

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Eau Terre Environnement

**Étude d'un mélange *Sinorhizobium meliloti-Trichoderma viride* produit
dans les eaux usées d'amidon : optimisation et effet sur la luzerne**

Par
Najib MHAMDI

Maîtrise en sciences de l'eau
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de :
Maître ès sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Stéphan Pouleur Agriculture et Agroalimentaire Canada
Examineur interne	Professeur Jean Francois Blais INRS-ETE, Université du Québec
Directeur de recherche	Professeur R.D. Tyagi INRS-ETE, Université du Québec
Codirectrices de recherche	Dre Danielle Prévost Agriculture et Agroalimentaire Canada Professeure Satinder Kaur Brar INRS-ETE, Université du Québec

Février 2011

REMERCIEMENTS

Ce mémoire reflète, sans doute, l'écho des nombreuses rencontres que j'ai eu la chance de faire pendant cette recherche de maîtrise. Je tiens à remercier ici toutes les personnes, qui, de près ou de loin, ont suivi mon évolution.

En particulier, je remercie Dr Rajeshwar Dayal Tyagi, mon directeur à l'Institut national de la recherche scientifique (INRS-ETE), de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et d'avoir accepté de diriger mes travaux, pour les opportunités d'enseignement et d'encadrement qu'il m'a offertes, pour sa générosité en communiquant avec les étudiants et pour la confiance qu'il a toujours montré à mon égard.

Dre Satinder Kaur Brar, professeure à l'INRS-ETE est ma codirectrice, je la remercie infiniment pour ses suggestions et son soutien, pour ses conseils et son suivi durant l'avancement de mon travail. Je lui dois une grande reconnaissance.

Je remercie aussi Dre Danielle Prévost, chercheure au centre de recherche et de développement sur les sols et les grandes cultures, Agriculture et Agroalimentaire Canada, pour le milieu de travail qu'elle m'a offert, pour tout ce qu'elle a pu me transmettre comme information et pour l'enthousiasme dont elle a toujours fait preuve, notamment lors des discussions qu'on a eu l'occasion d'avoir. À cette occasion, je tiens aussi à remercier Carole Gauvin et Sandra Delaney, techniciennes de recherche de Dre Prévost pour leur aide au laboratoire.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Dr Stéphan Pouleur, chercheur au centre de recherche et de développement sur les sols et les grandes cultures de Agriculture et Agroalimentaire Canada pour son chaleureux accueil et les discussions toujours enrichissantes, ainsi pour sa collaboration à la poursuite de ce sujet de recherche. Je me permets de distinguer Lucie Lévesque, sa

technicienne de recherche pour sa bonne humeur permanente. Mes vifs remerciements s'adressent à Suzanne Dussault et Johanne Desrosiers pour leur aide continue aux étudiants, j'en suis reconnaissant.

Je tiens à remercier Syngenta Crop Protection Canada Inc. de nous avoir fourni le Maxim 480.

Merci au Professeur Jean Francois Blais qui a accepté de corriger mon mémoire.

Un grand merci aux techniciens de l'INRS-ETE pour leur aide à manipuler les instruments des laboratoires et, plus particulièrement, René Rodrigue et Stéphane Prémont.

Mes remerciements s'adressent aux participants dans ce projet: Tarek Rouissi et Rojan Papi John qui n'ont cessé de m'aider par l'échange d'idées et de suggestions.

Un clin d'œil à mes amis Tunisiens de l'INRS-ETE avec qui j'ai passé les moments les plus agréables, et notamment Jihene Zaiem (7ab7ouba), Asma Chemingui, Dali ben Alaya, Fatma Gassara, Aymen Ben Ayssia, Slim Kouki, Dorra Hammami, Kingumbi Ahmadi, Rimeh Daghrir et Amine Mahmoudi. Je ne peux que souhaiter nos retrouvailles un jour ou l'autre, quelque part sur la planète; alors : adieux, au revoir, adios. J'en profite pour leur souhaiter une bonne chance dans leurs travaux.

Je remercie également mes amies de l'ISA Chott-Mariem, Tunisie, Boutheina DOUH et Mounira SOULI pour leur aide et leur gentillesse.

Mes sincères remerciements à mes frères : Lotfi pour ses corrections et son aide, Naceur de m'avoir aidé à faire les analyses statistiques et mon frère Kamel et son épouse puis le petit ange Jacem.

Ma profonde gratitude à mes parents, mes frères et mes sœurs. À l'âme de mon grand-père Hadj Ahmed Ben Smida qui était notre soleil par son grand humour, ton âme est toujours vivante dans nos cœurs. Nous t'aimerons toujours énormément cher grand-père.

Un grand merci à toute la famille MHAMDI.

Enfin, merci, en vrac, à tous ceux qui m'ont permis, à un moment ou à un autre, de relativiser les succès et les difficultés.

RÉSUMÉ

La valorisation des eaux usées s'est avérée intéressante pour la production de biofertilisants et de biopesticides. En effet, il a été démontré que les bioinoculants de *Sinorhizobium* produits dans les eaux usées favorisent la fixation d'azote chez la luzerne et que ceux de *Trichoderma viride* produits dans les eaux usées servent comme agent d'amélioration de croissance et de lutte biologique pour la tomate. Des mélanges des différents bioinoculants sont de plus en plus utilisés pour améliorer la croissance chez les plantes et lutter contre les agents pathogènes. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'interaction *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* produits dans les eaux usées d'amidon sur la croissance de la luzerne. La méthodologie consiste à appliquer les bioinoculants de *S. meliloti* (10^5 UFC/mL) et de *T. viride* (10^5 UFC/mL) produits dans les eaux usées d'amidon, ainsi que dans leurs milieux standards, seuls ou en mélange (*Sinorhizobium*, *Trichoderma*, mélange *Sinorhizobium*-*Trichoderma*) sur des plants de luzerne cultivés en sachets de croissance. Les résultats ont montré que les eaux usées d'amidon supportent bien la croissance de *S. meliloti* et de *T. viride* en les comparant avec les résultats des mêmes microorganismes produits dans les boues d'épuration et ce, du point de vue du nombre de cellules et de leur efficacité. *T. viride* a ralenti la croissance de la luzerne et a diminué l'indice nodulaire. D'autres essais ont été conduits avec des doses plus élevées de *Sinorhizobium* (10^8 UFC/mL) et ont montré que l'effet de *Sinorhizobium* domine celui de *Trichoderma*. L'application d'un agent pathogène, *Fusarium avenaceum*, a montré que *Trichoderma* diminue l'effet pathogène de *F. avenaceum* sur la luzerne et retarde le développement de la maladie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 BIOINOCULANTS À BASE DE <i>RHIZOBIUM</i>	3
1.1.1 Généralités sur les <i>Rhizobium</i>	3
1.1.2 Besoins des <i>Rhizobium</i> en éléments nutritifs	4
1.1.3 Établissement de la symbiose	5
1.1.4 Conditions de production des <i>Rhizobium</i>	6
1.2 BIOINOCULANTS À BASE DE <i>TRICHODERMA VIRIDE</i>	7
1.2.1 Généralités sur le <i>Trichoderma</i>	7
1.2.2 Production de <i>Trichoderma</i>	10
1.2.3 Formulations à base de <i>Trichoderma</i>	11
1.2.4 Mode d'action de <i>Trichoderma</i>	12
1.2.5 Interaction avec les plantes et mycoparasitisme.....	13
1.2.6 Association plante- <i>Trichoderma</i>	13
1.2.7 Éliciteurs biochimiques de la résistance aux maladies.....	13
1.2.8 Effets de la colonisation des racines sur le métabolisme de la plante (effet bénéfique).....	14
1.2.9 Interaction <i>Trichoderma</i> - <i>Rhizobium</i>	16
1.2.10 Inconvénients de <i>Trichoderma</i>	17
1.3 GÉNÉRALITÉS SUR LES <i>FUSARIUM</i>	18
1.3.1 Systématique du genre <i>Fusarium</i>	18
1.3.2 Dégâts de la fusariose	19
1.3.3 Fonte de semis (<i>Seedling blight</i>).....	19
1.3.4 Pourriture des racines (<i>Root rot</i> ou <i>common root rot</i>).....	20
1.3.5 Pourriture du pied (<i>Foot rot</i> ou <i>dry land foot rot</i>).....	20
1.3.6 Cycle biologique de la maladie.....	21
1.3.7 Pourriture des racines et du collet chez la luzerne causée par <i>Fusarium avenaceum</i>	22
1.4 LUZERNE.....	23
1.5 PROBLÉMATIQUE	24

1.6	OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	24
1.7	HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	25
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
2.1	EFFETS DE L'INTERACTION <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI-TRICHODERMA VIRIDE</i> SUR LA NODULATION ET LA CROISSANCE.....	27
2.1.1	<i>Production d'inocula à base de Sinorhizobium meliloti</i>	27
2.1.2	<i>Préparation de l'inoculum et fermentation</i>	27
2.1.3	<i>Culture d'une souche de S. meliloti dans les eaux usées d'amidon</i>	28
2.1.4	<i>Production d'inoculant à base de Trichoderma viride</i>	28
2.2	TESTS DE NODULATION	29
2.2.1	<i>Tests de nodulation en sachets de croissance</i>	29
2.2.2	<i>Tests de nodulation en pots</i>	32
2.3	ÉTUDE DE L'EFFET DU MÉLANGE <i>S. MELILOTI - T. VIRIDE</i> EN LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE <i>F. AVENACEUM</i>	33
2.3.1	<i>Vérification du pouvoir pathogène du F. avenaceum chez la luzerne SEMIS</i>	34
2.3.2	<i>Évaluation du potentiel de lutte biologique</i>	35
2.3.3	<i>Comparaison de l'efficacité du T. viride et d'un fongicide de synthèse comme moyen de lutte contre le F. avenaceum</i>	37
2.4	DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET ANALYSES STATISTIQUES	38
3.	RÉSULTATS	41
3.1	EFFETS DU <i>TRICHODERMA</i> SUR LA NODULATION ET LA CROISSANCE EN SACHETS DE CROISSANCE.....	41
3.2	TESTS SUR L'EFFET DU <i>T. VIRIDE</i> SUR LA LUZERNE EN POTS	44
3.3	TESTS DE NODULATION EN SACHETS DE CROISSANCE AVEC FORTE DOSE DE <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i>	45
3.4	INTERACTION DE <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI-TRICHODERMA VIRIDE</i> AVEC <i>FUSARIUM AVENACEUM</i>	48
3.5	INFECTION DE LA LUZERNE AVEC LE <i>FUSARIUM AVENACEUM</i> EN POTS ET POUVOIR DE BIOCONTRÔLE CHEZ <i>TRICHODERMA VIRIDE</i>	51
3.6	TEST DE COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DU <i>TRICHODERMA</i> PAR RAPPORT À UN AGENT CHIMIQUE DE LUTTE CONTRE LES PHYTOPATHOGENES (MAXIM)	54
4.	DISCUSSION.....	57
5.	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	59
	RÉFÉRENCES.....	61
	ANNEXES	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Méthodes de maintenance, caractéristiques principales et viabilité des cellules selon différentes méthodes pour la conservation des cellules de <i>Rhizobium</i>	7
Tableau 2	Effets de différents déchets agroindustriels sur la densité cellulaire de <i>Trichoderma Harzianum</i> (Singh <i>et al.</i> 2007).....	11
Tableau 3	Pourcentage cumulé des racines pourries au cours du stockage de manioc inoculés par <i>T. viride</i> et post récolte des agents pathogènes (Horsfall <i>et al.</i> 1945; Michaud <i>et al.</i> 1985).....	15
Tableau 4	Solution de Hoagland et Arnon (1938).....	30
Tableau 5	Traitements de bioinoculants appliqués à la luzerne lors d'un essai en sachets de croissance.....	31
Tableau 6	Critères et méthode de calcul pour évaluer l'indice nodulaire (Ben Rebah, 2001).....	32
Tableau 7	Tests d'efficacité de <i>S. meliloti</i> et <i>T. viride</i> sur la luzerne.....	33
Tableau 8	Évaluation du potentiel de lutte biologique.....	35
Tableau 9	Échelle des indices de pourriture des racines.....	36
Tableau 10	Comparaison de l'efficacité du <i>Trichoderma viride</i> et d'un fongicide de synthèse.....	37
Tableau 11	Effets de <i>Trichoderma viride</i> sur la nodulation.....	75
Tableau 12	Effets de <i>Trichoderma viride</i> sur le poids sec du feuillage chez la luzerne.....	75
Tableau 13	Effets de <i>Trichoderma viride</i> sur le poids sec du feuillage chez la luzerne en pots.....	76
Tableau 14	Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec différents mélanges de <i>Trichoderma</i> et de <i>Sinorhizobium</i> lors des essais en sachets.....	76
Tableau 15	Poids sec du feuillage de la luzerne inoculée avec différents mélanges de <i>Trichoderma</i> et de <i>Sinorhizobium</i> lors des essais en sachets.....	76
Tableau 16	Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec <i>Fusarium</i> en fonction des traitements.....	77
Tableau 17	Indice de maladie de la luzerne inoculée avec <i>Fusarium</i> en fonction des traitements.....	77
Tableau 18	Poids sec de la luzerne inoculée avec <i>Fusarium</i> en fonction des traitements.....	77
Tableau 19	Comparaison de l'effet des <i>Trichoderma</i> par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (indice nodulaire).....	78
Tableau 20	Comparaison de l'effet des <i>Trichoderma</i> par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (indice de maladie).....	78
Tableau 21	Comparaison de l'effet des <i>Trichoderma</i> par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (poids sec).....	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Courbe de croissance de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (Rojan 2010, modifiée).....	6
Figure 2	Photomicrographies de <i>Trichoderma viride</i>	15
Figure 3	Cycle de <i>Fusarium spp.</i> : Illustration des différents modes d'action (Caron 2000, modifiée).....	22
Figure 4	Effets de <i>Trichoderma viride</i> sur la nodulation de la luzerne.....	42
Figure 5	Effet du <i>Trichoderma viride</i> sur le poids sec du feuillage chez la luzerne.....	43
Figure 6	Effet du <i>Trichoderma viride</i> sur le poids sec du feuillage chez la luzerne en pots.....	44
Figure 7	Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec différents mélanges de <i>Trichoderma</i> et de <i>Sinorhizobium</i> lors d'essais en sachets.....	46
Figure 8	Poids sec du feuillage de la luzerne inoculée avec différents mélanges de <i>Trichoderma</i> et de <i>Sinorhizobium</i> lors d'essais en sachets.....	47
Figure 9	Test <i>in vitro</i> de 1 mois: <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i>	49
Figure 10	Vérification du pouvoir pathogène du <i>Fusarium avenaceum</i> chez la luzerne. a : en boîte de Pétri; b : en sachet de croissance	50
Figure 11	Paramètres étudiés de la luzerne inoculée avec <i>Fusarium</i> en fonction des traitements. a : indice nodulaire; b : indice de maladie; c : poids sec du feuillage	53
Figure 12	Comparaison de l'effet des <i>Trichoderma</i> par rapport à maxim. a : indice nodulaire; b : indice de maladie; c : poids sec	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCA :	Agents de biocontrôle (Biocontrol agent)
EPB :	Espace pér bactéroidien
EUA :	Eaux usées d'amidon
MPB :	Membrane pér bactéroidienne
PDA:	Gélose à base de bouillon de dextrose de patates (Potato dextrose agar)
PDB :	Bouillon à base de dextrose de patates (Potato dextrose broth)
PGPM :	Agents d'amélioration de la croissance végétative (Plant growth promoting microorganisms)
Rhz :	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Tri :	<i>Trichoderma viride</i>
TSA:	Gélose à base de bouillon de soja (Tryptic soy agar)
YGB :	Bouillon à base de glucose supplémenté de levure (Yeast glucose broth)
YMA:	Gélose à base de mannitol et d'extrait de levure (Yeast mannitol agar)
YMB:	Bouillon à base de mannitol (Yeast mannitol broth)

INTRODUCTION

Les agents de fertilisation et de protection des sols contre les pathogènes ont été largement étudiés et signalés dans différentes conditions. Les études ont porté généralement sur les agents de biocontrôle contre les pathogènes du sol (Deacon *et al.* 1988; Weller 1988). La production industrielle d'inocula pour les légumineuses à base de *Sinorhizobium* dans des milieux liquides est généralement limitée à cause de son coût élevé et de la faible disponibilité des sources de carbone (Bissonnette 1986). En effet, le milieu synthétique inclut souvent le mannitol comme source principale de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote. Le bouillon de mannitol a été utilisé comme milieu synthétique pour la production de *Rhizobium*. Le bouillon à base de dextrose de patates a été largement utilisé comme milieu synthétique pour la production de *Trichoderma* supposé agir comme agent d'amélioration de croissance et de lutte biologique. Quelques sous-produits industriels ont été valorisés pour la production d'inocula à base de *Rhizobium* et de *Trichoderma*, à savoir, les boues municipales préalablement traitées. Cette méthode a été optimisée par Ben Rebah *et al.* (2001) dans le cas de *Rhizobium* et par Verma (2007) dans le cas de *Trichoderma*. Elle est d'une efficacité élevée du point de vue de la concentration cellulaire et ce, dans la plupart des cas, même lors d'une fermentation en fioles d'Erlenmeyer. Dans le cadre de la production de biofertilisants et biopesticides, l'utilisation des eaux usées des industries agroalimentaires vise à valoriser les déchets liquides, limiter leurs effets environnementaux néfastes et minimiser les coûts de production de bioinoculants, qui seront par la suite homologués et commercialisés tout en respectant les normes environnementales prescrites. Ces déchets servent à la production de souches bactériennes en milieu liquide, ils peuvent aussi être utilisés comme support solide ainsi que liquide (formulation) pour la conservation des formulations (Ben Rebah 2001).

D'autres substrats ont aussi été utilisés comme support, tels que la tourbe, qui a donné d'excellents résultats au niveau de la qualité d'inoculum et qui a révélé la plus longue période de conservation des cellules de *Rhizobium*, soit de 2 à 4 ans (Hungria *et al.* 2005). Dans ce contexte, Vincent (1970) concluait que pour un simple suivi de la qualité de l'inoculum, il faudra utiliser la tourbe. Dans des substrats non stériles, la plupart des contaminants poussent plus vite que les *Sinorhizobium* et peuvent interférer dans la survie des *Rhizobium* et dans l'efficacité de l'inoculant (qualité du produit). Pour certains auteurs, la tourbe reste le meilleur substrat pour des inocula à base de *Sinorhizobium* (Burton 1967; Peterson 1981; Feng *et al.* 2002).

