



**Original Paper**

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

## **Evaluation *in vitro* du potentiel antagoniste de *Trichoderma harzianum* du Burkina Faso contre *Magnaporthe grisea*, l'agent causal de la pyriculariose du riz, isolées au Mali**

Yaya KONE<sup>1,3\*</sup>, Tobdem Gaston DABIRE<sup>2</sup>, Hamadoun AMADOU<sup>1</sup> et Irénée SOMDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut d'Economie Rurale (IER), Centre Régional de Recherche Agronomique (CRRA) de Sikasso, Programme Riz Bas-fonds, BP : 16 Sikasso, Mali.

<sup>2</sup> Université Nazi Boni, Institut du Développement Rural (IDR), Laboratoire des Systèmes Naturelles, Agrosystèmes et Ingénierie de l'Environnement (SY.NA.IE), 01 BP : 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

<sup>3</sup> Université Fédérale de Lavras (UFLA), MG-Brésil.

\*Correspondant auteur ; E-mail : [yaya.kone385@gmail.com](mailto:yaya.kone385@gmail.com); Tél. (00223) 76496895 / 68700702

### **RESUME**

*Magnaporthe grisea*, pathogène du riz est cosmopolite et cause d'énormes dégâts au Mali. L'utilisation de variétés résistantes et de fongicides chimiques sont efficaces pour son contrôle, mais présentent des limites objectives avec le contournement des gènes de résistances par l'agent pathogène, ainsi que les risques sanitaires et environnementaux que présentent les fongicides. Avec cette information de base, cette étude s'est proposée de développer une stratégie de lutte biologique utilisant des antagonismes naturels afin de contrôler *M. grisea*. Dix souches de *M. grisea* du Mali ont été caractérisées morphologiquement et moléculairement pour confirmer leurs identité et variabilité. L'action antagoniste *in vitro* de 05 souches de *T. harzianum* a été évaluée sur ces souches pathogènes. *M. grisea* et *T. harzianum* ont ainsi été mises en confrontation directe dans des boîtes de Petri pendant 06 jours. Les croissances radiales du pathogène ont été évaluées et les coefficients d'antagonisme calculés. L'analyse moléculaire a indiqué que toutes les souches appartiennent à *M. grisea* et présentent de fortes homologues avec les souches de références du NCBI. L'analyse des séquences a indiqué trois groupes légèrement distingués. Toutes les souches de *T. harzianum* ont inhibé la croissance du pathogène avec des coefficients d'antagonisme compris entre 0,50 et 0,78.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

**Mots clés:** Riz, *Magnaporthe grisea*, *In vitro*, *Trichoderma harzianum*, antagonisme.

### ***In vitro* evaluation of the antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* from Burkina Faso against *Magnaporthe grisea*, the causative agent of rice blast disease, isolated in Mali**

### **ABSTRACT**

*Magnaporthe grisea*, a rice pathogen, is cosmopolitan and causes enormous damage in Mali. The use of resistance cultivars and chemical fungicide are generally effective control methods. However, the durability of genetic resistance is often short-lived because of the pathogen's ability to rapidly evolve to overcome resistance gene, and then environmental and toxicity threat of chemicals employment. With this basic

information, this study proposed to develop an alternative strategy to control *M. grisea* with *T. harzianum*. *M. grisea* from Mali has been characterized morphologically and molecularly to confirm their identity and variability. The *in vitro* antagonistic action of 05 strains of *T. harzianum* was tested. *M. grisea* and *T. harzianum* were thus confronted with a direct confrontation in the Petri dishes during 06 days. The radial growths of the pathogen were evaluated and the coefficients of antagonism calculated. Molecular analysis with all strains corresponds to *M. grisea* and strong assertions with NCBI reference strains. Sequence analysis indicated three slightly distinguished groups. *T. harzianum* strains inhibited growth of the pathogen with antagonistic coefficients between 0.50 and 0.78.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

**Keywords:** Rice, *Magnaporthe grisea*, *In vitro*, *Trichoderma harzianum*, antagonism

## INTRODUCTION

Produit dans 113 pays de la planète, le riz (*Oryza sativa* L.) est la troisième céréale la plus cultivée après le blé et le maïs et occupe 15% des superficies totales emblavées dans le monde (Trebuil, 2004). Il s'agit d'une monocotylédone de la famille des *Poacea* adaptée aux sols à texture argilo limoneuse riche en matière organique avec un pH de 6 à 7. Produit pour ses caryopses utilisés dans l'alimentation humaine, le riz constitue la base alimentaire de plus de la moitié de l'humanité (Fageria et al., 2015). La proclamation de l'année 2004 pour la deuxième fois après 1997 par l'Assemblée générale des Nations Unies comme l'année internationale du riz témoigne non seulement de l'importance du riz mais aussi du rôle majeur des systèmes agricoles dans leur ensemble face aux grands enjeux mondiaux.

Plus de 95% de la production rizicole est assurée par les pays en voie de développement, permettant ainsi à ces pays de participer au commerce international (Remmert, 2003). Au Mali, le riz occupe également la troisième place des céréales produites après le mil/sorgho et le maïs. La riziculture est considérée au Mali comme l'un des secteurs agricoles prioritaires pour le développement du pays. Selon Coulibaly et Ouologuem (2014), le riz représente 8,3% du chiffre d'affaire agricole du Mali (environ 5% du PIB du pays) et se classe donc juste après la production de coton.

Toutefois, au Mali comme partout en Afrique occidentale, les productions nationales demeurent insuffisantes par rapport aux besoins. Les consommations internes sont

donc tributaires du riz produit à l'étranger (essentiellement de Chine). Cette forte importation du riz occasionne d'importantes sorties de devises (FOESMR, 2006).

Outre l'absence de politiques agricoles favorables, la faiblesse des productions rizicoles en Afrique est aussi due à des contraintes liées à la non maîtrise de l'eau, à la compétition avec les adventices et à la pression exercée par les complexes parasites (champignons, bactéries, virus, nématodes et insectes). Cette dernière contrainte engendre d'énormes chutes des rendements dans les périmètres aménagés pour la riziculture. En effet, lorsque les rendements augmentent grâce aux intrants, à l'utilisation de variétés performantes, à l'irrigation et à l'amélioration des voies techniques, les cultures deviennent également plus sensibles aux bio-agresseurs (ravageurs et maladies) (Lepoivre, 2003).

