

Effet de différents éléments fertilisants sur le développement de deux espèces de *Trichoderma* spp.

[Effect of different fertilizing elements on the development of two species of *Trichoderma* spp.]

Hanane EL KAISOUMI, Abdellatif OUAZZANI CHAHDI, Karima SELMAOUI, Rachid BENKIRANE, Amina OUAZZANI TOUHAMI, and Allal DOUIRA

Laboratoire de Botanique, Biotechnologie et de Protection des Plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP. 133, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

Copyright © 2017 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The compatibility of two species of *Trichoderma* spp. was tested *in vitro* and in soil with different fertilizing elements (N, P, K, Ca) added to increase concentrations in the solid potato-based medium.

After 48 h of incubation, CaCl₂, KNO₃ and KH₂PO₄ at 400 mg/L showed an inhibitory effect on mycelial growth of *Trichoderma harzianum* strain (Tcomp) and *Trichoderma viride* strain (TV1) compared to controls varying respectively from 9.66 to 28.33 and 10.33 to 29.16 / 90.00 mm. For cons, the NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ and CaSO₄, 2H₂O had a mean toxicity against the two strains tested, mycelial growth was ranged from 50.50 to 64.00 / 90 mm. After 7 days of incubation, both strains were able to produce conidia; their numbers have varied respectively from 6369.00 to 117833.20 / 245843.00 conidia / mm² and 6793.00 to 67221.70 / 649635.00 conidia / mm².

The pH was slightly basic in the potato liquid medium before culturing and after the addition of the products at different concentrations (7.64-8.60). The pH became acid after culturing of the two strains; it varied between 3.13 and 5.85. Fresh weights were low in the presence of 50 mg / L of Calcium Chloride and medium for other products from 0.01 to 2.79 and 3.04 to 6.69 respectively compared to control 7.31 - 9.28 mg. Dry weights were low in the presence of the tested products compared to controls from 7.31 - 9.28 mg.

In soil, both strains were able to grow on barley straw fragments at a concentration of 400 mg/L. The colonization percentage varied respectively between 63% and 94%.

Two strains of *Trichoderma* showed substantial compatibility with the most part of fertilizers tested *in vitro* and a great capacity to keep the soil in the presence of different elements. Thus, the antipollution properties of *Trichoderma* spp. can be used in agriculture in soils with excess of nitrogen and phosphate. They also have the ability to increase the capacity of nutrient uptake by plants.

KEYWORDS: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, fertilizing elements, mycelial growth, conidia production, weight, saprotrophic activity.

RÉSUMÉ: La compatibilité de deux espèces de *Trichoderma* spp. est testée *in vitro* et dans le sol avec différents éléments fertilisants (N, P, K, Ca) additionnés à des concentrations croissantes dans le milieu à base de pomme de terre solide.

Après 48 h d'incubation, le CaCl₂, le KNO₃ et le KH₂PO₄ à la concentration de 400 mg/L ont montré un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de la souche Tcomp de *Trichoderma harzianum* et TV1 de *Trichoderma viride* par rapport aux témoins variant respectivement de 9,66 à 28,33 et 10,33 à 29,16/90,00 mm. Par contre, le NH₄NO₃, le (NH₄)₂SO₄ et le CaSO₄, 2H₂O ont présenté une toxicité moyenne vis-à-vis des deux souches testées, la croissance mycélienne a varié de 50,50 à 64,00/90 mm. Après 7 jours d'incubation, les deux souches ont été capables de produire des conidies, leurs nombres ont varié respectivement de 6369,00 à 117833,20/245843,00 conidies/mm² et 6793,00 à 67221,70/649635,00 conidies/mm².

Le pH du milieu liquide à base de pomme de terre est légèrement basique avant la mise en culture et après l'addition des produits à différentes concentrations (7,64-8,60). Il est devenu acide après la culture des deux souches de *Trichoderma*, il a varié entre 3,13 et 5,82. Les poids frais ont été faibles en présence de 50 mg/L du Chlorure de Calcium et moyens pour les autres produits respectivement 0,01-2,79 et 3,04-6,69 par rapport aux témoins 7,31-9,28 mg. Les poids secs ont été faibles en présence des produits testés par rapport aux témoins 7,31-9,28 mg.

Dans le sol, les deux souches ont été capables de se maintenir sur les fragments de paille d'orge à une concentration de 400 mg/L. Le pourcentage de colonisation a varié de 63% à 94%.

Les deux souches de *Trichoderma* ont montré une compatibilité importante avec la plus part des fertilisants testés *in vitro* et une grande capacité de se maintenir dans le sol en présence de différents éléments. Ainsi, les propriétés dépolluantes des *Trichoderma* spp. pourront être utilisées en agriculture dans les sols présentant un excès d'azote et de phosphate. Ils ont aussi la capacité d'augmenter la capacité d'absorption des éléments fertilisants par les plantes.

MOTS-CLEFS: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, éléments fertilisants, croissance mycélienne, production des conidies, poids, activité saprophytique.

1 INTRODUCTION

Les champignons du genre *Trichoderma*, connus depuis 1887 pour leurs propriétés antagonistes, ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes. Récemment, certaines études ont démontré l'aptitude des *Trichoderma* à stimuler la croissance de certaines plantes et de concurrencer les champignons phytopathogènes du sol [1].

Leur efficacité dépend de leur aptitude à la compétition saprophytique et à la quantité d'inoculum incorporée dans le sol [2]. Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes liées aux sols et aussi pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols. 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 [3]. La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium ...) à partir de la solution du sol [4]. Cette augmentation de l'absorption des éléments nutritifs indique une amélioration de ce mécanisme actif. Les éléments fertilisants sont nécessaires pour les organismes vivants. Cependant, ils deviennent toxiques à des concentrations élevées. Certains métaux ne sont pas biodégradables et se déplacent vers le haut de la chaîne alimentaire via la bioaccumulation [5]. Ils influent sur les processus métaboliques vitaux de toutes les formes de vie, mais ils peuvent être toxiques à une concentration supérieure à l'exigence nutritionnelle. Les travaux de Anand *et al.* [6] et Errasquin et Vazquez [5] ont montré que *Trichoderma* spp. a présenté une tolérance considérable aux métaux et en accumulent des quantités élevées. Par conséquent, les espèces de *Trichoderma* tolérantes peuvent devenir des organismes dominants dans certains sols pollués et peuvent jouer un rôle important dans la technologie de l'élimination des métaux de l'environnement [7].