Les eaux usées industrielles et municipales sont devenues de plus en plus compliquées à s'en débarrasser à cause des problèmes environnementaux qu'elles causent. Dans ce contexte, plusieurs solutions ont été adoptées, à savoir, l'épandage des boues d'épuration comme fertilisants et leur enfouissement (Golueke 1992). Différents milieux liquides comme le lactosérum, générés par l'industrie de fromage (Bissonnette 1986), ont servi pour la production d'inocula. Ce matériau contient les facteurs de croissance, l'azote et le carbone, nécessaires pour le développement et la croissance de différentes espèces de *Sinorhizobium*. Récemment, les eaux usées d'amidon (EUA) ont été utilisées pour la production de bioinoculants à base de *Rhizobium* et ont donné des résultats fiables. Ceci a été prouvé par Khanh *et al.* (2009) qui ont trouvé des résultats comparables à ceux obtenus dans d'autres milieux de culture.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Bioinoculants à base de *Rhizobium*

1.1.1 Généralités sur les *Rhizobium*

Les *Rhizobium* sont des bactéries du sol, en forme de bâtonnets et non sporulantes, appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Jordan 1952). Ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses (pois, haricot, luzerne, etc.). En condition de carence en azote, les *Rhizobium* induisent la formation de nodules au niveau des racines des légumineuses. Ces nodules sont de véritables organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes. Cette symbiose va permettre aux bactéries de bénéficier d'un micro habitat exceptionnellement favorable au niveau de l'hôte leur procurant un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, ces bactéries vont fixer et réduire l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes. Selon Allen et Allen (1950), la capacité de ces bactéries à former des nodules et à fixer l'azote atmosphérique est le seul critère fiable pour leur identification. En se référant à la classification de plusieurs auteurs, il y a différents genres de la famille des *Rhizobiaceae*: *Rhizobium* (*R. galegae*, *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (*S. meliloti*, *S. fredii*, *S. teranga*, *S. saheli*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii*), et *Azorhizobium* (*A. caulinodans*) (Young *et al.* 1996; Young 2001; Willems 2006). Un nouveau genre a été découvert récemment par Amarger (2001), elle lui a attribué le nom de *Allorhizobium* (*A. undicicola*). La vitesse de croissance est aussi un critère important pour la caractérisation des *Rhizobium*. Ainsi, on trouve des espèces à croissance rapide (*Rhizobium* et *Sinorhizobium*) et d'autres à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Dans ce qui suit on va s'intéresser à l'espèce *Sinorhizobium meliloti* qui est une bactérie spécifique nodulant la luzerne.

Les propriétés compétitives des *Sinorhizobium* sont liées à leur survie dans le sol, leur relation avec d'autres microorganismes et leur capacité d'utiliser les nutriments (Triplett *et al.* 1992; Vande Broek 1995; Burgos 1996). Tout déficit dans ces facteurs affecte l'efficacité des *Sinorhizobium* vis-à-vis de la fixation de l'azote atmosphérique et la nodulation. En plus, ils posent de plus en plus des problèmes limitant l'usage commercial des *Sinorhizobium* comme biofertilisant (Streeter 1994; Toro 1996).

Les *Rhizobium* qui se caractérisent par une croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 heures), comprennent : *R. leguminosarum*, *S. meliloti* et *R. galegae*. Les souches de développant dans un bouillon à base de glucose et d'extrait de levure (YGB), ont un temps de génération de 3,4 à 8,3 h (Martinez-De Drets *et al.* 1972). Les souches les plus représentatives des *Rhizobium* ont un temps de génération de 5,5 h (Martinez-De Drets *et al.* 1972) ou moins (Kennedy *et al.* 1982). Elles forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre après 3 à 5 jours d'incubation sur gélose à base de mannitol et d'extrait de levure (YMA).

1.1.2 Besoins des *Rhizobium* en éléments nutritifs

Les *Rhizobium* sont généralement très exigeants en carbone. Le sucrose est le plus conseillé comme source de carbone, le mannitol et le glycérol sont utilisés surtout pour les espèces de *Rhizobium* à croissance lente. Il a été démontré qu'en présence du glycérol, le temps de génération des *Rhizobium* est plus court qu'en présence de mannitol, glucose, sucrose et galactose (Arias *et al.* 1976). La majeure proportion de la matière sèche des *Rhizobium* est du carbone. L'extrait de levure est utilisé comme source principale d'azote pour la culture des *Rhizobium*. En effet, une dose de 1 g/L est largement suffisante pour une croissance normale de *Rhizobium* (Skinner 1977). L'extrait de levure sert aussi comme source de sels minéraux (potassium, calcium, magnésium, etc.), indispensables pour leur croissance (Bruce *et al.* 1989).

Il a été démontré que lors de sa croissance, *Sinorhizobium meliloti* nécessite de la biotine, du cobalt ou bien de la méthionine (Watson *et al.* 2001). Toutefois, Jordan (1952) présume que ce type de vitamine n'est pas forcément suggéré pour l'initiation de la croissance des *Sinorhizobium*. Jordan (1952) a ajouté que la plupart des *Rhizobium* (y compris *Sinorhizobium meliloti*) peuvent pousser dans un milieu privé de vitamine mais contenant certains acides aminés tels que : l'histidine, la cystéine et la méthionine.

1.1.3 Établissement de la symbiose

La symbiose entre les espèces *Rhizobium* et les plantes s'effectue avec un hôte spécifique tel que le cas de *Sinorhizobium meliloti* et la luzerne. Ce processus de symbiose implique des molécules secrétées par les plantes. Ces molécules s'appellent lectines et permettant la reconnaissance de l'hôte et la fixation de l'espèce appropriée de *Rhizobium* sur des sites spécifiques des racines (Prescott 1995). Ces lectines produites par les hôtes permettent l'agglomération des *Rhizobium* (Prescott 1995). De plus, les *Rhizobium* libèrent des lipopolysaccharides qui pénètrent dans le poil absorbant et dirigent la formation du filament infectieux (Dazzo 1991; Pelmont 1993). Lors du contact de la bactérie avec la racine, le poil aura une forme de crosse et, par conséquent, la bactérie y pénètre et induit la formation d'un filament infectieux par la plante qui s'allonge dans la racine vers la racine. Le *Rhizobium* se propage dans le filament infectieux et infecte les cellules adjacentes de la racine qui subiront par la suite des divisions successives et les nodules apparaissent. Les bactéries se multiplient dans les cellules infectées et se développent en ramifications gonflées, nommées bactéroïdes, qui sont responsables de réduire l'azote atmosphérique en ammoniac. En plus, il y a la production de leghémoglobine et de la noduline dans les bactéroïdes. La noduline formée cause l'élargissement du cortex cellulaire tandis que la

leghémoglobine est à l'origine de la couleur rose chez les nodules et permet la régulation de l'oxygène chez les bactéroïdes (Allen et Allen 1950; Prescott 1995).

1.1.4 Conditions de production des *Rhizobium*

Une croissance normale des *Rhizobium* nécessite une oxygénation et une température appropriées. Lors du processus de fermentation, une augmentation de l'aération est requise et se traduit par une augmentation du taux de croissance (Quispel 1974). La température d'incubation n'est pas un facteur limitant de la croissance des *Rhizobium*; généralement une température entre 25 et 30°C est suggérée pour une bonne croissance. Le taux d'inoculation influence la concentration du bouillon fermenté. Dans ce cadre, Date et Roughley (1977) ont proposé une inoculation de 0.1 à 1%. Bissonnette *et al.* (1986) ont suggéré un volume d'inoculum de 1 à 3% tout en tenant compte du milieu de culture. La Figure 1 montre la cinétique de croissance de *Sinorhizobium meliloti* (*Sm*) dans son milieu synthétique (YMB) et dans les eaux usées d'amidon (EUA).

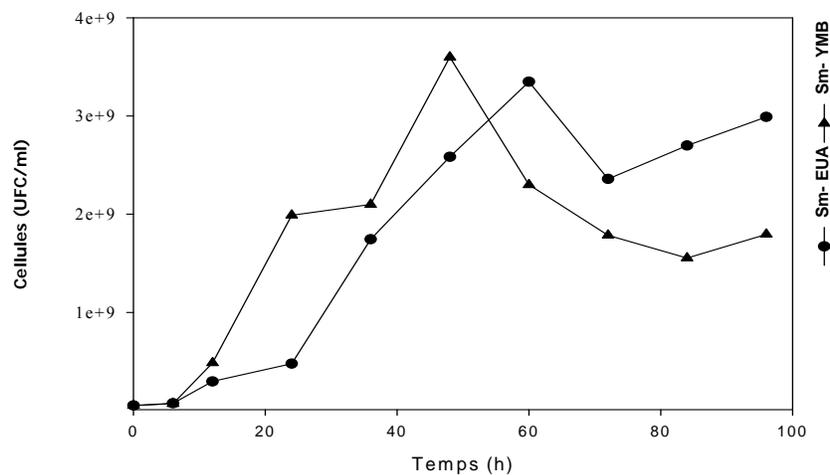


Figure 1 Courbe de croissance de *Sinorhizobium meliloti* (Rojan 2010, modifiée)

Le Tableau 1 montre, pour sa part, différentes conditions de conservation des cultures de *Rhizobium*.

Tableau 1 Méthodes de maintenance, caractéristiques principales et viabilité des cellules selon différentes méthodes pour la conservation des cellules de *Rhizobium*

Méthode	Caractéristiques	Viabilité
Agar	Milieu avec extrait de levure, mannitol, sel, 5-6°C, simple et faible cout	Une année
Agar	Couvert avec de minéraux stériles ou huile de paraffine,	2 années
Billes de porcelaine	Cellules sèches en suspension dans un ‘porcelaine’ stérile	2 années
Sol, tourbe ou argile	De préférence avec des hautes capacités de rétention d’eau, avoir des propriétés chimiques intéressantes, stériles	2-4 années
Bandes de papiers	Bandes de papiers ou disque plein de suspensions de bactéries séchées conservées au réfrigérateur	6 mois
Congélation	Gamme de température :-70°C- 190°C, au congélateur ou azote liquide. La Viabilité dépend du milieu de culture, vitesse de congélation, température de congélation, bonne viabilité prouvée après un nombre de collections après 15-20 ans	Mois-années
Lyophilisation	La viabilité dépend de l’état physiologique de la culture, la concentration des cellules, le milieu de culture, le taux de lyophilisation, température ordinaire des chambres.	Mois-Années

1.2 Bioinoculants à base de *Trichoderma viride*

1.2.1 Généralités sur le *Trichoderma*

La production d’agents de lutte biologique (ALB) à base de *Trichoderma viride* 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. Ce champignon (*Trichoderma viride*) est caractérisé par une croissance rapide, une grande capacité à la compétition saprophytique (Mouria *et al.* 2005) et parasite le mycélium

d'autres champignons. Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, aussi bien que 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 pour 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 viride* appliqués sur les semences (moins de 1 g/ha).

Trichoderma est un champignon du sol, filamenteux, connu comme un agent de biocontrôle efficace contre certains pathogènes du sol. Il est l'agent de biocontrôle le plus étudié contre les phytopathogènes. Weindling et Emerson (1936) ont démontré que *Trichoderma* est capable de sécréter une substance extracellulaire, appelée « Gliotoxine », capable de dégrader les pathogènes. *Trichoderma* est un genre de champignon à reproduction asexuée qui se caractérise par des colonies à croissance rapide et colonise les plantes ligneuses et les herbacées. Les *Trichoderma* présentent une diversité génétique très élevée et peuvent être utilisés pour produire des produits à intérêt écologique et commercial marqué. Ils produisent des protéines extracellulaires et sont connus comme meilleurs producteurs d'enzymes dégradant la cellulose et la chitine en plus d'autres enzymes à différents usages qui ont été identifiés (Haran *et al.* 1996; Harman *et al.* 2004). *Trichoderma viride* est efficace pour le contrôle de *Rizoctonia solani*, un

champignon qui cause la fonte des semis et la pourriture des racines, cependant, soixante-dix souches de *Trichoderma* y compris *T. viride*, *T. harzianum* et *T. aureoviride* ont été testés contre le *R. solani in vitro* et ont montré une inhibition totale de la croissance de *R. solani*. 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. Au moins quelques souches établissent une colonisation robuste et durable au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité, 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 (Lindsey *et al.* 1967; Chang *et al.* 1986). Le parasitisme de *T. viride*, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme incluant les cellulases, les chitinases et des antibiotiques, tel que la gliotoxine (Haran *et al.* 1996). 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. Le maïs répond généralement à l'ajout de fertilisants riches en azote par l'amplification de l'intensité de la couleur verte, une bonne croissance et un rendement maximum. Cependant, les plantes de maïs issues de semences traitées avec *Trichoderma T-22* ont donné un rendement maximum avec un fertilisant contenant 40% moins d'azote par rapport à des semences non traitées avec *T-22* (Harman 2000, 2001).

1.2.2 Production de *Trichoderma*

Trichoderma pousse généralement dans les PDA (Potatoes Dextrose Agar) ou TSA (Tryptic Soy Agar). Il est connu que *Trichoderma* pousse mieux dans le PDA (Ubalua *et al.* 2007; Verma 2007), les autres milieux comme le TSA sont rarement utilisés. *Trichoderma* a été produit dans des milieux complexes comme les eaux usées et les boues municipales et a donné d'excellents résultats (Verma 2007). Il a été démontré également que *Trichoderma* pousse dans des préparations à base des parois cellulaires de l'orge (Kanauchi *et al.* 2001), avec une croissance maximale à une température de 30°C. La croissance à une température entre 30 et 35°C est caractérisée par la sécrétion élevée de protéines qui explique le fait d'une forte synthèse d'enzymes à cette température. Davet et Comporota (1986) ont mis au point une technique de production d'inoculum de *Trichoderma* à partir d'un milieu renfermant du blé et de la farine d'avoine. Afin de sélectionner un substrat qui pourrait procurer aux *Trichoderma* un plus grand pouvoir compétitif vis-à-vis des microorganismes telluriques, cinq types de farines à diverses concentrations ont été testées sur l'inoculum initial de trois souches de *Trichoderma*. Davet *et al.* (1981) ont démontré que le milieu à base de paille de blé permet une plus longue conservation des souches de *Trichoderma* que les milieux de synthèse ou le sol dénué de support nutritif. La paille favorise l'émission par les *Trichoderma* d'antibiotiques volatils (Davet 1983). Le Tableau 2 montre l'effet de différents déchets agro-industriels sur la densité de *Trichoderma*.

Tableau 2 Effets de différents déchets agroindustriels sur la densité cellulaire de *Trichoderma Harzianum* (Singh et al. 2007)

Déchets agroindustriels	UFC/g						
	Jours						
	30	60	90	120	150	180	210
Pseudotronc Banane	5.8×10^6	5.5×10^6	5.1×10^5	4.8×10^5	4.2×10^4	3.1×10^4	2.6×10^4
Compost	7.3×10^6	7.3×10^6	5.3×10^6	4.3×10^6	5.5×10^5	5.9×10^5	2.5×10^4
Maïs	5.4×10^6	5.4×10^6	3.8×10^6	3.4×10^6	5.3×10^5	7.9×10^4	2.4×10^4
Farine de maïs	3.3×10^7	3.3×10^7	3.0×10^7	5.8×10^6	6.7×10^5	6.0×10^5	8.3×10^4
Balle de Riz	6.4×10^7	6.4×10^7	6.2×10^7	5.9×10^7	1.2×10^6	7.8×10^5	5.2×10^4
Sciure	4.4×10^6	4.3×10^6	4.1×10^6	3.8×10^6	3.1×10^6	2.7×10^6	2.4×10^4
Grain de sorgho	2.1×10^7	2.1×10^7	1.9×10^7	1.6×10^7	1.5×10^7	3.3×10^6	2.1×10^4
Feuilles de thé usagées	8.0×10^8	8.0×10^8	8.0×10^7	7.8×10^7	7.5×10^7	6.5×10^7	6.1×10^4
Son de blé	2.4×10^7	2.1×10^7	2.0×10^7	2.0×10^7	9.8×10^6	6.4×10^6	5.7×10^4

1.2.3 Formulations à base de *Trichoderma*

Le comportement antagoniste des espèces fongiques du genre *Trichoderma* a été abordé dans de nombreux travaux de recherche. Il a été démontré que si l'activité de défense d'un agent biologique n'est pas liée à la taille de sa population, le maintien de tout inoculum assure une action prolongée (Davet 1983). L'application des agents fongiques comme le genre *Trichoderma* pour contrer les phytopathogènes nécessite des quantités importantes d'inocula avec une formulation permettant une bonne croissance de l'agent de biocontrôle par rapport aux espèces pathogènes. Davet *et al.* (1981) ont montré que l'inoculum de *Trichoderma*, sous forme d'une simple poudre de spores, appliqué à un sol non stérile, se maintient difficilement et y est peu actif. Pour éviter ce problème, il faudra absolument introduire le champignon *Trichoderma* dans un genre de substrat lui permettant d'échapper aux microorganismes du sol. Plusieurs substrats ont été testés pour la formulation d'inocula à base de *Trichoderma*. Ainsi, le son du blé a été largement utilisé pour la formulation des inocula de plusieurs antagonistes dont *Trichoderma* (Rovira 1969; Chet *et al.* 1979; Aziz *et al.* 1997). Une formulation de son de blé à base de

Trichoderma harzianum a réduit la fonte de semis, dû au *Pythium*, de 77% contre 32,4% par une simple suspension sporale de *Trichoderma* (Mukherjee *et al.* 1989). Cette formulation a été aussi très efficace pour le contrôle contre *Sclerotium rolfsii* (Chet 1987). La population existante des *Trichoderma* qui se trouve dans les terres agricoles ne dépasse pas 10^2 UFC/g de sol (Chet 1987). Chet et Backer (1979) ont démontré que la concentration minimale exigée pour les sols doit être autour de 10^6 UFC/g de sol.

1.2.4 Mode d'action de *Trichoderma*

Généralement, *Trichoderma* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur des phytopathogènes, *Trichoderma* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systématique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante (Lindsey *et al.* 1967; Yedida *et al.* 2001), soit au niveau du sol (Chang *et al.* 1986; Harman 2000). L'induction de la résistance chez les plantes par *Trichoderma* a été étudiée et comparée avec les réponses induites par les rhizobactéries. *Trichoderma* est résistante aux cyanures et produit deux différentes enzymes qui sont capables de dégrader les cyanures dans la zone racinaire (Ezzi *et al.* 2002). Par la suite, ce champignon peut augmenter la croissance racinaire, détruit les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines. Des observations microscopiques sur des cultures de différents champignons ont montré que *Trichoderma* croît parallèlement avec *Rizoctonia Solani*. Toutefois, *Trichoderma* s'enroule autour du *Rizoctonia solani* et forme des crochets empêchant ainsi le développement de celle-ci (Shalini *et al.* 2007).

1.2.5 Interaction avec les plantes et mycoparasitisme

Trichoderma est très connu pour sa capacité de coloniser les racines des plantes, d'autre part les conidies de *Trichoderma* ont été appliquées aux fruits, fleurs et feuillage et les racines (Elad 1994; Harman 2000). La pénétration de *Trichoderma* au niveau du tissu racinaire est généralement limitée au niveau de la première couche ou bien la couche secondaire des cellules racinaires (Yedidia *et al.* 1999, 2000; Metcalf *et al.* 2001).

