR1, LR3 et V1 se classent comme moyens à faibles. On obtient à J30 un classement sensiblement analogue, avec une tendance générale à la diminution du nombre d'UC 50/g, à 3 exceptions près.

### D. Activité cellulolytique

Les filtrats de culture hydrolysent la carboxyméthylcellulose dans des proportions variables (tabl. 4). Les clones MD1, 3160 et JE1 ont l'activité la plus faible ; B140, LR1 et MB ont l'activité la plus grande.

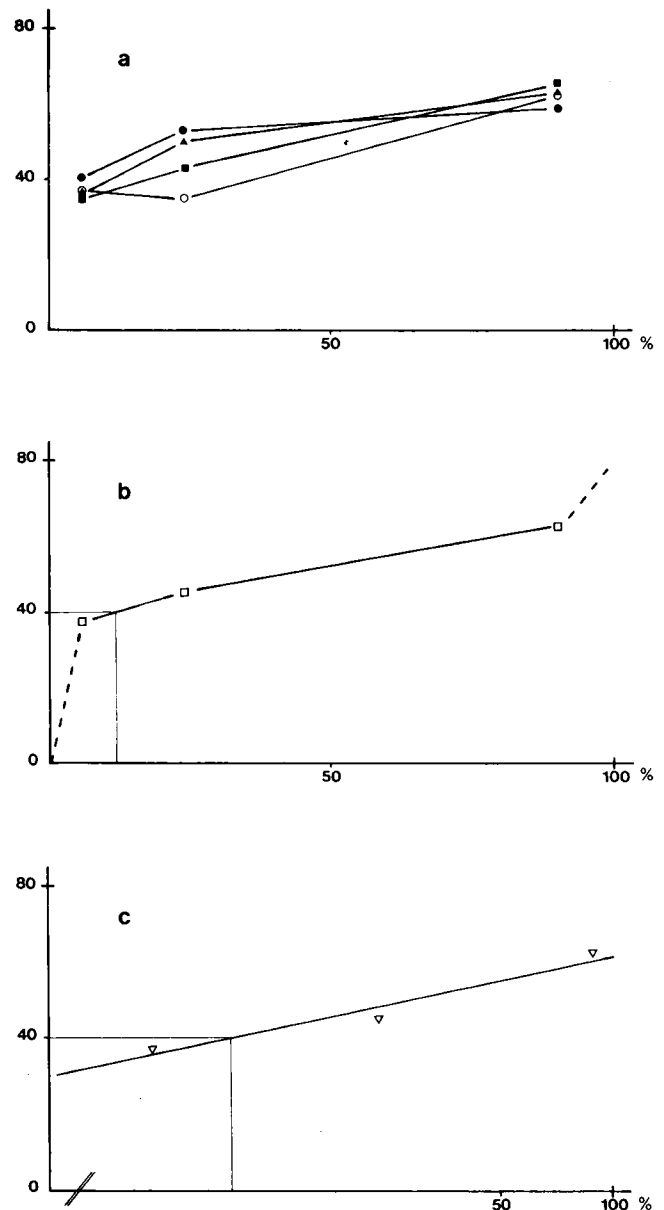


Figure 1

Exemple de résultats obtenus avec la méthode des pastilles gélosées pour le clone HH1.

a) évolution de la notation en fonction de la proportion d'inoculum de *Trichoderma*, lors de 4 répétitions distinctes. L'inoculum est apporté à raison de 6, 24 et 90 p. 100.

b) graphique construit à partir des moyennes des valeurs représentées sur la figure 1a et détermination graphique de C 40. Les parties représentées en tirets sont extrapolées en considérant que l'on obtient la note 0 lorsqu'il n'y a aucun inoculum et la note maximum 80 lorsqu'on a 100 p. 100 d'inoculum.

c) les points ne sont pas toujours aussi bien alignés que sur le graphique b mais la courbe peut être linéarisée après expression des concentrations en logarithmes.

L'équation de la droite est ici :  $y = 21,22 \log x + 61,63$ .

Example of results obtained for clone HH1 by the agar-disk method. a) data obtained for different proportions of *Trichoderma* inoculum in soil, in 4 distinct replicates. Inoculum concentrations were 6, 24 and 90 % w/w.

b) graph constructed from the means of the values presented in fig. 1a. Parts with broken lines were extrapolated, assuming value 0 in the absence of any inoculum, and a maximum value 80 with inoculum concentration 100 %. The graphical determination of C 40 has also been represented.

c) dots were not always laid out in a rather straight line as in graph b, but the curve could be streightened if concentration was expressed logarithmically. In this case, the equation was :  $y = 21,22 \log x + 61,63$ . It was therefore easy to calculate the value of x when  $y = 40$ .