Ce travail a pour objectif de déterminer l'effet *in vitro* et dans le sol de différents éléments fertilisants sur le développement de deux espèces de *Trichoderma*.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL FONGIQUE

Une souche de *Trichoderma viride* (TV1) et une souche de *Trichoderma harzianum* (Tcomp) appartenant à la Mycothèque du Laboratoire de Botanique, Biotechnologie et Protection des Plantes de la Faculté des Sciences de Kénitra (Maroc) sont mises en culture sur le milieu PSA (Pomme de terre: 200 g; Saccharose: 20 g; Agar-agar : 15 g ; Eau distillée : 1000 mL) et incubée à 25°C pendant 4 jours à l'obscurité totale et 3 jours à la lumière continue.

2.2 LES ÉLÉMENTS FERTILISANTS

Quatre éléments fertilisants (N, P, K, Ca) ont été utilisés respectivement sous forme d'Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Potassium phosphate monopotassique (KH_2PO_4), Potassium nitrate (KNO_3), Calcium sulfate d'hydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et Calcium chlorure (CaCl_2).

2.3 EFFETS *IN VITRO* DES ÉLÉMENTS FERTILISANTS SUR LE CYCLE DE VIE DES DEUX SOUCHES DE *TRICHODERMA*

2.3.1 SUR MILIEU PSA SOLIDE

Les éléments fertilisants sont ajoutés à des concentrations croissantes (0- 5- 50- 200 et 400 mg/L) au milieu de culture PSA [Potato- Saccharose Agar]. Les différents milieux sont autoclavés à 120°C pendant 30 min. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

Des boutures de 4 mm de diamètre prélevées à l'emporte pièce à partir des cultures jeunes des deux souches de *Trichoderma* (TV1 et Tcomp) sont déposées au centre de la boîte de Petri. L'incubation est faite à 25°C et à l'obscurité pendant 7 jours.

La croissance mycélienne est estimée en mesurant les diamètres perpendiculaires de chaque colonie après 48h d'incubation pour les deux souches de *Trichoderma*.

Après 7 jours d'incubation, la production des conidies est estimée sur les boîtes ayant servies à la croissance mycélienne. 4 disques mycéliens de 5 mm de diamètre sont découpés à l'emporte pièce de chacun des trois axes, introduits dans un tube à essai contenant 1 mL d'eau distillée stérile. Après agitation mécanique, le comptage des conidies s'effectue à l'aide d'une cellule de Malassez. Chaque boîte a fait l'objet de trois répétitions à raison de dix lectures par répétition.

La sporulation est estimée par le nombre de spores $\times 10^5$ conidies/mm².

2.3.2 DANS LE MILIEU LIQUIDE À BASE DE POMME DE TERRE

Les cultures liquides sont réalisées dans des erlenMeyer de 250 mL à raison de 100 mL par erlenMeyer contenant le milieu à base de pomme de terre liquide (Pomme de terre : 200 g, Saccharose : 15 g, Eau distillée : 1000 mL), les éléments fertilisants sont ajoutés à des concentrations croissantes (0 - 2,5- 5 -10 et 50 mg /L). Les différents milieux sont autoclavés à 120°C pendant 30 min. Une bouture de chaque souche de *Trichoderma* est ajoutée au milieu liquide préparé. L'incubation est réalisée à 25°C et à l'obscurité pendant 7 jours. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

Le pH du milieu est mesuré avant la stérilisation et après 7 jours d'incubation des cultures à l'aide d'un pH-mètre. Ensuite, les cultures liquides des deux souches de *Trichoderma* sont filtrées sous vide, lavées 2 fois à l'eau distillée. Le mycélium est mis entre plusieurs couches de papier filtre, puis le poids frais du mycélium est pesé avec une balance de précision. Le poids sec est pesé après séchage du mycélium à 70°C pendant 24h.

2.4 MAINTIEN DES *TRICHODERMA* DANS LE SOL

2.4.1 SOL

Le sol utilisé dans tous les essais est celui de la forêt de la Mamora, il est meuble et très sableux. La quantité nécessaire aux essais est tamisée à travers un tamis dont les mailles sont de 1 mm de diamètre, puis stockée au laboratoire dans un sac en polyéthylène fermé dans un endroit sec.

Selon la méthode de Davet et Comporota (1986), 10 g de la farine d'orge est ajoutée à 200 g de sol dans des fioles de roux, le mélange est humidifié par 30 mL d'eau distillée et autoclavé deux fois pendant 30 min à 120°C à 24 h d'intervalle.

2.4.2 ENSEMENCEMENT

Les cultures des deux souches de *Trichoderma* sur milieu PSA sont incubées à 28°C et à l'obscurité pendant 7 jours. 3 mL d'eau distillée stérile sont introduits dans chaque boîte et la surface du milieu est raclée à l'aide d'une spatule stérile. La suspension conidienne obtenue est diluée de façon à obtenir une concentration de 10^5 conidies /mL. Les milieux à base de la mixture sol - farine d'orge autoclavés sont alorsensemencés chacun par 2 mL de cette suspension.

2.4.3 INCUBATION

Les fioles sont placées pendant 12 jours dans un incubateur à 28°C et à l'obscurité, puis maintenues pendant 12 jours à la température ambiante du laboratoire et à la lumière du jour.

Au terme de ce séjour, les mixtures sont récupérées, homogénéisées et séchées à l'air dans des conditions aseptiques pendant 3 jours. Les poudres ainsi obtenues ont constitué l'inoculum, qui peut être utilisé ou stocké à 5°C.

2.4.4 APPORT DE LA PAILLE

Une quantité de 10 g d'inoculum est mélangée à l'aide d'une spatule pendant 8 min à du sol de la Mamora tamisé, non stérilisé et non humidifié, amendé par les sels à la concentration de 400 mg/L de manière à obtenir 200 g de sol inoculé. À 200 g de sol, ainsi inoculé, sont ajoutés 2 g de paille d'orge, coupés aux ciseaux en fragments d'environ 2 cm et 15 mL d'eau.

L'ensemble est brassé à l'aide d'une spatule et introduit dans des erlenMeyer fermés. Les erlenMeyer sont incubés quatre jours à 28°C et à l'obscurité.