Au nombre des contraintes biotiques dont fait face le riz, la pyriculariose, est une maladie fongique causée par *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (anamorphe : *Pyricularia oryzae* Cavana) dont la seule évocation suscite de l'inquiétude chez les riziculteurs et les chercheurs du riz, constitue une grande menace pour la sécurité alimentaire du fait qu'elle détruit annuellement plus de 150 millions de tonnes de riz cultivé à travers le monde, de quoi nourrir 60 millions de personnes (ADRAO, 2003). Il s'agit d'un ascomycète filamenteux et hétérothallique qui provoque collectivement des maladies chez de nombreuses espèces de la famille des graminées dont le riz (*Oryza sativa*), le blé (*Triticum aestivum*), l'avoine (*Avena sativa*),

l'orge (*Hordeum vulgare*) et le millet (*Eleusine coracana*, *Pennisetum glaucum*, *Setaria italica* etc.) (Gladieux et al., 2018). C'est un agent pathogène multi hôtes qui infecte plus de 50 autres espèces de graminées (Castroagudín et al., 2016). La pyriculariose est une maladie cosmopolite (Betts, 2007) particulièrement préjudiciable au riz pluvial et de bas-fond (Nguyen et al., 2016). Les pertes annuelles causées par *M. grisea* varient entre 10% et 30% de la production et peuvent être totales en cas d'utilisation d'une variété très sensible (Raveloson et al., 2013). *M. grisea* est à la fois transmis par le vent et les semences et peut se répandre dans le monde entier par le biais du mouvement des semences ou des grains (Gladieux et al., 2018). En plus de toutes les parties aériennes du riz, cet agent pathogène est également capable de coloniser les racines (Raaijmakers et al., 2009) et demeurer ainsi dans les résidus après la récolte.

Les stratégies de contrôle jusqu'ici utilisées contre cette maladie demeurent l'utilisation de variétés résistantes, les pratiques culturales et l'emploi de fongicides de synthèse (Pooja et Katoch, 2014). L'application de fongicides et l'utilisation de cultivars résistants sont généralement des méthodes de lutte efficaces (TeBeest et al., 2011). Toutefois, aucune de ces stratégies ne s'est avérée durablement efficace parce que le champignon devient de plus en plus résistant aux fongicides et adopte des formes de plus en plus virulentes pour contourner les résistances des variétés sélectionnées après quelques années (TeBeest et al., 2011 ; Nguyen et al., 2016). L'agent pathogène de la pyriculariose est si variable, particulièrement en conditions de monoculture intensive à grande échelle, qu'il peut rendre vulnérables, les variétés résistantes de riz au bout de 2 ou 3 ans (ADRAO, 2003). En outre, l'utilisation de produits chimiques n'est généralement plus conseillée en raison des nombreux risques sanitaires et environnementaux qu'elle représente (risques de toxicité, d'écotoxicité, de réapparition de souches résistantes de l'agent pathogène) (Raveloson et al., 2013).

Dans ces conditions, il s'avère nécessaire que des méthodes alternatives de contrôle de la pyriculariose soient mises au point pour accompagner durablement et efficacement la production du riz au Mali. Dans plusieurs institutions de recherche agricole, des agents de lutte biologique (BCA) ont été testés avec succès sur des champignons phytopathogènes (Dabiré et al., 2016). Il s'agit de méthodes qui exploitent des antagonismes naturels entre agents microbiens permettant de réduire la pression de la maladie tout en préservant l'environnement (Moricca et al., 2015). Au nombre des BCA testés et commercialisés, les champignons telluriques du genre *Trichoderma* figurent en bonne position. Plusieurs souches des champignons filamenteux *Trichoderma* spp. (téléomorphe *Hypocrea*) ont attiré beaucoup de recherches, car elles constituent un agent de biocontrôle efficace contre un large éventail des agents phytopathogènes du sol et des feuilles (Deravel et al., 2014 ; Zhang et al., 2016). Les *Trichoderma* sont des champignons ascomycètes à spores vertes omniprésents dans la rhizosphère (Hem et Pang, 2017). Certaines souches ont la capacité de réduire la sévérité des maladies des plantes en inhibant les agents phytopathogènes, principalement dans le sol ou sur les racines des plantes (Silva et al., 2017 ; Hermosa et al., 2012). Les principaux modes d'action de *Trichoderma* spp. comprennent la compétition pour les nutriments et l'espace, la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, la production de métabolites antifongiques diffusibles et volatils et le mycoparasitisme (Hermosa et al., 2012).

La présente étude se donne pour ambition d'évaluer l'action antagoniste *in vitro* de cinq souches de *T. harzianum* contre des souches de *M. grisea* isolées au Mali dans la perspective de mettre au point une méthode de lutte biologique contre cette maladie dévastatrice.

## MATERIEL ET METHODES

### Les espèces fongiques testées

Cinq isolats de *Trichoderma harzianum* dont quatre isolés à partir

d'échantillons de sols prélevés au Burkina Faso dans la rhizosphère des périmètres maraîchers et un isolat obtenu à partir d'une poudre commerciale (Eco-T, Plant Health Product) Sud-africaine, ont été testés. Dix monosouches de *M. grisea*, isolées à partir des feuilles de riz cultivé et sauvage présentant des symptômes typiques de la pyriculariose et purifiées ensuite par isolement monoconidien ont été utilisées (Tableau 1).

Pour l'obtention des quatre isolats locaux de *T. harzianum*, 10 grammes de chaque échantillon de sol ont été macérés dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau stérile. Les filtrats obtenus ont été dilués 100 et 1000 fois. A l'aide d'une pipette pasteur, quelques gouttelettes des solutions mères et celles diluées (100 et 1000 fois) ont été déposées dans des boîtes de Petri contenant un milieu PDA. Les boîtes de Petri ont ensuite été mises en incubation sous un cycle alternatif de lumière proche UV et d'obscurité (12 h/12 h) à la température de 22-25 °C pendant 5 jours. A la fin de l'incubation, les colonies fongiques dont la morphologie était caractéristique des *Trichoderma* ont été purifiées puis leur identification a été faite sur la base des caractères culturels et des organes de fructifications (colonies, phialides et conidies). Le cinquième isolat de *Trichoderma* a été obtenu en déposant de fines portions de la poudre commerciale Eco-T dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA puis en incubant les boîtes de Pétri comme précédemment. L'identification morphologique de l'ensemble des souches de *Trichoderma* utilisées a été complétée par une identification moléculaire. Pour ce faire, un séquençage de parties de génome pertinentes/discriminantes par amplification PCR des régions ITS1 et ITS 2 de l'ARN ribosomal a été réalisé au laboratoire de phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain en Belgique.

