



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2017

THÈSE

Présentée par

DENDOUGA Wassila

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Impact des facteurs écologiques sur les moisissures
antagonistes et productrices des enzymes
hydrolytiques**

Soutenu le : 12/02/2017

DEVANT LE JURY

Président	Guechi Abdelhadi	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Belhamra Mohamed	Pr. UMK Biskra
Co-directeur	Bouregghda Houda	MCA. ENSA Alger
Examineurs	Harzallah Daoud	Pr. UFA Sétif 1
	Kacem Chaouche Noredine	Pr. Univ. Constantine 1
	Mezaache Samia	MCA. UFA Sétif 1

*Laboratoire de Diversité des Ecosystèmes et Dynamiques des Systèmes de Production Agricoles en
Zones Arides. Université de Biskra.*

Dédicaces

Cette thèse, je l'ai commencée aux côtés de l'être qui m'est le plus cher au monde, mon père, parti il y a presque quatre ans maintenant, et c'est comme si c'était hier...

Tu aurais tant aimé me voir soutenir, papa, et ce travail, achevé aujourd'hui est un simple hommage que je voudrais rendre à ton immense courage, à ta longue patience et à ton unique façon d'endurer et de supporter la souffrance partagée.

A ta mémoire, cher papa.

A toi, ma chère mère,

Pas un mot ne pourrait exprimer ma gratitude pour ton soutien indéfectible tout au long de ma vie, pour ta tendresse inépuisable, pour tous tes encouragements et tes sacrifices... Puisse Dieu te protéger et t'offrir longue vie.

A mes sœurs et à mon frère Mohamed

A mon fils Ahmed Moncef

A toute ma famille

A tous mes amis

A mon étudiante DJENIDI Habiba

A tous mes collègues de département de Biologie de Biskra

À tous ceux qui me sont chers, que j'aime et qui m'aiment.

Wassila

Remerciements

Je remercie tout d'abord **ALLAH** tout puissant, de m'avoir donné tous ce que je possède et de guider mes pas vers le chemin du savoir avec un avenir toujours inchaallah prometteur.

Je tiens particulièrement à exprimer fortement ma gratitude et mes sincères sentiments de respects à Mr. **BELHAMRA Mohamed** d'avoir bien voulu diriger ce travail et surtout de m'avoir accordé sa confiance à de multiples occasions, vous méritez Professeur ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Également, j'adresse mes vifs remerciements à Melle. **BOUREGHDA Houda** pour m'avoir supporté et m'avoir guidé pendant les moments les plus difficiles de la réalisation de ce travail. Je la remercie pour ses conseils, fort précieux, qu'il n'a cessés de me prodiguer pour la réalisation surtout de la partie identification et tests d'antagonisme de *Trichoderma*, ainsi que pour sa disponibilité dont il a toujours fait preuve à mon égard. Un simple mot de merci n'est pas suffisant pour vous exprimer ma gratitude.

C'est avec un grand plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance à Mr. **JAOUANI Attef** qui m'a accueilli au niveau du laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à Tunis, pour sa collaboration et son aide dans la réalisation des analyses phylogénétiques et enzymatiques qui m'ont permis d'avancer dans mon travail.

Je remercie sincèrement Mr. **GUECHI Abdelhadi** Professeur à l'université de Sétif de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes sincères remerciements sont adressés à Mr. **HARZALLAH Daoud** Professeur à l'université de Sétif, Mme. **MEZAACHE Samia** Maitre de conférences à la même université, Mr. **KACEM CHAOUICHE Noredline** Professeur à l'université de Constantine pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Mme. **BENAOUN Saliha** et Mr. **OTMAN Tarik** des ingénieurs au CRSTRA-Biskra pour leur contribution à l'avancement dans la partie pédologique et Melle. **CHAIB Warda** chercheuse dans le même centre.

A **BOOUSSOUAR Fayçal** chercheur à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble, qui m'a donné l'occasion de manipuler pour la première fois en biologie moléculaire. Cette expérience a été déterminante pour mon travail et j'en suis profondément reconnaissante.

A **MOUSSI Abdelhamid**, chef de département de biologie à Biskra, pour son aide, ses encouragements et surtout ses qualités humaines.