La paille est ensuite récupérée, lavée sous un courant d'eau pendant une minute, désinfectée superficiellement à l'hypochlorite de sodium pendant deux minutes, rincée et découpée en fragments de 5 mm de long.

Pour chaque sel, 100 fragments sont mis en culture dans une boîte de Petri sur le milieu PSA, pendant 7 jours à l'obscurité et à 28°C. Le pourcentage de colonisation des fragments par *Trichoderma* est estimé par rapport au nombre total de fragments pour chaque traitement.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

2.5 ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont analysés par comparaison des moyennes, selon le test de Newman & Keuls au seuil de 5%. Les analyses ont porté sur les moyennes attribuées à l'effet de chaque élément fertilisant *in vitro* sur le cycle de vie et l'activité saprophytique dans le sol des deux souches de *Trichoderma*. Les pourcentages sont transformés en Arcsin VP.

3 RÉSULTATS

3.1 EFFETS *IN VITRO* DES ÉLÉMENTS FERTILISANTS SUR LE CYCLE DE VIE DES DEUX SOUCHES DE *TRICHODERMA* SUR LE MILIEU PSA SOLIDE

Les tableaux 1 et 2 montrent la variation de la croissance mycélienne et de la sporulation des deux souches de *Trichoderma* (Tcomp et TV1) en présence des différents sels et à différentes concentrations.

Ces résultats ont montré que la croissance mycélienne des deux souches de *Trichoderma* (Tcomp et TV1) est meilleure en absence des sels (90 mm). L'augmentation de la concentration des sels a provoqué une diminution progressive de la croissance mycélienne de Tcomp et de TV1 variant respectivement de 36,66 à 70,50 à une concentration de 5 mg/L, 21,16 à 67,50 à 50 mg/L, 15,48 à 65,00 à une concentration de 200 mg/L et de 9,66 à 64,00 à 400 mg/L. En effet, les valeurs de croissance mycélienne les plus faibles de Tcomp et de TV1, respectivement de 9,66 mm et 10,33 mm, ont été enregistrées en présence du potassium Phosphate monopotassique à une concentration de 400 mg/L (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Effet de différents sels sur la croissance mycélienne de *Trichoderma harzianum* et *T. viride* sur le milieu solide PSA.

Sels	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations (mg/L)				
		0	5	50	200	400
Ammonium nitrate	Tcomp	90,00 ^a	61,33 ^b	57,66 ^b	55,02 ^b	50,5 ^b
	TV1	90,00 ^a	70,00 ^b	65,16 ^b	63,50 ^b	60,66 ^b
Calcium chlorure	Tcomp	90,00 ^a	3,50 ^{bc}	41,66 ^b	37,33 ^c	28,33 ^d
	TV1	90,00 ^a	56,00 ^b	51,66 ^b	50,83 ^b	49,16 ^b
Ammonium sulfate	Tcomp	90,00 ^a	70,00 ^b	66,00 ^b	65,00 ^b	64,00 ^b
	TV1	90,00 ^a	56,66 ^b	56,66 ^b	56,03 ^b	54,16 ^b
Potassium nitrate	Tcomp	90,00 ^a	54,16 ^b	50,83 ^b	39,16 ^{cd}	29,16 ^d
	TV1	90,00 ^a	64,16 ^b	60,38 ^b	37,50 ^c	25,00 ^c
Calcium sulfate hydrate	Tcomp	90,00 ^a	65,00 ^b	55,00 ^b	54,16 ^b	50,50 ^c

Potassium phosphate monopotassique	TV1	90,00 ^a	70,50 ^b	67,50 ^b	59,50 ^c	56,33 ^b
	Tcomp	90,00 ^a	36,66 ^b	22,16 ^b	15,48 ^b	9,66 ^b
	TV1	90,00 ^a	37,16 ^b	21,16 ^c	16,66 ^d	10,33 ^c

Deux valeurs lus sur la même ligne, suivies par la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman & Keuls.

Malgré la présence des sels les deux souches ont été capables de sporuler. Le nombre de spores a varié de 47979,80 à 435042,20 à 5 mg/L, 28872,60 à 348682,10 à 50 mg/L, 28448,20 à 195956,20 à 200 mg/L et de 6369,20 à 117833,20 à 400 mg/L. Les plus faibles valeurs de sporulation de Tcomp et de TV1 par rapport aux témoins sont respectivement de 6369,00/245843,00 conidies /mm² et 6793,00/649635,00 conidies/mm² obtenues sur un milieu additionnée de sel de Potassium Phosphate monopotassique à une concentration de 400 mg/L (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Effet de différents sels sur la sporulation de *Trichoderma harzianum* et *T. viride* sur le milieu solide PSA.

Sels	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations (mg/L)				
		0	5	50	200	400
Ammonium nitrate	Tcomp	245843,00 ^a	145213,20 ^b	107450,3 ^b	42035,50 ^c	11464,20 ^c
	TV1	649635,00 ^a	435042,20 ^b	203703,1 ^b	83853,60 ^b	67221,70 ^b
Calcium chlorure	Tcomp	245843,00 ^a	147539,00 ^b	59255,00 ^b	50103,00 ^b	8544,40 ^b
	TV1	649635,00 ^a	242022,00 ^b	76852,60 ^b	30995,80 ^b	17833,20 ^b
Ammonium sulfate	Tcomp	245843,00 ^a	50376,60 ^b	40499,60 ^b	19107,00 ^c	9658,00 ^c
	TV1	649635,00 ^a	71757,00 ^b	53075,00 ^b	51367,00 ^b	9341,00 ^c
Potassium nitrate	Tcomp	245843,00 ^a	97658,00 ^b	61142,40 ^{bc}	26325,00 ^c	25146,60 ^c
	TV1	649635,00 ^a	69209,80 ^b	54773,40 ^b	33690,00 ^b	11039,60 ^c
Calcium sulfate hydrate	Tcomp	245843,00 ^a	238321,60 ^b	196384,20 ^c	125051,40 ^d	117833,20 ^d
	TV1	649635,00 ^a	523031,20 ^b	348682,10 ^{bc}	195956,20 ^c	11266,20 ^c
Potassium phosphate monopotassique	Tcomp	245843,00 ^a	47979,80 ^b	30571,20 ^c	10615,00 ^d	6369,00 ^d
	TV1	649635,00 ^a	65813,00 ^b	28872,60 ^c	28448,20 ^c	6793,00 ^d

Deux valeurs lus sur la même ligne, suivies par la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman & Keuls.