1.2.6 Association plante-*Trichoderma*

Quelques souches de *Trichoderma* sont capables de coloniser seulement des sites locaux au niveau des racines, en contrepartie, d'autres souches compétentes de la rhizosphère colonisent la surface racinaire au complet pour plusieurs semaines (Thrane *et al.* 1997) ou mois (Harman 2000).

1.2.7 Éliciteurs biochimiques de la résistance aux maladies

Trois classes de composés secrétés par *Trichoderma* induisant la résistance aux maladies sont identifiées. Ce sont des protéines à fonction enzymatique ou autres fonctions, des protéines homologues encodées par des gènes de virulence, des oligosaccharides et, enfin, d'autres composantes de faible poids moléculaire qui sont libérées à partir des parois cellulaires (Harman *et al.* 2004). Avant la découverte de l'induction de la résistance chez les plantes par *Trichoderma*, il y avait la protéine 22-k Da xylanase qui est secrétée par plusieurs espèces de *Trichoderma* (Yedidia *et al.* 1999). Cette protéine est capable de déclencher la production d'éthylène et la défense des plantes (Fuchs *et al.* 1989; Anderson 1993). Il est important de mentionner le mode d'acheminement de cette protéine. En effet, cette protéine est transloquée via le système vasculaire du tabac après avoir été introduite aux pétioles (Bailey *et al.* 1991). Il

fallait donc que la translocation de cette protéine aie lieu dans la plante elle-même et non pas uniquement au niveau des pétioles.

1.2.8 Effets de la colonisation des racines sur le métabolisme de la plante (effet bénéfique)

Plusieurs études ont montré que la colonisation des racines résulte de l'augmentation des enzymes de défense incluant différentes peroxidases, chitinases, β -1,3-glucanase et la voie de lipoxygénase hydroperoxyde lyase (Yedidia *et al.* 1999, 2003; Howell *et al.* 2000; Harman *et al.* 2004). La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia *et al.* 2001). Cette augmentation de l'absorption des éléments nutritifs indique une amélioration du mécanisme actif d'absorption des éléments nutritifs. En outre, Huaying (1998) ainsi que Liansheng et Weihua (2000) ont rapporté que le mycoparasitisme fait partie du mécanisme de biocontrôle de *Trichoderma* contre *Botrytis Cinerea*. Yedidia *et al.* (2000) ont prouvé que l'association de *Trichoderma* avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes. La présence de T-22 dans certains types de fertilisants augmente l'efficacité de ce fertilisant en azote. Cet azote est utilisé par le maïs qui est capable de réduire la pollution des eaux de surface ainsi que les eaux souterraines. En plus de son efficacité vis-à-vis de l'azote, cet organisme aide à assimiler différents éléments présents dans la solution du sol tels que l'arsenic, le cobalt, le cadmium, le chrome, le nickel, le plomb, le vanadium, le magnésium, le manganèse, le cuivre, le bore, le zinc, l'aluminium et le sodium. Il y a probablement des souches de *Trichoderma* autre que la T-22 qui sont capables de solubiliser différents nutriments comme les roches phosphate, le Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , et Zn^0 qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous forme non assimilable, tels que les chélates (Altomare *et al.* 1999). Altomare (1999) a ajouté que

T-22 réduit les ions métalliques oxydés pour augmenter leur solubilité et produire les sidérophores qui chélatent le fer (Figure 2).

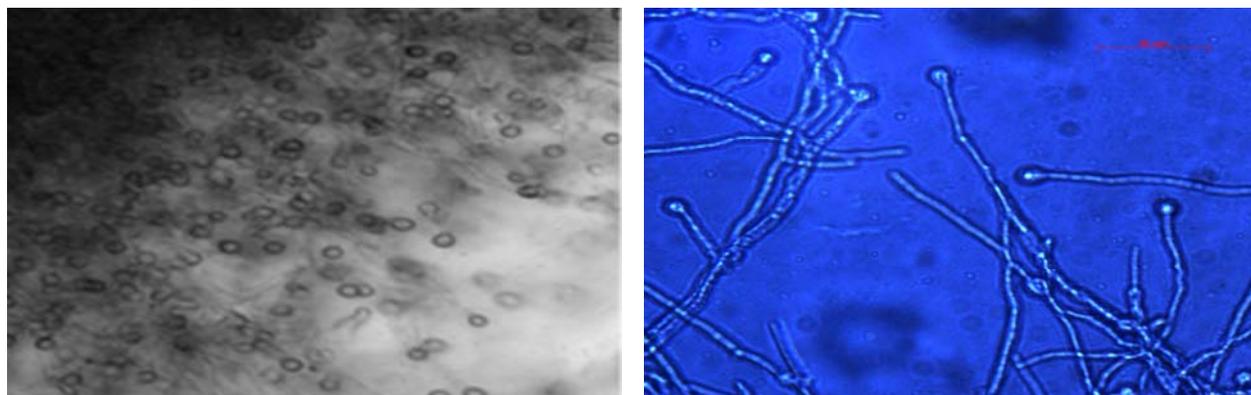


Figure 2 Photomicrographies de *Trichoderma viride*

Tableau 3 Pourcentage cumulé des racines pourries au cours du stockage de manioc inoculés par *T. viride* et post récolte des agents pathogènes (Horsfall *et al.* 1945; Michaud *et al.* 1985)

Traitement	Une semaine	Deux semaines	Trois semaines
Non inoculé (contrôle)	4	12	28
<i>B. theobromae</i>	8	16	20
<i>Aspergillus flavus</i>	6	20	44
<i>Fusarium solani</i>	9	15	35
<i>Rhizopus oryzae</i>	4	24	30
<i>Trichoderma viride</i> (antagoniste)	0	0	0
<i>Trichoderma viride</i> + <i>B. theobromae</i>	3	0	0
<i>Trichoderma viride</i> + <i>Aspergillus flavus</i>	1	1	2
<i>Trichoderma viride</i> + <i>Rhizopus oryzae</i>	2	0	0
<i>Trichoderma viride</i> + <i>Fusarium solani</i>	1	1	3

Le Tableau 3 illustre bien les caractéristiques de *Trichoderma* en tant qu'agent de lutte biologique contre des pathogènes, ceci est en accord avec la plupart des études antérieures portant sur *Trichoderma*.

1.2.9 Interaction *Trichoderma*-*Rhizobium*

Les agents prometteurs de la croissance végétale (PGPM), ainsi les agents de contrôle biologique (BCA) possèdent des effets bénéfiques secondaires qui peuvent augmenter leur utilisation comme bioinoculants sans tenir compte de leurs rôles primordiaux. En effet, les PGPM tels que *Rhizobium* sont supposés améliorer la croissance des plantes et la production (premier effet). Il a été démontré aussi que les *Rhizobium* réduisent l'incidence des maladies des racines chez la luzerne comme un rôle de lutte biologique (effet secondaire) (Tu 1978; Tan 1986). Contrairement aux PGPM, les BCA comme *Trichoderma* peuvent contrôler les maladies (effet primaire) et aussi stimuler la croissance végétative (effet secondaire) en absence des pathogènes (Avis *et al.* 2008). Pour compléter tout déficit de contrôle (croissance ou maladie), un mélange de bioproduits est suggéré afin d'améliorer la situation. Des études faites par Rajeshkannan *et al.* (2007), Dubey (2007) et Whipps *et al.* (2001) ont prouvé l'effet bénéfique de la combinaison de différents microbes à la fois par rapport à une application individuelle. Cette constatation a été prouvée par Haque *et al.* (1992) qui ont remarqué que l'usage combiné de *Trichoderma* spp. et *Sinorhizobium meliloti* a diminué l'effet toxique de *Macrophomina phaseolina* chez des plantes de fenugrec et soja (Ali *et al.* 1991) de 30 et 60 jours d'âge. Haque *et al.* (1992) ont aussi remarqué que l'utilisation combinée de *Trichoderma viride* et *Sinorhizobium meliloti* a fait disparaître complètement l'infection par *Fusarium* spp. chez des plantes à l'âge de 30 jours tandis que pour des plantes à l'âge de 60 jours, plus que 50% de réduction de l'infection a été enregistrée, soit par l'utilisation individuelle de *Trichoderma* spp. et du *Sinorhizobium meliloti*,

soit par l'utilisation des deux bioproduits combinés en pulvérisant les sols, ou bien par enrobage des graines. D'autres études qui portaient sur l'effet combiné de *Trichoderma* et *Rhizobium* ont démontré une diminution importante de la fréquence des souches causant la pourriture du collet des plantes d'arachides suite à l'usage combiné de *Rhizobium* et *Trichoderma* (Ganesan *et al.* 2007). Dans la plupart des cas, l'utilisation combinée de bioproduits, tels que : *Rhizobium* et *Trichoderma* spp, améliore la croissance, augmente le taux de germination, l'absorption des nutriments, la hauteur des plantes, la nodulation et la biomasse totale chez le pois chiche par rapport à l'utilisation individuelle des différents bioproduits (Rudresh *et al.* 2005).

1.2.10 Inconvénients de *Trichoderma*

Bien que *Trichoderma* et d'autres champignons infectent les racines, ils ne sont pas considérés comme des agents pathogènes. Cependant, dans quelques cas, des souches de *Trichoderma* spp. sont pathogènes pour les plantes et ont causé des maladies des cultures telles que le pommier et la luzerne, d'autres souches peuvent aussi produire des métabolites phytotoxiques en masse (Bailey *et al.* 1998). Il y a des producteurs d'enzymes qui sont nécessaires pour dégrader les parois cellulaires des plantes (Haran *et al.* 1996). Ainsi, le fait que *Trichoderma* spp. infecte les racines et a la capacité d'être un phytopathogène, son infection reste superficielle et un phénomène remarquable. Cependant, il a été démontré qu'après une pulvérisation foliaire par des conidies, les spores ont germé et plusieurs *Trichoderma* ont été observés (Nelson *et al.* 1998). Ainsi, quelques souches de *Trichoderma* peuvent coloniser la surface foliaire dans des conditions bien déterminées. D'après des travaux antérieurs, le biocontrôle ne devra pas dépendre du développement de *Trichoderma* sur la surface foliaire, comme la présence du pathogène peut induire une résistance systématique ou bien affecte négativement la croissance ou la pénétration du pathogène au niveau de la plante (Elad *et al.* 1999).

1.3 Généralités sur les *Fusarium*

1.3.1 Systématique du genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* a été découvert par Link en 1809 et délimité dans son sens actuel par Appell et Wollenweber (1910) et correspond à la forme de reproduction asexuée. Il appartient aux Deutéromycètes, ordre des Hyphales, famille des Tuberculariacées et constitue un groupe de champignons (Hyphomycètes) représenté dans la nature par une majorité d'espèces saprophytes ou parasites de faiblesse appartenant aux sous-groupe des hyphomycètes à conidiophores réunis en sporodochia, au sein desquelles peuvent se différencier des formes plus au moins spécialisées et douées d'une véritable virulence (Nasraoui 2000b). Le cycle de ce champignon est généralement divisé en deux périodes: une première réalisée par la forme imparfaite (reproduction asexuée) et une seconde caractérisée par une reproduction sexuée (forme parfaite). Il peut aussi être constitué d'une seule forme correspondant à la reproduction asexuée continue qui se renouvelle et se perpétue par les conidies, c'est le cas de *Fusarium roseum* var *culmorum*. Dans le cas d'une reproduction asexuée, les *Fusarium* produisent des macro-conidies pluricellulaires en forme de croissant, d'autres formes peuvent être aussi présentes, constituées par des micro-conidies unicellulaires, ovoïdes ou piriformes et des chlamydospores arrondies ou cylindriques (Booth 1977). La forme parfaite se rattache aux Hypocrécées, ordre des Sphaeriales et classe des Ascomycètes. La présence ou l'absence de macro- et micro-conidies, de chlamydospores ainsi que la couleur et la forme de *Fusarium* sont les caractères de classification utilisés couramment pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (Nasraoui 2000b).

1.3.2 Dégâts de la fusariose

Les espèces du genre *Fusarium* sont des pathogènes responsables des pertes économiquement importantes chez la majorité des cultures. Ils attaquent tous les organes végétatifs et reproducteurs des plantes (Gargouri 2003). Ces agents pathogènes peuvent causer la fonte de semis, la pourriture des racines et du collet (Pauvert 1984).

1.3.3 Fonte de semis (Seedling blight)

La fonte de semis est due à des semences contaminées et elle est fréquente dans les régions humides où la maladie de l'épi prédomine (Gargouri *et al.* 2001). Moins fréquemment, cette maladie peut être causée par l'inoculum présent dans le sol ce qui est généralement le cas des régions arides (Gargouri 2003). La maladie peut se traduire par des manques à la levée. En effet, la germination a eu lieu mais les racines meurent au cours de leur développement ou elles sont partiellement nécrosées. Les premiers symptômes apparaissent sur la jeune coléoptile qui porte des lésions nécrotiques, le parasite pénètre ensuite dans les racines primaires et les premières feuilles n'atteignent pas la surface du sol (Anatasoff 1920). La fonte de semis due au *Fusarium* se manifeste tardivement, elle est localisée dans les zones les plus sèches. Parfois, la maladie se traduit par le dessèchement brutal de jeunes plantules qui restent dressées. Dans le cas d'une infection sévère, les racines latérales avortent ou encore sont détruites dans un stade assez jeune (Mrabet 1998). La fonte de semis est responsable d'une réduction de rendement qui peut atteindre 17% (Gargouri 2003).

1.3.4 Pourriture des racines (Root rot ou common root rot)

La pourriture des racines appelée aussi la pourriture commune est une maladie qui apparaît chez les plantes âgées et se manifeste par une infection des parties souterraines. Elle est due à la présence de l'inoculum dans le sol, aux débris végétaux infectés ainsi qu'aux semences contaminées. L'infestation a lieu dans les régions où la pluviométrie est déficiente (Gargouri *et al.* 2001). La maladie cause la destruction des tissus des racines, du rhizome et de la partie souterraine de la tige. Les symptômes typiques se caractérisent par une coloration brune ou noire. Ce brunissement peut progresser vers le plateau de tallage et très peu vers la tige. Les symptômes peuvent se traduire, mais moins fréquemment que la pourriture du pied, en des épis blancs prématurés (Gargouri 2003).

1.3.5 Pourriture du pied (Foot rot ou dry land foot rot)

La pourriture du pied est une maladie grave des grandes cultures, céréales et plantes fourragères, dans les régions arides et semi-arides pouvant occasionner des pertes élevées du rendement. Les conditions climatiques de la Tunisie par exemple favorisent le développement de cette maladie (sol sec quand les plantes sont jeunes). En effet, selon les travaux menés par Ghodbane *et al.* (1974), les pertes du rendement dues à la fusariose étaient de l'ordre de 44%. Cette maladie est due principalement aux champignons présents dans le sol sous forme de chlamydospores, de mycélium et débris végétaux infestés enfouis dans la couche superficielle du sol. Les pathogènes pénètrent par le coléoptile, le rhizome ou les racines secondaires (Burgess *et al.* 1981). L'infection reste latente et ne se développe que si la plante se trouve dans les conditions de stress hydrique pendant ou juste après la floraison (Gargouri 2003). Lorsque l'attaque du collet est précoce, le champignon peut attaquer les différentes gaines et détruire la jeune plante.

1.3.6 Cycle biologique de la maladie

Le *Fusarium avenaceum*, responsable d'importants dégâts durant tout le cycle vital de la plante hôte, chez les légumineuses, est transmis essentiellement par les semences, mais peut aussi provenir du sol où il se conserve sous forme de spores durables. Parasitant les caryopses, le *Fusarium* peut être présent à la surface, soit à l'état de spores libres, soit sous forme de petites colonies mycéliennes. Plus fréquemment, il est interne et se localise dans le péricarpe ou plus profondément dans les téguments séminaux et l'embryon. Présent autour de ce dernier sous forme de mycélium, les caryopses germent et donnent des plantules qui présentent des faciès caractéristiques durant le cycle vital de la plante hôte (Champion 1997). Les plantules détruites par le parasite, en pré-émergence comme en post-émergence, constituent une source de contamination par des plantes voisines, c'est le premier foyer infectieux. En effet, le parasite édifié sur la plantule détruit des coussinets sporifères qui sont les spores entraînées par le vent et par la pluie. Ces spores vont infecter les autres plantes ou contaminer le sol.

Au cours des périodes successives de croissance jusqu'à celles de la reproduction de la plante puis la maturité des graines, le *Fusarium*, d'abord localisé au niveau des parties souterraines, se développe et sporule abondamment (Figure 3). Il constitue ainsi un deuxième foyer d'infection qui favorise la dissémination de la maladie aux plantes voisines. La maladie se perpétue, ainsi d'une année à une autre, soit par les caryopses infectés qui hébergent le parasite, soit par les spores formées sur la plante parasitée durant tout le cycle végétatif, soit enfin par contamination du sol (Mrabet 1998; Caron 2000).

