

Criblage de produits de protection et/ou de biostimulation à base de *Trichoderma*

Dorcas Lin

Valentin Goupille

Objectif : évaluer l'activité de protection et de biostimulation de croissance de plusieurs souches de *Trichoderma*.

Dans le but de trouver des alternatives aux pesticides et engrains chimiques dans le domaine de l'agriculture, notre expérience se concentre sur le criblage de trois souches de *Trichoderma* pour tester leurs effets de biostimulation chez la tomate et de biocontrôle contre une souche de *Pythium*, agent phytopathogène de la tomate. Les effets de biostimulations ont été basées sur 3 mesures telles que la taille de la plante entière, son stade physiologique et si les plantules sont normales ou non. La biostimulation des souches de *Trichoderma* est testée *in vitro* et soit par contact direct soit par composés volatiles. Les effets de biocontrôle sont testés *in vitro* et *in situ*. L'inoculation a été faite par immersion de graines préalablement stérilisées.

Les trois souches de *Trichoderma* utilisées sont 1295, I1237 et PAS3361 et une souche de *Pythium ultimum* est utilisée pour tester les effets de biocontrôle.

Criblage d'isolats en conditions *in vitro*

Stimulation de la croissance

Plusieurs lots de semences de tomate désinfectées ont été mises en contact via immersion avec différentes concentrations conidiennes de 3 souches de *Trichoderma* : 1295, I1237 et PAS3361. La taille des plantules a été mesurée après 1 semaine le dépôt des graines sur gélose.

L'analyse des stades physiologiques et de l'état des plantules (figure 1) tend à suggérer que contrairement à I1237 qui lui semble avoir un effet neutre, le traitement avec les souches de *Trichoderma* 1295 et PAS3361 est délétère pour le

bon développement de notre variété de tomate en condition *in vitro*. En effet, pour ces deux souches (1295 et PAS3361) l'augmentation de la concentration en conidies est directement corrélée avec l'augmentation de la proportion de plantules non germées, anormales, et n'ayant pas des cotylédons bien développés. Par exemple, avec la souche 1295, nous observons 7% de graines non germées pour la concentration 10^3 , contre 20% pour le traitement à 10^7 conidies/mL. De la même manière, nous observons 13 % de plantules anormales à 10^3 contre 33% à 10^7 . Enfin 60% de plantes avec des cotylédons bien développés sont observés pour la concentration 10^3 contre seulement 27% pour le traitement à 10^7 conidies/mL.

Ces résultats vont de pairs avec ceux de la figure 2 dans laquelle nous pouvons observer un effet significatif défavorable ($p<0,05$) de la concentration croissante des souches 1295 et PAS3361 sur la taille des plantules. Les valeurs moyennes de la taille des plantules inoculées sont toutes inférieures à celle de leur témoin respectif. Ces deux souches ne montrent donc pas d'intérêt pour la biostimulation des semences de tomate pour les concentrations qui ont été testées et par immersion. Concernant la souche I1237, nous ne retrouvons pas de différences significatives avec les témoins (figure 2). Les témoins de chaque souche ont été comparés entre eux pour savoir s'il était possible de comparer l'efficacité des souches entre elles. Etant donné qu'il y a une différence significative entre I1237 et PAS3361, ces deux souches ne sont pas comparables entre elles. Cependant 1295 peut être comparée à I1237 et à PAS3361, mais étant donné leur impact négatif sur le phénotype des plantules de tomates, il n'est pas intéressant d'étudier leurs différences pour répondre à notre question biologique.

Stimulation de la croissance par émission de composés volatiles

Ici on s'est intéressés à la possibilité de biostimulation des graines de tomates par la production de composés volatiles en séparant la gélose en deux et en y plaçant les graines d'un côté et un explant de *Trichoderma* de l'autre. Dans la figure 3, nous avons pu observer qu'aucune souche n'a présenté d'effet de biostimulation significatif sur la taille des plantules de tomates via la libération de composés volatiles.