TABLEAU 2

Exemple de résultats obtenus par la méthode des pastilles gélosées. Dans cette série d'essais, les volumes d'inoculum utilisés sont les mêmes pour tous les clones ; l'incubation est faite à 28 °C. Le coefficient de corrélation entre les 2 premiers classements est 0,99 ; la corrélation entre les classements 1 et 3 est 0,98 ; pour les classements 2 et 3,  $r = 0,97$ .

Example of results obtained with the agar-disk method. In the series of trials reported here, inoculum concentrations for each clone were 6, 24 and 90 % (w/w) ; the disks were incubated at 28 °C. In the first column, the clones were characterized by a graphically determined C 40 value. In the second column, C 40 value is a theoretical number, calculated after linearization of the corresponding curves. In the third column, each clone was defined by the total of partial scores corresponding to each dilution. Correlation coefficients for classifications 1 and 2, 1 and 3, 2 and 3 were respectively 0,99, 0,98 and 0,97.

Clone	Note C 40 estimée graphiquement		Note C 40 calculée après linéarisation		Note obtenue par sommation des notes partielles	
	C 40	Classement 1	C 40	Classement 2	Note totale	Classement 3
24	4,5	1	0,8	2	186,8	2
B1	5	2	1,5	3	182,2	3
3160	5,5	3	0,7	1	192,4	1
HH1	12	4	9,5	4	144,9	5
HH3	14,5	5	11	5	150,2	4
MB	21,5	6	17	6	136,0	6
V1	23,5	7	18	7	130,8	7
LK1	42,5	8	19	8	126,3	8
LR3	56,5	9	41	9	98,6	9
JE1	69,5	10	62,5	10	65,6	13
KZ1	74	11	69	11	68,2	12
LX1	84,5	12	102	12	77,4	11
B140	91	13	245	15	88,2	10
LX3	91	14	186	13	59,0	15
LR1	91	15	191	14	62,8	14
LW1	92	16	275	16	43,3	16
MD1	93	17	1 175	17	38,0	17
LN3	94	18	10 000	18	16,6	18
LN1	95	19	$468 \times 10^{12}$	19	3,9	19
J11	95,5	20	$10^{152}$	20	0,6	20

TABLEAU 3

Comparaison, pour un échantillon de 12 clones, des classements obtenus à 22 et à 28 °C par la méthode des pastilles gélosées (2 répétitions ; nombres de propagules égaux pour chaque série de mesures).

Comparison of classifications obtained by the agar-disk method at 22 and 28 °C, with a sample of 12 clones (means of 2 replicates ; every inoculum concentration was adjusted to have the same numbers of propagules/g in each series of measurements).

Clone	MD1	24	B1	KZ1	LX3	MB	LR3	V1	HH1	HH3	LW1	B140
Température optimale de croissance <i>in vitro</i>	22	22	24	24	28	28	28	28	28	28	28	28
Classement à 22 °C	11	2	1	5	9	3	12	6	7	4	10	8
Classement à 28 °C	11	4	2	7	9	6	10	5	3	1	12	8

### E. Correspondance entre les diverses méthodes

Lorsqu'on estime l'activité saprophytique des *Trichoderma* par leur aptitude à coloniser des fragments de paille en un temps limité, on obtient un classement des clones très proche du classement établi par la méthode des pastilles gélosées ( $r = 0,84$ , significatif à 2 p. 1 000).

Il y a en outre une bonne corrélation entre le classement issu de la méthode des pastilles gélosées et le classement des clones établi à partir de la méthode des pièges de papier-filtre :  $r = 0,73$  pour les estimations à J0 et  $r = 0,79$  pour les notations à J30. La corrélation entre le degré de colonisation des pailles et l'aptitude à dégrader la carboxyméthylcellulose est moins bonne, mais néanmoins significative au seuil de

5 p. 100 ( $r = 0,45$ ). Il n'y a pas de corrélation entre cette activité enzymatique et le comportement des clones dans la méthode des pastilles gélosées, ni dans celle des pièges de papier-filtre.

### IV. DISCUSSION

Pour caractériser les clones de *Trichoderma*, nous avons d'abord choisi un modèle qui ne soit pas trop éloigné des conditions naturelles : la colonisation de fragments de paille enfouis dans un sol non stérile. Malgré un temps d'incubation court et une très grande dilution de l'inoculum, certains clones arrivent à