3.2 ESTIMATION DE L'EFFET DES ÉLÉMENTS FERTILISANTS SUR LE pH, POIDS FRAIS ET POIDS SEC SUR MILIEU LIQUIDE

3.2.1 LE PH

Le tableau 3 montre l'effet des sels sur l'évolution du pH des deux souches de *Trichoderma* (Tcomp et TV1) sur milieu liquide.

Avant la mise en culture, le pH du milieu de culture à base de pomme de terre à 0 mg/L est légèrement basique 7,64, à l'addition des sels, le pH a augmenté avec l'augmentation des concentrations variant de 7,64 à 8,22 à 2,5 mg/L, 7,64 à 8,28 à 5 mg/L, 7,66 à 8,30 à 10 mg/L et de 7,73 à 8,60 à 50 mg/L.

Sept jours après la mise en culture des deux souches de *Trichoderma*, le pH diminue pour les témoins et en présence des différentes concentrations des sels de calcium jusqu'à devenir acide variant de 3,79 à 5,83 à 2,5 mg/L, 3,60 à 5,66 à 5 mg/L, 3,43 à 5,5 à 10 mg/L et de 3,13 à 5,06 à 50 mg/L.

Tableau 3 : Effet de différents sels sur le pH avant et après la culture de *T. harzianum* et de *T. viride*.

Sels	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations (mg/L)									
		Avant la culture					Après la culture				
		0	2,5	5	10	50	0	2,5	5	10	50
Ammonium nitrate	Tcomp	7,64 ^b	8,22 ^a	8,28 ^a	8,30 ^a	8,60 ^a	5,87 ^a	5,26 ^a	4,52 ^{ab}	3,93 ^b	3,88 ^b
		TV1	4,87 ^a	4,82 ^a	4,70 ^{ab}	4,45 ^b	4,43 ^b	5,87 ^a	4,39 ^{ab}	3,99 ^b	3,91 ^b
Calcium chlorure	Tcomp	7,64 ^b	8,15 ^a	8,22 ^a	8,30 ^a	8,45 ^a	4,87 ^a				
		TV1	5,87 ^a	4,75 ^b	4,14 ^b	4,08 ^b	4,04 ^b	5,87 ^a	4,56 ^a	4,36 ^a	4,16 ^a
Ammonium sulfate	Tcomp	7,64 ^b	8,03 ^a	8,05 ^a	8,14 ^a	8,15 ^a	4,87 ^a				
		TV1	5,87 ^a	4,75 ^b	4,14 ^b	4,08 ^b	4,04 ^b	5,87 ^a	4,56 ^a	4,36 ^a	4,16 ^a
Potassium nitrate	Tcomp	7,64 ^a	7,64 ^a	7,64 ^a	7,66 ^a	7,73 ^a	4,87 ^a				
		TV1	5,87 ^a	4,47 ^a	4,35 ^a	4,20 ^a	4,17 ^a	5,87 ^a	5,16 ^{ab}	4,54 ^b	4,09 ^b
Calcium sulfate hydrate	Tcomp	7,64 ^a	7,69 ^a	7,80 ^a	7,86 ^a	7,91 ^a	4,87 ^a				
		TV1	5,87 ^a	5,16 ^{ab}	4,54 ^b	4,09 ^b	3,13 ^c	5,87 ^a	5,83 ^a	5,66 ^a	5,5 ^a
Potassium phosphate monopotassique	Tcomp	7,64 ^b	7,69 ^b	7,85 ^{ab}	7,9 ^a	7,92 ^a	4,87 ^a				
		TV1	5,87 ^a	4,82 ^a	4,62 ^a	4,28 ^a	4,20 ^a				

Deux valeurs lus sur la même ligne pour chaque type de culture, suivies par la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman & Keuls.

3.2.2 LES POIDS FRAIS ET SECS

Les tableaux 4 et 5 montrent l'effet de différents sels sur les poids frais et sec du mycélium des deux souches de *Trichoderma* (Tcomp et TV1).

Ces résultats montrent que plus la concentration des sels augmente, plus le poids frais du mycélium de Tcomp et de TV1 diminue. Il a varié de 3,29 à 10,01 à 2,5 mg/L, 3,28 à 9,73 à 5 mg/L, 2,76 à 9,30 à 10 mg/L et de 0,01 à 6,69 à 50 mg/L. En effet, les valeurs les plus faibles, respectivement 0,01 mg et 2,79 mg, ont été enregistrées en présence du Calcium chlorure à une concentration de 50 mg/L.

De même, après 24h à 70°C, les poids secs ont diminué en présence des différents sels variant de 0,55 à 5,81 à 2,5 mg/L, 0,39 à 4,13 à 5 mg/L, 0,05 à 3,34 à 10 mg/L et nul à 2,80 mg/L. Les plus faibles valeurs de poids sec de Tcomp et de TV1 ont été respectivement nulle et de 0,54 mg ont été obtenues sur un milieu additionnée du Calcium chlorure à une concentration de 50 mg/L.

Tableau 4 : Effet de différents sels sur les poids frais du mycélium de *T. harzianum* et de *T. viride* (exprimés en mg).

Sels	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations (mg/L)				
		0	2,5	5	10	50
Ammonium nitrate	Tcomp	8,36 ^a	7,80 ^a	7,29 ^a	6,95 ^a	6,69 ^a
	TV1	10,38 ^a	6,13 ^a	5,16 ^a	5,03 ^a	5,00 ^a
Calcium chlorure	Tcomp	8,36 ^a	6,19 ^{ab}	6,19 ^{ab}	5,32 ^b	0,01 ^b
	TV1	10,38 ^a	6,49 ^{bc}	6,49 ^{bc}	3,62 ^{bc}	2,79 ^c
Ammonium sulfate	Tcomp	8,36 ^a	3,83 ^a	3,76 ^a	3,66 ^a	3,04 ^a
	TV1	10,38 ^a	10,01 ^a	9,73 ^a	9,30 ^a	5,57 ^a
Potassium nitrate	Tcomp	8,36 ^a	3,29 ^b	3,28 ^{bc}	2,76 ^{bc}	2,69 ^c
	TV1	10,38 ^a	4,43 ^b	4,35 ^b	3,86 ^b	3,60 ^b
Calcium sulfate hydrate	Tcomp	8,36 ^a	8,22 ^a	7,66 ^a	5,13 ^b	3,76 ^b
	TV1	10,38 ^a	6,99 ^{bc}	6,70 ^b	6,04 ^{bc}	4,81 ^c

Potassium phosphate monopotassique	Tcomp	8,36 ^a	4,69 ^b	4,64 ^b	4,40 ^{ab}	3,77 ^b
	TV1	10,38 ^a	5,53 ^b	6,54 ^b	6,30 ^b	6,11 ^b

Deux valeurs lus sur la même ligne, suivies par la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman & Keuls.