Si nous nous concentrons sur le stade physiologique des plantules (figure 4), nous pouvons observer une proportion nulle de graines non germée pour les lots non ayant reçu un explant 1295 ou PAS3361 alors que les témoins présentent 13% et 20%. Étant donnée les effectifs très réduits de graines utilisés par condition ($n=15$), il serait intéressant d'utiliser des lots plus grands pour confirmer ou réfuter cet effet potentiel de biostimulation par émission de composés volatils.

Protection des semences

Après inoculation à différentes concentrations de *Trichoderma*, un explant de *Pythium* a été placé sur la gélose pour son effet phytopathogène contre les plants de tomates.

A nouveau dans la figure 2, dans la partie « Avec Pythium » l'unique souche qui présente un phénotype d'intérêt serait la 1295 où, à une concentration à 10^3 spores/mL, nous retrouvons une taille des plantules qui est significativement supérieure à celle du témoin. Concernant les autres souches nous pouvons observer une tendance de biocontrôle en présence de *Trichoderma*, mais aucune concentration n'a montré de différence significative avec le témoin. La comparaison des témoins entre les souches a montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre elles. Nous aurions donc pu comparer les différences souches entre elles si elles apportaient toutes un phénotype d'intérêt aux plantules de tomates. Cependant, seule la souche 1295 présente un phénotype significativement différent de son témoin. C'est donc l'unique souche qui pourrait être intéressante d'utilisation pour une action de biocontrôle contre *Pythium*.

En comparaison avec les stades physiologiques des plantules (Fig 1.), nous observons à nouveau cet effet de biocontrôle de 1295 à 10^3 spores/mL. Aussi, la souche I1237 induit un phénotype intéressant comparé à son témoin où aux concentrations 10^3 et 10^7 spores/mL, nous observons non seulement moins de graines non germées mais aussi plus de plantules avec des cotylédons formés et moins de plantules anormales. L'inoculation avec la souche PAS3361 présente aussi un phénotype intéressant à une concentration de 10^3 spores/mL, où on ne retrouve aucune graine non germée et plus de plantules avec des cotylédons formés. La réalisation de tests de khi-deux auraient pu être intéressante pour comparer ces différentes proportions.