L'isolement de *M. grisea* a été réalisé par la technique de dépôt des lésions (à partir des échantillons de feuilles, tige et panicules de riz) sur le milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar), puis mise en incubation à la température de 22 °C. Après 6 jours

d'incubation, les fragments découpés ont été examinés sous microscope optique dans des conditions aseptiques pour détecter la présence ou l'absence des conidies. Les conidies ont ensuite été détachées du mycélium avec de l'eau Milli-Q+Tween20. A l'aide du milieu HA (Eau-Agar), une seule conidie a été ensuite prélevée afin d'obtenir une culture monosporee. Toutes les cultures dérivent alors des clones monospores, issus de la germination d'une conidie unique (isolement monoconidial).

### Caractérisation moléculaire des souches de *M. grisea*

Les 10 monosouches de *M. grisea* ont été mises en culture sur milieu PDA pendant 7 jours. L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode phénol/chloroforme (Lee et Taylor, 1990). Une PCR classique a été réalisée sur les régions ITS pour les autres espèces fongiques. Les amorces utilisées ont été les suivantes :

**ITS1:** TCCGTAGGTGAACCTGCGG ;

**ITS2:** GCTGCGTTCTTCATCGATGC (White et al., 1990).

Les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (M J Mini™) suivant le cycle de dénaturation de 95 °C pendant 10 minutes suivi de 40 cycles (95 °C pendant 30 secondes (dénaturation) ; 52 °C pendant 30 secondes (hybridation) ; 72 °C pendant 1 minute (élongation). L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 10 minutes. Les amplicons ont migré par électrophorèse à 120 Volts sur gel d'agarose 1,2% pendant 1 heure avant d'être visualisés sous UV en présence de bromure d'éthidium. Le séquençage a été réalisé à l'unité de Biochimie physiologique de l'UCL avec les produits PCR 10 fois dilués à l'eau distillée. L'identification des espèces fongiques et la construction de l'arbre phylogénique ont été réalisés en utilisant les outils bio-informatiques NCBI BLAST, Muscle alignement et le logiciel MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

### Evaluation de l'activité antagoniste *in vitro*

L'activité antagoniste des isolats de *T. harzianum* vis-à-vis des monosouches de *M.*

*grisea* a été étudiée *in vitro* en coculture dans des boîtes de Petri selon la technique de la coculture en confrontation directe. Cette technique a consisté en des confrontations par contact direct sur milieu de culture des cinq isolats de *T. harzianum* avec les trois souches de l'agent pathogène. Ces confrontations ont été effectuées selon la méthode de Meraj et al., (2012). Dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant 15 ml du milieu PDA, des explants mycéliens de 6 mm de diamètre de chaque souche et de chaque antagoniste ont été déposés sur un même axe à équidistance du centre de la boîte de Petri. La distance qui sépare les deux explants est de 5 cm (Figure 1). Les boîtes de Petri ont été incubées à 22-25 °C pendant 6 jours. Le témoin est constitué par un repiquage du pathogène placé au centre de la boîte de Petri. Chaque couple pathogène-antagoniste a été répété cinq fois.

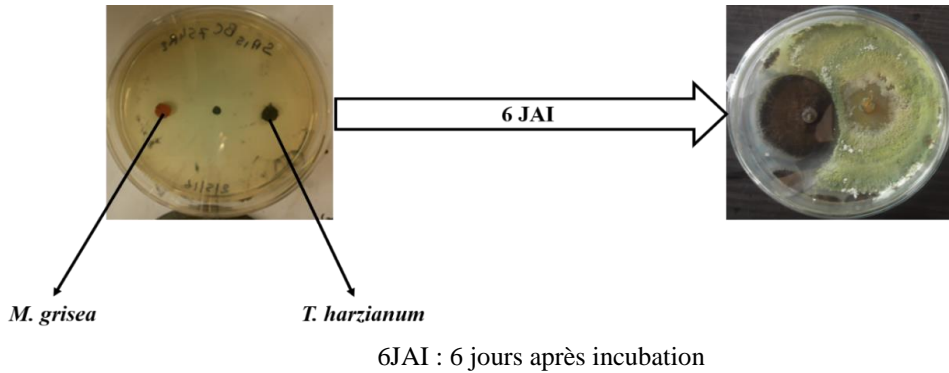
Après 6 jours, le rayon des colonies des souches pathogènes dans l'axe séparant les deux explants a été mesuré. L'inhibition exercée par *Trichoderma* a été estimée par le calcul du coefficient d'antagonisme (Mory Ebstam, 2005) selon la formule suivante :  $a_a = (C_{\text{tem}} - C_{\text{trait}}) / C_{\text{tem}}$  où  $a_a$  est le coefficient d'antagonisme,  $C_{\text{tem}}$  le rayon moyen des colonies témoins (souches de champignons phytopathogènes en croissance en l'absence d'antagoniste),  $C_{\text{trait}}$  le rayon moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

### Analyses statistiques

Le logiciel Excel a servi pour le recueil des données, les dépouilles et les histogrammes. L'ensemble des données ont été analysées avec le logiciel IBM.SPSS version 22. Les moyennes ont été comparées suivant le test de Student Newmann et Keuls au seuil de signification de 5%.

