

Caractérisation phénotypique des espèces locales de *Trichoderma* sous différentes températures dans les systèmes de culture à base de plantain au Sud Bénin

Euloge Codjo TOGBÉ^{1*}, Alphonsine Agbalè BADOU¹, Ezéchiél Jean-Paul Armand MENSAH²
et Bonaventure Cohovi AHOHUENDO¹

¹ Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences Agronomiques, Ecole des Sciences et Techniques de Production Végétale, Laboratoire de Biologie Végétale, Unité de Recherche en Phytopathologie, 01 BP 526, Cotonou, Bénin

² Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences Agronomiques, Laboratoire d'Écologie Appliquée, 01 BP 526, Cotonou, Bénin

(Reçu le 20 Décembre 2023 ; Accepté le 22 Janvier 2024)

* Correspondance, courriel : euloge.togbe@yahoo.fr

Résumé

Cette étude a pour objectif d'étudier l'effet des variations de températures sur la diversité des espèces locales de *Trichoderma* au sud-Bénin. Au total, 40 isolats de *Trichoderma* ont été isolés et incubés à températures variables à partir de 183 échantillons de sol, des feuilles nécrosées de plantain et des débris végétaux. Les paramètres morphologiques tels que la pigmentation du mycélium, du revers de la boîte de culture, la présence d'anneau et de pustule sur la surface du mycélium et la croissance moyenne des isolats à différentes températures ont été évalués. Les résultats montrent que les températures optimales pour la croissance des isolats de *Trichoderma* sont comprises entre 25°C et 28°C. Les variations notées au niveau des paramètres étudiés ont permis d'identifier six groupes différents au sein des isolats de *Trichoderma*. Cette diversité est un atout pour la gestion durable des nuisibles du fait qu'elle est un indicateur d'une forte probabilité de succès de la lutte biologique à base des souches de *Trichoderma*.

Mots-clés : *Trichoderma*, espèces locales, diversité, paramètres morphologiques, système de culture.

Abstract

Phenotypic characterization of local species of *Trichoderma* under various temperatures in plantain-based cropping systems in southern Benin

The objective of this study was to investigate the effect of plantain-based cropping systems on the diversity of local *Trichoderma* species in southern Benin. Soil samples, necrotic plantain leaves and plant debris were collected from different plantain cropping systems in three municipalities. Overall, 40 strains of *Trichoderma* were isolated and incubated at various temperatures from 183 samples including soil samples, necrotic plantain leaves and plant debris. Morphological parameters that were evaluated include mycelium pigmentation, the one of the back side of the Petri dish, the presence of rings and pustules on the top of the mycelium of the strains and the average growth of the isolate at various temperatures. Results show that the

optimal temperatures for the growth of *Trichoderma* isolates are located between 25°C and 28°C. The variations recorded with the investigated parameters led to the identification of six various groups of *Trichoderma*, which is an indication of the high likelihood of the success of biological control in pest management.

Keywords : *Trichoderma, local species, diversity, morphological parameters, cropping system.*

1. Introduction

Les champignons antagonistes sont reconnus comme de meilleurs agents de lutte biologique à cause de leur capacité à coloniser le sol et/ou les parties aériennes de la plante, occupant ainsi l'espace et limitant la prolifération des phytopathogènes [1]. Parmi ces derniers, le genre *Trichoderma* constitue un agent de lutte biologique efficace largement utilisée contre une gamme variée d'agents phytopathogènes du sol et des feuilles [2]. Les espèces de ce champignon sont largement utilisées dans la lutte biologique en raison de leur croissance rapide, leur capacité à survivre dans des conditions extrêmes ; ce qui favorise la croissance des plantes et la lutte contre les champignons phytopathogènes [3]. De plus, les espèces de *Trichoderma* interviennent également dans la décomposition des matières organiques du sol conduisant ainsi à une grande disponibilité des nutriments assimilables par les plantes [4, 5]. Au Bénin, l'utilisation des espèces de *Trichoderma* contre les maladies des plantes avait porté sur *Sclerotium rolfsii*, agent pathogène responsable de la fonte de semis et de la pourriture des tiges du niébé [6]. Aussi, [7] a-t-il été évalué le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* sur *Mycosphaerella fijensis*, agent pathogène de la cercosporiose noire du plantain. L'ensemble des souches de *Trichoderma* utilisées lors de ces études se sont révélées très efficaces dans la gestion des agents pathogènes des cultures. Mais, les souches utilisées n'étaient pas locales. Pourtant, l'utilisation des souches locales pour la formulation des biopesticides à base de *Trichoderma* est fortement recommandée pour garantir une meilleure efficacité biologique des espèces [8]. La diversité des espèces de *Trichoderma* a fait l'objet de plusieurs études dans le monde [9]. Mais au Bénin, les activités de recherche y relatives sont très limitées. L'objectif du présent travail est de caractériser les espèces locales de *Trichoderma* inféodées au plantain dans différents systèmes de culture à base de plantain au sud Bénin en vue de leur utilisation pour la mise en place d'une méthode de lutte intégrée contre les maladies des bananiers. En effet, la diversité des souches de *Trichoderma* est influencée par divers facteurs tels que les pratiques culturales, les systèmes de culture et d'autres facteurs abiotiques comme la température [10]. Dans la présente étude, il s'agira d'inventorier les espèces locales de *Trichoderma* inféodées aux plantains en fonction des systèmes de culture et de faire une caractérisation morphologique des espèces locales de *Trichoderma* sous l'effet de la variation de la température.

2. Matériel et méthodes

2-1. Milieu d'étude

Les échantillons de sol, de feuilles de bananier et des débris végétaux ont été prélevés au niveau des différents systèmes de culture de bananier plantain dans les communes de Athiémé, Adja-Ouèrè et Ouinhi respectivement dans les départements du Mono, Plateau et Zou au sud-Bénin. Ces communes ont été identifiées comme de fortes zones de production de plantain par le projet AVLANTO-Bénin. Elles sont caractérisées par un climat subéquatorial avec une forte humidité, deux saisons sèches (de novembre à mars et de mi-juillet à mi-septembre) et deux saisons pluvieuses (d'avril à mi-juillet et de mi-septembre à octobre). La pluviométrie varie entre 900 mm et 1500 mm avec une température moyenne annuelle qui est de 26,5°. L'humidité relative est de 75 % en moyenne par an. L'insolation moyenne annuelle est de 2290 heures et la majorité des sols de ces communes sont de types hydromorphes, ferralitiques et ferrugineux tropicaux [11].