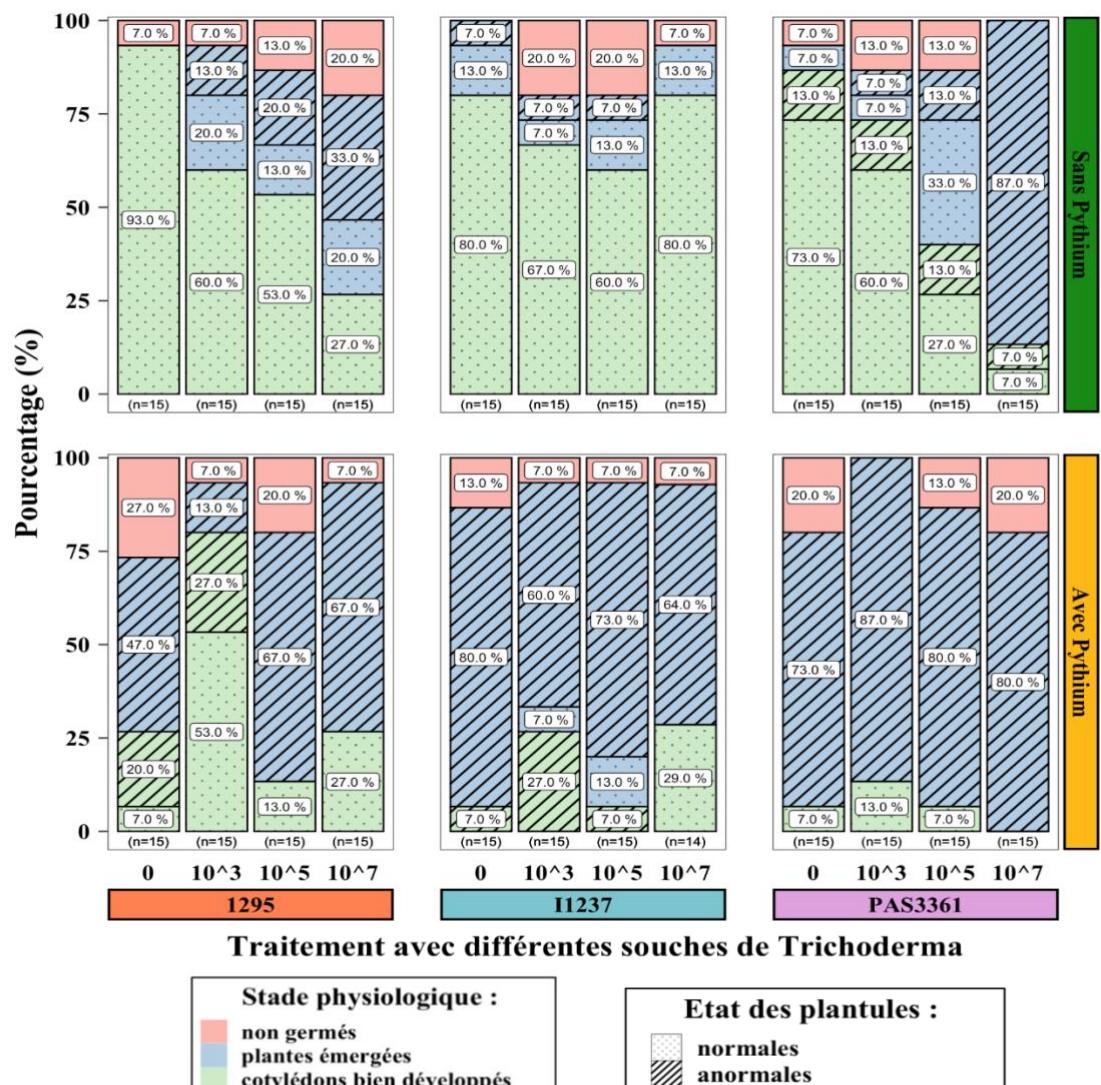


Figure 1. Effet de l'inoculation de souches de *Trichoderma* par immersion de semences stériles de tomate sur le stade physiologique des plantules *in vitro*.

Chaque groupe de Travaux Pratiques est représenté par une forme de point différente (réplicats) et 3 souches de *Trichoderma* ont été testées à 3 différentes concentrations (en spores/mL) en plus du témoin. On y retrouve deux conditions d'inoculation, sans ou avec *Pythium* pour tester respectivement la biostimulation et le biocontrôle. Il y a 5 réplicats techniques pour chaque groupe. Les inoculations sont faites par immersion des graines stériles dans des spores des microorganismes. Les stades physiologiques des plantules de tomates ont été annotés en couleurs et notés selon une échelle sur trois (0 : non germées, 1 : émergées, 2 cotylédons bien développés). Ici, est représenté, pour les états 1 et 2, si les plantules sont normales ou non par respectivement des pointillés ou des hachures. Les étiquettes indiquent la proportion de chaque observation (stade physiologique \times état des plantules).