**Tableau 1 :** Caractéristiques des espèces fongiques testées.

Espèces fongiques	Codes des souches	Source d'isolement	Lieu d'isolement
<i>Magnaporthe grisea</i>	M14	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Station de Longorola
	M15	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Station de Longorola
	M16	<i>O. sativa</i>	Mali, Sikasso ville
	M17	<i>O. sativa</i>	Mali, Sikasso ville
	M18	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Bamadougou
	M19	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Sélingué/sect A21
	M20	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Sélingué/sect A17
	M21	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Sélingué/sect A19
	M22	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Sélingué/sect B12
	M24	<i>O. longistaminata</i>	Mali, Sélingué/sect B 11
<i>Trichoderma harzianum</i>	Th8130	Rhizosphère oignon	BF, Sanmatenga, Korsimoro
	Th8131	Rhizosphère oignon	BF, Sanguié, Tenado
	Th8132	Rhizosphère oignon	BF, Boulgou, Bagré
	Th8133	Rhizosphère oignon	BF, Comoé, Niantonon1
	Th8134	Rhizosphère oignon	BF, Comoé, Niantonon2



**Figure 1 :** Méthode de co-culture en confrontation directe.

## RESULTATS

### Identité et diversité de *M. grisea*

Les résultats de la chromatographie sur gel d'agarose des produits PCR obtenus à l'issue de l'amplification indique que les poids moléculaires des différents produits sont tous d'environ 500 Pb et le témoin positif à 600 Pb. Tandis qu'avec l'eau (témoin négatif), aucune migration n'a été observée indiquant que la PCR s'est bien déroulée (Figure 2).

Les différentes souches présentent des homologies de séquences très élevées. L'arbre phylogénique construit par la méthode de « Maximum Likelihood » avec les séquences des souches du Mali et avec d'autres séquences prises dans la base de données du NCBI indique que toutes les souches du Mali se distinguent des autres souches de *M. grisea* prises dans NCBI avec une valeur de bootstrap de 93% (à l'exception de la souche de référence JQ911754 qui se classe avec elles (Figure 3). En leur sein, un sous-groupe de deux souches (M15 et M17) se distingue légèrement avec les autres avec une valeur de bootstrap de 64% et se met ensemble avec la souche de référence JQ911754. Un autre sous-groupe de deux souches (M18 et M20) se dégage également des autres avec une valeur de bootstrap de 66% (Figure 3). L'arbre présente donc trois sous-groupes parmi les 10 souches de *M. grisea* du Mali.

### Evaluation de l'activité antagoniste *in vitro*

Au terme de l'analyse de l'arbre phylogénique, trois sous-groupes de *M. grisea* ont été identifiés.

-Sous-groupe 1 : Deux souches : M17 et M15 ;

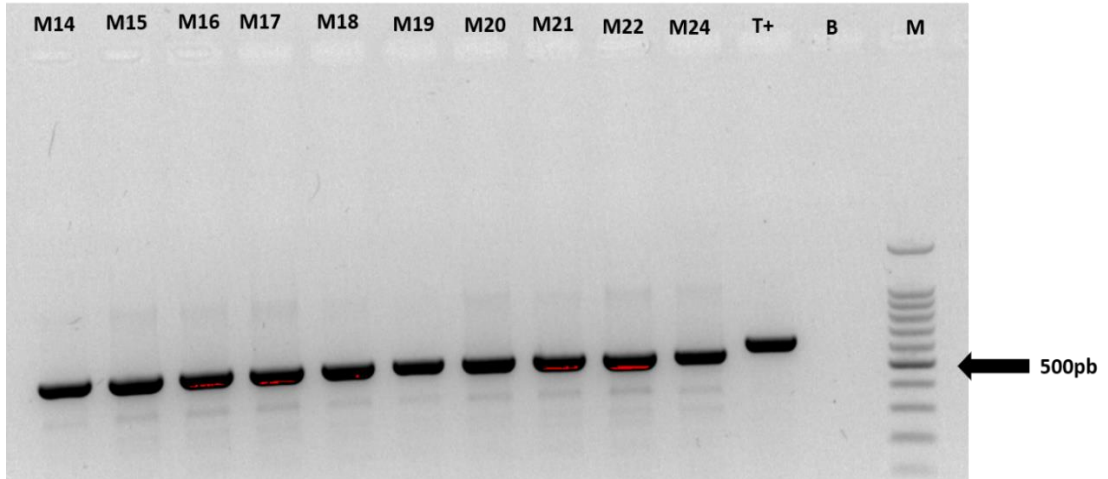
-Sous-groupe 2 : Deux souches : M18 et M20 ;

-Sous-groupe 3 : Six souches : M14, M16, M19, M21, M22, M24.

Les souches M17, M18 et M24 ont été choisies au hasard comme représentants de chaque groupe pour subir les tests d'antagonisme avec *T. harzianum*.

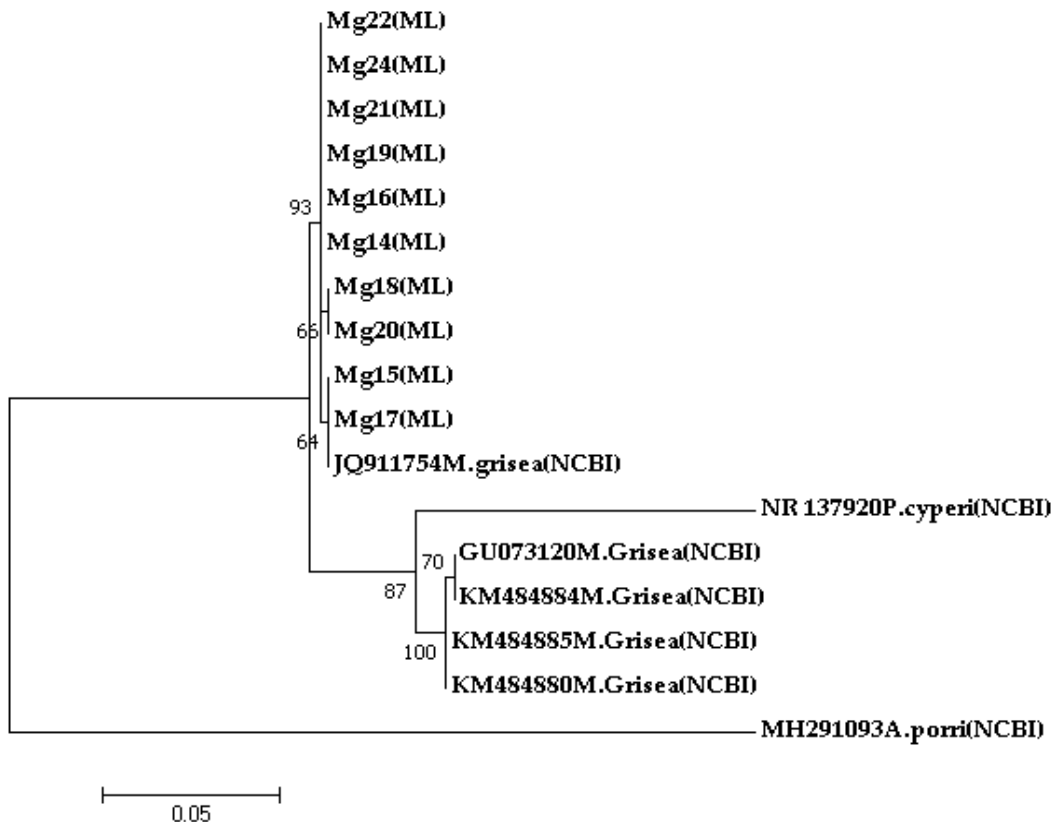
Les rayons moyens de croissance du mycélium des trois souches de l'agent pathogène mis en coculture en confrontation directe avec les isolats de *T. harzianum* sont consignés dans le tableau 2. L'analyse de ce tableau indique que l'ensemble des cinq souches de *T. harzianum* ont entraîné une réduction des rayons moyens de croissance du mycélium des trois représentants des sous-groupes de *M. grisea* avec des coefficients d'antagonisme allant de 0,50 à 0,78. Les coefficients d'antagonisme de chaque souche ne sont pas significativement différents au niveau de M17 mais significativement différents au niveau de M18 et M24 (Tableau 2).