2-2. Cadre expérimental

L'isolement et l'identification morphologique des isolats de *Trichoderma* ont été faits à l'Unité de Recherche en Phytopathologie, Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), Université d'Abomey-Calavi (UAC). La commune d'Abomey-Calavi est située dans le département de l'Atlantique entre les parallèles de 6° 22' et 6° 30' de latitude Nord et les méridiens 2° 15' et 2° 22' de longitude Est.

2-3. Méthodes d'échantillonnage

La taille de l'échantillon de plantations de plantain prospectées par commune a été définie proportionnellement au nombre de producteurs de plantain préalablement recensés dans la commune suivant la formule de [12], donnant 47, 9 et 5 producteurs respectivement pour sur un total de 1029 producteurs à Athiémé (Mono), 523 à Adja-Ouèrè (Plateau) et 176 à Ouinhi (Zou).

$$n_i = = U_{1-\alpha/2}^2 p_i (1 - p_i) / d^2 \quad (1)$$

avec,

- n_i , la taille minimale de producteurs de plantain à échantillonner dans la commune i afin de pouvoir généraliser les résultats obtenus ;
- $U_{1-\alpha/2}$ est la valeur de la variable normale aléatoire pour une valeur de probabilité de α . $\alpha = 0,05$, donc $U_{1-\alpha/2} = 1,96$;
- p_i , le poids des producteurs de la banane rapportée aux agriculteurs et para agriculteurs dans la commune i ;
- d , la marge d'erreur fixée à 5 %.

Les valeurs du paramètre p_i utilisées ici ont été calculées sur la base du quatrième Recensement Général de la Population et de l'Habitation (RGPH-4) effectué en 2013. La **Formule** suivante a permis d'estimer la population d'agriculteurs en 2019 qui est l'année de référence.

$$Pop_n = Pop_0 (1 + t)^n \quad (2)$$

où, Pop_n : Population pour l'année n ; Pop_0 : Population pour l'année de référence ; t : Taux de croissance de la population ; n : Différence entre l'année ciblée et l'année de référence.

2-4. Origine de prélèvement des isolats de *Trichoderma*

Les souches de *Trichoderma* caractérisées ont été isolées des échantillons de sol, de feuilles de bananier et des débris végétaux sous les bananiers prélevés au niveau des différents systèmes de culture à base de plantain dans chaque commune. A cet effet, 100 g de sol ont été prélevés à une profondeur de 15 cm à l'aide d'une tarière au niveau du système racinaire de cinq pieds de bananiers plantains choisis dans chaque plantation suivant la diagonale. Les échantillons de sol provenant d'une plantation ont été par la suite homogénéisés puis 40 g de sol ont été prélevés et conservés dans des sachets stériles. Les feuilles de bananiers plantain présentant les symptômes de la cercosporiose noire et les débris végétaux ont été prélevées dans chaque plantation puis conservées dans des enveloppes, et transportées au laboratoire pour être conservées à 4°C jusqu'à l'isolement [13].

2-5. Méthode d'isolement des espèces de *Trichoderma*

Le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) a été utilisé pour l'isolement et la purification des espèces de *Trichoderma*. Pour la préparation, 39 g de la poudre PDA a été dissout dans 1L d'eau distillée et le mélange a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Après autoclavage, de la pénicilline (Benzathine Benzylpénicilline) 1000000 UI (765 mg/l) et de la spectinomycine ont été ajoutées au milieu afin de réduire les contaminations. Le mélange a été par la suite coulé dans les boîtes de Petri sous une hotte à flux laminaire. Deux différentes méthodes ont été utilisées pour l'isolement de *Trichoderma* en fonction de la niche écologique du champignon :

- **Isolement de *Trichoderma* à partir du sol et des débris végétaux** : le sol et les débris végétaux ont été séchés à l'ombre pendant 4 jours et écrasés respectivement à l'aide d'un mortier et d'un mixeur puis tamisés. Ensuite, 10g de chaque échantillon ont été prélevés et versés dans des tubes à centrifuger auquel ont été ajoutés 40 ml d'eau distillée stérile. Le mélange obtenu a été homogénéisé, puis centrifugé à 4000 tours/minute pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été versé et le culot a été utilisé pour l'application de la technique de dilution suspension. Cette technique a consisté à mettre en suspension le culot des 10g d'échantillons préalablement centrifugé en y ajoutant 90 ml d'eau distillée stérile. Le mélange a été agité à l'aide d'un vortex pendant environ 30 minutes afin d'homogénéiser la solution, laquelle a constitué la dilution 10^{-1} . Cette solution a servi à préparer les dilutions décimales par l'ajout successif de 1ml de la solution à 9 ml d'eau distillée stérilisée jusqu'à l'obtention de 10^{-3} de dilution. Ensuite, un volume de 0,1ml de chaque dilution a été prélevé avec une micropipette et ensemencé dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA. Les boîtes ont été agitées manuellement de manière circulaire sur un plan horizontal afin de répartir la solution à la surface du PDA. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant quatre à sept jours en fonction de l'apparition des colonies de microorganismes [14].

- **Isolement de *Trichoderma* à partir des feuilles** : les feuilles de bananier ont été préalablement rincées au robinet puis séchées à l'ombre sur des papiers aluminium. Ensuite, elles ont été envoyées sous une hotte à flux laminaire et nettoyées avec de l'alcool 90°, puis découpées en de petits morceaux d'environ 0,5 cm² avec un ciseau stérile. Les morceaux de feuilles ont été désinfectés avec l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 3 minutes et rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, ces morceaux de feuilles ont été séchées sur des papiers essuie-tout et ensemencés dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA à raison de 4 morceaux par boîte. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant quatre à sept jours en fonction de l'apparition des colonies de microorganismes [15].

2-6. Purification des souches de *Trichoderma*

La purification des souches de *Trichoderma* a été fait à partir du 4^{ième} jour après ensemencement à partir des colonies de microorganismes apparue à la surface du PDA. Ainsi, les colonies présentant les caractères phénotypiques de *Trichoderma* ont été identifiées puis prélevées et ensemencée de manière aseptique en un seul point au centre d'une nouvelle boîte de Petri contenant le milieu PDA. Ces boîtes ont été scellées avec du papier film et incubées à 28°C pendant cinq jours [16]. En cas de contamination ou d'apparition de colonies présentant plusieurs caractères phénotypiques de *Trichoderma* dans une même boîte de Petri, des purifications successives ont été faites jusqu'à l'obtention d'une colonie pure du champignon.