Mes amitiés aux étudiants du département de biologie dont j'ai eu le plaisir de diriger les mémoires parallèlement à la réalisation de cette thèse, avec qui j'ai partagé ma passion pour l'isolement jusqu'à la lutte biologique, et dont les travaux m'ont éclairci le chemin : Khoukhou Abdelsalam, Abbassi Fatima, Kiram Anissa, Djenhani Hana, Merredef Hadjer, Neguia F. Zohra, Bnouli Abir et Fateh Khadidja.

Avant propos

Les principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu :

Publications

Dendouga W., Boureghda H. & Belhamra M. 2015. Edaphic factors affecting distribution of soil fungi in three Chotts located in Algerian desert. *Courrier du Savoir*, 19: 147-152.

Dendouga W., Boureghda H. & Belhamra M. 2016. Biocontrol of wheat *Fusarium* crown and root rot by *Trichoderma* spp. and evaluation of their cell wall degrading enzymes activities. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 51: 1- 12. DOI: 10.1556/038.51.2016.1.1

Communications

Dendouga W., Boureghda H., Ben Zohra I. E & Belhamra M. 2013. Caractérisation des souches antagonistes de *Trichoderma* sp. efficaces en protection de blé. Séminaire **internationale** de protection phytosanitaire : situation et perspectives. Batna, 17-19 Novembre 2013.

Dendouga W., Boureghda H., Neguia F. Z. & Belhamra M. 2015. Extracellular hydrolase profiles of fungi isolated from hypersaline soils of Algerian Sahara. Séminaire **internationale** des biotechnologies. Constantine, 19-21 Octobre 2015.

Dendouga W., Boureghda H., Merredaf H. & Belhamra M. 2015. Antagonistic activity of *Trichoderma* strains isolated from Algerian Sahara soils against *Fusarium culmorum*. **International** symposium on genomics, metagenomics, plant biotechnology, environment and health. Biskra, 22 - 24 Novembre 2015.

RESUMÉS

ملخص

في إطار البحث عن سلالات *Trichoderma* محلية من الصحراء الجزائرية و من اجل استغلال فعال لها في مكافحة البيولوجية ضد تعفن جذور وتاج القمح بالمناطق الجافة ، تم إجراء تحاليل ميكروبيولوجية وكيميائية لمختلف عينات التربة. أظهرت معالجة البيانات ب CCA تأثير كبير للمواد العضوية و الملوحة على توزيع *Trichoderma*، إضافة إلى وجود *Pseudomonas* و *actinomycètes*. تحديد نوع عزلات *Trichoderma* تبين من خلال الجمع بين النتائج المورفولوجية، الفسيولوجية و تحليل تسلسل DNA لمنطقة ITS. دراسة فعالية تضاد عزلات *Trichoderma* اتجاه ثلاث أنواع ممرضة من *Fusarium* تمت باختبارات *in vitro* و *in vivo*. أظهرت النتائج المتحصل عليها بالمختبر قدرة جميع عزلات *Trichoderma* على التقليل المعتبر في إنتاج الابواغ و النمو مقارنة بالشاهد. في اختبار المواجهة المباشرة، أعلى نسب التخفيض تم الحصول عليها بوجود *T.harzianum* Thr.4 التي قدرت ب 70.68٪، 67.05٪ و 70.57 ضد *F. culmorum*، *F. graminearum* و *F. verticillioides* على التوالي. في حين أثناء المواجهة غير المباشرة أعلى نسب التخفيض تم الحصول عليها بوجود *T. viride* Tv.6، التي قدرت بحوالي 50٪. في اختبار *in vivo*، معالجة البذور بمستحضر *Trichoderma* قبل زرعها في تربة محقونة مسبقا بالفطريات مسببات المرض أدى إلى انخفاض كبير في شدة الإصابة بالمرض مقارنة بالشاهد. العزلات الأكثر فعالية (> 70٪) في حماية القمح ضد مسببات المرض الثلاثة هي (Thr.10) *T. harzianum* و *T. viride* Tv.6. إنتاج الإنزيمات المحللة β -1,3-glucanase، chitinase و protease تم في روائح بيئات زرع *Trichoderma*، حيث سجلت أعلى مستويات النشاط الانزيمي في وجود جدار الخلية *F.graminearum* كمصدر وحيد للكربون مقارنة ب *F. verticillioides* و *F.culmorum*. العزلة *T.harzianum* Thr.4 أظهرت أعلى نشاط للإنزيمات المحللة في وجود الجدار الخلوي ل *F. graminearum* و *F. culmorum*، بالمقابل في حالة *F. verticillioides* أعلى نشاط للإنزيمات المحللة سجلته *T. viride* Tv.6. أظهرت هذه الدراسة أن درجة الحرارة والملوحة تؤثر على إنتاج الإنزيمات المحللة التي تلعب دورا أساسيا في مكافحة البيولوجية لعزلات *Trichoderma*.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد، العوامل البيئية، الصحراء الجزائرية، *Trichoderma*، *Fusarium*، إنزيمات التحليلية.