La souche Th8133 a été la plus efficace avec un coefficient moyen global de 0,78 (Figure 4). Au niveau des souches du pathogène, on note que leurs sensibilités vis-à-vis des antagonistes n'ont pas été significativement différentes (Figure 5).



Souches de *M. grisea* : M14 à M24 ; T+ : Témoin positif ; B : Blanco ; M : Lecteur de poids moléculaire.

**Figure 2 :** Migration des produits PCR de l'amplification des régions ITS de l'ARN ribosomal de 10 monosouches de *Magnaporthe grisea*.



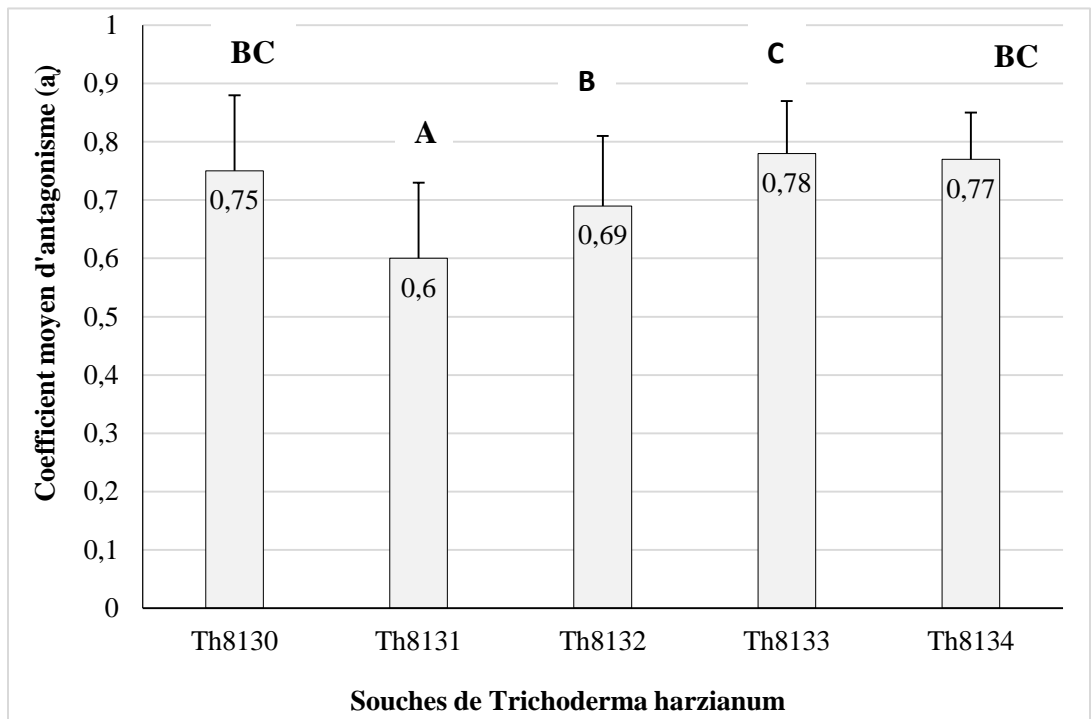
Les lettres ML entre parenthèses indiquent les séquences du Mali. Pour les autres séquences, le numéro d'accèsion suivi du nom de l'espèce fongique et entre NCBI sont des séquences prises dans cette base de données.

**Figure 3 :** Analyse phylogénétique moléculaire réalisée sur base des séquences d'une région commune de l'ADN ribosomal par la méthode de « Maximum Likelihood » montrant la position des isolats de *M. grisea* du Mali.

**Tableau 2 :** Croissance radiale de trois souches de *M. grisea* et coefficient d'antagonisme de 5 souches de *T. harzianum* sur les trois souches pathogènes en confrontation directe.

Traitements	Souches représentatives des variantes de <i>M. grisea</i>					
	Souche M17		Souche M18		Souche M20	
	Cr (cm)	a <sub>i</sub>	Cr (cm)	a <sub>i</sub>	Cr (cm)	a <sub>i</sub>
Souche seule	1,32		1,4		1,34	
Souche+ Th8130	0,3	<b>0,77 ± 0,14<sup>a</sup></b>	0,3	<b>0,79 ± 0,17<sup>b</sup></b>	0,42	<b>0,69 ± 0,10<sup>ab</sup></b>
Souche+ Th8131	0,4	<b>0,70 ± 0,08<sup>a</sup></b>	0,7	<b>0,50 ± 0,09<sup>a</sup></b>	0,52	<b>0,61 ± 0,15<sup>a</sup></b>
Souche+ Th8132	0,5	<b>0,62 ± 0,12<sup>a</sup></b>	0,3	<b>0,79 ± 0,10<sup>b</sup></b>	0,44	<b>0,67 ± 0,09<sup>ab</sup></b>
Souche+ Th8133	0,3	<b>0,73 ± 0,11<sup>a</sup></b>	0,22	<b>0,84 ± 0,03<sup>b</sup></b>	0,3	<b>0,78 ± 0,07<sup>b</sup></b>
Souche+ Th8134	0,3	<b>0,76 ± 0,10<sup>a</sup></b>	0,32	<b>0,77 ± 0,09<sup>b</sup></b>	0,3	<b>0,78 ± 0,05<sup>b</sup></b>
Valeur de F		1,570		8,239		2,609
Probabilités		0,221		0,000		0,066