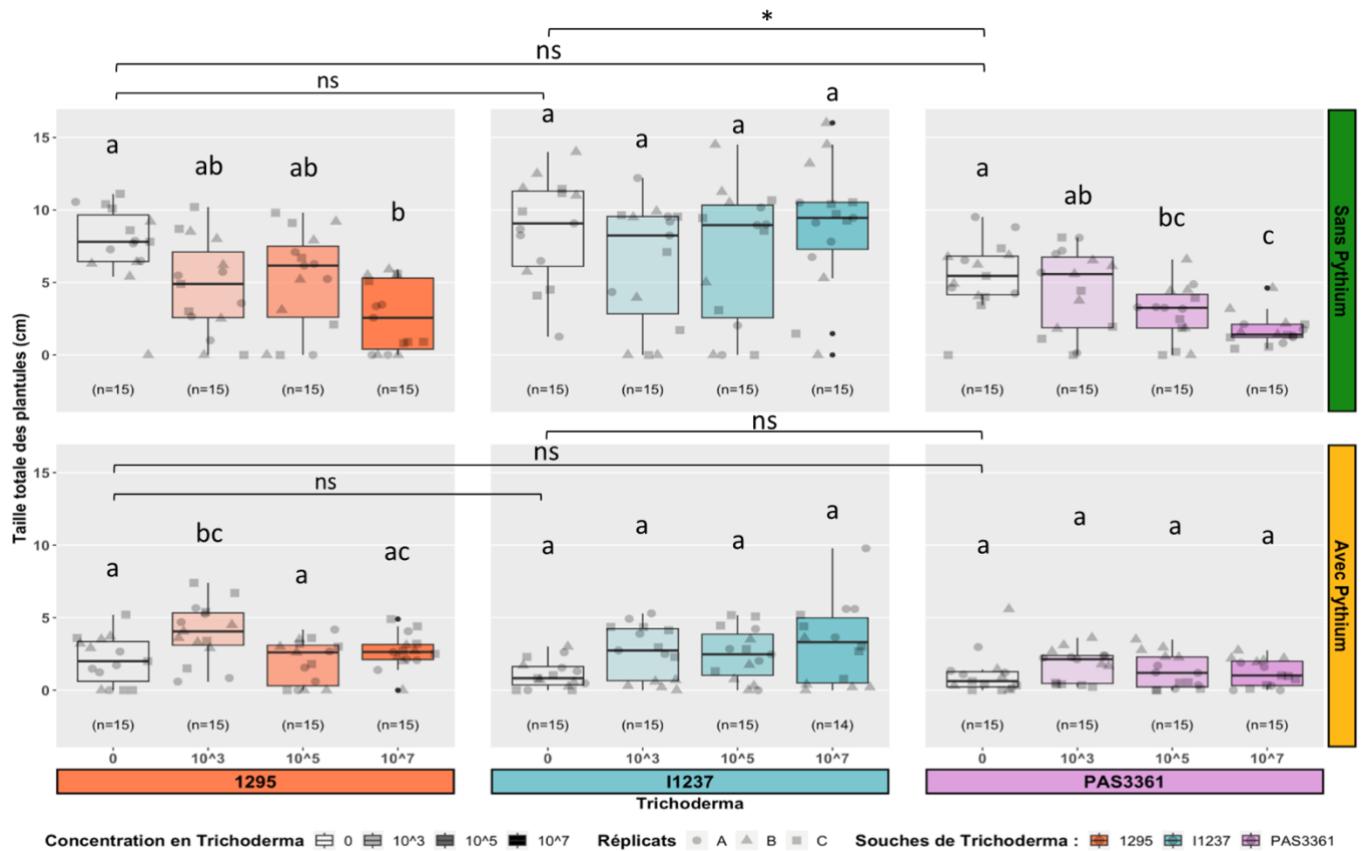


Figure 2. Effet de l'inoculation de souches de *Trichoderma* par immersion de semences stériles de tomate sur la taille des plantules *in vitro*.

Chaque groupe de Travaux Pratiques est représenté par une forme de point différente (réplicats) et 3 souches de *Trichoderma* ont été testées à 3 différentes concentrations (en spores/mL) en plus du témoin. On y retrouve deux conditions d'inoculation, sans ou avec *Pythium* pour tester respectivement la biostimulation et le biocontrôle. Il y a 5 réplicats techniques pour chaque groupe. Les inoculations sont faites par immersion des graines stériles dans des spores des microorganismes. Les différences significatives intra-souches sont représentées avec des lettres ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis avec le test post hoc de Dunn) et celles des témoins inter-souches sont représentées par des étoiles ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis avec le test post hoc de Dunn).