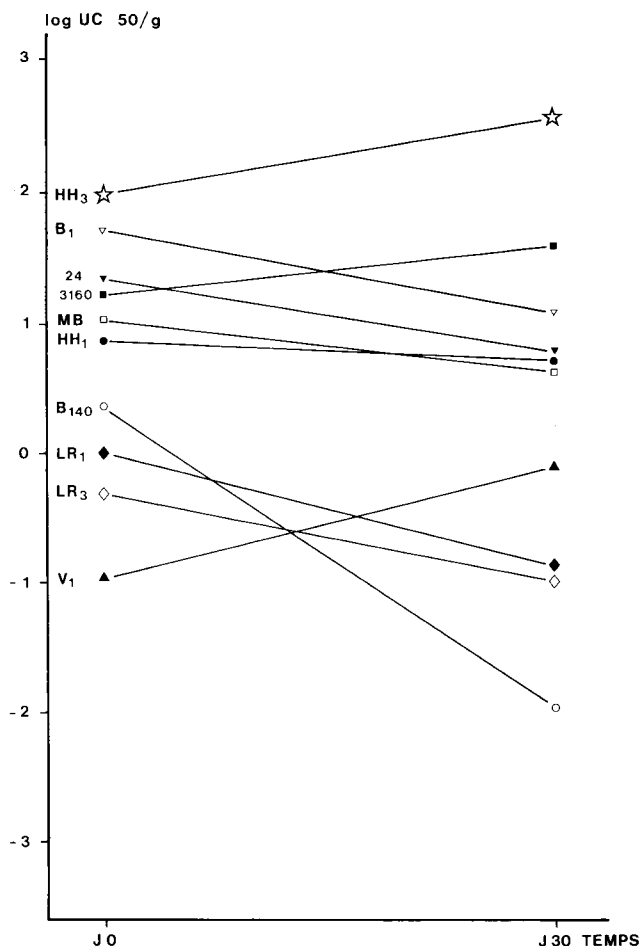


Figure 2  
Méthode des pièges de papier-filtre : variation du nombre d'Unités de Colonisation 50/g de sol entre le jour de l'incorporation de l'inoculum dans la terre (J 0) et la date J 0 + 30.

Filter paper trap method : the graph represents the variation of the number of Units of Colonization 50 per g of soil, from the day of inoculum incorporation into the soil (J 0) to the date J 0 + 30 days.

coloniser jusqu'à 62 p. 100 des fragments, montrant ainsi une aptitude élevée au développement saprophytique. Certains autres clones s'implantent très mal. Un travail de sélection s'impose donc puisque seuls peuvent être retenus, comme candidats à la lutte biologique dans le sol, les clones possédant une compétitivité élevée.

Nous retrouvons un résultat déjà établi par GARRETT il y a plusieurs années (1966, 1975) pour d'autres champignons : la capacité de coloniser les fragments

de paille en situation de compétition est liée à l'activité cellulolytique des clones. Ce caractère pourrait donc servir de critère pour un travail de sélection : on sait qu'il est possible de trouver des souches de *Trichoderma* très fortes productrices de cellulase (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977). Dans les travaux de GARRETT, l'activité cellulolytique est estimée par l'aptitude des champignons à se développer sur la cellulose du papier-filtre et la correspondance avec la colonisation des pailles est très bonne. Ici, nous avons évalué seulement l'activité du complexe enzymatique capable d'hydrolyser la carboxyméthylcellulose. Ces mesures ne prennent pas en compte l'attaque de la cellulose cristalline, ce qui explique sans doute que la corrélation observée ne soit pas très élevée, bien que significative.

L'utilisation de fragments de paille, de composition mal définie, ajoute un facteur de variabilité à ceux qui sont apportés par le sol. La méthode des pastilles gélosées et la méthode des pièges de papier-filtre permettent de travailler dans des conditions beaucoup mieux standardisées.

La méthode des pastilles gélosées a l'avantage de donner des résultats aisément reproductibles. Le substrat étant moins sélectif que la paille, on remarque, d'une part, que les doses d'inoculum nécessaires sont plus importantes puisque la concurrence est plus sévère, d'autre part, que l'activité cellulolytique n'est plus primordiale. L'activité antibiotique des *Trichoderma* joue certainement dans ce cas un rôle important dans leur succès pour la conquête du substrat, mais d'autres facteurs peuvent intervenir (vitesse de croissance, tolérance aux antibiotiques d'origine étrangère). Le classement auquel on aboutit est en bon accord avec le classement obtenu dans des conditions plus « naturelles » sur les fragments de paille. La technique est assez rapide et permet une bonne séparation entre clones compétitifs et clones peu actifs. L'ordre des clones n'est pas sensiblement modifié selon que l'on travaille à nombre de propagules égal ou à poids d'inoculum égal (sans tenir compte des variations éventuelles de teneur d'un inoculum à un autre). Ceci permet d'éviter le dosage préalable des propagules dans les poudres servant d'inoculum. Le classement peut être obtenu très rapidement après simple addition des notes correspondant à chacune des concentrations essayées.

La méthode des pièges de papier-filtre aboutit à un classement voisin de la méthode précédente, bien que la comparaison porte ici seulement sur la moitié des clones de la collection. Le léger écart entre les

TABLEAU 4

Activité cellulasique des clones, représentée par l'apparition de molécules de glucose dans une solution de carboxyméthylcellulose incubée pendant 6 h à 38 °C en présence de filtrats de culture.