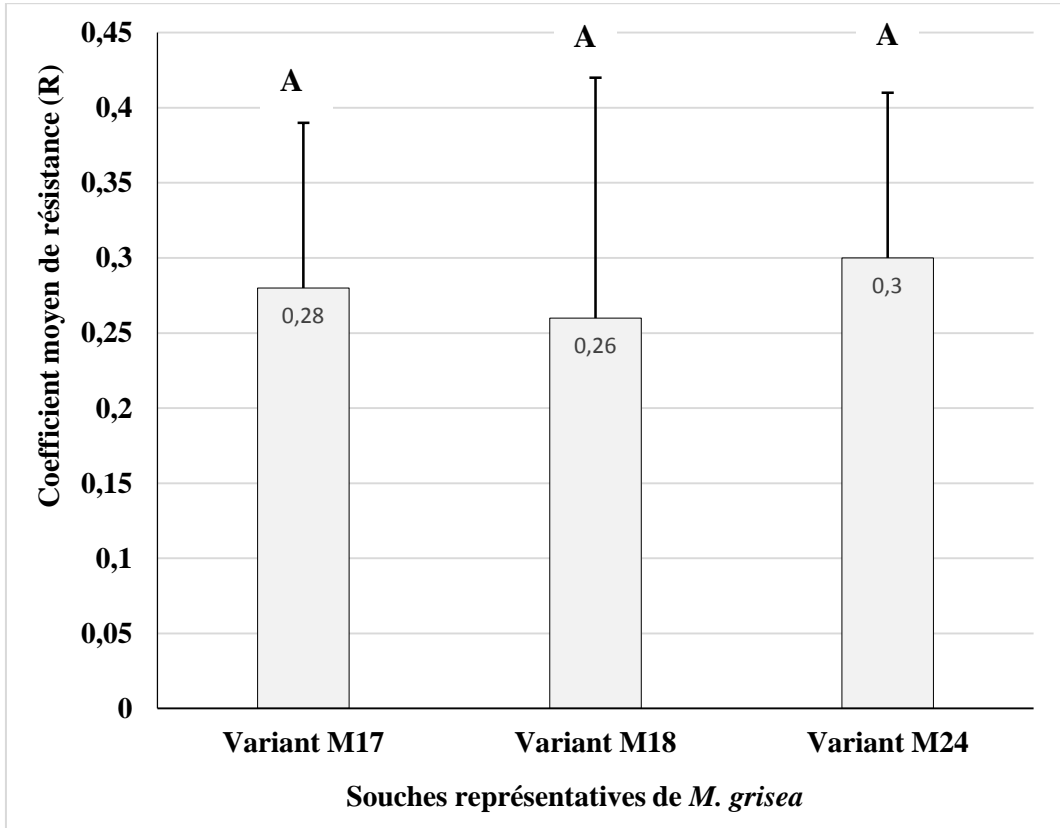
Les moyennes suivies de la même lettre alphabétique dans chaque colonne ne sont pas différentes significativement au seuil de 5% (Test de Student Newmann et Keuls). Cr : Croissance radiale ; a<sub>i</sub> : coefficient d'antagonisme.



Les barres affectées de la même lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Student Newmann et Keuls).

**Figure 4:** Potentiel antagoniste de 5 souches de *T. harzianum* du Burkina Faso sur la population de *M. grisea* du Mali.





Les barres affectées de la même lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Student Newman-Keuls).

**Figure 5:** Capacité de résistances de la population de *M. grisea* du Mali aux souches antagonistes de *T. harzianum* du Burkina Faso.

## DISCUSSION

Les espèces de *Trichoderma* sont connus pour leur activité de biocontrôle contre plusieurs agents phytopathogènes. Les isolats fongiques utilisés dans cette étude ont été sélectionnés à partir d'un système de criblage pour identifier les meilleures antagonistes fongiques (Dabiré et al., 2016). La présente étude fait état de l'isolement des souches de pathogènes, la construction d'un arbre phylogénique en utilisant NCBI BLAST, Muscle alignement et le logiciel MEGA 7 afin d'identifier les différents sous-groupes parmi les 10 souches de *M. grisea*. Ainsi, un représentant de chaque sous-groupe (soit trois souches) a été testé sur les cinq isolats de *T. harzianum in vitro*. Il a été enregistré une diminution significative de la croissance

radiale des isolats de *M. grisea* par les souches de *T. harzianum* testées avec principalement comme mode d'action la concurrence pour les nutriments, l'espace et le mycoparasitisme. Les résultats de l'expérience de coculture ont indiqué que l'ensemble des cinq souches de *T. harzianum* ont inhibées la croissance du mycélium des souches du pathogène avec des coefficients d'antagonisme allant de 0,50 à 0,78 à 6 jours après l'incubation et agissent en colonisant le mycélium du pathogène. De récentes études menées par Dabiré et al. (2016) en utilisant les mêmes souches de *T. harzianum* sur *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* en confrontation directe *in vitro* ont obtenu des pourcentages d'inhibition du pathogènes de 71 à 84% à 5 jours d'incubation. Ce qui est en