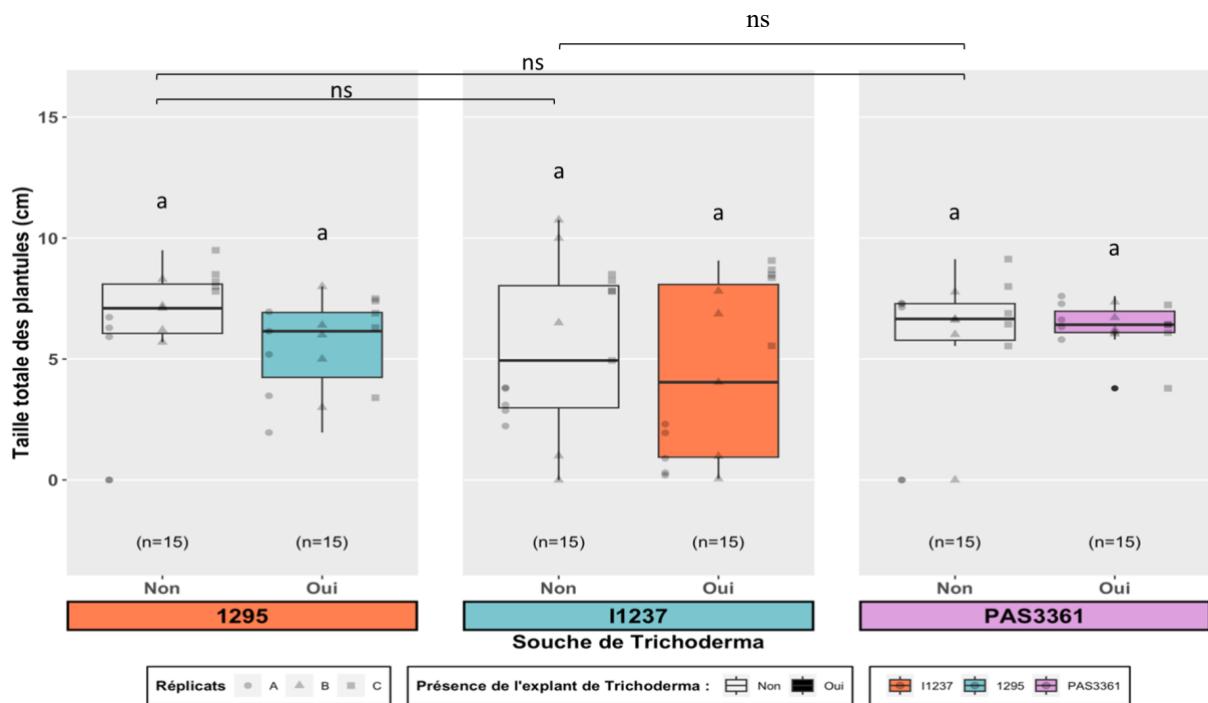


Figure 3. Effet de l'inoculation de souches de *Trichoderma* par explants sans contact direct de semences stériles de tomate sur la taille des plantules *in vitro*.

Aucune différence intra-souches n'est observés ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis)

Aucune différence inter-souches n'est observés ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis)