Tableau 5 : Effet de différents sels sur les poids sec du mycélium de *T. harzianum* et de *T. viride* (exprimés en mg).

Sels	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations (mg/L)				
		0	2,5	5	10	50
Ammonium nitrate	Tcomp	7,31 ^a	2,56 ^b	2,23 ^b	1,82 ^b	1,29 ^b
	TV1	9,28 ^a	2,44 ^b	1,90 ^b	1,05 ^b	1,01 ^b
Calcium chlorure	Tcomp	7,31 ^a	0,85 ^b	0,39 ^b	0,05 ^b	0,00 ^b
	TV1	9,28 ^a	1,86 ^b	1,30 ^b	0,58 ^b	0,54 ^b
Ammonium sulfate	Tcomp	7,31 ^a	1,20 ^b	0,92 ^b	0,89 ^b	0,53 ^b
	TV1	9,28 ^a	2,72 ^a	2,54 ^a	2,39 ^a	2,11 ^a
Potassium nitrate	Tcomp	7,31 ^a	0,55 ^b	0,55 ^b	0,53 ^b	0,5 ^b
	TV1	9,28 ^a	0,63 ^b	0,62 ^b	0,60 ^b	0,00 ^b
Calcium sulfate hydrate	Tcomp	7,31 ^a	5,81 ^a	4,13 ^b	3,34 ^b	1,33 ^c
	TV1	9,28 ^a	3,73 ^b	2,61 ^{bc}	1,88 ^c	0,28 ^c
Potassium phosphate monopotassique	Tcomp	7,31 ^a	2,60 ^b	1,70 ^{bc}	1,57 ^{bc}	0,26 ^c
	TV1	9,28 ^a	3,11 ^b	2,51 ^b	1,84 ^b	2,80 ^b

Deux valeurs lus sur la même ligne, suivies par la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman & Keuls.

3.3 EFFET DES D'ÉLÉMENTS FERTILISANTS SUR LE MAINTIEN DE *TRICHODERMA* DANS LE SOL

Les résultats des pourcentages de colonisation des fragments de pailles d'orge par *T. harzianum* et *T. viride* dans un sol additionné de 400 mg/L de chacun des produits contenant des fertilisants sont illustrés dans la **Figure 1**.

En absence des éléments fertilisants, les deux souches ont colonisé tous les fragments de paille d'orge, le pourcentage de colonisation est de 100%. Cependant, avec l'addition des éléments fertilisants, les pourcentages des fragments de paille colonisés par les deux souches ont légèrement diminué.

La souche de *Trichoderma harzianum* a colonisé 89% des fragments de paille, en présence de l'Ammonium nitrate et 63% en présence du Potassium nitrate.

Trichoderma viride a colonisé respectivement 94 et 89% des fragments de paille en présence du potassium nitrate et du calcium chlorure. Par contre, en présence de l'Ammonium nitrate et l'Ammonium sulfate, *Trichoderma viride* a colonisé respectivement 71 et 77% des fragments de paille.

Le calcium sulfate d'hydrate a eu le même effet sur les deux souches de *Trichoderma*, le pourcentage de colonisation est de 79% pour les deux souches.

Trichoderma viride est sensible au potassium phosphate mono potassique, le pourcentage des fragments de paille colonisés est de 68%. Par contre, *Trichoderma harzianum* s'est montré plus résistante et a colonisé 84% des fragments de paille.

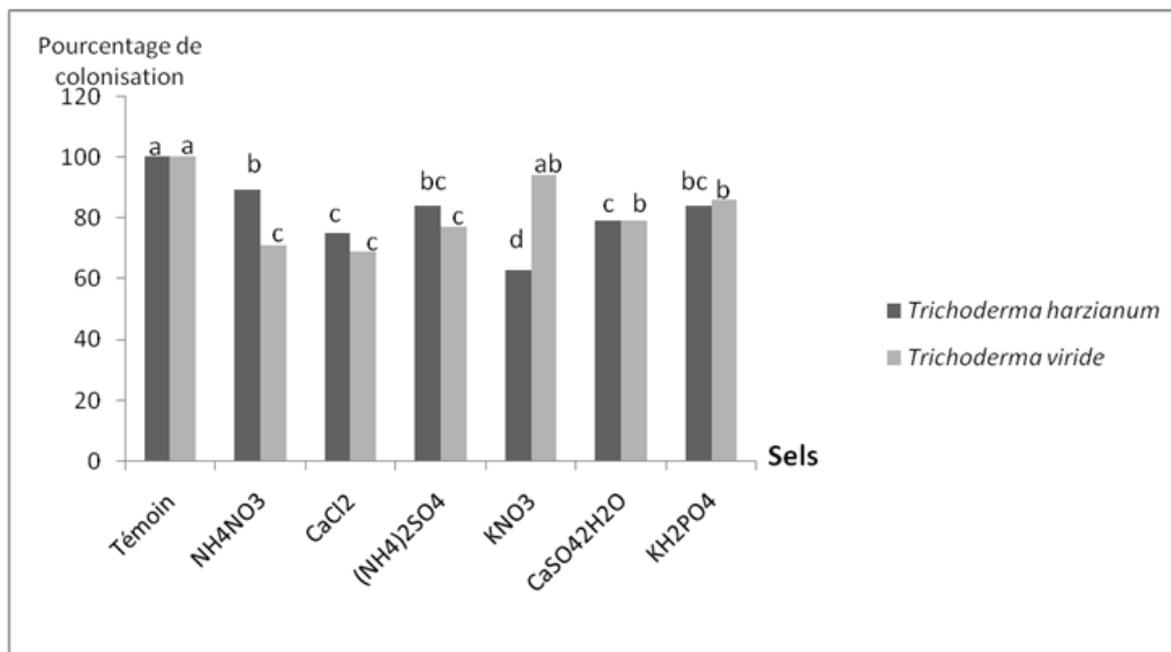


Figure 1 : Colonisation des fragments de paille d'orge par *T. harzianum* et *T. viride* apportée au substrat additionné par 400 mg/L de chacun des sels, après 4 jours d'incubation dans un sol non stérilisé (exprimé en %).