conformité avec les résultats de cette étude. Ghorri et al. (2013), ont montré l'efficacité de deux isolats de *Trichoderma* (sp1 et sp2) contre des souches de la fusariose avec des taux d'inhibition de la croissance mycélienne supérieures à 65 % à 6 jours d'incubation à 25 °C. D'après des études de Zhang et al. (2016), *T. harzianum* isolat T-aloe a inhibé la croissance de *S. sclerotiorum* avec une efficacité de 56,3% en double culture dans la protection du soja. Ces résultats corroborent avec celui de cette étude sur *M. grisea* du riz. Des études ont révélé que la souche SL2 *Trichoderma* sp. avait une capacité élevée de stimuler l'élongation des racines, le taux de germination, l'indice de vigueur et la vitesse de germination des semences du riz, comparé à d'autres souches par la production des composés d'auxines et de gibbérelline (Doni et al., 2014). Dans ce même cadre d'étude, Pandey et al. (2016) ont démontré que les génotypes de riz traités avec une dose élevée de souche Th-56 de *T. harzianum* aurait montré une meilleure tolérance à la sécheresse grâce au taux élevé de malondialdéhyde, de proline et de superoxyde dismutase. Ces différentes recherches ne sont pas en contradiction avec les résultats de cette étude, car des recherches de Benítez et al. (2004) ont prouvé que les souches de *Trichoderma* exercent une lutte biologique contre les agents phytopathogènes fongiques, soit indirectement, en se disputant les nutriments et l'espace, en modifiant les conditions environnementales ou en favorisant la croissance et les mécanismes de défense et d'antibiose des plantes, ou directement par des mécanismes tels que le mycoparasitisme. Aussi, Selon Caron et al. (2016), la souche de *T. harzianum* MAUL-20 a un effet protecteur et stimulateur de croissance contre *Pythium ultimum* et *R. solani* sur le concombre et la tomate si l'agent de lutte biologique est introduit au moins deux semaines avant l'arrivée de l'agent pathogène. Et que durant cette période, *Trichoderma* se multiplie et colonise la rhizosphère, ce qui lui permet d'occuper prioritairement la niche écologique et met à profit l'un de ses modes d'action dont la compétition ou la stimulation de croissance

de la plante. Les études de ces différents auteurs ne sont pas en contradiction avec cette étude sur *M. grisea* dont la croissance du mycélium a été inhibé en confrontation directe à au moins 60% en 6 jours. Bekkar et Belabid (2013) ont réalisé des essais de confrontation directe sur milieu de culture, ou à distance entre des pathogènes et des microorganismes bénéfiques (*T. harzianum* et *T. longibrachiatum*) et ont trouvé que les *Trichoderma* ont inhibé la croissance mycélienne des pathogènes en moyenne de 46 à 87% par rapport au témoin. Les résultats de cette étude complètent largement ceux de Ghorri, et al. (2013) ainsi que ceux de Bekkar et Belabid (2013) où les cinq souches de *T. harzianum* provoquent une inhibition de croissance du pathogène de plus de 60% à une température d'incubation de 22 °C en 6 jours. D'autres études antérieures ont montré qu'un extrait à l'acétate d'éthyle du filtrat de culture de l'isolat H921 (H921-EAE-CF) du *Trichoderma* spp. a complètement supprimé la germination et la formation de l'appressorium des spores de *M. oryzae* et ont estimé que *Trichoderma* produit des enzymes telles que la chitinase et la  $\beta$ -1,3-glucanase impliquées dans la dégradation des parois et des membranes cellulaires des agents phytopathogènes (Nguyen et al., 2016). Ailleurs, il a été démontré par Hem et Pang (2017) des effets biostimulants positifs importants sur les performances de croissance du riz, par l'absorption plus élevée des éléments nutritifs, même dans des conditions difficiles de pH du sol avec des souches de *T. harzianum*, *T. lignorum* et *T. koningii*.

## Conclusion

La présente étude s'est proposé d'évaluer l'action antagoniste *in vitro* de cinq souches de *T. harzianum* du Burkina Faso sur des souches de *M. grisea* du Mali dans la perspective de mettre au point une méthode de lutte biologique contre la pyriculariose du riz. La caractérisation par Polymerase chain reaction (PCR) a permis de montrer que les 10 souches sont *M. grisea* à 100%. L'étude a démontré l'habilité de *T. harzianum* à contrôler ou éliminer l'agent pathogène de la

pyriculariose en confrontation directe *in vitro* en 6 jours d'incubation, par des mécanismes de compétitions pour les nutriments, l'espace et le mycoparasitisme. Ce qui explique, que ces champignons omniprésents dans la rhizosphère pourraient réduire l'inoculum primaire de la pyriculariose avec une application préventive. En dépit de tout, il est à rappeler que les agents de lutte biologiques ne sont pas une panacée pour contrôler tous les désordres phytosanitaires. *T. harzianum* a montré des résultats prometteurs contre *M. grisea in vitro* et pourrait être une alternative à utiliser dans un cadre de gestion intégrée des maladies (PIP) dans lequel, associé à d'autres pratiques et stratégies de contrôle. Ainsi, afin d'avoir une règle de décision sur l'application des souches de *T. harzianum* performants de cette étude au Mali, des essais en station, puis au champ pourraient être envisagés.

#### CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'il n'y a aucun conflit d'intérêts.

#### CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

YK : Conduite des essais, rédaction du manuscrit ; GD, IS : L'analyse statistique des données, relecture du manuscrit et lecture critique du manuscrit ; HA : Coordination de l'équipe de recherche et lecture critique du manuscrit.

#### REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de phytopathologie d'Earth and Life Institute, Microbiology (ELIM) de L'université catholique de Louvain (Belgique) avec l'appui financier de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES/Belgique). L'auteur voudrait adresser ses vifs remerciements à l'équipe des chercheurs et techniciens du laboratoire ainsi qu'à la ARES pour avoir permis son aboutissement. Ils remercient également le Directeur Général de l'Institut d'Economie Rurale (IER) du Mali et l'équipe du Programme Riz de Bas-fond du Centre Régional de Recherches Agronomique

(CRRA) de Sikasso pour leur soutien moral et intellectuels.

#### REFERENCES

- Sandiego CA, Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- ADRAO. 2003. Sur les traces d'un gros ravageur. In Bulletin Esprit, le centre du riz pour l'Afrique Numero 3.
- Agarwal PC, Nieves Mortensen C, Mathur SB. 1994. Maladies Du Riz Transmises Par Les Semences et Tests Phytosanitaires. Royaume-Uni.
- Bekkar AA, Belabid L. 2013. Bioprotection des plantes par l'utilisation de *Trichoderma* a l'égard des champignons phytopathogènes.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, **7**: 249-260. [www.im.microbios.org](http://www.im.microbios.org).
- Betts MF. 2007. Identification of New Pathogenicity Genes in *Magnaporthe oryzae* through the Construction of an Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Insertion Mutant Library. PhD thesis, UNIVERSITY OF ARIZONA p. 437.
- Caron J, Laverdière L, Thibodeau PO, Bélanger RR. 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**(2): 73-87. DOI: <https://doi.org/10.7202/706230ar>.
- Castroagudín VL, Moreira SI, Pereira DAS, Moreira SS, Brunner PC, Maciel JLN, Crous PW, McDonald BA, Alves E, Ceresini PC. 2016. Pyricularia Graminis-Tritici, a New Pyricularia Species Causing Wheat Blast *Pyricularia graminis-Tritici*, **37**: 199-216. DOI: 10.3767/003158516X692149.