Résumé

Dans le cadre de la recherche des souches de *Trichoderma* spp. autochtones du Sahara Algérien et pour une application efficace de ces antagonistes contre la pourriture racinaire et de collet du blé dans les régions arides, des analyses microbiologiques et édaphiques ont été effectuées. Le traitement des données par ACC a montré l'impact majeur de la matière organique, la salinité, la présence de *Pseudomonas* et d'actinomycètes sur la répartition des *Trichoderma* spp. L'identité des *Trichoderma* spp. est confirmée par la combinaison des résultats des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que l'analyse génétique des séquences ITS. L'étude de l'efficacité des isolats appartenant aux espèces antagonistes de *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. viride* a été étudiée par des tests *in vitro* et *in vivo* à l'égard de trois isolats de *Fusarium* spp. Tous les isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une réduction significative de la sporulation et du diamètre de la colonie de *Fusarium* spp. par rapport au témoin. En confrontation directe, les pourcentages de réduction les plus élevés ont été obtenus en présence de *T. harzianum* Thr.4 avec une réduction de 70.68%, 67.05% et 70.57 contre *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. verticillioides*, respectivement. Cependant, en confrontation indirecte les pourcentages les plus élevés ont été obtenus par *T. viride* Tv.6 avec une réduction de l'ordre de 50%. Le traitement des semences par *Trichoderma* spp. avant de semer dans un sol déjà infesté par les agents pathogènes a abouti à une diminution significative de la gravité de la maladie par rapport au témoin non traité. Les isolats les plus efficaces (> 70%) dans la protection de blé contre les trois agents pathogènes sont les deux isolats de *T. harzianum* (Thr.4 et Thr.10) et *T. viride* Tv.6. La production de chitinase, de β -1,3 glucanase et de protéase est recherchée dans les filtrats des cultures des antagonistes. Les niveaux les plus élevés d'activité hydrolytique ont été enregistrés en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum* comme seule source de carbone par rapport à *F. verticillioides* et *F. culmorum*. L'isolat *T. harzianum* Thr.4 a montré les activités d'hydrolase les plus élevées en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum* et *F. culmorum*. Bien que dans le cas de *F. verticillioides*, les activités hydrolytiques maximales ont été enregistrées par *T. viride* Tv.6. La présente étude a montré que la température et la salinité influencent sur la sécrétion des hydrolases qui jouent un rôle essentiel dans la lutte biologique des isolats de *Trichoderma* spp.

Mots clés : antagonisme, facteurs écologiques, Sahara Algérien, *Trichoderma*, *Fusarium*, hydrolase.