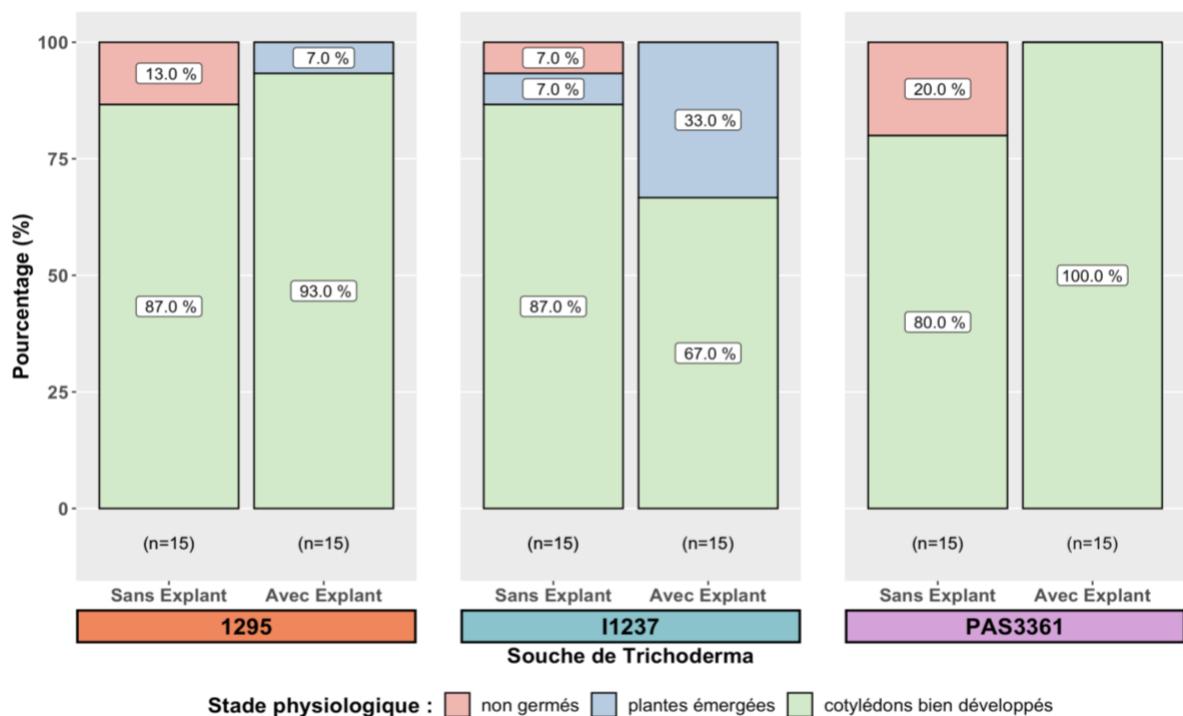


Figure 4. Effet de l'inoculation de souches de *Trichoderma* par explants sans contact direct de semences stériles de tomate sur le stade physiologique des plantes *in vitro*.

Criblage d'isolats en Serre

En comparaison avec les tests *in vitro*, il était intéressant de tester les effets de biostimulation et de biocontrôle aussi *in situ* (Fig. 5). Seuls les stades physiologiques et l'état des plantules de tomates ont été observées. Dans le cadre de la biostimulation, nous observons un effet positif seulement lorsqu'il y a inoculation de PAS3361. En comparaison aux tests *in vitro*, PAS3361 avait présenté un intérêt pour ses effets de biostimulation par composés volatiles. Ici, cette souche semble avoir un effet positif sur les plantules de tomates, cependant, le témoin représente des données très différentes des autres témoins. Ce résultat pourrait donc être l'effet d'une erreur de manipulation.

Concernant l'effet de biocontrôle où toutes les souches ont présenté un phénotype d'intérêt dans les stades physiologiques, on ne retrouve pas ces effets chez les plantules de tomates en serre.

Ces résultats ont été obtenus par l'inoculation des graines par immersion à une concentration de 10^3 spores/mL et en inoculant le sol directement avec du *Pythium*. Il aurait été intéressant de tester différentes concentrations pour les souches de *Trichoderma*.