Deux résultats affectés de la même lettre pour chaque souche ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de Newman & keuls

4 DISCUSSION

Dans les systèmes agricoles, des composés contenant du métal sont de plus en plus libérés dans le sol à partir des pesticides, des engrais chimiques et des effluents d'eaux usées industrielles et ménagers [8]. En effet, certains minéraux ont un effet important dans la croissance et le développement des organismes, ils peuvent conduire à une toxicité à concentration élevée par l'intermédiaire du blocage, la dénaturation et l'inactivation de certaines molécules biologiques importantes telles que les protéines et les enzymes. Ils sont aussi des perturbateurs des échanges d'ions de la membrane cellulaire [5]. Cependant, certains minéraux à une concentration optimale, jouent un rôle majeur dans la croissance, le développement et les réponses de défense des plantes contre différents types de stress biotiques et abiotiques [9].

La prise de conscience de la pollution par les métaux dans le sol a soulevé la nécessité d'étudier des alternatives telles que l'utilisation des *Trichoderma* spp. comme bio-pesticides, engrais biologiques et bioabsorbants ainsi que agents de bioremédiation/bioaccumulation particulièrement dans les sols agricoles sur les sites industriels. D'autre part, l'application de *Trichoderma* avec certains métaux contenus dans les pesticides et / ou dans les engrais chimiques soulève la nécessité d'études approfondies [9].

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* comme des agents de lutte biologique (ALB) contre les maladies des plantes a été reconnu pour la première fois dans les années trente [10]. Ce potentiel leur a été attribué grâce à la multitude des caractères bénéfiques qu'elles possèdent.

L'utilisation de *Trichoderma* à des fins de lutte biologique aurait des répercussions positives sur l'environnement, telles que la diminution des intrants chimiques, l'amélioration des rendements, puisque les plantes seraient moins stressées par l'action souvent nocive des fongicides, et la réduction de l'exposition des travailleurs à ces produits [11]. De nombreux travaux ont montré l'efficacité des *Trichoderma* spp. dans la protection de plusieurs cultures contre différents pathogènes, luzerne / *Fusarium avenaceum* [12], Tomate / *Botrytis cinerea* [13], Tomate / *Verticillium dahliae* [14], et Pomme de terre / *Phytophthora infestans* [15].

Dans ce travail, la tolérance et la survie de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* ont été évaluées en présence de quatre éléments fertilisants (N, P, K, Ca), utilisés respectivement sous forme d'Ammonium nitrate (NH₄NO₃), Ammonium

sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Potassium phosphate mono potassique (KH_2PO_4), Potassium nitrate (KNO_3), Calcium sulfate d'hydrate ($\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) et Calcium chlorure (CaCl_2).

Les résultats obtenus ont montré que les éléments fertilisants les plus toxiques contre la croissance du mycélium des deux souches de *Trichoderma* sont le Calcium chlorure et le Potassium phosphate monopotassique. Ils ont permis une réduction de plus 50% de la croissance radiale des deux espèces.

Par contre, les deux souches de *Trichoderma* ont présenté une forte tolérance aux éléments fertilisants présents dans NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et KNO_3 . *T. harzianum* et *T. viride* ont pu survivre à une concentration plus élevée de $\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$.

Le chlorure de calcium a pourtant montré une action modérée sur l'inhibition des trois stades du cycle des isolats d'*Alternaria alternata*. Ce produit a inhibé légèrement la germination des conidies des isolats de *Fusarium oxysporum* mais s'est montré très inefficace sur la croissance radiale et la production de conidies [16]. Des résultats similaires ont été notés lors du traitement par du CaCl_2 de *Penicillium expansum* et *Alternaria* spp. isolés des pommes et des poires [17, 18, 19], d'*A. alternata*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum* et *Fusarium avenaceum* isolés des pommes [16] et de *Leucostoma persoonii* isolé des pêches [20]. Les sels de calcium ont par ailleurs montré un effet significatif sur la croissance de *Leucostoma persoonii*, agent responsable du chancre du pêcher. Biggs *et al* [21] ont montré que tous les sels de calcium testés à l'exception du formate, le panthothénate et le phosphate dibasique de calcium ont réduit la croissance de *Monilia fructicola*, agent responsable de la pourriture brune du pêcher sur le milieu PDA enrichi. La croissance *in vitro* du *Rhizopus stolonifer*, champignon responsable de la pourriture des fruits et légumes en post-récolte, a été inhibée par le chlorure de calcium comme cela a été également le cas pour l'*Helminthosporium solani* [22].

Les résultats obtenus *in vitro* sur l'effet des éléments nutritifs phosphatés sur la croissance mycélienne et la sporulation des deux souches de *Trichoderma* spp. agents de lutte biologique ont montré que la croissance mycélienne et la sporulation ont été réduites sur un milieu de culture amendé de KH_2PO_4 . De même, l'augmentation de la concentration du KH_2PO_4 a entraîné une diminution de 50 % de la sporulation chez *Claviceps purpurea* [23]. Les niveaux très élevés de phosphore ont entraîné une inhibition des enzymes importants dans le processus de sporulation chez ce champignon. Ceci montre que les concentrations de phosphore qui sont optimales pour certains processus sont inhibitrices pour d'autres [24]. Par contre, les résultats obtenus par Sanogo et Yang [25] sur l'effet des éléments nutritifs phosphatés sur la croissance mycélienne et sur la germination *in vitro* de *Fusarium solani* (Mart) Sacc. f sp. *glycines* (*Fsg*), agent responsable du syndrome de la mort subite du soya, ont montré que la croissance mycélienne a été améliorée sur un milieu de culture amendé de KH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 comme *Helminthosporium solani* en présence de $\text{Na}_3\text{PO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$. Le même phénomène a été observé chez *Candida* sp. où la croissance a significativement augmenté en présence d'une variété de sources organiques et inorganiques de phosphore [26].