Abstract

As part of the search for autochthon strains of *Trichoderma* spp. from Algerian Sahara and for an effective application of these antagonistic strains against *Fusarium* crown and root rot of wheat in arid regions, microbiological and edaphic analyzes were performed. Data treatment with CCA showed the major impact of organic matter, salinity, presence of *Pseudomonas* and actinomycetes on *Trichoderma* spp distribution. Identity of *Trichoderma* spp. was confirmed by combining morphological results, physiological characteristics and genetic analysis of ITS sequences. Study of efficiency of the antagonist species *T. harzianum*, *T. hamatum* and *T. viride* was studied by *in vitro* and *in vivo* based bioassay against three pathogenic species of *Fusarium*. *In vitro* based bioassay results obtained with all *Trichoderma* spp. isolates showed significant decrease in colony diameter and sporulation of *Fusarium* species compared to the control. In direct confrontation, the highest percentages of reduction in colony diameter were obtained with *T. harzianum* Thr.4 causing a growth reduction of 70.68 %, 67.05 and 70.57 % against *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. verticillioides*, respectively. However, in indirect confrontation the highest percentages of reduction in colony diameter were around 50% obtained with *T. viride* Tv.6. The seed treatment by *Trichoderma* spp. isolates before sowing in a soil already infested by the pathogens led to a significant decrease of disease severity compared to the untreated control. The highest disease index decrease (>70 %) was obtained with two isolates of *T. harzianum* (Thr.4 and Thr.10) and *T. viride* Tv.6 against the three fungal pathogens. Production of chitinase, β -1,3-glucanase and protease was tested in the filtrates of cultures antagonists. Higher levels of hydrolytic activities were induced by hyphal cell walls of *F. graminearum* as sole carbon source than cell walls of *F. verticillioides* and *F. culmorum*. *T. harzianum* Thr.4 was exhibited the highest enzyme activities with hyphal cell walls of *F. graminearum* and *F. culmorum*. However, in the medium amended with cell wall of *F. verticillioides*, maximal lytic activities were recorded for *T. viride* Tv.6. The present study showed the influence of temperature and salinity on stability of hydrolases which play an essential role in the biological control of *Trichoderma* spp. isolates

Key words: antagonism, ecological factors, Algerian Sahara, *Trichoderma*, *Fusarium*, hydrolase.

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I: Etude bibliographique

I.1 : Moisissures	4
--------------------------------	----------

I.1.1 : Caractères généraux	4
I.1.2 : Structure et composition chimique	4
I.1.3 : Facteurs abiotiques influençant la croissance des moisissures	5
I.1.4 : Environnements extrêmes	8
I.1.5 : Méthodes d'analyse en écologie microbienne	9

I.2: Données sur le genre <i>Trichoderma</i>	12
---	-----------

I.2.1 : Habitat.....	12
I.2.2 : Historique de la taxonomie	13
I.2.3 : Méthode d'identification de <i>Trichoderma</i>	15
I.2.4 : Pouvoir antagoniste des espèces de <i>Trichoderma</i>	16

I.3 : Données sur le genre <i>Fusarium</i>	23
---	-----------

I.3.1 : Description générale.....	23
I.3.2 : Fusariose de blé.....	23
I.3.3 : Agents pathogènes.....	25
I.3.4 : Moyens de lutte.....	28

Chapitre II: Impact des facteurs écologiques sur la répartition des moisissures dans les sols salins

II.1 : Introduction.....	30
---------------------------------	-----------

II.2 : Matériel et méthodes	32
--	-----------

II.2.1 : Présentation de la région d'étude.....	32
II.2.2 : Collection des échantillons du sol	33

II.2.3 : Analyses du sol.....	33
II.2.4 : Isolement	34
II.2.5 : Identification	34
II.2.6 : Analyses statistiques	35
II.3: Résultats	36
III.3.1 : Analyses du sol.....	36
III.3.2 : Isolement et énumération des colonies fongiques et bactériennes.....	36
III.3.3 : Distribution et abondance relative des moisissures.....	39
III.3.4 : Caractérisation physiologique.....	41
III.3.5 : Corrélation entre la densité des moisissures et les paramètres édaphiques	42
III.3.6 : Influence des différents facteurs sur la répartition des <i>Trichoderma</i> spp	43
II.4: Discussion.....	44
II.5: Conclusion.....	49

Chapitre III: Identification des isolats de *Trichoderma* spp.