2-7. Descripteurs de caractérisation phénotypique des espèces de *Trichoderma*

La caractérisation phénotypique des isolats de *Trichoderma* a été faite au laboratoire en utilisant des isolats cultivés dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA. A cet effet, 0.003cm de bouchon mycélien de chaque isolat ont été coupés à l'aide d'un boreur stérile et repiqués au centre. Chaque culture d'isolat a été répétée

trois fois sur du milieu de culture gélosé. Les boîtes ensemencées ont été par la suite incubées à 15°C, 25°C, 28°C et 35°C pendant 96 heures. Le diamètre de croissance de chaque isolat a été mesuré toutes les 24 heures. Les paramètres phénotypiques qualitatifs (i) la pigmentation du mycélium, (ii) la pigmentation du revers de la boîte de culture, (iii) l'absence ou la présence d'anneaux sur la surface du mycélium et (iv) l'absence ou la présence de pustule sur la surface du mycélium ont été mesurés le dernier jour de l'incubation [13, 17, 18].

2-8. Analyses statistiques

Les données de croissance par isolat ont été analysées en utilisant un modèle linéaire à effet fixe sur les données longitudinales. Le facteur isolat a été considéré comme fixe. La fonction lm a permis d'implémenter ce modèle. L'effet de la température sur la couleur du mycélium, la couleur du revers, la présence ou absence d'anneau et de pustule a été évalué en fonction des systèmes de culture grâce au modèle linéaire généralisé à effet fixe avec la famille poisson comme distribution de l'erreur. Ce dernier a été possible grâce à la fonction glm du package. En plus des résultats du modèle linéaire présentés, les moyennes ajustées aux différents modèles ont été obtenues par la fonction lsmeans du package lsmeans [19], et présentées graphiquement. Une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été effectuée sur la sortie de l'Analyse Multi Factorielle (AMF). La AMF et la CAH ont été réalisées avec le logiciel R 4.1.0 [20] à l'aide du package Factoshiny [21]. Toutes les analyses et graphiques ont été réalisées dans l'environnement du logiciel R 4.1.0 [20].

3. Résultats

3-1. Inventaire des espèces locales de *Trichoderma* inféodées aux plantains en fonction des systèmes de culture

Au total, 40 isolats de *Trichoderma* ont été isolés à partir de 183 échantillons constitués de sol, de débris végétaux et de feuilles nécrosées, collectés à partir de 61 plantations à base de plantain différenciées par trois systèmes de culture (monoculture, culture associée et la jachère) (**Tableau 1**). Le nombre d'isolats le plus élevé a été obtenu dans le système de culture pure avec une fréquence de 42,50 %, suivi du système de culture de jardin de case (40 %) et enfin la culture associée (17,5 %).

Tableau 1 : *Isolats provenant de chaque système de culture et leur fréquence relative*

Système de culture	Nombre d'échantillons par SC*	Nombre d'échantillons ayant d'isolat	Fréquence relative (%)
Culture associée	45	7	17,50
Culture pure	81	17	42,50
Jardin de case	57	16	40,00
Total	183	40	100

* SC = système de culture

3-2. Croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* en fonction de la variation thermique, la durée d'incubation et les systèmes de culture

L'origine (système de culture) des isolats n'a aucun effet sur la croissance de ces derniers (**Tableau 2**). Toutefois, cette croissance est influencée significativement par la température et la durée d'incubation. La croissance moyenne maximale des isolats a été enregistrée entre 25°C et 28°C dans tous les systèmes de

culture. Les isolats T2_3, T2_14, T2_24, T2_26 et T2_30 ont eu une croissance moyenne supérieure (allant de 6,02 cm à 7,11 cm) à celle des isolats T2_29 et T2_2 (0,00 cm et 1,42 cm) à 35°C. A 15°C, il a été remarqué que la majorité des isolats provenant de tous les systèmes de culture ont une croissance moyenne nulle (**Figure 1a, Figure 1b, 1c et 1d**). A 25°C, les isolats T2_29 et T1_5 provenant de jardin de case ont eu une croissance moyenne inférieure (environ 0,5cm et 2cm) à celle des autres isolats (**Figure 1d**). De plus, il a été remarqué que l'isolat T2_19 provenant du système de culture associée a eu une croissance moyenne supérieure (environ 6,8 cm) comparativement aux autres isolats dont la croissance moyenne était d'environ 5,8cm à 28°C (**Figure 1b**). Six sous-ensembles ayant une croissance moyenne différente ont été observés (**Tableau 3**). La croissance moyenne de l'isolat T2_29, du sous-ensemble "d" était relativement faible (1,92 cm) par rapport à celle des isolats des autres sous-ensembles. Le seul isolat T2_14 du sous-ensemble "a" avait eu la croissance la plus élevée (5,34cm) comparativement aux autres isolats. Par contre, les sous-ensembles "ab", "abc", "bc" et "c" comportent les isolats dont la croissance moyenne est comprise entre 3,15 cm et 5,12 cm statistiquement différente des autres groupes.

Tableau 2 : Effet de la niche, l'isolat, la température et le temps d'incubation sur la croissance des isolats

Facteur	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	P(>F)
Système	2	1	1	0,086	0,917ns
Isolat	40	729	20	3,382	< 0,001***
Température	1	4626	4626	794,025	< 0,001***
Temps	1	8976	8976	1540,53	< 0,001***
Système*Isolat*Température *Temps	2	2	1	0,158	0,854ns
Résidus	1876	10930	6		

ns = non significatif *** ($P < 0,001$) = très hautement significatif, ** ($P < 0,01$) = hautement significatif, * ($P < 0,05$) = significatif.