Cellulolytic activity of a collection of *Trichoderma* strains, expressed as the weight of glucose liberated in one ml of carboxymethylcellulose solution, after 6 h incubation at 38 °C with culture filtrates.

Clone	B140	LR1	MB	HH3	V1	LR3	HH1	LX1	LW1	LX3	LN3	KZ1	LN1	LK1	BI	24	J11	MD1	3160	JE1
Glucose libéré (mg . ml <sup>-1</sup> )	0,67	0,62	0,61	0,58	0,53	0,49	0,45	0,37	0,32	0,31	0,29	0,18	0,17	0,16	0,16	0,15	0,11	0,08	0,08	0,08
Ecart-type	0,10	0,34	0,14	0,32	0,32	0,13	0,15	0,14	0,16	0,16	0,21	0,10	0,16	0,12	0,15	0,13	0,11			

2 notations peut provenir du fait que les pièges utilisés sont partiellement sélectifs, ce qui modifie sensiblement les conditions de la compétition. L'intérêt de cette technique, par rapport aux précédentes, est qu'elle se prête très bien à une étude dynamique, sans exiger de grandes quantités d'inoculum et sans entraîner de perturbations du sol en cours d'étude. L'évolution du nombre d'UC 50/g en fonction du temps peut être considérée comme une indication de l'aptitude d'un clone à se conserver dans un sol donné.

Toutes les expérimentations rapportées ci-dessus ont été réalisées dans le même sol de Montpellier, mais les travaux en cours nous permettent de penser que nos

conclusions restent valables dans d'autres types de sol. En résumé, plusieurs approches sont possibles pour apprécier l'aptitude des *Trichoderma* à la compétition saprophytique. Les méthodes que nous venons d'envisager donnent des résultats convergents. Pour trier des clones dans une collection, la plus facile à mettre en œuvre nous paraît être la méthode des pastilles gélosées. Pour des études de dynamique des populations, la méthode des pièges de papier filtre semble la plus intéressante.

Reçu le 19 décembre 1985.

Accepté le 4 mars 1986.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Artigues M., Davet P.**, 1984. Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons à sclérotés. *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 413-417.
- Barton R.**, 1961. Saprophytic activity of *Pythium mamillatum* in soils. II. Factors restricting *P. mamillatum* to pioneer colonization of substrates. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **44**, 105-118.
- Butler F. C.**, 1953. Saprophytic behaviour of some cereal root-rot fungi. *Ann. appl. Biol.*, **40**, 284-311.
- Camporota P.**, 1981. Mesure de la colonisation saprophytique en compétition de *Rhizoctonia solani* Kühn dans les sols et substrats. *Agronomie*, **1**, 513-517.
- Camporota P.**, 1983. Evolution du comportement saprophytique de souches de *Trichoderma* spp. dans les sols. Technique d'étude. *Agronomie*, **3**, 607-609.
- Davet P.**, 1976. Comportement sur divers substrats des champignons associés à la maladie des racines liégeuses de la tomate au Liban. *Ann. Phytopathol.*, **8**, 159-169.
- Davet P.**, 1979. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 529-533.
- Davet P.**, 1983. Les *Trichoderma*. Exemple de champignons antagonistes d'agents pathogènes. In « Faune et flore auxiliaires en Agriculture », ACTA, Paris, 193-205.
- Garrett S. D.**, 1950. Ecology of the root-inhabiting fungi. *Biol. Rev.*, **25**, 220-254.
- Garrett S. D.**, 1966. Cellulose-decomposing ability of some cereal foot-rot fungi in relation to their saprophytic survival. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **49**, 57-68.
- Garrett S. D.**, 1975. Cellulolysis rate and competitive saprophytic colonization of wheat straw by foot-rot fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **7**, 323-327.
- Lucas R. L.**, 1955. A comparative study of *Ophiobolus graminis* and *Fusarium culmorum* saprophytic colonization of wheat straw. *Ann. appl. Biol.*, **43**, 134-143.
- Montenecourt B. S., Eveleigh D. E.**, 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 777-782.
- Papavizas G. C., Davey C. B.**, 1961. Saprophytic behaviour of *Rhizoctonia* in soil. *Phytopathology*, **51**, 693-699.
- Papavizas G. C., Lumsden R. D.**, 1980. Biological control of soil-borne fungal propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **18**, 389-413.
- Rao A. S.**, 1959. A comparative study of competitive saprophytic ability in twelve root-infecting fungi by an agar plate method. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **42**, 97-111.
- Thomas P., Reymond D.**, 1958. *Techniques de Biochimie*. J. B. Baillière et fils, Paris.