III.1 : Introduction	51
III.2 : Matériel et méthodes.....	52
III.2.1 : Identification morphologique.....	52
III.2.1 : Caractérisation physiologique.....	52
III.2.2 : Caractérisation biochimique	53
III.2.1 : Identification moléculaire des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	53
III.3 : Résultats	54
III.3.1 : Identification morphologique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp	54
III.3.2 : Caractérisation physiologique et biochimique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp	60
III.2.3 : Identification moléculaire	63
III.4 : Discussion	65
III.5 : Conclusion	70

Chapitre IV: Etude de l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo*

IV.1 : Introduction	71
IV.2 : Matériel et méthodes.....	72
IV.2.1 : Matériel fongique.....	72
IV.2.2 : Matériel végétal.....	73
IV.2.3 : Activité antagoniste <i>in vitro</i>	74
IV.2.3 : Activité antagoniste <i>in vivo</i>	75
IV.2.5. Analyses statistiques.....	76
IV.3 : Résultats	77
IV.3.1: Action antagoniste de <i>Trichoderma</i> spp. en confrontation directe.....	77
IV.3.2 : Action antagoniste de <i>Trichoderma</i> spp. en confrontation indirecte.....	81
IV.3.3 : Etude <i>in vivo</i>	84
IV.3.4 : Analyse comparative de l'efficacité des agents antagonistes <i>in planta</i> et <i>in vitro</i>	86
IV.4 : Discussion	87
IV.5 : Conclusion	92

Chapitre V: Activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp.

V.1 : Introduction.....	94
V.2 : Matériel et méthodes	100
V.2.1 : Matériel fongique	100
V.2.2 : Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires	100
V.2.3 : Détermination de l'activité spécifique de chaque enzyme.....	101
V.2.4 : Effet des paramètres abiotiques sur la production des enzymes	102
V.2.5 : Etude de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	102
V.2.6 : Analyse statistique	103

V.3 : Résultats	103
V.3.1 : Activités enzymatiques.....	103
V.3.2 : Influence des paramètres abiotiques sur la production des enzymes	108
V.3.2 : Activités antifongiques des extraits enzymatiques	111
V.3.3 :Corrélation entre l'activité enzymatique et le pouvoir de réduction de la maladie..	112
V.4 : Discussion.....	113
V.5 : Conclusion	119
Conclusion générale et perspectives	120
Références bibliographiques	123

Liste des Abréviations

ACC	: Analyse Canonique des Correspondances
ADNr	: ADN ribosomal
BSA	: "Bovine serum albumin" ou sérum albumine bovine
CE	: Conductivité Electrique
CLM	: Czapec Liquide Modifié
CMC	: Carboxy-Methyl-Cellulose
CYA	: Czapec Yeast Agar
DNS	: 3,5-DinitroSalicylic acid
EC	: "Enzyme commission"
EDTA	: Acide éthylène-diamine-tétra-acétatique
GlcNAc	: N-Acétylglucosamine
ITS	: Espaceurs Internes Transcrits
LSU	: Large SubUnit ribosomal
Mpa	: MégaPascal
ms/cm	: Milli-Siemens par centimètre
MSM	: Mineral Synthetic Medium
NTP	: Nucleotide Tri Phosphate
PAGE	: Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PDB	: Potato Dextrose Broth
pH	: Potentiel d'Hydrogène
ppm	: Partie Par Million " Parts Per Million"
rpm	: Rotation par minute
SD	: Standard deviation
SSU	: Small SubUnit ribosomal
TCA	: Acide trichloroacétique
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TME	: Trichoderma Medium Extract
Tris	: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TSM	: Trichoderma-Selective-Medium
TSA	: Trypticase Soy Agar
Tween 80	: Polyoxyéthylène sorbitan monooleate
U	: Unité enzymatique internationale
UFC	: Unité Formant Colonie " Colony Forming Unit"