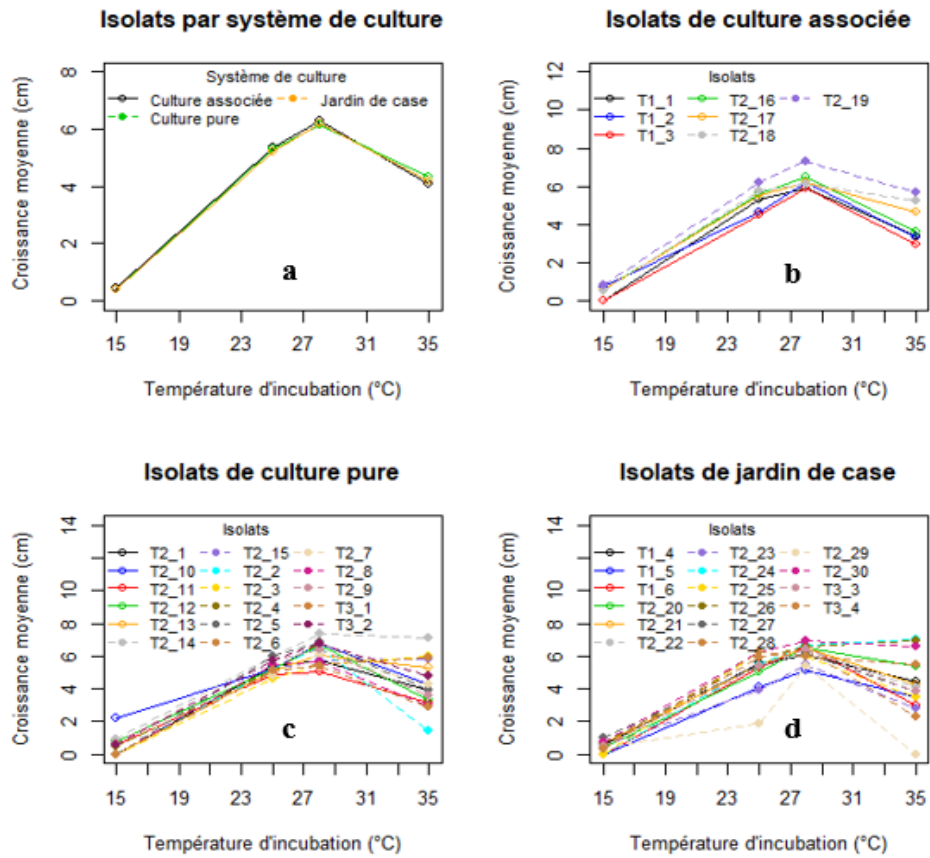


Figure 1 : Croissance moyenne des isolats à différentes températures

Tableau 3 : Moyenne de la croissance des isolats suivant le test SNK

N°	Isolat	Croissance	Groupe	N°	Isolat	Croissance	Groupe
1	T2_14	5,34	a	21	T2_9	4,10	abc
2	T2_30	5,12	ab	22	T2_16	4,09	abc
3	T2_26	5,02	abc	23	T3_3	4,04	abc
4	T2_19	5,01	abc	24	T2_3	4,03	abc
5	T2_24	4,80	abc	25	T2_12	3,99	abc
6	T2_10	4,61	abc	26	T2_7	3,95	abc
7	T3_4	4,51	abc	27	T2_25	3,93	abc
8	T3_2	4,47	abc	28	T2_28	3,80	abc
9	T2_18	4,40	abc	29	T2_1	3,79	abc
10	T2_20	4,34	abc	30	T1_6	3,72	abc
11	T2_4	4,29	abc	31	T1_2	3,71	abc
12	T2_17	4,24	abc	32	T1_1	3,66	abc
13	T2_15	4,21	abc	33	T2_8	3,52	abc
14	T2_21	4,21	abc	34	T2_11	3,43	bc
15	T2_5	4,19	abc	35	T3_1	3,36	bc
16	T1_4	4,17	abc	36	T1_3	3,34	bc
17	T2_22	4,11	abc	37	T2_2	3,28	bc
18	T2_13	4,11	abc	38	T1_5	3,17	c
19	T2_6	4,11	abc	39	T2_23	3,15	c
20	T2_27	4,10	abc	40	T2_29	1,92	d

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes.

3-3. Effet de la température sur les caractères qualitatifs

L'effet de la température sur les caractères qualitatifs a été analysé en fonction du système de culture. L'analyse révèle que l'origine de ces isolats n'a aucun effet sur lesdits caractères d'une température à une autre (*Tableau 4*). Toutefois seule la température a induit les différences ($p < 0,001$) au niveau des caractères qualitatifs tels que la couleur du mycélium, la couleur du revers, la présence ou absence d'anneau au niveau de tous les isolats, la présence ou absence de pustule à la surface du mycélium des isolats. L'aspect de la couleur du mycélium, du revers de la boîte et des isolats ayant d'anneau et de pustule se présente comme suit : (*Figure 2 et Figure 3*). Il existe une variabilité entre les isolats à toutes les températures (*Tableau 5*). La pigmentation du revers de la boîte de tous les isolats était restée incolore sauf l'isolat T1_1 qui avait un revers vert-blanchâtre à 15°C. A 25°C et 28°C, la couleur prédominante du mycélium était le vert ; tandis qu'au niveau de la couleur du revers le blanc et le jaune-pâle étaient respectivement prédominants. Une absence de pustule et d'anneau a été observé au niveau de tous les isolats à 15°C. De même, une absence de pustule a été enregistrée chez tous les isolats à 35°C.

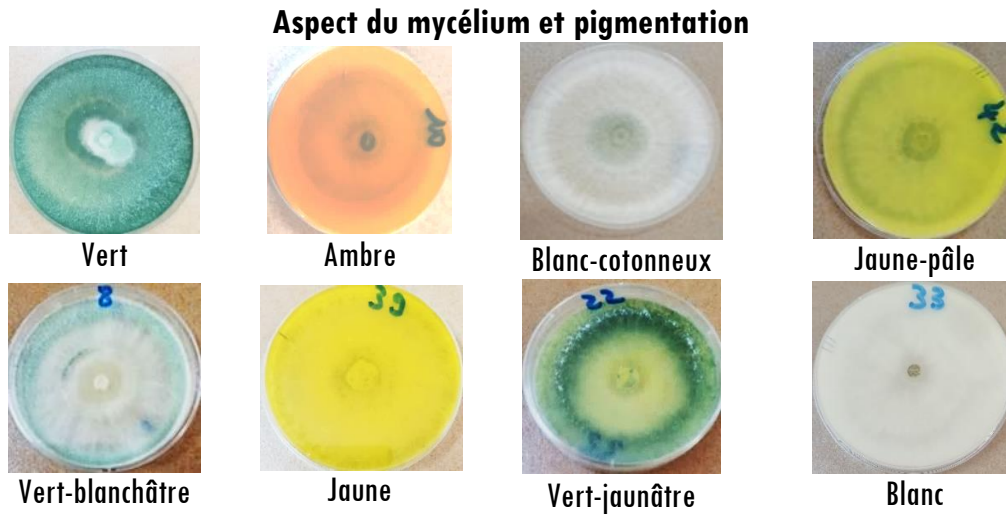


Figure 2 : Aspect mycélien et du revers de quelques isolats de *Trichoderma*



Figure 3 : Quelques isolats de *Trichoderma* ayant d'anneau (A) et de pustule (B)

Tableau 4 : Effet de la température sur les caractères qualitatifs des isolats selon le système de culture