- Coulibaly YM, Ouologuem A. 2014. Etude Sur Les Chaînes de Valeur Riz Au Mali Rapport Final, 1–82.
- Dabiré TG, Bonzi S, Somda I, Legreve A. 2016. Evaluation in vitro de l'activité Antagoniste d'isolats de *Trichoderma Harmzianum* Pers. Contre Trois Espèces Fongiques Pathogènes de l'oignon Au Burkina Faso. *Tropicicultura*, **34** (3) : 313-322.
- Deravel J, Krier F, Jacques P. 2014. Les Biopesticides, Compléments et Alternatives Aux Produits Phytosanitaires Chimiques (Synthèse Bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, **18**(2): 220–32.
- Doni F, Anizan I, Che Radziah C M Z, Ahmad Hilmi Salman, Muhammad Hidayat Rodzihan, Wan Mohtar Wan Yusoff. 2014. Enhancement of Rice Seed Germination and Vigour by *Trichoderma* spp. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, **7**: 4547–4552.
- Fageria NK, Wander AE, Silva SC, 2015. Rice (*Oryza sativa*) cultivation in Brazil. *Indian Journal of Agronomy*, **59**(3): 350-358. DOI: <https://5548a4b90cf2b0cf7acef42b.pdf>.
- FOESMR. 2006. Analyse économique et financière de la filière riz au Burkina Faso. Rapport final Projet 8 ACP BK 014 (8ème FED) Fonds d'Observation Economique et Sociale du Monde Rural.
- Ghorri S, Benserrad O, Laouar M, Dehimat L. 2013. Essai de lutte biologique contre la fusariose des plantes cultivées par l'utilisation des microorganismes antagonistes.
- Gladieux P, Condon B, Ravel S, Soanes D, Maciel JLN, Nhani A, Chen Jr L, Terauchi R, Lebrun MH, Tharreau D, Mitchell T, Pedley KF, Valent B, Talbot NJ, Farman M, Fournier E. 2018. Gene flow between divergent cereal and grass-specific lineages of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *mBio*, **9**: e01219-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01219-17>.
- Hem R, Pang A. 2017. Bio-stimulant effects of *Trichoderma* spp. on rice (*Oryza sativa* L.): an initial evaluation using a strongly acidic clay loam soil. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, **11**(5): 42–48. DOI: <http://aensiweb.net/AENSIWEB/aejsa/aejsa/2017/Sept-oct/42-48.pdf>.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-Beneficial Effects of *Trichoderma* and of Its Genes. *Microbiology*, **158**(1): 17–25. DOI 10.1099/mic.0.052274-0.
- Lee SB, Taylor JW. 1990. Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds). Academic Press: San Diego; 282-287. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50038-x>.
- Lepoivre F. 2003. Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte (édition de Boeck Université). *Presses Agronomiques de Gembloux* : Belgique.
- Meraj-ul-Haque, Nandkar PB, 2012. Antagonistic effect of rhizospheric *Trichoderma* isolates against tomato damping-off pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. *International Journal of Research in BioSciences*, **1**: 27-31. DOI: [http://www.ijrbs.in/abstract.php?article\\_id=1239&title](http://www.ijrbs.in/abstract.php?article_id=1239&title).
- Moricca S, Ragazzi A, Assante G. 2015. Biological Control of Rust Fungi by *Cladosporium Tenuissimum*. *Rust Diseases of Willow and Poplar*, **19**: 213–29.
- Morsy EM, 2005. Role of growth promoting substances producing microorganisms on tomato plant and control of some root rot fungi. Ph.D Thesis, Fac. of Agric. Ain shams Univ., Cairo. P. 127.
- Nguyen QT, Ueda K, Kihara J, Ueno M. 2016. Culture Filtrates of *Trichoderma* Isolate H921 Inhibit *Magnaporthe oryzae* Spore Germination and Blast

- Lesion Formation in Rice. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **243**: 521–527. DOI: 10.4236/aim.2016.67052.
- Pandey V, Ansari MW, Tula S, Yadav S, Sahoo RK, Shukla N, Tuteja N. 2016. Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. *Planta*, **243**(5): 1251–1264. DOI: 10.1007/s00425-016-2482-x.
- Pooja K, Katoch A. 2014. Past, Present and Future of Rice Blast Management. *Plant Science Today*, **1**(3): 165-173. DOI: <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2014.1.3.24>.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: A playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, **321**: 341–361. DOI: 10.1007/s11104-008-9568-6.
- Raveloson H, Tharreau D, Sester M. 2013. Les Sources d'inoculum Primaire de La Pyriculariose. Rôle Des Semences et Des Pailles Infectées Dans Le Développement Des Épidémies.
- Remmert C. 2003. Un ingrédient indispensable pour éradiquer la faim. Nations Unies chronique édition en lignes, volume XL Numero 4.
- da Silva FF, Castro EDM, Moreira SI, Ferreira TC, Eduardo AD, Alves E, 2017. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa phytopathol*, **43**(1): 41–45. DOI: 10.1590/0100-5405/2212.
- TeBeest DO, Jecmen A, Ditmone M. 2011. Infection of rice by the false smut fungus, *Ustilaginoidea virens*. *B.R. Wells Rice Research Series - Arkansas Agricultural Experiment Station University of Arkansas*, **591**: 70-81 <http://arkansasagnews.uark.edu/591-8.pdf>.
- Trébuil G. 2004. Rizicultures asiatiques : enjeux écologiques et économiques à l'aube du 21ème siècle. Conférence-débats, Guy Trébuil ; géo agronome au département TERA du CIRAD et division des sciences sociales de l'IRRI.
- Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma Harzianum* on Microelement Concentrations and Increased Growth of Cucumber Plants. *Plant and Soil*, **235** : 235–42. DOI: <https://10.1023/A:1011990013955.pdf>.
- Zhang F, Ge H, Zhang F, Guo N, Wang Y, Chen L, Ji X, Li C. 2016. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, **100**: 64–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.017>.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Innis A, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). Academic Press : San Diego, USA; 315-322.