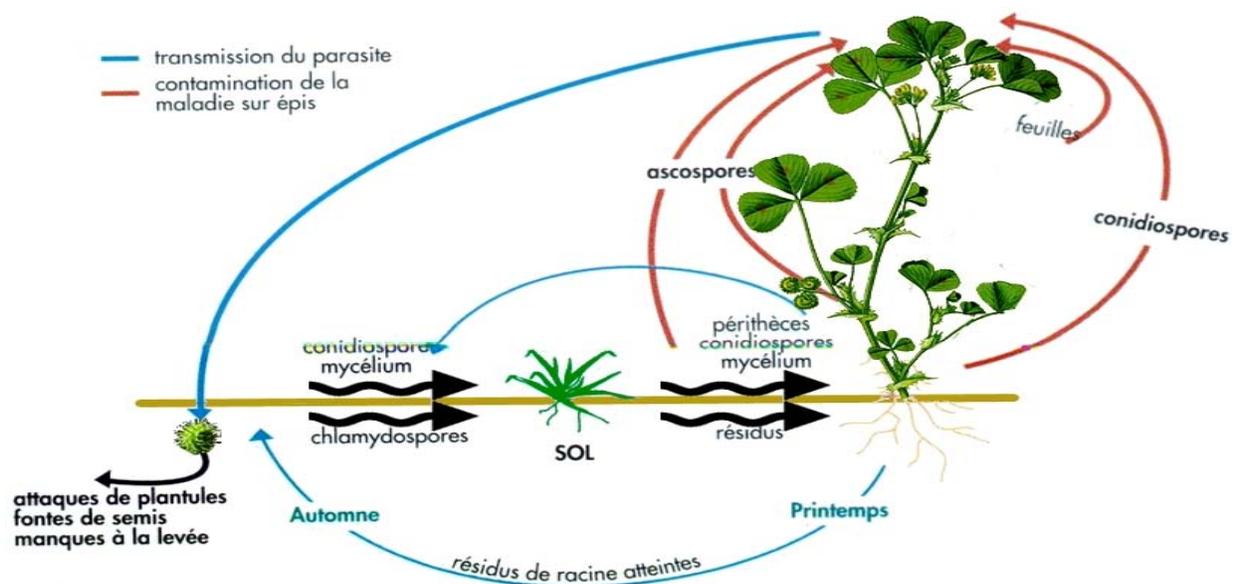


Figure 3 Cycle de *Fusarium spp.* : Illustration des différents modes d'action (Caron 2000, modifiée)

1.3.7 Pourriture des racines et du collet chez la luzerne causée par *Fusarium avenaceum*

Fusarium avenaceum est connu comme un pathogène affectant plusieurs cultures particulièrement la luzerne. Il a été démontré que *Fusarium avenaceum* est responsable de la pourriture des racines et du collet chez la luzerne. La pourriture des racines et du collet chez la luzerne, dont *Fusarium* est la cause principale, est un facteur significatif dans la réduction du rendement (Salter *et al.* 1994) et de la longévité chez la luzerne (Millergarvin *et al.* 1994). D'après une étude menée en Alberta par Hwang *et al.* (1989) dont l'objectif est d'identifier les maladies liées à la luzerne et causées par *Fusarium*, *F. avenaceum* a été démontré susceptible de causer la pourriture des racines et du collet de 21% de la culture de luzerne installée. Richard *et al.* (1985) ont ajouté que l'infection avec *Fusarium* affecte le processus physiologique chez la

luzerne et réduit son potentiel d'atteindre le maximum de résistance au froid. Il a été démontré que toutes les variétés de luzerne recommandées sont susceptibles de subir la pourriture des racines et du collet (Michaud *et al.* 1985). *F. avenaceum* a été démontré comme un champignon pathogène prédominant qui cause la nécrose au niveau des racines parmi une série d'espèces de *Fusarium* (Kalb *et al.* 1994). Dans le cadre de comparaison du degré de pathogénicité, *F. avenaceum* a été démontré le moins pathogène pour la luzerne par rapport à *F. Solani*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum* et *F. sambucinum* (Uddin *et al.* 1991). Des considérations primaires devront être prises durant les pratiques agronomiques comme la sélection de variétés résistantes aux conditions climatiques extrêmes, une fertilisation et découpage appropriés qui sont des facteurs prometteurs de la croissance chez la luzerne.

1.4 Luzerne

La luzerne (*Medicago sativa* L) est une herbe vivace de la famille des légumineuses qui mesure de 30 cm à 70 cm de hauteur. Elle est utilisée généralement pour l'alimentation des bétails. Elle a été utilisée par les arabes en matière d'élevage chevalin. Ce sont les premiers qui l'ont utilisée pour augmenter la valeur nutritive de l'alimentation destinée à leurs bétails. Elle constitue un bon apport en protéines. Sa culture étant relativement facile, son utilisation comme fourrage pour le bétail s'est rapidement répandue dans le monde entier (Lefrançois *et al.* 2009).

1.5 Problématique

Les fertilisants et les pesticides chimiques sont des menaces pour l'agriculture. En effet, ces produits affectent la fertilité des sols et changent la qualité des produits. Les rejets des industries alimentaires se sont accentués durant les dernières décennies et le problème de gestion de ces rejets s'est posé partout. L'utilisation de ces rejets comme milieux de culture pour les biopesticides et les biofertilisants est devenue un moyen pratique pour la production de biofertilisants et biopesticides à moindre coût, étant donné que la matière première (rejet = milieu de culture) est disponible en masse. Différents travaux dont le but est de produire des biofertilisants et des biopesticides ont été abordés et ont abouti à des bons résultats. Des études antérieures ont montré que la combinaison des différents produits à la fois est plus efficace qu'un seul produit. Le problème qui se pose dans la présente étude est comment avoir un produit biologique combiné de deux bioproduits à base de *Sinorhizobium meliloti* et de *Trichoderma viride* produit dans les eaux usées d'amidon. Comment produire une combinaison des deux bioproduits et comment l'appliquer sur les cultures concernées.

1.6 Objectifs de la recherche

L'objectif principal de ce projet est l'optimisation d'un mélange *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* pour la production d'un biofertilisant ou biopesticide combiné en évaluant la capacité des eaux usées d'amidon à supporter la croissance des microorganismes étudiés et en se basant sur des paramètres de production déjà optimisés (Ben Rebah 2001). Le mélange étudié est appliqué par la suite sur la luzerne pour évaluer son effet sur des paramètres bien précis. Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- Obtenir une meilleure combinaison du mélange *Trichoderma viride-Sinorhizobium meliloti*;
- Étudier l'efficacité du mélange sur l'amélioration de la croissance (biofertilisant);
- Étudier l'efficacité du mélange pour la lutte biologique contre les pathogènes (biocontrôle contre *Fusarium avenaceum*).

1.7 Hypothèses de travail

Les hypothèses de travail sont les suivantes :

- *Sinorhizobium meliloti et Trichoderma viride* sont deux microorganismes qui vivent en synergie;
- *Sinorhizobium meliloti et Trichoderma viride* augmentent la croissance chez les légumineuses en particulier la luzerne;
- En plus de son rôle comme améliorateur de croissance, *Trichoderma viride* est un agent de lutte biologique contre les maladies des racines causées par certaines espèces, telle que *Fusarium avenaceum*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Effets de l'interaction *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* sur la nodulation et la croissance

2.1.1 Production d'inocula à base de *Sinorhizobium meliloti*

La bactérie utilisée est *Sinorhizobium meliloti* souche A2 (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy, QC, Canada). Les eaux usées d'amidon ont été stérilisées à l'autoclave à 121°C pendant 15 min après avoir ajusté leur pH à 7 à l'aide de HCl, H₂SO₄ et NaOH. Les bactéries ont été cultivées sur un milieu solide (gélósé) à base de mannitol, dont la composition est citée ci-dessous, et d'extrait de levure (YMA: Yeast Mannitol Agar). La culture a été par la suite incubée dans une étuve à 30°C pendant 48 h. La souche a été conservée à 4°C pour des utilisations ultérieures.

Le milieu de culture YMA contient (g/L): K₂HPO₄: 0.5; MgSO₄.7H₂O: 0.2; extrait de levure: 1; NaCl: 1; Mannitol: 10; Agar : 15.

2.1.2 Préparation de l'inoculum et fermentation

Des Erlenmeyers de 500 ml ont été utilisés pour la préparation des inocula. Chaque Erlenmeyer contenait 100 ml de bouillon à base de mannitol et d'extrait de levure YMB (Yeast Mannitol Broth). Le YMB contient (g/L): K₂HPO₄: 0.5; MgSO₄.7H₂O: 0.2; extrait de levure: 1; NaCl: 1; Mannitol: 10.

Les bouillons de culture, dont le pH a été ajusté à 7, ont été stérilisés à l'autoclave (121°C, 20mn). Une fois refroidis, les bouillons ont étéensemencés avec un inoculum cultivé auparavant

sur la gélose (YMA) à l'aide d'un fil à boucle et ont été incubés pendant 24 h dans un incubateur agitateur (30°C, 200 rpm).

2.1.3 Culture d'une souche de *S. meliloti* dans les eaux usées d'amidon

La quantité d'eau d'amidon nécessaire pour la fermentation a été stérilisée dans des Erlenmeyers à l'autoclave (121°C, 20 min) après avoir ajusté son pH à 7 puis a été inoculée à l'aide du bouillon de culture préparé dans le milieu standard YMB selon une dose de 3% (v/v). Les Erlenmeyers ont été transférés par la suite dans un incubateur agitateur dans les mêmes conditions que celles du bouillon de départ et incubés pendant 72 h. Le comptage des cellules a été effectué par la technique de dénombrement sur milieu gélosé (YMA) enrichi de Congo rouge (0,25%), pour distinguer les colonies de la gélose, suite à une série de dilutions (NaCl 0.85%) appropriées selon la méthode de Ben Rebah *et al.* (2001). Le comptage a été fait en trois répétitions.

2.1.4 Production d'inoculant à base de *Trichoderma viride*

La souche utilisée est *Trichoderma viride* Persoon (ATCC : 9276). L'espèce *T. viride* a été inoculée dans un milieu synthétique standard (PDA) pendant 4-7 jours à l'obscurité à 26±1°C (35±2% humidité relative), puis conservée à 4±1°C. Les inocula ont été préparés dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 150 ml de bouillon à base de dextrose et de bouillon de patate (PDB). Ces bouillons ont été stérilisés à l'autoclave (121±1°C, 15 min) après avoir ajusté leur pH à 6±1. Après un refroidissement, ils ont étéensemencés avec la colonie déjà cultivée sur une gélose PDA, puis incubés pendant 48 h dans un incubateur agitateur (28±1°C, 250±5 rpm). Après 48 h d'incubation, le bouillon a été gardé à 4±1°C pour l'inoculation des milieux à base des eaux usées d'amidon. Des échantillons de 150 ml des eaux usées ont été stérilisés (121±1°C, 15 min) dans des Erlenmeyers de 500 ml après avoir ajusté leur pH à 6±1, puis inoculés (10% v/v) après

avoir été refroidis. Les Erlenmeyers ont été par la suite transférés dans un incubateur agitateur (96 h, 28±1°C, 250±5 rpm) et des prélèvements à des intervalles de 6-12 h ont été faits pour suivre la croissance de la souche cultivée (Bottomley *et al.* 1994; Verma 2007).

2.2 Tests de nodulation

2.2.1 Tests de nodulation en sachets de croissance

Les sachets de croissance sont des gaines en papier brun ayant un repli en haut qui permet de déposer les semences (megainternational-USA : dlarsonmega@yahoo.com). Ces sachets sont conçus pour des essais de germination et l'étude des interactions plante-microorganismes. Cette sorte de papier brun est plongée dans une enveloppe en plastique qui permet de mettre de l'eau dans le fond qui remontera par capillarité et répondra aux besoins des plantes. Ces sachets sont généralement stériles, mais une fois exposés à l'air, il faut les autoclaver en les couvrant avec du papier aluminium.

Stérilisation des graines

Des graines de luzerne cv. Saranac (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy, QC, Canada) ont été désinfectées en surface (alcool éthylique 95%, 2 min, hypochlorite de sodium NaOCl à 5%, 10 min; cinq rinçages ont été effectués avec de l'eau distillée stérile) (Ben Rebah 2001).

Solution nutritive

La solution nutritive stérile (sans azote) est composée comme suit (mg/L d'eau distillée) : 174 mg de K₂HPO₄, 136 mg KH₂PO₄, 5 mg de citrate de fer, 493 mg MgSO₄.7H₂O, 147 mg CaCl₂ 2H₂O et 1 ml de la solution de Hoagland (Tableau 4).

Tableau 4 **Solution de Hoagland et Arnon (1938)**

Produit	Quantité
H ₃ BO ₃	2.86 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.008 mg
H ₂ MoO ₄ H ₂ O (85%MoO ₃)	0.09 mg
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0.004 mg
H ₂ O	1000 ml

Germination des graines et inoculation

Des graines de luzerne cv. Saranac ont été désinfectées en surface (alcool éthylique 95%, 2 min) et semées dans des sachets de croissance (10/sachet) contenant 30 ml de solution nutritive chacun. Après 48 h de germination à l'obscurité et à 20°C, les plantules ont été éclaircies à 5 plantes/sachet, puis inoculées avec les bouillons préparés selon les traitements décrits au Tableau 5. Les sachets ont été transférés dans une chambre de croissance (photopériode de 16 h, température de 20°C le jour et 15°C la nuit) pour une durée de 30 jours. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine avec de l'eau distillée stérile.

Tous les essais ont été faits en 5 répétitions. Les doses des deux inoculums ont été de 10⁵ cellules/ml/plante.

Tableau 5 Traitements de bioinoculants appliqués à la luzerne lors d'un essai en sachets de croissance

Traitement	Microorganisme	Milieu de culture	Volume de bioinoculants (ml)	Volume d'eau (ml) ajouté pour compléter à 10 ml
T1	aucun	aucun	-	10
T2	Rhz	EUA	5	5
T3	Tri	EUA	5	5
T4	Rhz +Tri	EUA	2.5 ml de chacun	5
T5	Rhz+Tri (24h après)	EUA	2.5 ml de chacun	5
T6	Tri+Rhz (24h après)	EUA	2.5 ml de chacun	5
T7	Rhz	YMB	5	5
T8	Rhz	YMB+dilué dans l'EUA	5	5

Paramètres à mesurer

Après 4 semaines de croissance, on a déterminé le nombre de nodules, l'indice nodulaire (Tableau 6) et le poids sec du feuillage. On a aussi déterminé l'indice de maladie des racines dans les essais où les plantes de luzerne ont été inoculées avec le *Fusarium avenaceum*. L'indice nodulaire est une caractéristique de la croissance chez quelques légumineuses. L'indice nodulaire exprime la qualité de symbiose entre la plante et les microorganismes, c'est une valeur qualitative qui tient compte de la grosseur, du nombre et de la couleur des nodules. Elle se calcule comme le montre le Tableau 6.

Tableau 6 Critères et méthode de calcul pour évaluer l'indice nodulaire (Ben Rebah, 2001)

Grosueur des nodules	Gros 3 Moyen 2 Petit 1
Couleur des nodules	Rose 2 Blanc 1
Nombre de nodules	Pas de nodules 0 Peu de nodules 2 Beaucoup 3
Autres caractéristiques	Sur racine principale P Sur racine secondaire S Sur les racines P et S Forme allongée A Forme ronde R En groupe (grappe) G Isolé I
Indice nodulaire	A x B x C=18 maximum

2.2.2 Tests de nodulation en pots

Des essais de culture ont été réalisés dans des pots de 6'' (15 cm de diamètre) remplis d'un mélange stérile de terreau-promix. Les graines de luzerne désinfectées en surface ont été semées et pré-germées durant 48 h, puis on a procédé à un éclaircissage de façon à garder 5 plants/pot. Les différents traitements sont décrits au Tableau 7. Tous les essais ont été conduits en 4 répétitions, une dose de 10^5 cellules/plante, un volume de 10 ml/plante pour garder une certaine humidité et diminuer l'effet des dilutions que peut causer l'arrosage, soit un volume de 50 ml/pot. Un total de 28 pots a été utilisé. Après environ un mois, une coupe au stade de 10% de floraison a été effectuée pour déterminer l'indice nodulaire et le poids sec des racines. Les conditions de croissance sont les mêmes que pour les sachets de croissance.

Tableau 7 Tests d'efficacité de *S. meliloti* et *T. viride* sur la luzerne

Traitement	Microorganisme	Milieu de culture	Volume de bioinoculants (ml)	Volume d'eau (ml) Ajouté pour compléter à 10
T1	aucun	-	-	10
T2	Rhz	EUA	5	5
T3	Tri	EUA	5	5
T4	Rhz +Tri	EUA	2.5 ml de chacun	5
T5	Rhz	YMB	5	5
T6	Tri	PDB	5	5
T7	Rhz+Tri	YMB-TPDB	2.5mL de chacun	5

Tests de nodulation avec forte dose de *S. meliloti* (10^8 UFC/ml/plante)

Suite aux résultats des premiers tests indiqués ci-dessus, d'autres tests ont été faits en augmentant la concentration du *S. meliloti* (10^8 UFC/ml/plante) en suivant les traitements mentionnés au Tableau 7.

2.3 Étude de l'effet du mélange *S. meliloti* - *T. viride* en lutte biologique contre *F. avenaceum*

Pour les essais de lutte biologique contre les maladies de racines de la luzerne, l'espèce *Fusarium avenaceum* SRSF 411 (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy, QC, Canada) isolée au Québec des racines de luzerne atteintes de pourritures, a été utilisée. Le pouvoir pathogène de cet isolat a d'abord été vérifié dans un essai en boîtes de pétri, puis dans des sachets de croissance.

Des inocula de *F. avenaceum* ont été faits comme suit :

- Culture de la souche *F. avenaceum* dans un milieu solide PDA durant 7 jours à 20-24°C;
- Inoculation d'un milieu stérile de PDB avec la culture déjà produite dans le PDA;
- Transfert de l'inoculum dans un incubateur agitateur pour 4 jours à 20-24°C (Nygaard *et al.* 1995).

2.3.1 Vérification du pouvoir pathogène du *F. avenaceum* chez la luzerne

Préparation des graines

Des graines stériles de luzerne (Saranac) ont été enrobées avec du *S. meliloti* (10^8 UFC/ml) (Bottomley *et al.* 1994) à une dose de 1 ml/1.5 g de graines avec du sorbitol comme agent adhésif. D'autres graines ont été traitées avec un bouillon de *Trichoderma* (10^5 UFC/ml) avec une dose de 1 ml/1.5 g de graines. Le PVP (25%) a été utilisé comme agent adhésif à une dose de 2% du volume du bouillon. Les graines traitées ont été laissées pour sécher sous la hotte à flux laminaire pendant 12 h.

Semis

Vingt-cinq graines stériles de luzerne (Saranac) ont été placées à égale distance dans la boîte de Pétri à base d'eau gélosée préalablement inoculée avec *Fusarium*. Un témoin consiste à placer des semences dans l'eau gélosée non inoculée avec le *Fusarium* pour voir l'influence de ce dernier sur la germination. D'autres boîtes ont été inoculées avec *Trichoderma*, puis placées dans un incubateur à 18°C. Le taux de germination a été évalué cinq jours après le semis (Altier 1995).

2.3.2 Évaluation du potentiel de lutte biologique

Des graines stériles de luzerne ont été pré-germées dans des sachets de croissance durant 48 h, puis un éclaircissage a été réalisé de façon à garder cinq plants/sachet. Les traitements sont décrits au Tableau 8.

Tableau 8 Évaluation du potentiel de lutte biologique

Traitement	Microorganisme	Milieu de culture	Volume de bioinoculants (ml)	Volume d'eau (ml) ajouté pour compléter à 10
T1	Rhz	EUA	5	5
T2	Rhz +Tri	EUA	2.5 ml de chacun	5
T3	Fus	YMB	5	5
T4	Rhz + Fus	EUA-PDB	5	5
T5	Rhz+Tri+Fus	YMB-PDB	2.5mL de chacun	2.5
T6	Rhz+Tri (pur, 0.5 ml/plante) +Fus	EUA-PDB	2.5mL de chacun	2.5
T7	Rhz+Tri (pur, 1 ml/plante) +Fus	EUA-PDB	2.5mL de chacun	2.5

Les trois *inocula* (*Sinorhizobium*, *Trichoderma*, *Fusarium*) ont été appliqués simultanément. Tous ces essais sont conduits en cinq répétitions selon une dose de 10^5 UFC/ml (pour *Trichoderma* et *Fusarium*), 10^8 UFC/ml (*Sinorhizobium*). Après quatre semaines de croissance, le taux de germination, l'indice nodulaire, le poids sec du feuillage et l'indice de maladie ont été déterminés. L'indice de maladie est décrit comme le montre le Tableau 9.