Variable	Facteur	Df	Chisq	Pr (> Chisq)
Couleur du mycélium	Système	20	24,522	0,2204 ^{ns}
	Température	30	213,398	< 0,0001 ^{***}
	Système Température	60	21,786	1 ^{ns}
Couleur du revers	Système	12	20,529	0,0577 ^{ns}
	Température	18	185,579	< 0,0001 ^{***}
	Système Température	36	16,09	0,9983 ^{ns}
Apparition d'anneau	Système	2	4,888	0,0868 ^{ns}
	Température	3	35,599	< 0,0001 ^{***}
	Système Température	6	2,717	0,8434
Apparition de pustule	Système	2	2,4283	0,2969 ^{ns}
	Température	3	9,3502	0,0249 [*]
	Système Température	6	0	1 ^{ns}

ns = non significatif, *** (P < 0,001) = très hautement significatif, ** (P < 0,01) = hautement significatif et * (P < 0,05) = significatif

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des isolats collectés dans chaque système de culture suivant les températures

Système	Code	15°C				25°C				28°C				35°C			
		M	R	A	Pu	M	R	A	Pu	M	R	A	Pu	M	R	A	Pu
Culture associée	T1_1	Incolore	Vert B	-	-	Vert	Incolore	-	-	Vert B	Jaune P	+	-	Vert	Blanc	+	-
	T1_2	Blanc T	Incolore	-	-	Vert B	Blanc	-	-	Vert	Jaune P	+	-	Vert B	Blanc	+	-
	T1_3	Incolore	Incolore	-	-	Vert J	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	-	-	Blanc	Incolore	-	-
	T2_16	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert	Jaune P	+	-	Vert B	Blanc	+	-
	T2_17	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	+	-	Vert	Jaune P	-	-
	T2_18	Blanc C	Incolore	-	-	Vert B	Vert B	-	-	Vert	Ambre	+	-	Vert	Incolore	-	-
	T2_19	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert J	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert	Jaune	-	-
Culture pure	T2_1	Incolore	Incolore	-	-	Vert J	Jaune P	-	-	Vert B	Jaune P	-	-	Vert B	Jaune P	-	-
	T2_10	Incolore	Incolore	-	-	Vert Cl	Blanc	+	-	Vert	Ambre	-	-	Blanc	Ambre	-	-
	T2_11	Incolore	Incolore	-	-	Jaune B	Jaune P	-	-	Vert B	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-
	T2_12	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert B	Blanc	-	-
	T2_13	Incolore	Incolore	-	-	Vert B	Blanc	-	-	Vert	Jaune P	+	-	Vert B	Blanc	-	-
	T2_14	Incolore	Incolore	-	-	Vert B	Blanc	-	-	Vert	Ambre	+	-	Vert	Jaune	-	-
	T2_15	Blanc C	Incolore	-	-	Vert B	Blanc	-	-	Blanc V	Jaune P	-	-	Vert B	Incolore	-	-
	T2_2	Incolore	Incolore	-	-	Vert J	Blanc	-	-	Vert	Ambre	+	-	Vert B	Ambre	-	-
	T2_3	Blanc C	Incolore	-	-	Jaune V	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert B	Jaune P	-	-
	T2_4	Vert J	Incolore	-	-	Vert J	Blanc	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert B	Blanc	+	-
	T2_5	Blanc C	Incolore	-	-	Blanc V	Blanc	-	+	Blanc V	Jaune	-	-	Vert B	Jaune P	-	-
	T2_6	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	+	Vert J	Incolore	+	+	Vert B	Jaune P	-	-
	T2_7	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert J	Jaune P	-	-	Vert B	Jaune	-	-
	T2_8	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert	Jaune	-	-
	T2_9	Incolore	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert B	Jaune	-	-	Vert	Jaune P	-	-
	T3_1	Incolore	Incolore	-	-	Vert J	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	+	-	Vert B	Blanc	+	-
	T3_2	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert B	Blanc	-	-

NB : M = mycélium, R = revers, A = Anneau, Pu = Pustule, Présent (+), Absent (-), B = blanchâtre, J = Jaunâtre, V = verdâtre, P = Pâle, Cl = clair, C = cotonneux et tr = translucide

Tableau 5 (suite) : Caractéristiques morphologiques des isolats collectés dans chaque système de culture suivant les températures

Système	Code	15°C				25°C				28°C				35°C			
		M	R	A	Pu	M	R	A	Pu	M	R	A	Pu	M	R	A	Pu
Jardin de case	T1_4	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	+	-	Vert	Incolore	-	-
	T1_5	Incolore	Incolore	-	-	Vert Cl	Blanc	+	-	Vert B	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-
	T1_6	Incolore	Incolore	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert	Ambre	+	-	Vert	Incolore	-	-
	T2_20	Blanc C	Incolore	-	-	Vert J	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	+	-	Vert B	Blanc	+	-
	T2_21	Blanc C	Incolore	-	-	Vert J	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	-	-	Vert B	Blanc	+	-
	T2_22	Blanc tr	Incolore	-	-	Jaune V	Jaune P	-	-	Vert B	Ambre	+	-	Blanc	Incolore	-	-
	T2_23	Blanc C	Incolore	-	-	Jaune V	Blanc	-	-	Vert	Ambre	+	-	Vert B	Ambre	-	-
	T2_24	Incolore	Incolore	-	-	Vert	Ambre	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert	Jaune	-	-
	T2_25	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	-	Vert B	Jaune	-	-	Vert	Jaune	-	-
	T2_26	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert	Ambre	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-
	T2_27	Blanc C	Incolore	-	-	Vert	Blanc	-	+	Vert B	Incolore	+	-	Blanc	Incolore	-	-
	T2_28	Blanc tr	Incolore	-	-	Blanc	Blanc	-	-	Blanc	Incolore	-	+	Blanc	Jaune P	-	-
	T2_29	Blanc C	Incolore	-	-	Blanc tr	Blanc	-	-	Blanc	Incolore	-	-	Vert B	Incolore	-	-
	T2_30	Blanc tr	Incolore	-	-	Vert	Jaune	-	-	Vert	Jaune P	-	-	Vert	Jaune P	-	-
	T3_3	Blanc tr	Incolore	-	-	Jaune V	Blanc	-	-	Vert B	Jaune P	+	-	Vert	Blanc	-	-
	T3_4	Blanc C	Incolore	-	-	Blanc V	Blanc	-	+	Blanc	Incolore	-	-	Vert	Jaune	-	-

NB : M = mycélium, R = revers, A = Anneau, Pu = Pustule, Présent (+), Absent (-), B = blanchâtre, J = Jaunâtre, V = verdâtre, P = Pâle, Cl = clair, C = cotonneux et tr = translucide.