Liste des figures

Fig.01 : Représentation schématique de l'extrémité d'un filament	5
Fig.02 : Représentation schématique des gènes d'ADNr de la cellule eucaryote.....	11
Fig.03 : Présentation des cinq sections systématiques de <i>Trichoderma</i>	14
Fig.04 : Mise en évidence du mycoparasitisme par microscope électronique	22
Fig.05 : Cycle biologique de <i>Fusarium</i> du blé.....	26
Fig.06 : Situation géographique des sites de prélèvements.....	31
Fig.07 : Nombre des colonies des moisissures énumérées sur les trois milieux gélosés	38
Fig.08 : Nombre des colonies bactériennes isolées de chaque site	38
Fig.09 : Pourcentage des groupes dominants des moisissures isolées de chaque site.....	39
Fig.10 : Fluctuation en pourcentage des moisissures selon la température et la salinité	41
Fig.11 : Représentation graphique de l'analyse canonique des correspondances.....	43
Fig.12 : Morphologie des isolats du premier sous groupe avec un Schéma représentant l'aspect microscopique de <i>T. harzianum</i> Rifai	57
Fig.13 : Morphologie des isolats du deuxième sous groupe avec un schéma représentant l'aspect microscopique de <i>T. hamatum</i> (Bon.) Bain.....	58
Fig.14 : Morphologie des isolats du deuxième groupe avec un schéma représentant l'aspect microscopique de <i>T. viride</i> Pers. ex S. F. Gray	59
Fig.15 : Gel d'électrophorèse des amplifias de PCR.....	63
Fig.16 : Schéma présentant la confrontation directe	73
Fig.17 : Schéma présentant la confrontation indirecte.....	74
Fig.18 : Echelle de notation	76
Fig.19 : Confrontation directe entre l'antagoniste et le phytopathogène après 6 jours	79
Fig.20 : Présentation du pouvoir mycoparasitaire des antagonistes.....	80
Fig.21 : Confrontation indirecte entre l'antagoniste et le phytopathogène	82
Fig.22 : Modification morphologique affectant le mycélium du <i>F. culmorum</i>	84
Fig.23 : Les témoins de trois agents pathogènes.....	85
Fig.24 : Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vivo</i>	85
Fig.25 : Représentation générale de la structure de chitine.....	95
Fig.26 : Représentation de la structure de β -glucane	97

Fig.27 : Architecture de la paroi cellulaire fongique	99
Fig.28 : L'activité protéolytique spécifique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur MSM additionné de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogènes.	105
Fig.29 : L'activité glucanolytique et chitinolytique produites par les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur MSM additionné de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogène.....	106
Fig.30 : L'activité spécifique des trois enzymes produites par les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur MSM.....	107
Fig.31 : Effet de la température sur la production des hydrolases extracellulaires	109
Fig.32 : Effet de la salinité sur la production des hydrolases extracellulaires	110

Liste des tableaux

Tab.01 : Localisation et caractéristiques des sites de prélèvements des sols.....	33
Tab.02 : Analyses physicochimiques du sol.....	37
Tab.03 : Abondance relative (%) des moisissures isolées de chaque site	40
Tab.04 : La corrélation entre la densité de la population des champignons filamenteux et la teneur des éléments nutritifs du sol.....	42
Tab.05 : Intervalle de dimensions et forme des phialides et conidies des isolats de <i>Trichoderma</i>	56
Tab.06 : Caractérisations physiologique et biochimique des isolats de <i>Trichoderma</i>	62
Tab.07 : Résultats de l'identification des isolats de <i>Trichoderma</i>	64
Tab.08 : Origine des isolats de <i>Trichoderma</i> et la date de leur isolement	72
Tab.09: Effet inhibiteur (%) des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne des agents pathogènes de <i>Fusarium</i> en confrontation directe.....	77
Tab.10 : Effet inhibiteur (%) des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la sporulation des agents pathogènes de <i>Fusarium</i> en confrontation directe.....	78
Tab.11 : Effet inhibiteur (%) des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne des agents pathogènes de <i>Fusarium</i> en confrontation indirecte	81
Tab.12 : Pourcentage de réduction de l'indice de maladie par les différents isolats de <i>Trichoderma</i>	84
Tab.13 : Activité antifongique des extraits enzymatiques testée <i>in vitro</i>	111
Tab.14 : Coefficients de corrélation de Pearson calculé entre les activités enzymatiques et le pourcentage de réduction de la maladie.	112

INTRODUCTION GENERALE

Le sol forme un habitat intéressant pour les moisissures, qui représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans son équilibre et sa résistance. Il est bien connu que la résistance des sols est due aux propriétés antagonistes de la microflore autochtone permettant de contrôler les agents phytopathogènes (Alexandre, 1994 ; Davet et Rouxel, 1997). Ces dernières années l'isolement des souches antagonistes fongiques a pris de plus en plus d'importance afin de pouvoir les utiliser comme agents efficaces en lutte biologique. En effet, l'abondance des moisissures dans le sol et leurs diverses activités sont influencées par : (i) des facteurs abiotiques tels que le contenu de matières organiques du sol et sa texture, la température, le pH et l'humidité... ; (ii) par les interactions microbiennes ; (iii) ainsi que par l'interaction de ces facteurs avec les différents groupes microbiens (Alexandre, 1994 ; Dendouga et *al.*, 2015).