Tableau 9 Échelle des indices de pourriture des racines

Indice de pourriture	Surface brunie ou attaquée (%)	Surface saine (%)
0	0	
1	1-3	
2	3-10	
3	10-25	
4	25-50	
5	50-75	25-50
6	75-90	10-25
7	90-97	3-10
8	97-99	1-3
9	100	0

La technique consiste à déterminer s'il y a plus de 50% ou moins de 50% de la surface (ou de l'ensemble des racines) qui est atteinte de maladie ou de brunissement. Si c'est moins, l'indice sera de 4 ou moins et on continue notre évaluation en considérant les parties atteintes de brunissement. Si la surface brune est plus de 50%, l'indice sera de 5 ou plus et on continue notre évaluation en considérant cette fois les parties saines. En réalité, la méthode des indices de pourritures de racines est un hybride entre la méthode Horsfall et Barratt (1945) et une adaptation de celle de Couture (1980). La première était constituée d'une échelle de 0 à 11, alors que celle de Couture est de 0 à 9. La méthode de Couture a consisté à répartir différemment les écarts de % de maladies de chaque indice de 0 à 9. De plus, la méthode de Couture a été développée pour les maladies des parties aériennes, mais a été adaptée pour les racines. L'échelle de Horsfall et Barratt a déjà été utilisée pour noter des indices de pourriture des racines de la luzerne par Michaud et Richard (1985).

2.3.3 Comparaison de l'efficacité du *T. viride* et d'un fongicide de synthèse comme moyen de lutte contre le *F. avenaceum*

L'efficacité de *T. viride* à réduire la pourriture des racines chez la luzerne causée par *F. avenaceum* a été comparée à celle du fludioxonil (Maxim 480, Syngenta Crop Protection Canada, Inc) selon la méthode de Hwang *et al.* (2006). Ce fongicide a été appliqué aux graines de luzerne à la dose de 0,040 g/ml/kg de graines. Les traitements sont décrits au Tableau 10.

Tableau 10 Comparaison de l'efficacité du *Trichoderma viride* et d'un fongicide de synthèse

Traitement	Microorganisme	Milieu de culture	Volume de bioinoculants (ml)	Volume d'eau (ml) ajouté pour compléter à 10
T1	Rhz	EUA	5	5
T2	Rhz +Tri	EUA	2.5 ml de chacun	5
T3	Fus	YMB	5	5
T4	Rhz + Fus	EUA-PDB	5	5
T5	Rhz+Tri+Fus	YMB-PDB	2.5mL de chacun	2.5
T6	Rhz+Tri (pur) +Fus	EUA-PDB	2.5mL de chacun	2.5
T7	Rhz+Tri +Fus (10x dilué)	EUA-PDB	2.5mL de chacun	2.5
T8	Rhz+Maxim	EUA	2.5mL de chacun	5
T9	Rhz+Maxim+Fus	EUA-PDB	2.5mL de chacun	5

2.4 Dispositif expérimental et analyses statistiques

Les essais se sont déroulés au centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Selon un dispositif en bloc complètement aléatoire (BAC) avec huit traitements (inoculants) et trois milieux de culture. Chaque milieu de culture constituait un bloc et dans chaque bloc huit traitements étaient appliqués. Étant donné qu'on va procéder à une analyse de la variance, des tests de normalité et d'homogénéité s'avèrent de grande importance pour valider l'ANOVA, vu que cette dernière suppose l'égalité des variances et la normalité des populations d'origine. Il est donc hautement recommandé de normaliser les données aussi bien que possible pour réduire l'asymétrie. En résumé, parmi les méthodes que nous avons examinées, les meilleures pour tester l'homogénéité des variances sont, en mode univariable, les tests de Bartlett et de Brown-Forsythe. Les données devraient être transformées en logs, et soumises au test de Bartlett permutatif ou au test de Brown-Forsythe. En effet, de nombreuses méthodes d'analyse statistique, et notamment le puissant groupe des statistiques paramétriques, se basent sur l'hypothèse de normalité: la distribution de fréquences de certaines variables utilisées est supposée conforme à la loi normale. Cette conformité n'est souvent pas assurée dans le cas des données écologiques brutes. Le chercheur a donc deux choix possibles: soit il a recours à des méthodes statistiques qui ne requièrent pas la normalité des données (comme les méthodes non paramétriques, ou les permutations, lorsqu'il y en a de disponibles pour réaliser l'analyse souhaitée), soit il normalise ses données. Le type de transformation normalisatrice choisie dépend de l'allure de la distribution de fréquences des données brutes. Il faut aussi remarquer que les transformations normalisatrices courantes possèdent la propriété importante de réduire l'hétéroscédasticité des données, c'est-à-dire de stabiliser leur variance (en d'autres mots encore,

de rendre leur variance indépendante de la moyenne et plus constante sur l'ensemble de l'échantillon).

Dans notre cas, les données suivent une distribution contagieuse: ce type de données est très courant en écologie, puisque la plupart des organismes vivants présentent une répartition agrégée. Les données suivent alors une distribution lognormale ou une distribution binomiale négative. Malheureusement, la normalisation est souvent difficile en raison d'un nombre excessif de zéros. Les distributions de fréquences des données brutes sont fortement asymétriques à droite: les classes représentant les valeurs faibles (de zéro à quelques individus pour des comptages d'effectifs) sont très surreprésentées, et quelques éléments contiennent un très grand nombre d'individus. On peut tenter la transformation logarithmique.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS (Version 9.13). Pour toutes les données, des analyses de variance par la procédure GLM, méthode de Least squares means (Lsmeans) ont été conduites. Le modèle linéaire général utilisé incluait le facteur fixe « traitement » après avoir testé son effet sur les variables mesurées.

Le modèle linéaire général utilisé est le suivant :

Équation 1 $Y_{ij} = \mu + Tr_{ti} + e_{ij}$

Avec:

Y_{ij} : la variable mesurée d' $i^{\text{ème}}$ traitement sur le $j^{\text{ème}}$ plant, μ : moyenne des observations, Tr_{ti} : effet de $i^{\text{ème}}$ traitement, et e_{ij} : effet aléatoire résiduel.

3. RÉSULTATS

3.1 Effets du *Trichoderma* sur la nodulation et la croissance en sachets de croissance

T. viride a diminué le nombre des nodules (Figure 4) ainsi que leur grosseur, ce qui explique la diminution de l'indice nodulaire. Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse suivante : *Trichoderma* nuit au développement des *Sinorhizobium*. En effet, le mauvais fonctionnement du *S. meliloti* peut s'expliquer par le fait que *Trichoderma* colonise les sites de fixation et ne laisse aucune chance au *S. meliloti* pour se fixer sur les racines de la luzerne.

La Figure 4 montre le même indice nodulaire pour les traitements à base de *Sinorhizobium* produit dans les eaux usées d'amidon (EUA), ainsi que pour le traitement à base de *Sinorhizobium* produit dans son milieu synthétique YMB. Les EUA présentent un milieu économique de production de *Sinorhizobium* et de *Trichoderma*.

Selon les analyses statistiques, on a classé les différents traitements en quatre groupes dont le premier groupe est composé des traitements à base de *S. meliloti* produit soit dans les EUA soit dans son milieu standard (YMB). Le deuxième groupe est composé essentiellement des deux espèces *Sinorhizobium* - *Trichoderma* inoculées simultanément, le troisième groupe est composé du mélange *Sinorhizobium* - *Trichoderma* avec une application de *Trichoderma* retardée de 24 h et le quatrième groupe est composé essentiellement du témoin (non inoculé), du traitement à base de *Trichoderma* seul et du traitement à base de *Trichoderma* suivi de *Sinorhizobium* après 24 h.

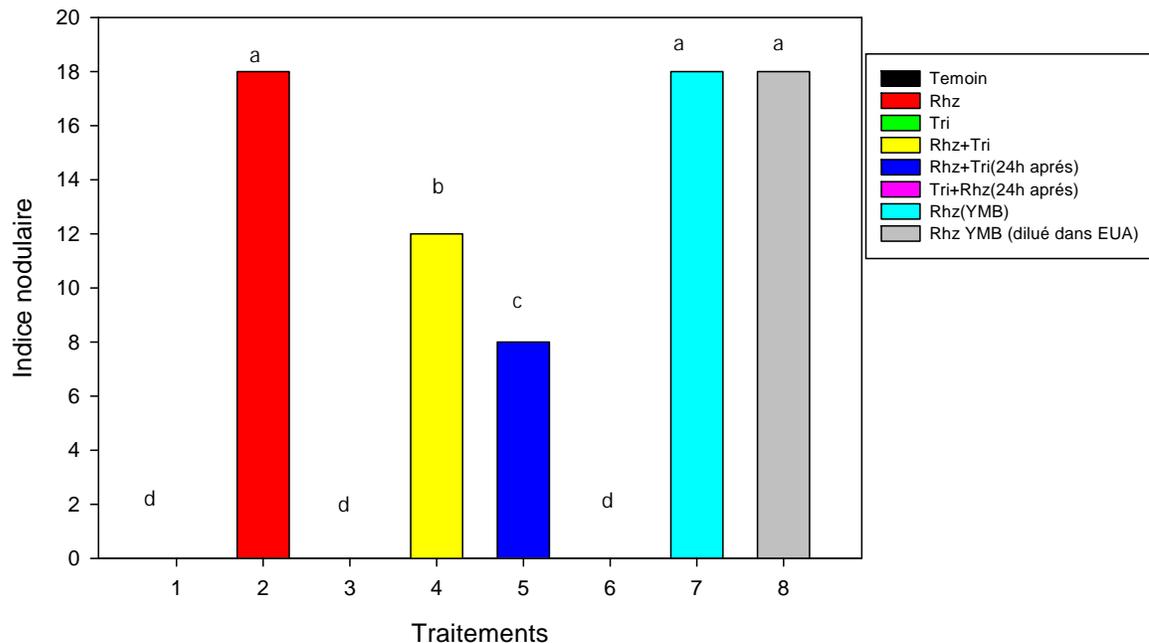


Figure 4 Effets de *Trichoderma viride* sur la nodulation de la luzerne

NB Les moyennes avec la même lettre ne sont pas différentes avec une probabilité de 95% selon le test de Duncan.

La Figure 5 montre que le poids sec suit la même tendance que l'indice nodulaire (Figure 4). Le traitement avec *Sinorhizobium* dilué dans les EUA semble être très performant pour le poids sec ce qui pourrait être aussi dû aux constituants des EUA qui pourraient favoriser la croissance végétative ou bien qui servent à mieux protéger les souches inoculées. On a constaté que la production de *Sinorhizobium*, ainsi de *Trichoderma* dans les EUA est aussi efficace que la production dans les eaux usées municipales, dont la production de différentes souches a été optimisée (Ben Rebah *et al.* 2002; Verma 2007).

D'après les résultats de l'analyse de la variance (procédure GLM), on a remarqué une différence significative entre les différents traitements (Figure 5). En effet, le test de comparaison des moyennes (test Student) a permis de classer les traitements en cinq groupes dont le traitement à base de *S. meliloti* produit dans le bouillon de mannitol et dilué dans les EUA a eu la moyenne la plus élevée (0.17g). Ce traitement est significativement différent de celui à base de *S. meliloti* produit dans son milieu standard et non dilué dans les EUA. Le poids moyen le plus faible est donné par le traitement à base de *Trichoderma* et *Sinorhizobium* après 24 h (0.02 g). Ce traitement n'est pas significativement différent des traitements témoin et *Trichoderma* qui font partie du quatrième groupe. Le deuxième groupe est constitué par les traitements à base de *Sinorhizobium* cultivé dans les EUA, le troisième groupe est constitué par les traitements *Sinorhizobium* - *Trichoderma* et *Sinorhizobium* - *Trichoderma* (24 h après) qui se comportent de la même manière, le reste des traitements constitue le cinquième groupe.

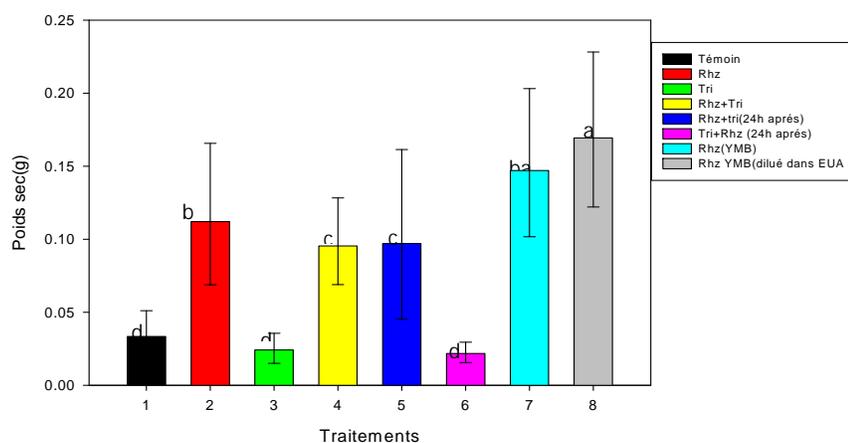


Figure 5 Effet du *Trichoderma viride* sur le poids sec du feuillage chez la luzerne

3.2 Tests sur l'effet du *T. viride* sur la luzerne en pots

Les tests en pots n'ont pas été très précis puisque les témoins non inoculés avec Rhz ont nodulé, ceci est probablement dû à une contamination entre les pots.

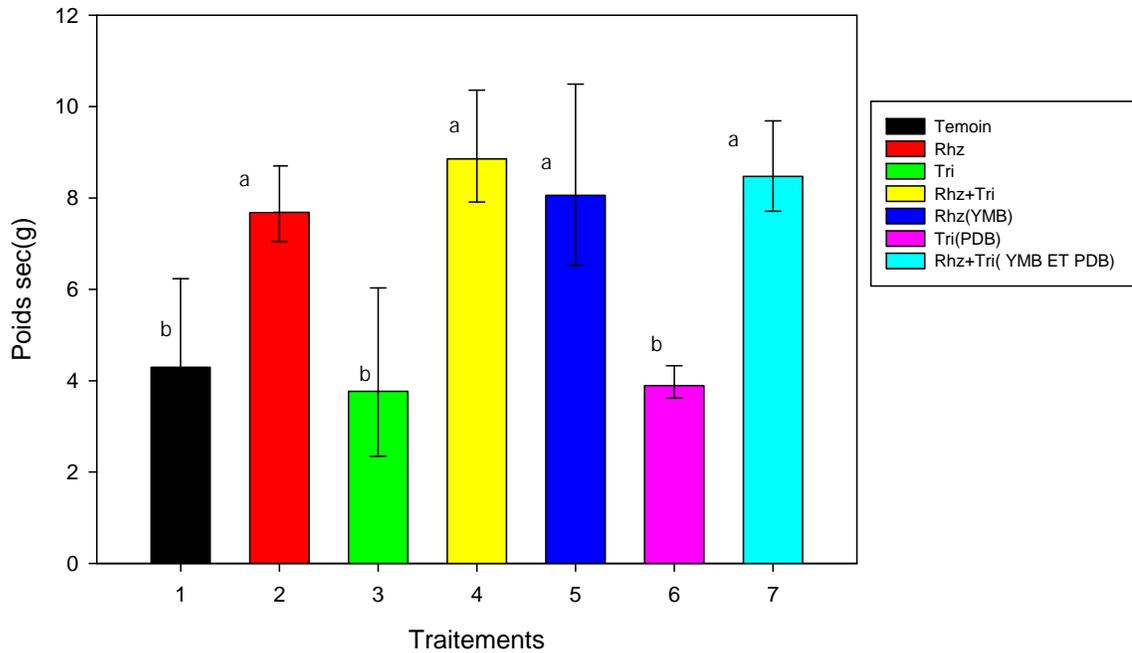


Figure 6 Effet du *Trichoderma viride* sur le poids sec du feuillage chez la luzerne en pots

Concernant l'indice nodulaire, la récupération des nodules n'était pas facile; il y a eu une perte qui a rendu les résultats moins précis en plus les témoins non inoculés ont été contaminés. On s'est contenté du poids sec du feuillage. Ce test a confirmé quelques résultats obtenus en sachets de croissance. En effet, le poids sec du feuillage a la même tendance dans les tests en pots que dans les tests en sachets pour les mêmes traitements. Par exemple, les traitements à base de *Sinorhizobium* produits dans les EUA ainsi que dans YMB augmentaient la croissance par

rapport au témoin non inoculé. La Figure 6 montre que les traitements à base de Rhz ont produit des effets différents sur le poids sec et les traitements appliqués sont classés en deux groupes. Le premier groupe est constitué par les traitements à base de *S. meliloti* seul ou en mélange avec *Trichoderma*, produits dans les EUA ou dans leurs milieux standards. Le deuxième groupe est constitué par le traitement témoin non inoculé et les deux traitements de *Trichoderma* seul produit dans les EUA et dans son milieu standard (PDB). Les traitements ont eu le même effet sur le poids sec du feuillage dans les essais en pots que dans les essais en sachets de croissance. Le test en pot est plus réaliste puisqu'il simule les conditions au champ et confirme que *Trichoderma* n'est pas un améliorateur de croissance chez la luzerne. Ceci est en accord avec les travaux de Bailey *et al.* (1998). Le *Trichoderma* ne semble pas être pathogène à la luzerne car il n'a pas fait diminuer sa croissance.

3.3 Tests de nodulation en sachets de croissance avec forte dose de *Sinorhizobium meliloti*

Suite aux résultats du premier test en sachets de croissance, on s'est aperçu que l'application du *Sinorhizobium* et *Trichoderma* à égale dose ne semblait pas être efficace en termes du poids sec végétatif. En effet, on s'attendait à une amélioration de l'indice nodulaire de la luzerne ainsi que sa croissance en ajoutant *Trichoderma* ce qui n'a pas été le cas. On a procédé à un deuxième test en augmentant la concentration de *S. meliloti* (10^8 UFC/ml/plante) tout en gardant la même concentration de *T. viride* (10^5 UFC/ml/plante).