Par contre, le sulfate d'ammonium a permis une croissance plus importante de *Trichoderma* dans les milieux solide et liquide par rapport à d'autre source d'azote tel que le nitrate de potassium. La croissance de *Trichoderma harzianum* a augmenté malgré les teneurs élevées en sulfate d'ammonium dans le milieu de culture. Par contre, en présence des taux élevés de l'urée et du nitrate de potassium, la croissance des souches de *Trichoderma* a montrée une légère diminution. Le potassium nitrate et l'urée sont relativement utilisés par *Trichoderma harzianum* et semblent avoir un effet défavorable à des taux élevés [27]. Papavizas [28] et Wekelin *et al.* [29] ont montré que le sulfate d'ammonium a été plus facilement assimilable par ce champignon par rapport au potassium nitrate et à l'urée. Ils ont également trouvé que les espèces de *Trichoderma* avaient une préférence de l'ion ammonium.

Cependant, ces engrais ont pu améliorer indirectement la croissance de *Trichoderma harzianum* par l'acidification du milieu. Il a été rapporté par de nombreux auteurs qu'un pH acide est favorable au développement de *Trichoderma* et de sa capacité antagoniste [30,31]. D'après Shylaja et Rao [32], le test de compatibilité de *Trichoderma harzianum* avec du nitrate d'ammonium calcaire a montré qu'ils sont incompatibles dans le cas des concentrations élevées du produit. Nyiransengiyumva [33] a montré que l'addition d'une concentration de $\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ a significativement diminué la croissance mycélienne d'*Helminthosporium solani* par rapport au témoin.

Avant la mise en culture, le pH du milieu de culture à base de pomme de terre en absence des éléments fertilisants est basique, et après la culture de *Trichoderma*, il y a une diminution du pH.

Une dissociation progressive des sites protons présents sur les parois de champignons peuvent être observées. La présence des métaux favorise la dissociation du site acide, abaissant le pH, par conséquent, l'augmentation de la quantité des éléments fertilisants. En effet, au cours du processus d'absorption, les ions métalliques sont en concurrence avec les protons pour les sites de liaison présents sur les parois de champignons [34]. La diminution du pH correspond seulement à la libération de protons des groupes réactifs présents à la surface des parois cellulaires des champignons. A des valeurs de pH plus élevées, les protons libérés de l'eau d'hydratation de l'élément fertilisant, contribuent également à l'augmentation du

pH [34]. L'acidification du milieu représentée par la diminution du pH a été observée sept jours après la culture de *Trichoderma harzianum* dans le milieu de culture et modifié par les différentes concentrations de NaCl [35].

Les poids frais et sec du mycélium des deux souches de *Trichoderma* ont diminué simultanément avec l'augmentation des concentrations des différents éléments fertilisants. Cette diminution a pour signification que seul le contenu du mycélium des deux souches de *Trichoderma* est resté après séchage.

L'ensemble des résultats obtenus a montré qu'en absence des éléments fertilisants, les deux souches de *Trichoderma* ont colonisé tous les fragments de paille d'orge. Cependant, les pourcentages de colonisation par les deux souches de *Trichoderma* des fragments de paille ont diminué après l'addition des éléments fertilisants. La souche Tcomp de *Trichoderma harzianum* s'est montrée plus tolérante à la présence de l'élément fertilisant que la souche TV1 de *Trichoderma viride*.

L'agent pathogène profite de la compétition pour les éléments nutritifs disponibles dans le substrat pour accroître son potentiel d'inoculum et par conséquent, sa capacité à causer la maladie. Si l'activité antagoniste d'un agent biologique n'est pas forcément liée à la taille de sa population [36], le maintien d'un inoculum important est la garantie d'une action prolongée.

Ainsi, il est nécessaire de favoriser la croissance des souches de *Trichoderma* destinées à la culture contre les microorganismes telluriques, puisque la population naturelle de *Trichoderma* dans les sols des régions agricoles ne dépasse en aucun cas 10^2 UFC/g de sol [37]. Or Chet et Baker [38] ont prouvé que la concentration efficace minimale de *Trichoderma* est d'environ 10^6 UFC/g de sol. En effet, l'antagoniste doit disposer, non seulement d'une activité mycoparasitaire spécifique, mais aussi d'une bonne aptitude à la compétition saprophytique dans le sol [39,40]. L'activité saprophyte de *Trichoderma harzianum* dans le sol n'a pas été affectée par l'augmentation des concentrations de NaCl [35].

5 CONCLUSION

Ce travail a permis de tester l'effet *in vitro* de quatre éléments fertilisants (N, P, K, Ca) sur le développement des deux espèces de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* en milieu solide et liquide. En effet, l'élément fertilisant le plus toxique contre les deux souches de *Trichoderma* est le Calcium chlorure à faible concentration. Par contre, elles ont présenté une forte tolérance aux éléments fertilisants présents (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 et KNO_3). *T. harzianum* et *T. viride* ont pu survivre à une concentration plus élevée de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Malgré un temps d'incubation très court et une concentration croissante des éléments fertilisants, la souche de *Trichoderma harzianum* est arrivée à coloniser la totalité des fragments de paille, montrant ainsi une aptitude très élevée au développement saprophytique, suivie de la souche de *T. viride* qui a été moins compétitive dans le sol.

Des expériences plus avancées pourront permettre de mieux comprendre l'effet de différentes sources d'azote et de phosphate sur le cycle de vie et l'activité saprophytique dans le sol de *Trichoderma*. En effet, les propriétés dépolluantes de ces deux espèces pourront être utilisées en agriculture dans la dépollution des sols présentant un excès d'engrais mais aussi augmenter l'absorption des éléments fertilisants par les plantes.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du programme national d'appui à la recherche sectorielle, projet RS-23, « Situation phytosanitaire de la culture du Fraisier au Maroc et recherche de moyens de lutte alternatifs : Production et formulation d'un Biofongicide à base de *Trichoderma* spp. » financé par le Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc.

REFERENCES

- [1] Mouria B., OuazzaniTouhami A. et Douira A., Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, 88 (3) (2007) 103-110.
- [2] Mouria B., OuazzaniTouhami A. et Douira A., 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 (2005) 211-224.
- [3] Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M., *Trichoderma* species –opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2004) 43-56.