La pourriture racinaire et du collet du blé causée par les espèces de *Fusarium* est très répandue et économiquement importante dans de nombreuses zones productrices de blé dans le monde, en particulier dans les zones à faible ou moyenne pluviométrie (Cook, 1980; Wiese, 1987; Moya-Elizondo, 2013). Durant ces dernières années, les symptômes de la fusariose sont devenus très fréquents au niveau des champs de blé en Algérie. En effet, une enquête récente sur 23 Wilayas potentiellement céréalières situées à différents étages bioclimatiques a indiqué un taux de présence des espèces de *Fusarium* estimé à 72.59% avec la dominance de *F. culmorum* suivie par *F. graminearum* (Moumen et *al.*, 2013). En plus de comporter des risques de pertes de rendement considérables, les espèces de *Fusarium* peuvent produire une large gamme de mycotoxines dangereuses pour l'animale et l'humain (Nelson et *al.*, 1993; Parry et *al.*, 1995 ; Pirgozliev et *al.*, 2003; Tunali et *al.*, 2008).

Compte tenu des inconvénients causés par la lutte chimique, des recherches actuelles sont menées dans le domaine agricole qui tend à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement. *Trichoderma* est l'un des agents fongiques les plus exploités en lutte biologique contre les champignons telluriques et aériens sur différentes cultures (Elad, 2000 ; Prabavathy et *al.*, 2006). Les souches de *Trichoderma* spp. isolées des rhizosphères de cultures agricoles ont fait l'objet de nombreuses études, cependant celles isolées à partir d'environnement extrêmes et malgré leurs intérêts restent encore peu étudiées. Les milieux salins peuvent offrir des possibilités d'isolement des souches de *Trichoderma* spp. avec une osmotolérance particulière considérée comme l'un des limites de leur utilisation agricole dans les régions arides caractérisées par la salinité élevée de l'eau d'irrigation et/ou

du sol (Gal-Hemed et *al.*, 2011). Par ailleurs, Delgado-Sanchez et *al.*, 2011 ont révélé le rôle important des champignons isolés des déserts chauds et parmi eux les *Trichoderma* spp. dans la germination des graines et l'augmentent de l'absorption de l'eau par la plante.

Le facteur déterminant de l'efficacité écologique du genre *Trichoderma* est la combinaison de ses divers mécanismes d'action plus l'induction des mécanismes de défense chez la plante. Les travaux de Rey et *al.* (2001) ; Viterbo et *al.* (2002) ; Benítez et *al.* (2004) ont montré que la sécrétion des enzymes lytiques a un impact majeur sur le potentiel de contrôle biologique des agents phytopathogènes, et en particulier dans l'activité mycoparasitaire des espèces de *Trichoderma*. Néanmoins l'efficacité biologique de ce genre est limitée aussi par les facteurs environnementaux associés au changement climatique, en particulier la température et la salinité du sol, qui peuvent avoir une influence sur l'agent phytopathogène, l'antagoniste, les mécanismes de leurs interactions, l'activité des enzymes extracellulaires et leur sécrétion (Kredics et *al.*, 2003 ; Kredics et *al.*, 2004 ; Gal-Hemed et *al.*, 2011). À ce titre, l'objectif premier de ce travail est l'étude de l'impact des facteurs écologiques sur la répartition des moisissures antagonistes dans les zones salines et l'évaluation de l'activité antagoniste à l'égard d'une maladie importante sur blé ; pourriture racinaire et du collet.