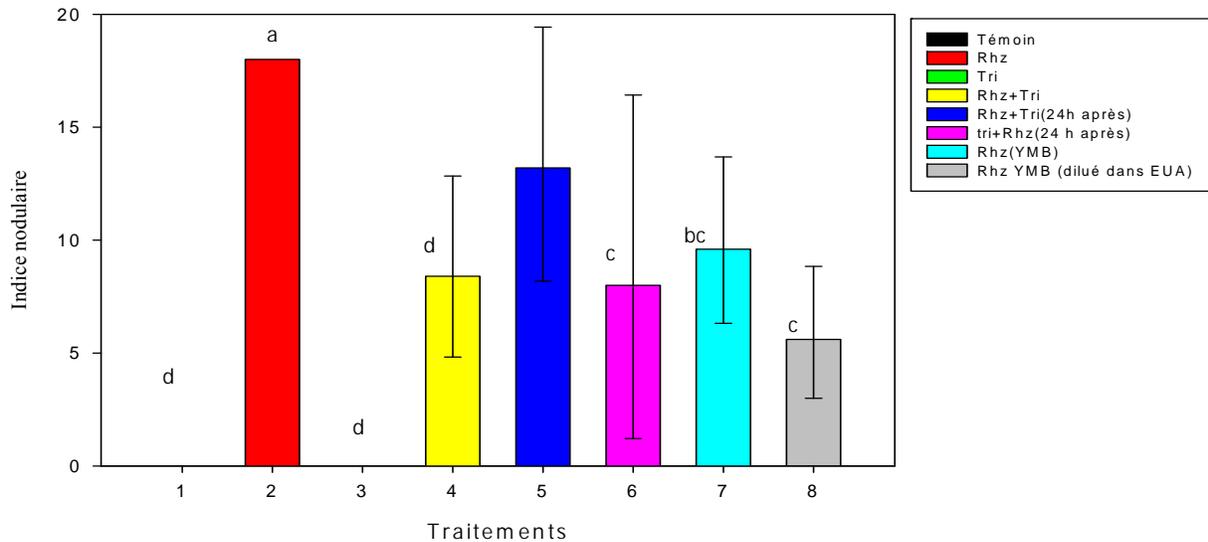


Figure 7 Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec différents mélanges de *Trichoderma* et de *Sinorhizobium* lors d’essais en sachets

La Figure 7 montre que l’effet de *S. meliloti* à forte dose domine celui de *T. viride*. Ceci est illustré par la comparaison du traitement 6 de la Figure 7 avec celui de la Figure 4. Les nodules se sont formés même si *S. meliloti* est appliqué 24 h après le *Trichoderma*. L’indice nodulaire a monté à 8 unités (6, Figure 7) avec la concentration élevée de *Sinorhizobium*, alors qu’il était nul avec l’application des deux inocula à égale concentration. En se basant sur ces résultats, on peut déduire que l’application de ces deux souches serait préférable en appliquant *T. viride* après le *Rhizobium* (temps à optimiser). Toutefois, vu la complexité de l’inoculation à l’échelle du champ, il est conseillé d’inoculer en une application simultanée pour les deux microorganismes.

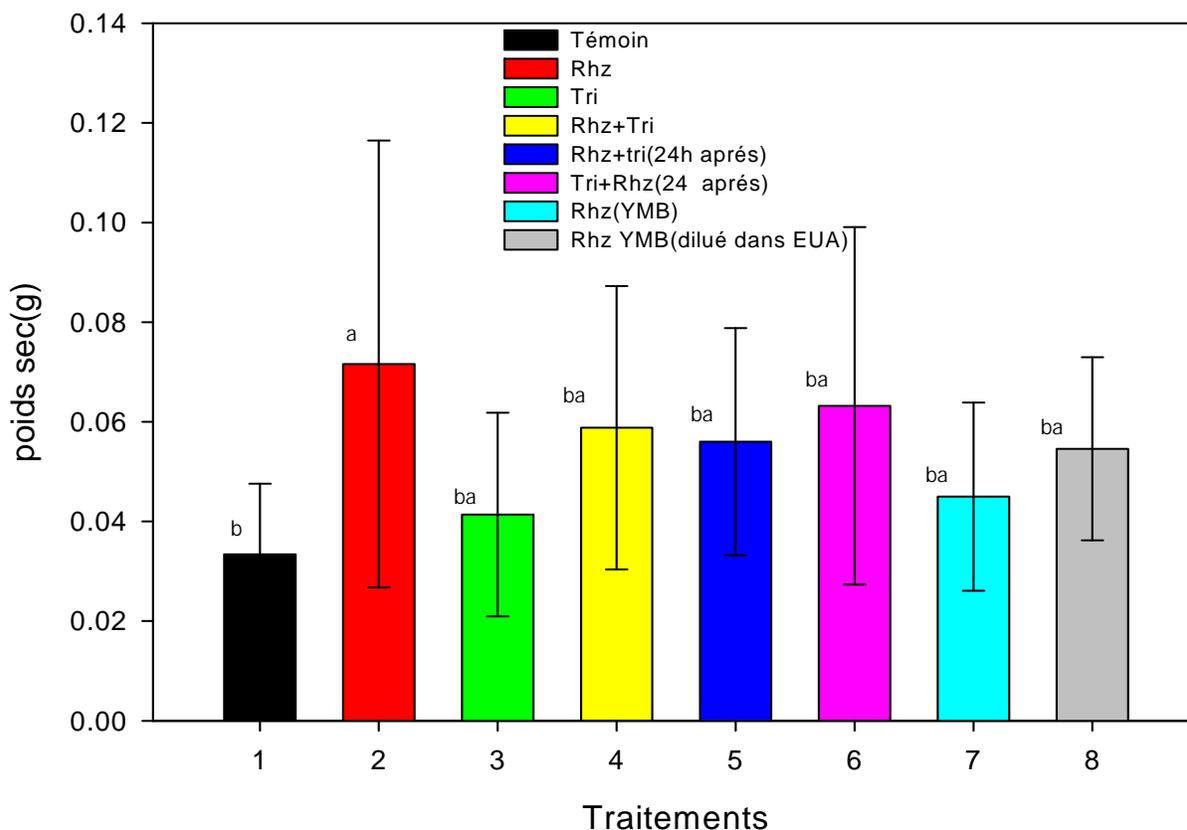


Figure 8 Poids sec du feuillage de la luzerne inoculée avec différents mélanges de *Trichoderma* et de *Sinorhizobium* lors d'essais en sachets

D'après les résultats de la Figure 8, le traitement à base de *Sinorhizobium* produit dans les EUA est classé en premier ordre et révèle les meilleurs résultats. En effet, le test de comparaison des moyennes (test Student) a permis de classer les traitements en trois groupes parmi lesquels le traitement *Sinorhizobium* a eu la moyenne la plus élevée (0.07 g) et le poids moyen le plus faible est donné par le témoin (0.03 g), alors que la troisième classe est constituée par les traitements {Tri + Rhz (24h après), Rhz - Tri, Rhz - Tri (24h après), Rhz (YMB dilué dans les EUA) et Rhz (YMB)} qui ont donné des valeurs non significativement différentes.

3.4 Interaction de *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* avec *Fusarium avenaceum*

En se référant à des travaux antérieurs (Hwang *et al.* 1989), on a choisi un pathogène, *Fusarium avenaceum*, dont on a testé son effet sur la luzerne, puis on a appliqué *Trichoderma* pour voir s'il agit comme agent de lutte biologique. Des tests préliminaires *in vitro* ont confirmé que *F. avenaceum* cause la pourriture des racines et du collet. Cependant, l'application de *Trichoderma* s'est avérée intéressante d'après les tests préliminaires (Figure 9). Ce champignon a limité la propagation du pathogène au niveau du milieu de culture sur des boîtes de Pétri (PDB). En se basant sur les résultats de ces tests préliminaires, des tests en sachets de croissance ont été menés en appliquant à chaque fois une combinaison des trois souches (*S. meliloti*, *T. viride*, *F. avenaceum*) avec les concentrations retenues depuis le deuxième test (Rh_z 10⁸ UFC/ml, Tri 10⁵ UFC/ml et Fus concentré puis 10x dilué). D'après les résultats des tests préliminaires indiqués par la Figure 10a, on remarque que *Fusarium* était répandu sur toute la superficie de la boîte par contre l'application de *Trichoderma* limite sa propagation. En effet, la croissance de *Fusarium* sous l'effet de *Trichoderma* est restée locale durant plus qu'un mois, durée nécessaire pour une croissance normale de la luzerne. La Figure 10b montre différents tests avec *Fusarium* sur la luzerne, on a remarqué que lorsque le *Fusarium* est appliqué 48 h avant le semis, les graines ne sont plus capables de germer, ceci confirme le pouvoir pathogène du *Fusarium*. De plus, on a remarqué une nécrose sur les racines des plantes de luzerne dont l'intensité dépend de la concentration de *Fusarium* (dilué ou pure).

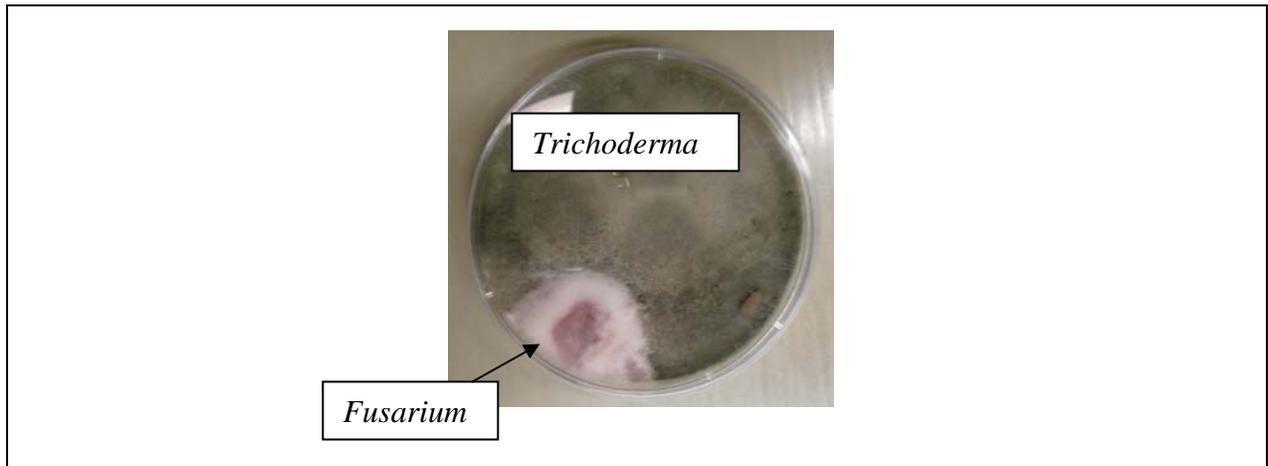
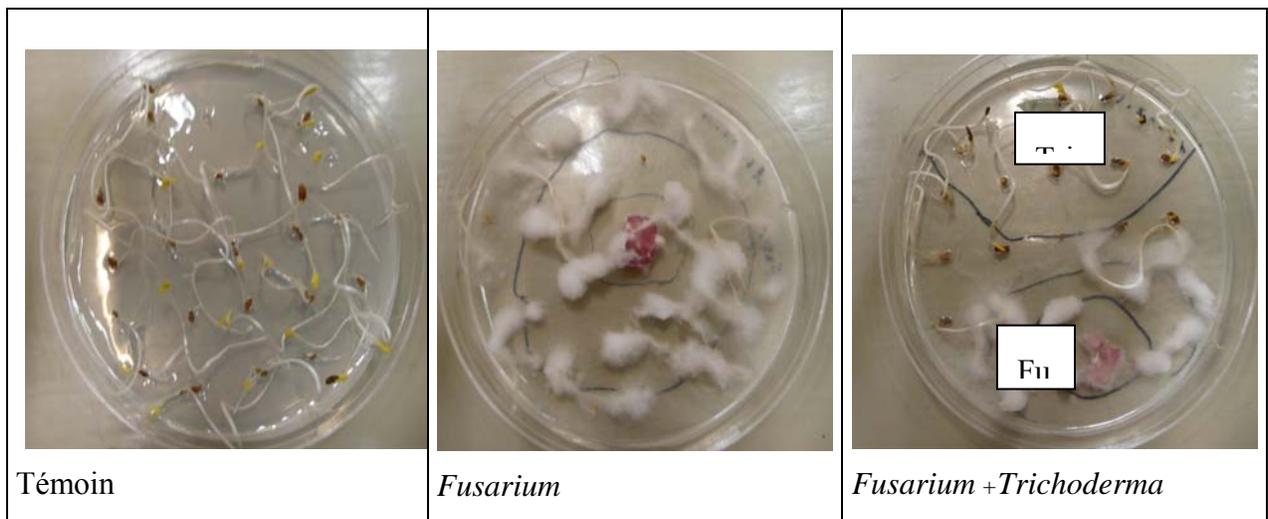
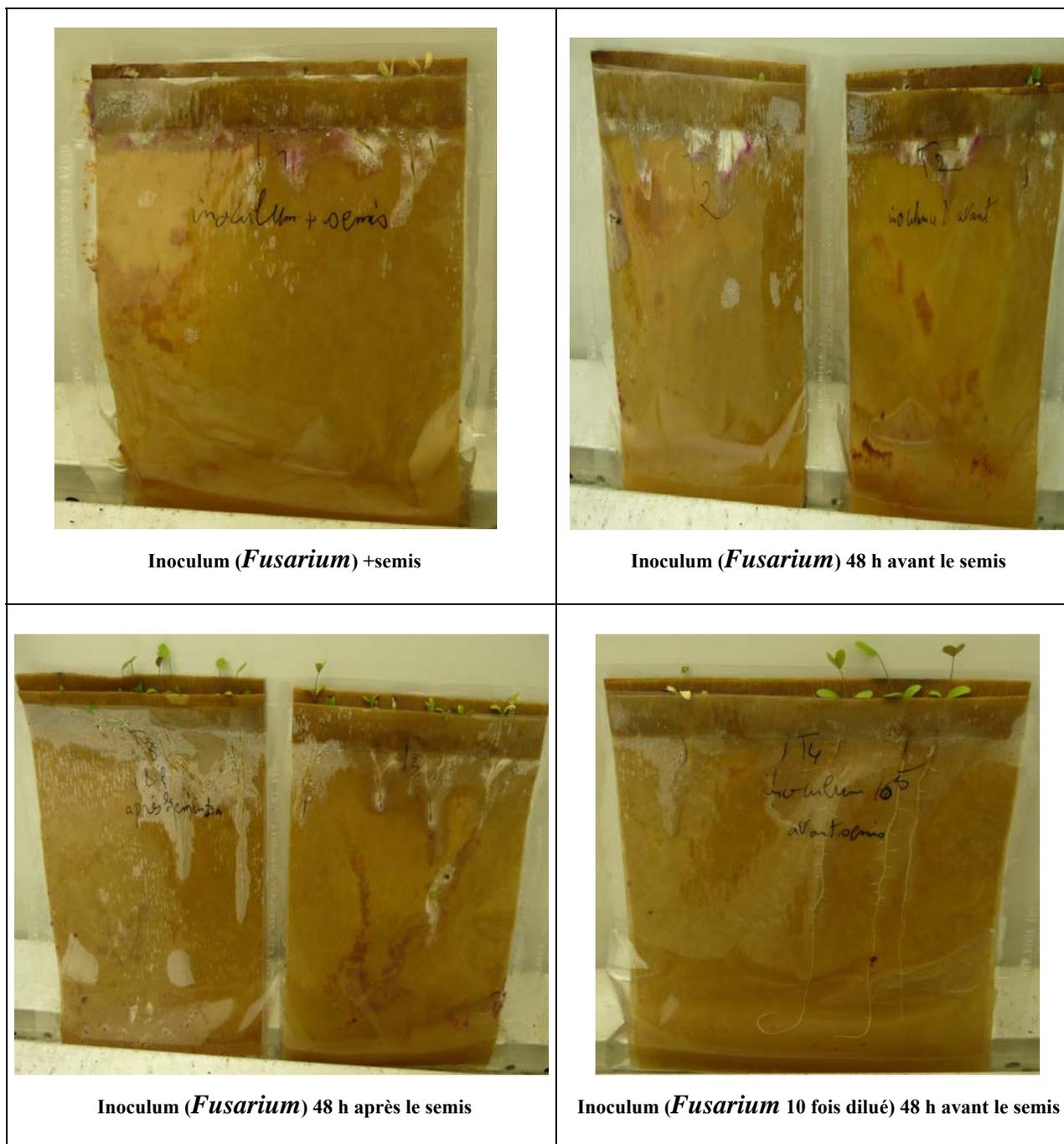


Figure 9 Test *in vitro* de 1 mois: *Trichoderma* + *Fusarium*



a) En boîte de Pétri



b) En sachet de croissance

Figure 10 Vérification du pouvoir pathogène du *Fusarium avenaceum* chez la luzerne. a : en boîte de Pétri; b : en sachet de croissance

3.5 Infection de la luzerne avec le *Fusarium avenaceum* en pots et pouvoir de biocontrôle chez *Trichoderma viride*

D'après les résultats présentés à la Figure 11a, on remarque les mêmes effets inhibiteurs de *Trichoderma* sur la nodulation comme dans les tests précédents. *Fusarium* était pathogène chez la luzerne en comparant les traitements 1 et 4, on remarque une grande baisse de l'indice nodulaire. En effet, *Fusarium* a causé une baisse de l'indice nodulaire de la luzerne d'environ 13 unités lorsqu'il a été appliqué avec *Sinorhizobium*, soit une baisse de 73% de l'indice nodulaire. L'application de *Trichoderma* et de *Sinorhizobium* aux plantes inoculées avec *Fusarium* était efficace contre l'effet pathogène de *Fusarium*. En effet, l'ajout de *Trichoderma* a amélioré l'indice nodulaire de 78% par rapport au traitement à base de *S. meliloti* et de *F. avenaceum*. *Trichoderma* a tendance à s'opposer à l'effet pathogène de *Fusarium* et à augmenter l'indice nodulaire par rapport au traitement à base de *S. meliloti* et de *F. avenaceum* même si les différences ne sont pas significativement différentes. Ceci est probablement dû au fait que l'indice nodulaire est un paramètre semi-quantitatif ce qui n'est pas aussi précis. Dans le but d'optimiser la concentration de *Trichoderma* à appliquer pour lutter contre les pathogènes, on a appliqué *Trichoderma* à forte dose (bouillon pur), les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessus (traitements 6 et 7 – Figure 11). D'après ces résultats, l'application de *Trichoderma* pure n'a pas d'effet bénéfique, ceci est en faveur d'une utilisation fiable et économique de cet agent de lutte biologique afin de rendre un tel projet agricole rentable en minimisant l'application de tout agent de traitement et prévention contre les maladies. Ce test a aussi prouvé que *T. viride* est un agent de lutte biologique lorsqu'il est appliqué sur la luzerne. On a vérifié avec ce test que *T. viride* n'est pas un agent d'amélioration de croissance chez la luzerne.

L'indice de maladie consiste à évaluer le pourcentage de la surface racinaire qui est brunie par la maladie. Cet indice est généralement maximal lors d'une application du phytopathogène *F. avenaceum*. D'après la Figure 11b, on remarque que l'application de Rhz (traitement 4) a fait diminuer l'indice de maladie par rapport aux plantes inoculées avec le *Fusarium* seul (T3). Cette observation est en accord avec les travaux de Tan (1986) et Tu (1978) qui ont démontré que le *S. meliloti* aide la luzerne à résister contre les pathogènes. L'application de *T. viride* a fait diminuer la maladie causée par le *F. avenaceum*, ceci est indiqué par la diminution de l'indice de maladie pour le traitement 5 (Rhz+Tri+Fus) alors que l'application de *Trichoderma* concentré (traitement 6) semble moins efficace.