- [4] Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y. and Chet I., Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235 (2001) 235-242.
- [5] Errasquin E.L. and Vazquez C., Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, 50 (2003) 137-143.
- [6] Anand P., Isar J., Savan S. & Saxena P.K., Bioaccumulation of Copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97 (2006) 1018-1025.
- [7] Ting A.S.Y. and Choong C.C., Bioaccumulation and bioabsorption efficacy of *Trichoderma* isolates SP2F1 in removing Copper (Cu II) from aqueous solutions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 (2009) 1431-1437.
- [8] Ochiai E.L., General principals of biochemistry of the elements. New York, Plenum Press. ISBN – 13(1987) 227-234.
- [9] Kucuk C., Kivanc M., Kinaci E. and Kinaci G., Determination of the growth and solubilization capability of *Trichoderma harzianum* T. *Biologia*, 63 (2) (2008) 167-170.
- [10] Howell C.R., Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87 (1) (2003) 4-10.
- [11] Caron J., Laverdière L., Thibodeau P.O. et Bélanger R.R. Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 (2) (2002) 73 – 87.
- [12] Mhamdi N., Etude d'un mélange *Sinorhizobium meliloti* – *Trichoderma viride* produit dans les eaux usées d'amidon: optimisation et effet sur la luzerne. Mémoire de Maîtrise en Sciences de l'Eau, Centre Eau Terre Environnement, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Canada (2011), 78 pages.
- [13] Mouria B., Ouazzani Touhami A. et Douira A., Effet du compost et de *Trichoderma harzianum* sur la suppression de la verticilliose de la tomate. *Journal of Applied Biosciences*, 70 (2013) 5531-5543.
- [14] Mouria B., Ouazzani Touhami A., Mouria A., Benkirane R. et Douira A., Effect of compost and antagonistic fungi on suppression of tomato Grey Mold. *Biolife* 3(2) (2015) 378- 390.
- [15] Kerroum F., Karkachi N., Jamal Edinne H., Kihal M., Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North – west of Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 6 (4) (2015) 44-53.
- [16] Selmaoui K. et Douira A., Effet *in vitro* des sels de calcium sur le développement et la colonisation des pommes en conservation par un complexe fongique. *Al Awamia*, (109-110) (2003) 159-174.
- [17] Biggs A. R., Ingle M. & Solihati W.D., Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. *Plant Disease*, 77(10)(1993) 976-980.
- [18] Conway W.S., Effect of postharvest calcium treatment on decay of Delicious apples. *Plant Disease*, 66 (5) (1982) 402-403.
- [19] Maouni A., Lamarti A., Douira A. et Badoc A., Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 140 (1-4) (2001) 71-80.
- [20] Biggs A. R., El-Kholi M.M. & El-Neshawy S.M., Effect of calcium salts on growth, pectic enzyme activity, and colonization of Peach twigs by *Leucostoma persoonii*. *Plant Disease*, 78 (9) (1994) 886-890.
- [21] Biggs A. R., El-Kholi M. M., El-Neshawy S., and Nickerson R., Effect of calcium salts on growth, polygalacturonase activity and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 81 (1997) 399-403.
- [22] Tian S. P., Fan Q., Xu Y. and Jiang A. L., Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathology*, 51 (2002) 352-358.
- [23] Kybal J., Majer J., Komersova I. and Wani W. D., Phosphorus content during development of *Claviceps purpurea*. *Phytopathology* 58 (1968) 647-650.
- [24] Garraway M. O. and Evans R. C., Fungal nutrition and physiology. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York, NY, (1984) 401 p.
- [25] Sanogo S., and Yang X. B., Relation of sand content, pH, potassium and phosphorus nutrition to the development of sudden death syndrome in soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23 (2001) 174-180.
- [26] Shamis D. L., Gelikova N. S. and Sarsenova L. N., Effect of different sources of phosphorus nutrition on biomass of fodder yeasts and the nitrogen and phosphorus content of them. *Trans. Inst. Microbiol. Virisol. Akad. Nauk. Kay. USSR* 11 (1968) 18-24.
- [27] Khatlaba N., Ezzahiri B., Louali L. and Oihabi A., Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*. *Agronomie*, 24 (5) (2004) 281-288.
- [28] Papavizas G.C., *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol, *Annual Review of Phytopathology*, 23 (1985) 23–54.
- [29] Wekelin S.A., Sivasithamparam K., Cole A.L.J & Skip R.A., Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42 (1999) 337–345.

- [30] Burpee L.L., The influence of abiotic factors on biological control of soil-borne plant pathogenic fungi, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12 (1990) 308–317.
- [31] Kredics L., Antal S., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F. & Nagy E., Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential, *Food Technology and Biotechnology*, 41 (2003) 37–42.
- [32] Shylaja M. and Rao M. S., *In vitro* compatibility studies of *Trichoderma harzianum* with inorganic fertilizers. *Nematol. mediterr.*, 40 (2012) 51-54.
- [33] Nyiransengiyumva C., Effet de différents éléments minéraux sur la croissance et le développement du champignon *Helminthosporium solani*, agent responsable de la gale argentée de la pomme de terre. Mémoire de Maîtrise en Biologie végétale, Département de Phytologie, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval Québec, (2007) 58 p.
- [34] Stevenson F.J., Nature of divalent transition metal complexes of humic acids as revealed by a modified potenziometric titration method. *Soil Science*, 1231(1977) 10-17.
- [35] Ouazzani Chahdi A., Chliyah M., Mouria B., Dahmani J., OuazzaniTouhami A., Benkirane R., Achbani H. and Douira A., *In vitro* and *in vivo* effect of salinity on the antagonist potential of *Trichoderma harzianum* and sensitivity of tomato to *Verticillium* wilt. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(4) (2014) 780-791.
- [36] Davet P., Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. In *Les antagonismes microbiens. Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes.* - 24e Colloque Société Française de Phytopathologie, Bordeaux, 26-28 mai 1983. Versailles : *Institut National de la Recherche Agronomique*, (1983)159-168.
- [37] Chet I., *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. *Innovative approaches to plant disease control.* New York. Wiley, (1987) 372 p.
- [38] Chet I. & Baker R., Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 70 (10) (1980) 994-998.
- [39] Davet P. et Comporota P., Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. *Agronomie*, 6 (6) (1986) 575-581.
- [40] Fahima T. and Henis Y., Quantitative assessment of the interaction between the antagonistic fungus *Talaromyces flavus* and the wilt pathogen *Verticillium dahliae* on eggplant roots. *Plant and Soil*, 176 (1) (1995) 129-137.