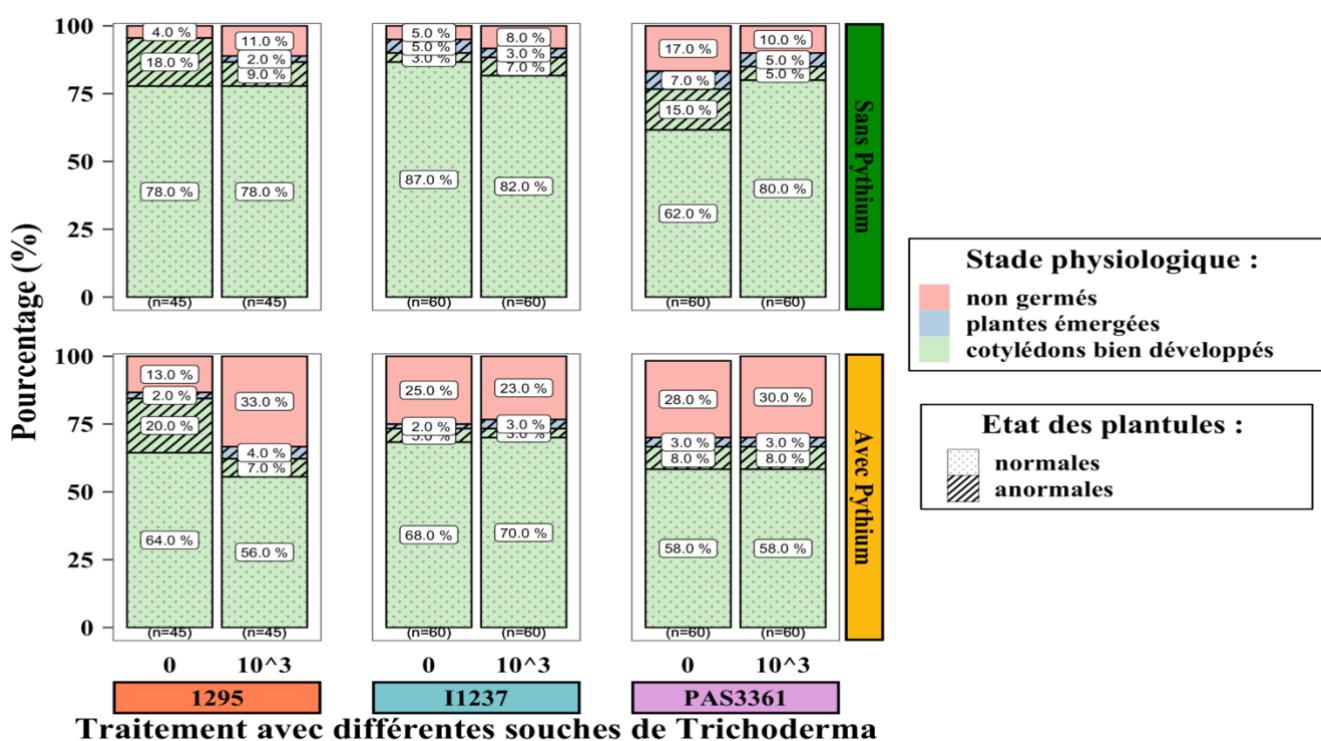


Figure 5. Effet de l'inoculation de souches de *Trichoderma* par immersion de semences stériles de tomate sur la taille des plantules *in situ*.

Conclusion et perspectives

Trois souches de *Trichoderma* ont été testées pour observer si elles pouvaient être intéressantes pour des effets de biostimulation ou de biocontrôle contre *Pythium* chez les plantes de tomates. Les valeurs *in vitro* ont démontré des effets potentiellement intéressants pour la biostimulation par composés volatiles pour la souche PAS3361. Les trois souches ont présenté des effets de biocontrôle contre *Pythium*. Cependant aucun de ces effets n'ont été retrouvés dans les test *in situ*. Il aurait été intéressant de renforcer ces expériences en ayant plus de réplicats techniques et biologiques ainsi que moins de biais expérimentateurs. Les mesures en serres représentent moins de biais dans les mesures et sont donc plus robustes. Aussi il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les observations *in vitro* concernant l'interaction de ces souches de *Trichoderma* et la tomate afin d'en avoir une meilleure compréhension et application *in situ*.