Le poids suit la même tendance que l'indice nodulaire. Le poids sec et l'indice nodulaire sont inversement proportionnels à l'indice de maladie. En effet, plus l'indice de maladie est faible, plus l'indice nodulaire est élevé. Par conséquent, le poids sec est élevé. D'après la Figure 11c, on remarque que l'application de *Trichoderma* a une tendance minime à faire augmenter le rendement en poids sec végétatif suite à la limitation de la maladie au niveau de la zone racinaire. En effet, la tendance de *Trichoderma* à protéger la luzerne contre le *Fusarium* est visible pour les trois paramètres mesurés lorsque l'on compare les traitements 4 et 5. La diminution de l'effet bénéfique de *Trichoderma* à forte dose serait que le *Trichoderma* devient nuisible au *Rhizobium* car il est trop abondant.

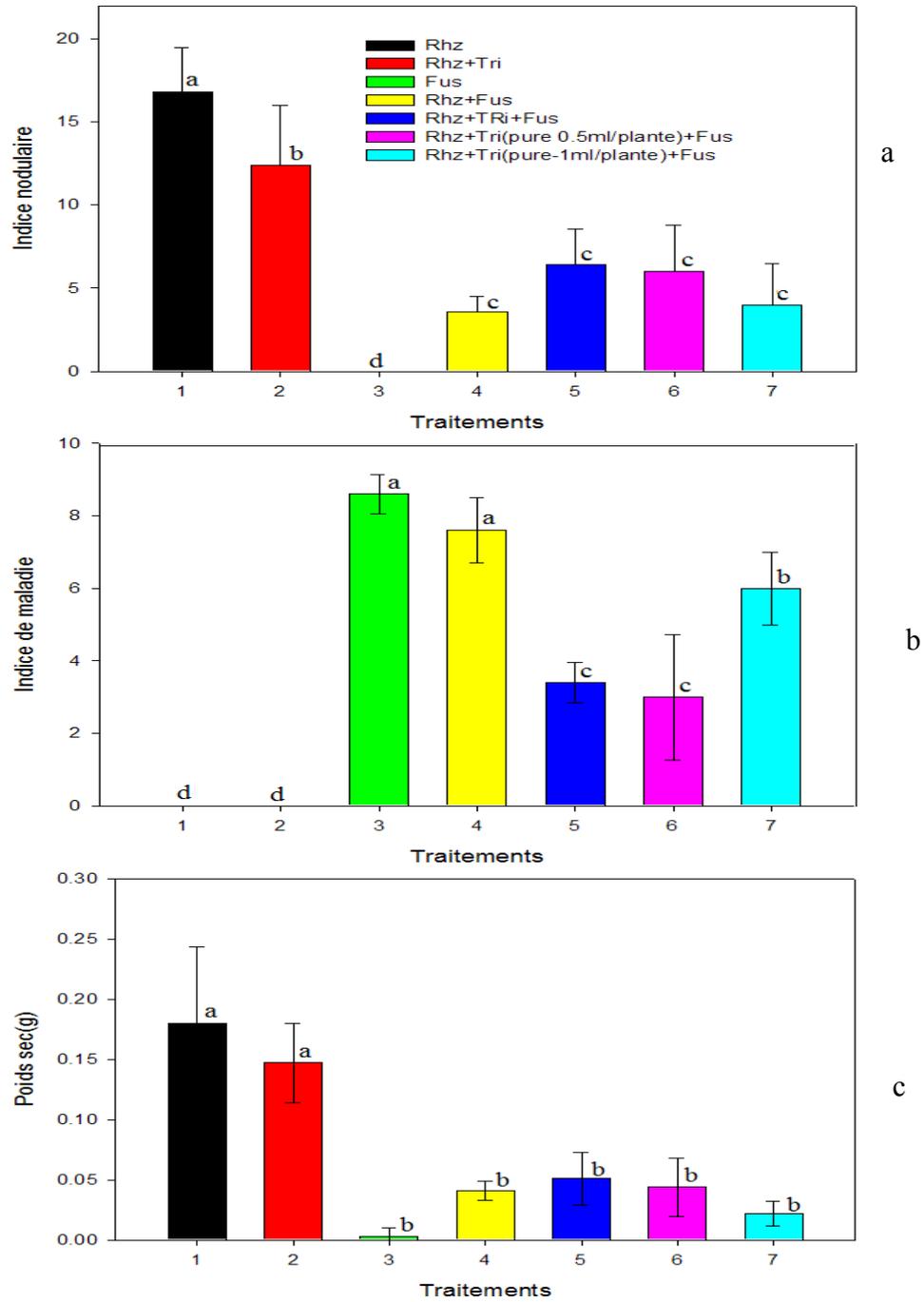


Figure 11 Paramètres étudiés de la luzerne inoculée avec *Fusarium* en fonction des traitements. a : indice nodulaire; b : indice de maladie; c : poids sec du feuillage

3.6 Test de comparaison de l'efficacité du *Trichoderma* par rapport à un agent chimique de lutte contre les phytopathogènes (Maxim)

L'objectif de ce test était de comparer l'efficacité de *T. viride* à celle du fongicide recommandé "Maxim" contre les maladies des racines de la luzerne. Des essais sur des plantes inoculées avec *Fusarium* et traitées avec Maxim ont été faits comme le montre la Figure 12. D'après les résultats de la Figure 12, *Trichoderma* est toujours efficace contre le pathogène *Fusarium*. En effet, l'ajout de *Trichoderma* avec *Sinorhizobium* et *Fusarium* a fait diminuer l'indice de maladie d'environ 50% (traitements 4 et 5 - Figure 12b). En comparant le traitement N1 et N8, on remarque que Maxim ne nuit pas à la nodulation. L'application de Maxim pour la lutte contre le pathogène *Fusarium* a un effet significatif (traitement 9) mais moins important que *Trichoderma* (traitement 5). Le traitement 7 montre que le *Fusarium* 10X dilué est beaucoup moins pathogène à la luzerne en présence de *Trichoderma* que dans le cas de *Fusarium* concentré (traitement 5).

La Figure 12b montre que l'application de *Rhizobium* a fait baisser la maladie, ceci est probablement dû à des substances sécrétées par *Rhizobium* qui peuvent aider la plante à résister contre la maladie ou bien le fait de combler le déficit d'azote par l'application de *Rhizobium* est un facteur qui aide la plante à résister à la maladie. L'application de *Trichoderma* (traitement 5, Figure 12b) a tendance à faire baisser la maladie, mais la différence avec le test à base de *Rhizobium* (traitement 4) n'est pas significative. En réalité *Trichoderma* et Maxim n'ont pas eu d'effet sur l'indice de maladie.

La Figure 12c montre que le rendement en poids sec végétatif suit la même tendance que l'indice nodulaire. En effet, l'application de *Trichoderma* avec *Rhizobium* a toujours tendance à faire baisser le rendement. De plus, l'application de *Trichoderma* sur des plantes inoculées avec

Rhizobium et *Fusarium* ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'amélioration du rendement en poids sec végétatif. Dans cet essai, le Maxim n'a pas été efficace contre *Fusarium* (Figure 12c). Maxim n'est pas un agent de lutte efficace contre *F. avenaceum*. Contrairement à ce qui a été rapporté par Hwang *et al.* (2006), plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence. Par exemple, la souche de *F. avenaceum* et le cultivar de luzerne qu'on a utilisé. Pour juger la fiabilité de *Trichoderma*, il faut la comparer à d'autres fongicides chimiques plus efficaces.

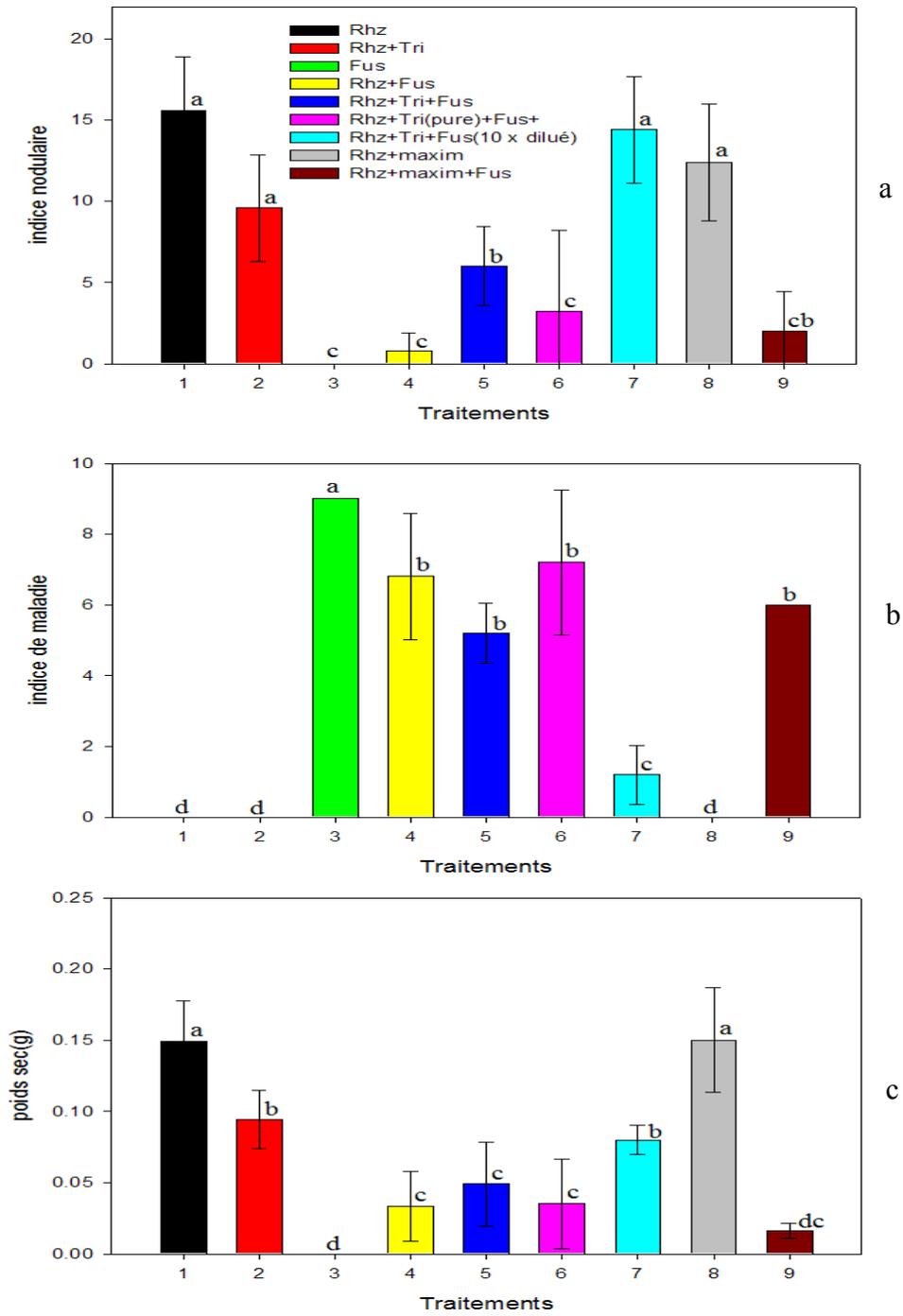


Figure 12 Comparaison de l'effet des *Trichoderma* par rapport à maxim. a : indice nodulaire; b : indice de maladie; c : poids sec

4. DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la performance du mélange *Sinorhizobium meliloti* (biofertilisant) et *Trichoderma viride* (biopesticide) en application sur la luzerne. Cette recherche consiste à étudier l'effet de ce mélange sur la croissance végétale et son pouvoir de lutte contre les phytopathogènes.

Les eaux usées d'amidon, milieu de production des bioinoculants, sont disponibles en énormes quantités. Ce rejet a été utilisé comme milieu de culture et il s'est révélé très performant en comparaison aux résultats de Khanh *et al.* (2009) et de Ben Rebah *et al.* (2001), en suivant la même méthodologie que Ben Rebah *et al.* (2001) dans le cas des boues d'épuration. L'utilisation des eaux usées d'industries agroalimentaires est une nouvelle alternative de valorisation et de recyclage des déchets. Cette initiative a permis d'améliorer et de diversifier la production de bioproduits agricoles en partant de simples produits à des produits combinés comme le cas du mélange *S. meliloti* – *T. viride* qui est plus pratique et efficace selon les travaux de Rajeshkannan *et al.* (2007), Dubey *et al.* (2007) et Whipps *et al.* (2001). En plus de son pouvoir de lutte biologique, *T. viride* est connu comme agent d'amélioration de croissance chez la plupart des plantes, ce qui n'est pas le cas avec la luzerne, ceci s'oppose aux résultats de Verma *et al.* (2007) qui ont travaillé sur la tomate et aux travaux de Gravel *et al.* (Avis *et al.* 2008) qui prouvaient que *Trichoderma* est un améliorateur de croissance chez certains types de végétaux. Le mélange *S. meliloti* - *T. viride* n'était pas intéressant pour la croissance végétative, par contre, il a donné de bons résultats pour la lutte biologique contre *Fusarium avenaceum* en améliorant l'indice nodulaire inhibé par ce pathogène. Ceci confirme les résultats des travaux de Haque *et al.* (1992) qui ont prouvé que la combinaison *S. meliloti* - *T. viride* a fait disparaître complètement

l'infection par *Fusarium* spp. chez des plantes de fenugrec à l'âge de 30 jours. De même, cette constatation a aussi été retenue par Ganesan *et al.* (2007) qui ont travaillé sur l'arachide.

Les résultats obtenus dans cette étude ont prouvé que *T. viride* peut être considéré comme un agent de lutte biologique pour la luzerne et sa combinaison avec *S. meliloti* s'avère avantageuse.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Au cours de ce recherche, il a été démontré que les eaux usées d'amidon supportent très bien la croissance de *Sinorhizobium meliloti* et *Trichoderma viride*. En effet, l'efficacité de ces rejets pour la croissance des microorganismes a été similaire au milieu synthétique de culture, ce qui suggère une méthode prometteuse dans le contexte de développement de combinaisons de biopesticides–biofertilisants. Il a été démontré qu'un ajout d'un mélange de *T. viride* - *S. meliloti* peut ne pas être synergique pour croissance de la luzerne. En effet, l'application de *T. viride* avec *S. meliloti* a engendré un ralentissement de la nodulation lorsque les deux microorganismes sont appliqués simultanément et à égale dose. Cependant, d'autres essais ont montré que l'application de *T. viride* 24 h avant *S. meliloti* inhibe la nodulation, alors que l'application de *S. meliloti* 24 h avant *Trichoderma* ne réduit pas la nodulation. *T. viride* colonise le système racinaire et est compétitif avec *S. meliloti*.

Dans le but de faciliter l'inoculation simultanée, l'application de *S. meliloti* à forte dose (10^8 UFC/ml) par rapport à *T. viride* (10^5 UFC/ml) favorise la nodulation même s'il est appliqué 24 h après *T. viride*. Le champignon *T. viride* a démontré un effet inhibiteur contre le phytopathogène *Fusarium avenaceum* en boîtes de Pétri et vis-à-vis la luzerne en inhibant son développement. Le *Trichoderma* a aussi eu tendance à protéger la luzerne contre le *F. avenaceum* dans les deux essais en sachets. Une seule souche de *Trichoderma* a été testée dans cette étude, mais il est probable qu'il existe d'autres souches aussi et même plus efficaces.

Dans le cadre de travaux futurs, il est recommandé de rechercher des souches de *Trichoderma* qui nuisent moins à la nodulation et qui inhibent davantage le pathogène *F. avenaceum*. Il est aussi suggéré d'optimiser les doses appliquées des deux bioinoculants (*S. meliloti* et *T. viride*) pour une application simultanée ou bien appliquer les deux traitements selon un décalage horaire

plus important (ex. 48 h ou 96 h) en appliquant toujours *S. meliloti* en premier. Une fois l'optimisation obtenue, les inoculants devront être développés, soit en formulations liquides ou solides sous forme de poudres ou de granules.

RÉFÉRENCES

- Ali, F. et A. Ghaffar. 1991. Effect of seed treatment with biological antagonists on rhizosphere mycoflora and root infecting fungi of soybean. *Pakistan Journal of Botany*, 23: 183-188.
- Allen, E.K et O.N Allen. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bacteriology Review*, 14: 273-330.
- Altier, N.A., D.K.Barnes, J.A.Thies et D.A. Samac. 1995. Pythium seed rot and damping-off resistance. ?????
- Altomare, C., W.A. Norvell, T. Barkman et G.E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2926-2933.
- Amarger. 2001. Rhizobia in the field. *Advances in Agronomy*, 73: 109-168.
- Anatasoff, D. 1920. *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals. *Agronomy Research*, 1-32.
- Anderson R.D. 1993. Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dans : *Proceedings of the International Symposium 'Cellular and Molecular Aspects of Biosynthesis and Action of the Plant Hormone Ethylene'*. (Agen, France, 31 août – 4 septembre, 1992). Pech J.C., Latché A. & Balagué C. (éds.). New York, Springer, pp 197-204.
- Arias, A. et G. Martinez-Drets. 1976. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 150-153.

- Avis, T.J., V. Gravel, H. Antoun et R.J. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1733-1740.
- Aziz, N.H., M.Z. El Fouly, A.A. El Assawy et M.A. Khalaf. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonisation by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38: 33-39.
- Bailey, B.A. et R.D. Lumsden. 1998. *Direct effects of Trichoderma and Gliocladium on Plant Growth and Resistance to Pathogens. In: Trichoderma and Gliocladium*. London, Taylor and Francis, 2: 185-204
- Bailey, B.A., R. Taylor, J.F.D. Dean et J.D. Anderson. 1991. Ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase is translocated through the xylem of *Nicotiana tabacum* cv xanthi plants. *Plant Physiology*, 97: 1181-1186.
- Ben Rebah, F. , R.D. Tyagi, , D. Prévost, et R.Y.Surampalli. 2002. Waste water sludge as a new medium for rhizobia growth. *Water Quality Research Journal of Canada*, 237: 353-370.
- Ben Rebah, F. 2001. Utilisation des bous d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculum à base de *Rhizobium*. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Sainte-Foy, QC, Canada, 214 p.
- Bissonnette, N., R. Lanande. et L.M. Bordeleau. 1986. Large scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. *Applied & Environmental Microbiology*, 52: 838-841.
- Booth, M. 1977. *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Society, Kewen, Angleterre, pp. 35-57.