3-4. Structure et relations entre isolats et groupe d'isolats

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) réalisée à partir des variables qualitatives (pigmentation du mycélium, la pigmentation du revers de la boîte de culture, la présence ou absence d'anneau et de pustule à la surface du mycélium) et de la variable quantitative (la croissance moyenne des isolats) a conduit au dendrogramme (Figure 4) présentant six groupes d'isolats. La variabilité intra-groupe des caractères des isolats a été minimisée, tandis que la variabilité inter-groupe a été maximisée. Par exemple, les isolats (T2_29 et T2_28) contenus dans le groupe (G1) ont eu des caractères différents des isolats des groupes G2, G3, G4, G5 et G6. Par contre, au sein du même groupe (G1) la variabilité des caractères étudiés a été uniquement enregistrée au niveau de la croissance mycélienne.

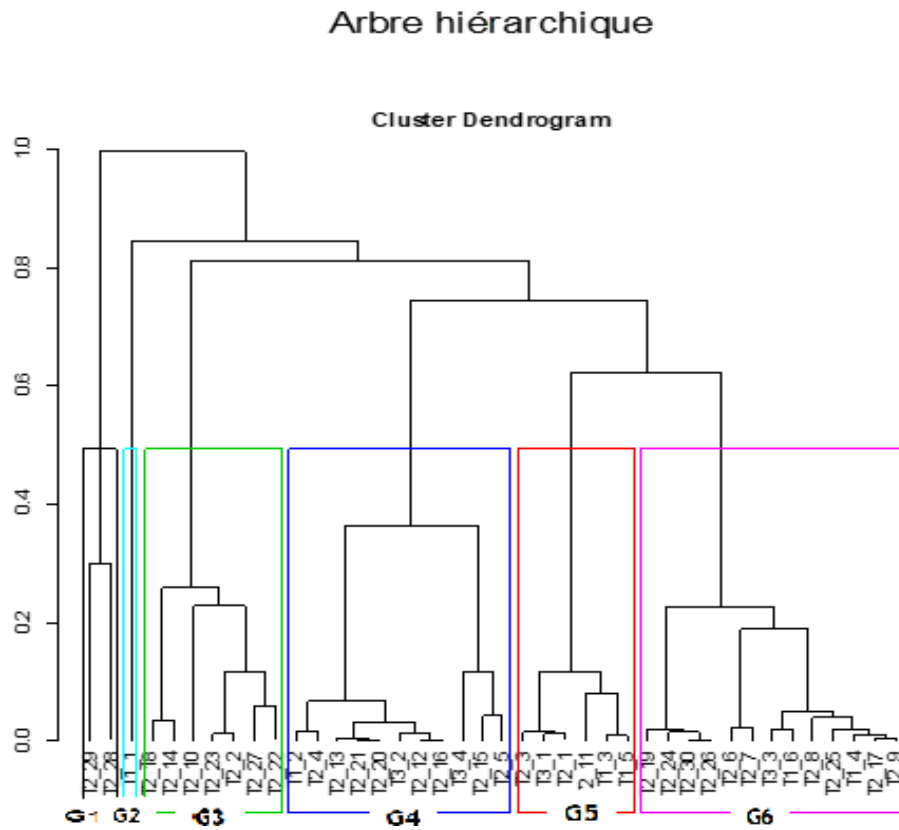


Figure 4 : Dendrogramme regroupant les isolats suivant les variables étudiées

4. Discussion

La présente étude a permis d'évaluer l'influence des systèmes de cultures sur la diversité des espèces locales de *Trichoderma* inféodées aux plantains en vue de leur utilisation pour la mise en place d'une méthode de gestion intégrée contre les maladies des bananiers.

4-1. Inventaire des isolats de *Trichoderma* inféodés aux plantains dans différents systèmes de culture

Il est remarqué que les systèmes de culture pure encore appelés monocultures ont enregistré un plus grand nombre d'isolats (42,50 %), suivis du jardin de case (40 %) et du système de cultures associées (17,50 %). Les systèmes de culture pure et jardin de case semblent être plus favorables à la diversité des espèces de *Trichoderma*. Cependant, les travaux de [22] portant sur l'évaluation de l'influence de la monoculture à base de banane sur la communauté microbienne indiquent que les structures des communautés bactériennes et fongiques bénéfiques du sol se sont modifiées de manière significative après la monoculture à base de bananes. La différence entre ces résultats peut s'expliquer par les systèmes de culture adoptés par les producteurs avant la mise en place des systèmes de culture pure de plantain. Par exemple, il a été constaté que les sols qui ont été soumis à une rotation régulière hébergent une grande diversité des microorganismes bénéfiques et favorisent la suppression des agents pathogènes [23]. Cette suppression est liée à divers mécanismes tels que l'interruption du cycle des agents pathogènes, l'augmentation de la biomasse et de l'activité des agents antagonistes causée par une augmentation du carbone du sol par les exsudats des racines et les résidus [24]. De plus, les systèmes de monoculture qui ont précédé les forêts, les prairies et les jachères

pourraient héberger un plus grand nombre d'isolats, car les espèces de *Trichoderma* sont abondantes dans les environnements naturels parce que ces derniers constituent des sources de carbone et d'azote pour les microorganismes du sol. Toutefois, dans cette étude, le nombre d'échantillons prélevés à partir du système de culture pure est largement supérieur à celui du système de cultures associées. Ce qui aurait influencé la quantité d'isolats de *Trichoderma* obtenue au niveau de ces deux systèmes de culture. L'association des cultures est une pratique qui réduit les maladies phytopathogènes du sol et augmente la diversité des communautés microbiennes bénéfiques dans le sol [25]. Cependant, les résultats de cette étude indiquent que l'association culturale a influencé la diversité des espèces de *Trichoderma*. Cela pourrait être lié à la structure biophysique des cultures mises en association avec le plantain, car les espèces de *Trichoderma* sont prédominants dans la rhizosphère des plantes ayant un enracinement peu profond et répandue [26]. De plus, dans certaines conditions, le type de plante et le type de sol exercent des effets complexes sur la structure de la communauté microbienne du sol [27]. Cela peut être lié au fait que les effets sont plus ou moins forts en fonction de la force relative des forces sélectives exercées par le sol ou la plante. De même, ce facteur déterminant peut être lié aux interactions microbiennes complexes dans le sol, y compris les interactions entre les microorganismes et les plantes [27]. La prédominance des isolats de *Trichoderma* au niveau des jardins de case de plantain pourrait être liée à la disponibilité de matière organique dans le sol qui est une source de carbone et d'azote pour les espèces de *Trichoderma* [28]. La disponibilité abondante de matière organique dans les jardins de case est due à la présence de déchets ménagers, de fientes de volailles et de déjections de bétail, de cendres de bois et du charbon accumulés autour des pieds des bananeraies. La décomposition de ces éléments enrichit les sols en matière organique et en éléments nutritifs tels que le calcium, le magnésium, le potassium qui sont des éléments essentiels pour le développement, la sporulation et la diversité des espèces de *Trichoderma* [28, 29]. Ainsi, une analyse sur les éléments nutritifs du sol au niveau de chaque système de culture pourrait aider à mieux comprendre la diversité des espèces de *Trichoderma* au sein de chaque système de culture étudié. De même, la caractérisation génétique moléculaire est nécessaire pour déterminer les espèces issues de ces isolats et le nombre relatif d'espèces présentes dans chaque système de culture.