- Bottomley, P.J., H.H. Cheng et S.R. Strain. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Applied & Environmental Microbiology*, 60: 1754-1761.
- Bruce, A.M et R.D. Davis. 1989. Sewage sludge disposal: current and future options. *Water Science and Technology*, 21: 1113-1128.
- Burgess L, R. Dodman, P. Mayers, et W Pont. 1981. *Fusarium* diseases of wheat, maize and grain sorghum in eastern Australia. Dans '*Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*'. Nelson, P., T Toussoun et R Cook (éds). University Park, Pennsylvania State University Pres. pp. 64-76.
- Burgos, P.A., E. Velazquez et N. Toro. 1996. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 843-849.
- Burton JC (1967). *Rhizobium* culture and use. Dans *Microbial Technology*, H.J. Peppler (éd), Reinhold, New York. pp 1-33.
- Caron D. (2000) Fusarioses des épis, Sait-on prévoir leur développement. *Perspectives Agricoles* janvier 2000, pp 56-62
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. *Plant Disease*, 70: 145-148.
- Chet, I et R. Backer. 1979. Biological control of soilborne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*. Schippers, Londres, Royaume-Uni, pp. 585-589.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma* application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. *Innovative approaches to plant disease control*. Wiley & Sons Inc., New York, NY, États-Unis, pp. 137-160.

- Couture, L. 1980. Assessment of severity of foliage diseases of cereals in cooperative evaluation tests. *Canadian Plant Disease Survey*, 60: 8-10.
- Date R.A. et R.J. Roughley. 1977. Preparation of legume seed inoculants. Dans : *A treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV, Agronomy and Ecology*. Hardy R.W.F. et A.H. Gibson (éds) New York, Wiley. pp. 243-275
- Davet P. 1983. Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. Dans : *Les antagonismes microbiens. Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. - 24e Colloque de la Société Françaises de Phytopathologie (Bordeaux, 26-28 mai 1983)*. Devannas, M.A., D. Rafaeli-Eshbol et G. Stotzky (éds). Versailles, INRA, pp. 159-168.
- Davet, P. et P. Comporota. 1986. Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. *Agronomie*, 6: 575-581.
- Davet, P., M. Artigues et C. Martin. 1981. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*, 1: 933-936.
- Dazzo, F.B. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread with metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 301-309.
- Deacon, J.W., A.R. Entwistle, R.R.M. Paterson, J.M. Lynch, J. Irvine et R.N. Strange. 1988. Biocontrol of soil-borne plant pathogens introduced bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Londres, Royaume-Uni*, 318: 357-373.

- Dubey, S.C. 2007. Integrating bioagent with botanical and fungicide in different modes of application for better management of web blight and mungbean (*Vigna radiata*) yield. Indian Journal of Agricultural Sciences, 77: 162-165.
- Elad, Y. 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum* Crop Protection, 13: 35-38.
- Elad, Y. et A. Kapat. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, 105: 177-189.
- Ezzi, M.I. et J.M. Lynch. 2002. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp.* Enzyme and Microbial Technology, 31: 1042-1047.
- Feng, L., R.J. Roughley et L. Copeland. 2002. Morphological changes of rhizobia in peat cultures. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1064-1070.
- Fuchs, Y., A. Saxena, H.R. Gamble et J.D. Anderson. 1989. Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. Plant Physiology, 89: 138-143.
- Ganesan, S., R.G. Kuppusamy et R. Sekar. 2007. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea L.*) using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31: 103-108.
- Gargouri, S. 2003. Evaluation de l'incidence de la pourriture du pied du blé et de la structure des populations des espèces de *Fusarium* associées à la maladie. Thèse en Biologie végétale, Faculté des sciences de Tunis, Tunis, Tunisie, 94 p.

- Gargouri, S., M.R. Hajlaoui, A. Guermech et M. Marrakchi. 2001. Identification des espèces fongiques associées à la pourriture du pied du blé et étude de leur répartition selon les étages bioclimatiques en Tunisie. *Bulletin OEPP, Tunis, Tunisie*, 31: 499-503.
- Ghodbane, A., M. Mahjoub, M. Djerbi, A. Mlaiki et A.L. Sharen. 1974. Project on *Septoria* and Root Rot. Montana State University, Montana, États-Unis, pp. 64-76.
- Golueke, C.G. 1992. Bacteriology of composting biocycle. *Journal of applied microbiology*, 33: 55-57.
- Haque, S.E. et A. Ghaffar. 1992. Efficacy of *Trichoderma spp*, and *Rhizobium-meliloti* in the control of root-rot of fenugreek. *Pakistan Journal of Botany*, 24: 217-221.
- Haran, S., H. Schickler et I. Chet. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Harman G.E. 2001. Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. Dans : *Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century: Mode of Action and Application Technology*. Tzeng, D.D.S. et J.W. Huang (éds). Taichung City, Taiwan, National Chung Hsing University, pp 71–84
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet et M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56.
- Harman, G.E., R. Petzoldt, A. Comis et J. Chen. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on

- diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94: 147-153.
- Horsfall, J.G. et R.W. Barratt. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, 35: 655.
- Howell, C.R., L.E. Hanson, R.D. Stipanovic et L.S. Puckhaber. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248-252.
- Hungria, M., M.F. Loureiro, I.C. Mendes, R.J. Campo. et P.H. Graham. 2005. Inoculant preparation, production and application. Dans: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Werner, D. et E. Newton (Éditeurs), Springer, Dordrecht, Allemagne, pp. 223-253.
- Hwang, S.F, H. Wang, B.D. Gossen, G.D. Turnbull, R.J. Howard et S.E. Strelkov. 2006. Effect of seed treatments and root pathogens on seedling establishment and yield of alfalfa, birdsfoot trefoil and sweetclover. *Plant Pathology Journal*, 5: 322-328.
- Hwang, S.F, R.J. Howard et E. Moskaluk. 1989. Crown and root rot of alfalfa in southern Alberta. *Canadian Plant Disease*, 69: 9-11.
- Jordan, D.C. 1952. Studies on the legume root nodules bacteria. *Canadian Journal of Botany*, 30: 693-700.
- Kalb, D.W., G.C. Bergstrom et E.J. Shields. 1994. Prevalence, severity and association of fungal crown and root rots with injury by the cover root curculio in New-York alfalfa. *Plant Disease*, 78: 491-495.

- Kanauchi, M. et C.W. Bamforth. 2001. Growth of *Trichoderma viride* on crude cell wall preparations from barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 883-887.
- Kennedy, L.D. et R.M. Greenwood. 1982. 6-phospho gluconate and glucose 6-phosphate dehydrogenase activities growth rate and acid production as taxonomic criteria for *Rhizobium*. *New Zealand Journal of Science*, 25: 361-366.
- Lefrançois, P et F. Ruby. 2009. Révision scientifique. site Web : http://www.xn--passeportsant-nhb.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=luzerne_ps#P33_1282.
- Lei, Z. et Z. Huaying. 1998. *Trichoderma* and seed biotreatment. *Journal of Microbiology*, 18: 50-57.
- Liansheng, T. et W. Wweihua. 2000. Control of of *Trichoderma* against *Botrytis cinera* of strawberries in greenhouse. *Plant Protection*, 16: 294-298.
- Lindsey, D. et R. Baker. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.
- Martinez-De Drets, G. et A. Arias. 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast growing and slow growing groups. *Journal of Bacteriology*, 109: 467-470.
- Metcalf, D.A. et C.R. Wilson. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, 50: 249-257.
- Michaud, R. et C. Richard. 1985. Evaluation of alfalfa cultivars for reaction to crown and root rot. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 65: 95-98.
- Millergarvin, J.E. et D.R. Viands. 1994. Selection for resistance to *Fusarium* root-rot, and associations among resistances to 6 diseases in alfalfa. *Crop Science*, 34: 1461-1465.

- Mouria, B., A. Ouazzani Touhami, A. Badoc. et A. Douira. 2005. Effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculums de trois souches de *Trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol. Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux, 144: 211-224.
- Mrabet, B. 1998. Incidence de la fusariose au nord de la Tunisie. Identification de source de résistance chez le blé. École Supérieure Agronomique de Kef, Kef, Tunisie, 60 p.
- Mukherjee, P.K., J.P. Upadhyay et A. Mukhopadhyay. 1989. Biological control of *Pythium* damping-off of cauliflower by *Trichoderma harzianum*. Journal of Biological Control, 3: 119-124.
- Nasraoui, B. 2000. Champignons mitosporés Dans : Introduction à la phytomycologie: morphologie, biologie et systématique appliquée aux champignons phytopathogènes. Tunis, Tunisie, Centre de publication universitaire. pp.155-183
- Nelson, E.B., C.T. Lo, C.K. Hayes et G.E. Harman. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathology, 88: 129-136.
- Nygaard SL & Brumner JE (1995) *Fusarium* Wilt Resistance - Greenhouse/Controlled Environment : Standard test to characterize alfalfa cultivars. Ohio State University), <http://www.naaic.org/stdtests/fusariumwilt2.pdf> (Consulté le 12 novembre 2010)
- Pauvert, P. 1984. Les fusarioses des céréales. Phytoma, 202: 15-16.
- Pelmont J. 1993. Bactéries et Environnement: adaptations physiologiques. Grenoble, Presses Universitaires de Grenoble. (Collection Grenoble Sciences) 900 p.
- Peterson, H.L. et T.E. Loynachan. 1981. The significance and application of *Rhizobium* in agriculture. International Review of Cytology, Supplement 13: 311-331.

- Prescott, H.K. 1995. Microbiologie. 2^{ième} Édition, Boeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1114 p.
- Quispel, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Pays-Bas.
- Rajeshkannan, V., V. Thangapandian, T. Muthukumar et C.S. Sumathi. 2007. Influence of bioinoculants on growth, nutrient uptake and yield of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Journal of Sustainable Agriculture, 31: 85-109.
- Richard, C., C. Willemot, R. Michaud, M. Bernier-cardou et C. Gagnon. 1985. Low temperature interactions in *Fusarium* wilt and root rot of alfalfa. Phytopathology, 72: 293-297.
- Rovira, A.D. 1969. Plant root oxudates. Botanical Review, 35: 35-57.
- Rudresh, D.L., M.K. Shivaprakash et R.D. Prasad. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma spp.* on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium L.*). Applied Soil Ecology, 28: 139-146.
- Salter, R., J.E. Millergarvin et D.R. Viands. 1994. Breeding for resistance to alfalfa root-rot caused by *Fusarium* species. Crop Science, 34: 1213-1217.
- Shalini, S. et A.S. Kotasthane. 2007. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma spp.* Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 6: 2272-2281.
- Singh, A., S. Srivastava et H.B. Singh. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology, 98: 470-473.
- Skinner F.A., R.J. Roughley et M.R. Chandler 1977. Viability and cell distortion in *Rhizobium spp.* Journal of Applied Bacteriology, 43: 287-297.

- Streeter, J.G. 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 513-522.
- Tan, G.Y. et W.K. Tan. 1986. Effects of nodulation on resistance to alfalfa sickness among ten alfalfa cultivars. *Plant and Soil*, 94: 133-141.
- Thanh, T.K.V., D.V. Khanh, D.T. Rajeshwar et D. Prévost. 2009. Starch industry waste water as raw material for production of rhizobial biomass. Rapport interne, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada, 11 p.
- Thrane, C., A. Tronsmo et D.F. Jensen. 1997. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: Purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium spp.* *European Journal of Plant Pathology*, 103: 331-344.
- Toro, N. 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12: 157-162.
- Triplett, E.W. et M.J. Sadowsky. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology*, 46: 399-428.
- Tu, J.C. 1978. Protection of soybean from severe *Phytophthora* root rot by *Rhizobium*. *Physiological Plant Pathology*, 12: 233-240.
- Ubalua, A.O. et E. Oti. 2007. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2447-2450.
- Uddin, W. et T.R. Knous. 1991. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada. *Plant Disease*, 75: 51-56.
- Vande Broek, A. 1995. The role of bacterial molecular. *Plant-Microbe Interactions*, 8: 800-810.

- Verma, M. 2007. Développement 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.
- Vincent, J.M. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria, Blackwell, Oxford, Royaume-Uni, 15 p.
- Watson, R.J., R. Heys, T. Martin et M. Savard. 2001. *Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. Applied and Environmental Microbiology, 67: 3767-70.
- Weindling, R. et H. Emerson. 1936. the isolation of toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*. Phytopathology, 26: 1068-1070.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.
- Werner, D. et E. Newton. 2005. Nitrogen fixation: origins, applications and research progress. Springer, Amsterdam, Pays-Bas, pp. 223-253.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.
- Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil, 287: 3-14.
- Yedida, I., A.K. Srivastva, Y. Kapulnik et I. Chet. 2001. effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant soil, 235: 235-242.

- Yedidia, I., A.K. Srivastva, Y. Kapulnik et I. Chet. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235: 235-242.
- Yedidia, I., M. Shoresh, Z. Kerem, N. Benhamou, Y. Kapulnik et I. Chet. 2003. Concomitant Induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7343-7353.
- Yedidia, I., N. Benhamou et I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1061-1070.
- Yedidia, I., N. Benhamou, Y. Kapulnik et I. Chet. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 863-873.
- Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr et H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 89-103.
- Young, J.P. et K.E Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, 133: 87-94.

ANNEXES

Tableau 11 Effets de *Trichoderma viride* sur la nodulation

Témoin	Rhz	Tri	Rhz+Tri	Rhz+Tri (24h après)	Tri+Rhz (24h après)	Rhz (YMB)	Rhz YMB (dilué dans EUA)
0	18	0	12	8	0	18	18
0	18	0	12	8	0	18	18
0	18	0	12	8	0	18	18
0	18	0	12	8	0	18	18
0	18	0	12	8	0	18	18

Tableau 12 Effets de *Trichoderma viride* sur le poids sec du feuillage chez la luzerne

Témoins	Rhz	Tri	Rhz+Tri	Rhz+Tri (24 h après)	Tri+Rhz (24 h après)	Rhz (YMB)	Rhz YMB (dilué dans EUA)
0.016	0.15	0.01	0.124	0.15	0.023	0.2	0.186
0.023	0.12	0.033	0.076	0.152	0.017	0.142	0.208
0.052	0.11	0.021	0.107	0.066	0.032	0.153	0.098
0.036	0.04	0.026	0.11	0.081	0.017	0.164	0.146
0.04	0.14	0.031	0.06	0.036	0.02	0.076	0.209

Tableau 13 Effets de *Trichoderma viride* sur le poids sec du feuillage chez la luzerne en pots

Témoin	Rhz	Tri	Rhz+Tri	Rhz (YMB)	Tri (PDB)	Rhz+Tri (YMB ET PDB)
3.04	6.803	2.902	9.651	8.061	4.237	9.148
3.896	7.632	5.703	9.671	7.336	3.722	8.573
5.946	8.06	3.94	7.838	10.18	3.631	7.384
4.296	8.24	2.524	8.262	6.644	3.977	8.788

Tableau 14 Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec différents mélanges de *Trichoderma* et de *Sinorhizobium* lors des essais en sachets

Témoin	Rhz	Tri	Rhz+Tri	Rhz+Tri (24h après)	Tri+Rhz (24 h après)	Rhz(YMB)	Rhz YMB (dilué dans EUA)
0	18	0	6	12	4	6	2
0	18	0	12	18	2	12	8
0	18	0	12	18	12	12	4
0	18	0	8	6	18	6	6
0	18	0	4	12	4	12	8

Tableau 15 Poids sec du feuillage de la luzerne inoculée avec différents mélanges de *Trichoderma* et de *Sinorhizobium* lors des essais en sachets

Témoin	Rhz	Tri	Rhz+Tri	Rhz+Tri (24h après)	Tri+Rhz (24 après)	Rhz (YMB)	Rhz YMB (dilué dans EUA)
0.016	0.015	0.034	0.058	0.057	0.021	0.023	0.055
0.023	0.094	0.028	0.1	0.074	0.031	0.055	0.08
0.052	0.128	0.062	0.071	0.077	0.096	0.06	0.031
0.036	0.082	0.064	0.032	0.02	0.098	0.026	0.062
0.04	0.039	0.019	0.033	0.052	0.07	0.061	0.045

Tableau 16 Indice nodulaire de la luzerne inoculée avec *Fusarium* en fonction des traitements

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz+Tri	Fus+Rhz+Tri (pure)	Fus+Rhz+Tri (pure, 5 mL/sachet)
12	12	0	4	8	2	2
18	18	0	2	4	8	8
18	12	0	4	4	8	2
18	12	0	4	8	8	4
18	8	0	4	8	4	4

Tableau 17 Indice de maladie de la luzerne inoculée avec *Fusarium* en fonction des traitements

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz+Tri	Fus+Rhz+Tri (pure)	Fus+Rhz+Tri (pure, 5 mL/sachet)
0	0	8	7	3	6	7
0	0	9	9	4	2	5
0	0	9	7	3	2	7
0	0	8	7	3	2	5
0	0	9	8	4	3	6

Tableau 18 Poids sec de la luzerne inoculée avec *Fusarium* en fonction des traitements

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz+Tri	Fus+Rhz+Tri (pure)	Fus+Rhz+Tri (pure, 5 mL/sachet)
0.144	0.201	0.015	0.03	0.071	0.045	0.015
0.131	0.12	0	0.035	0.031	0.036	0.031
0.142	0.126	0	0.044	0.077	0.04	8.00E-03
0.282	0.155	0	0.05	0.044	0.082	0.026
0.2	0.134	0	0.045	0.032	0.016	0.03

Tableau 19 Comparaison de l'effet des *Trichoderma* par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (indice nodulaire)

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz +Tri	Fus+Rhz +Tri (pure)	Fus (10 x dilué) +Rhz+Tri	Maxim +Rhz	Maxim +Rhz+fus
18	12	0	0	8	0	12	18	2
18	12	0	2	2	12	18	12	0
18	6	0	0	6	2	18	12	0
12	6	0	0	8	0	12	8	6
12	12	0	2	6	2	12	12	2

Tableau 20 Comparaison de l'effet des *Trichoderma* par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (indice de maladie)

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz +Tri	Fus+Rhz +Tri (pure)	Fus (10 x dilué) +Rhz+Tri	Maxim +Rhz	Maxim +Rhz+fus
0	0	9	5	4	9	2	0	6
0	0	9	5	6	5	1	0	6
0	0	9	7	6	8	0	0	6
0	0	9	8	5	9	2	0	6
0	0	9	9	5	5	1	0	6

Tableau 21 Comparaison de l'effet des *Trichoderma* par rapport à maxim sur les maladies des racines chez la luzerne (poids sec)

Rhz	Rhz+Tri	Fus	Fus+Rhz	Fus+Rhz +Tri	Fus+Rhz +Tri (pure)	Fus (10 x dilué)	Maxim +Rhz	Maxim +Rhz+fus
0.125	0.09	0	0.05	0.049	5.00E-03	0.085	0.12	0.013
0.12	0.071	0	0.018	0.03	0.077	0.09	0.11	0.011
0.19	0.083	0	0.011	0.035	3.00E-03	0.083	0.17	0.015
0.16	0.125	0	0.02	0.032	0.05	0.063	0.15	0.024
0.15	0.103	0	0.068	0.1	0.041	0.079	0.2	0.019