4-2. Effet des systèmes de culture et de la température sur les caractères morphologiques des isolats de *Trichoderma*

Les caractères morphologiques tels que : la pigmentation du mycélium, la pigmentation du revers de la boîte de culture, l'absence ou la présence d'anneaux et de pustule sur la surface du mycélium et la croissance mycélienne des isolats sont les caractères morphologiques existants utilisés dans cette étude [13, 17, 18]. Il ressort que les systèmes de culture n'ont pas eu d'influence sur les caractères étudiés. Par contre, la température avait hautement influencé la couleur du mycélium, la couleur du revers, la présence ou absence d'anneau et la croissance mycélienne de tous les isolats. En effet, l'évaluation de l'effet de la température et des systèmes de culture sur ces caractères ont montré une variabilité entre les isolats à toutes les températures. Ces résultats montrent que la température affecte les caractères morphologiques des espèces de *Trichoderma* [28, 30]. En effet, [31] indiquent que les espèces de *Trichoderma* sont sensibles aux changements de l'environnement. Cette sensibilité conduit à des changements de mécanismes tels que l'arrêt de la croissance des hyphes et la maturation du mycélium chez ces espèces [32]. Cela pourrait expliquer l'inhibition de la croissance des isolats et aussi l'immaturité du mycélium observées à 15°C. La pigmentation du revers de la boîte de culture des isolats était le jaune, le jaune-pâle, le blanc et ambre. Ces résultats se rapprochent des descriptions faites par [18] qui ont également étudié la diversité des espèces de *Trichoderma* en utilisant les caractères phénotypiques. Il a été également constaté que les espèces de ces isolats sont difficiles à identifier à cause de leur ressemblance sur le plan morphologique. Ces observations sont conformes à ceux rapportés par [33] qui ont aussi montré que les isolats de *Trichoderma* sont presque tous

identiques sur le plan morphologique. [34] estiment que les caractères morphologiques ne sont pas des descripteurs fiables pour la différenciation des espèces de *Trichoderma*, car les différences entre ces caractères sont insignifiantes et difficiles à observer. Il est donc nécessaire de procéder à la caractérisation génétique moléculaire de ces isolats afin de déterminer de façon spécifique les espèces. Il ressort de cette étude que la température optimale pour la croissance des espèces de *Trichoderma* est comprise entre 25°C et 28°C. Ce résultat est similaire à ceux de [35] qui ont montré que la température favorable pour la croissance des espèces de *Trichoderma* est comprise entre 25°C et 30°C. En effet, la meilleure croissance des espèces de *Trichoderma* est effective dans des températures favorables à leur développement [30].

5. Conclusion

La diversité des espèces de *Trichoderma* a été étudiée au sud Bénin en fonction de différentes températures et dans des systèmes de culture à base de plantain. Cette étude a permis de situer la température optimale pour la croissance des isolats d'espèces de *Trichoderma* entre 25°C et 28°C. L'effet de la température sur les caractères morphologiques a fait ressortir une variabilité entre les isolats à toutes les températures, permettant ainsi de distinguer six groupes à savoir G1, G2, G3, G4, G5, et G6. De plus, les systèmes de culture pure et de jardin de case semblent être les systèmes de cultures les plus favorables à la diversité des espèces de *Trichoderma*. Cette diversité apparaît comme un atout pour la lutte biologique du fait qu'elle est un indicateur d'une forte probabilité de succès de la lutte biologique à base des souches de *Trichoderma*. Dans une perspective de développement durable, l'évaluation du pouvoir antagoniste des espèces locales de *Trichoderma* devrait être envisagée en milieu réel.

Références

- [1] - M. TARIQ, A.KHAN, M. ASIF, F. KHAN, T. ANSARI, M. SHARIQ, & M.A. SIDDIQUI, "Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management," *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.*, Vol. 70, N°6 (2020) 507 - 524 p., doi: 10.1080/09064710.2020.1784262
- [2] - F. ZHANG, H. GE, F. ZHANG, N. GUO, Y. WANG, L. CHEN, X. JI & C. LI, "Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean," *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 100 (2016) 64 - 74 p., doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.017
- [3] - P. GUZMÁN-GUZMÁN, M. D. PORRAS-TRONCOSO, V. OLMEDO-MONFIL & A. HERRERA-ESTRELLA, "Trichoderma species : Versatile plant symbionts," *Phytopathology*, Vol. 109, N°1 (2019) 6 - 16 p., doi: 10.1094/PHTO-07-18-0218-RVW
- [4] - N. A. ZIN & N. A. BADALUDDIN, "Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications," *Ann. Agric. Sci.*, Vol. 65, N°2 (2020) 168 - 178 p., doi: 10.1016/j.aaoas.2020.09.003
- [5] - S. HALIFU, X. DENG, X. SONG & R. SONG, "Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings," *Forests*, Vol. 10, N° 9 (2019) 1 - 17 p., doi: 10.3390/f10090758
- [6] - A. ADANDONON, T. A. S. AVELING, N. LABUSCHAGNE & M. TAMO, "Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium*- caused cowpea damping-off and stem rot," *Eur. J. Plant Pathol.*, (2006), doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9031-6>
- [7] - G. P. F. HOUNDAFOCHE, "Evaluation de l'efficacité de *Trichoderma harzianum* sur *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent causal de la cercosporiose noire du bananier (*Musa* spp.) au sud- Bénin. Mémoire de Master, Faculté des Sciences Agronomiques (Bénin).," (2021)

- [8] - U. IQBAL & T. MUKHTAR, "Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous Trichoderma Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*," *Gesunde Pflanz.*, Vol. 72, N°2 (2020) 195 - 202 p., doi: 10.1007/s10343-020-00501-x
- [9] - T. KAMALA, S. I. DEVI, K. C. SHARMA & K. KENNEDY, "Phylogeny and taxonomical investigation of Trichoderma spp. from Indian region of Indo-Burma Biodiversity hot spot region with special reference to Manipur.," *Biomed Res. Int.*, (2015) 22 p., doi : <https://doi.org/10.1155/2015/285261>
- [10] - J. G. COMMATTEO, V. F. CONSOLO, P. A. BARBIERI & F. COVACEVICH, "Indigenous arbuscular mycorrhiza and Trichoderma from systems with soybean predominance can improve tomato growth," *Soil Environ.*, Vol. 38, N°2 (2019) 2 - 12 p., doi: 10.25252/SE/19/91805
- [11] - P. BLALOGOÉ, "Stratégies de lutte contre les inondations dans le Grand Cotonou : Diagnostic et alternative pour une gestion durable. Thèse de doctorat unique École Doctorale Pluridisciplinaire d'Université d'Abomey-Calavi.," (2014)
- [12] - P. DAGNELIE, *Statistiques théoriques et appliquées. Brussels : De Boeck.*, (1998)
- [13] - T. S. HUI, "Morphological characterization and sequence analysis of 5.8S-ITS region of Trichoderma species.," (2013)
- [14] - U. BHALE & J. RAJKONDA, "Evaluation of distribution of Trichoderma species in soils of Marathwada region of Maharashtra during 2007-2011," *J. Mycol. Plant Pathology*, Vol. 42, N° 4 (2012) 5 p.
- [15] - F. F. CAMPOS, P. A. SALES JUNIOR, A. J. ROMANHA, M. S. S. ARAÚJO, E. P. SIQUEIRA, J. M. RESENDE, T. M. A. ALVES, O. A. MARTINS-FILHO, V. L. DOS SANTOS, C. A. ROSA, C. L. ZANI & B. B. COTA "Bioactive endophytic fungi isolated from caesalpinia echinata Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from fusarium sp," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 110, N° 1 (2015) 65 - 74 p. , doi: 10.1590/0074-02760140243
- [16] - B. BOTTON BRETON, M. FÈVRE, S. GAUTHIER, P. GUY, J-P. P. LARPENT, J-J. REYMOND SANGLIER, Y. VAYSSIER & P. VEAU, *Moisissures Utiles et Nuisibles d'Importance Industrielle. Ed. Masson Collection Biotechnologie : Paris*, (1990)
- [17] - G. J. SAMUELS, S. L. DODD, W. GAMS, L. A. CASTLEBURY & O. PETRINI, "Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*," *Mycologia*, Vol. 94, N° 1 (2002) 146 - 170 p., doi: <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833257>
- [18] - M. M. SHAH & H. AFIYA, "Identification and Isolation of Trichoderma spp. - Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application.," *In Intech*, Vol. 11 (2019) 13 p., [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- [19] - V. R. LENTH, "Least-squares means: The R package lsmmeans," *J. Stat. Softw.*, Vol. 69, N° 1 (2016), doi: 10.18637/jss.v069.i01
- [20] - RCoreTeam, *A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.*, (2016). [Online]. Available: <https://www.r-project.org/>
- [21] - P. VAISSIE, A. MONGE & F. HUSSON, "Factoshiny : Perform Factorial Analysis from FactoMineR with a Shiny Application.," (2021)
- [22] - Z. SHEN, C. R. L. N. PENTON, C. XUE, X. YUAN, Y. RUAN, R. LI & Q. SHEN, "Banana Fusarium Wilt Disease Incidence Is Influenced by Shifts of Soil Microbial Communities Under Different Monoculture Spans.," *Microb. Ecol.*, Vol. 75, N° 3 (2017) 12 p., doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1052-5>
- [23] - Z. S. VENTER, K. JACOBS & H. J. HAWKINS, "The impact of crop rotation on soil microbial diversity : A meta-analysis," *Pedobiologia (Jena)*, Vol. 59, N° 4 (2016) 32 p., doi: 10.1016/j.pedobi.2016.04.001
- [24] - M. WINTER, F. DE MOL & A. VON TIEDEMANN, "Cropping systems with maize and oilseed rape for energy production may reduce the risk of stem base diseases in wheat.," *F. Crop. Res.*, Vol. 156, (2014) 249 - 257 p., doi: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.10.009>

- [25] - B. WANG, R. LI, Y. RUAN, Y. OU, Y. ZHAO & Q. SHEN, "Pineapple-banana rotation reduced the amount of *Fusarium oxysporum* more than maize-banana rotation mainly through modulating fungal communities," *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 86, (2015) 77 - 86 p., doi: 10.1016/j.soilbio.2015.02.021
- [26] - S. A. OKOTH, P. OKOTH, P. M. WACHIRA & H. ROIMEN, "Spatial distribution of *Trichoderma* spp, in Embu and Taita regions, Kenya," *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, Vol. 11, (2009) 291 - 302 p.
- [27] - P. GARBEVA, J. A. VAN VEEN and J. D. V. ELSAS, "Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness.," *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol. 42, N°29 (2004) 30 p., doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- [28] - H. SWER, M. S. DKHAR and H. KAYANG, "Fungal Population and Diversity in Organically Amended Agricultural Soils of.," *J. Org. Syst.*, (2011) 3 - 12 p.
- [29] - S. OKOTH, H. ROIMEN, B. MUTSOTSO, E. MUYA, J. KAHINDI, J. OWINO & P. OKOTH, "Land use systems and distribution of *Trichoderma* species in embu region, kenya.," *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, Vol. 7, N° 2 (2007) 105 - 122 p.
- [30] - L. K. T. AL-ANI, *Trichoderma from Extreme Environments : Physiology, Diversity, and Antagonistic Activity*, (2018). doi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_14
- [31] - N. CARRERAS-VILLASEÑOR, J. A. SÁNCHEZ-ARREGUÍN & A. H. HERRERA-ESTRELLA, "Trichoderma: Sensing the environment for survival and dispersal," *Microbiology*, Vol. 158, N° 1 (2012) 3 - 16 p., doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.052688-0>
- [32] - Y. BAHN, C. XUE, A. IDNURM & J. C. RUTHERFORD, "Sensing the environment : lessons from fungi," *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 5, (2007) 57 - 69 p., doi: 10.1038/nrmicro1578
- [33] - K. K. SHARMA & U. S. SINGH, "Cultural and morphological characterization of rhizospheric isolates of fungal antagonist *Trichoderma*," *J. Appl. Nat. Sci.*, Vol. 6, N° 2 (2014) 451 - 456 p., [Online]. Available: <https://doi.org/10.31018/jans.v6i2.481>
- [34] - L. HOYOS-CARVAJAL, S. ORDUZ & J. BISSETT, "Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions," *Fungal Genet. Biol.*, Vol. 46, N°9 (2009) 615 - 631 p.
- [35] - C. PETRISOR, A. PAICA & F. CONSTANTINESCU, "Influence of Abiotic Factors on in Vitro Growth of *Trichoderma* Strains.," *Proc. Rom. Acad. Ser. B*, Vol. 18, N°1 (2016) 11 - 14 p., doi: <http://www.acad.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2016-1/art02Petrisor.pdf>