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux moisissures, en se focalisant sur le genre *Trichoderma* comme agent antagoniste et le genre *Fusarium* comme phytopathogène. La seconde partie est structurée en quatre chapitres composés chacun d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre exposant, comparant et discutant les résultats obtenus :

- ✕ Le chapitre II concerne l'isolement des microorganismes (champignons et bactéries) à partir des sols salins de deux entités écologiques (la région d'Oued Righ et la région des Ziban), ainsi que l'étude de l'impact des facteurs écologiques biotiques et abiotiques sur leur abondance et leur répartition.
- ✕ Le chapitre III concerne l'identification de chaque isolat de *Trichoderma* spp. au niveau d'espèce par une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire.
- ✕ Le chapitre IV est consacré à l'évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. *in vivo* après l'étude de leurs comportements et leurs interactions avec le pathogène par des tests *in vitro*.

- ✕ Le chapitre V concerne la production des enzymes hydrolytiques extracellulaires par les isolats de *Trichoderma* spp. et l'étude de l'influence de la température et la salinité sur leur sécrétion.

Enfin, la dernière partie rassemble la conclusion générale et met en évidence les perspectives de recherche.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Moisissures

I.1.1. Caractères généraux

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques, définis comme étant des organismes eucaryotes hétérotrophes non photosynthétiques. Ils représentent un groupe de microorganismes aérobies physiologiquement divers qui sont caractérisés par un mode de nutrition absorptif. Ces microorganismes peuvent se développer en parasite sur des plantes ou des animaux, ou saprophyte quant ils colonisent un support mort ou inerte (Madelin, 1994 ; Bouchet et *al.*, 1999). Les champignons forment le groupe principal dans la plupart des sols en termes de biomasse, bien que le nombre et l'activité des microorganismes changent d'une région à une autre, influencés par le contenu en matières organiques du sol, sa texture, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Alexandre, 1994). Ces microorganismes jouent un rôle important dans l'écologie terrestre par leur caractère ubiquiste et participent largement à la biodégradation des matières organiques. La classification des champignons décrit quatre phylums; les Zygomycota, les Ascomycota, les Basidiomycota et les Chytridiomycota (Alexopoulos et *al.*, 1996). Les champignons sont caractérisés par leur mode de reproduction par deux types de spores asexués et sexuée. Ils produisent en effet un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion et de contamination considérable. Les champignons ont la capacité de produire des structures de résistances telles que les chlamydospores, les sclérotes qui peuvent jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Dans la nature le champignon peut exister sous sa forme sexuée (téléomorphe) ou asexuée (anamorphes) qui est la forme la plus répandue. Certaines espèces fongiques existent dans la même culture sous les deux formes, elles sont appelées holomorphes (Presscott et *al.*, 2010).

I.1.2. Structure et composition chimique

La composition globale des champignons présente de grandes variations, non seulement en fonction des espèces, mais aussi, au sein d'une même espèce, en fonction des conditions de culture et du stade de croissance. Seule la concentration d'ADN reste relativement constante (Boiron, 1996). Sur le plan morphologique, l'organisation cellulaire de base des champignons est le thalle qui constitue l'appareil végétatif (Figure 01). L'hyphe est une cellule tubulaire, contenant la plupart des organites des cellules eucaryotes emprisonnés dans une paroi rigide. La paroi des moisissures constitue la zone de contact entre le champignon et son environnement. Elle comporte à la surface, des facteurs de reconnaissance impliqués dans les

phénomènes d'agglutination et de croisement. Les études ultrastructurales démontrent que la paroi des champignons se présente typiquement comme un assemblage de couches particulièrement complexe, la couche basale constituée de microfibrilles de chitine est entourée d'une zone protéique, d'une couche de glycoprotéines enchâssée dans une matrice de glucanes associés à des mannoses et d'un manteau externe de glucanes. Il existe également d'autres résidus osidiques qui peuvent enrichir la paroi : mannose, galactose et tréhalose (Bouchet et *al.*, 1999 ; Ripert, 2013). Le contenu lipidique de la paroi varie largement selon les champignons et peut constituer jusqu'à 19 % du poids sec de la paroi. Il est constitué de triglycéride, de phospholipides et de stérol, l'ergostérol constitue le principal stérol de leur membrane (Boiron, 1996 ; Bouchet et *al.*, 1999). Les composants de la paroi jouent un rôle fonctionnel important comme antigène ou sont des cibles sur lesquelles agissent certains antifongiques (Ripert, 2013).

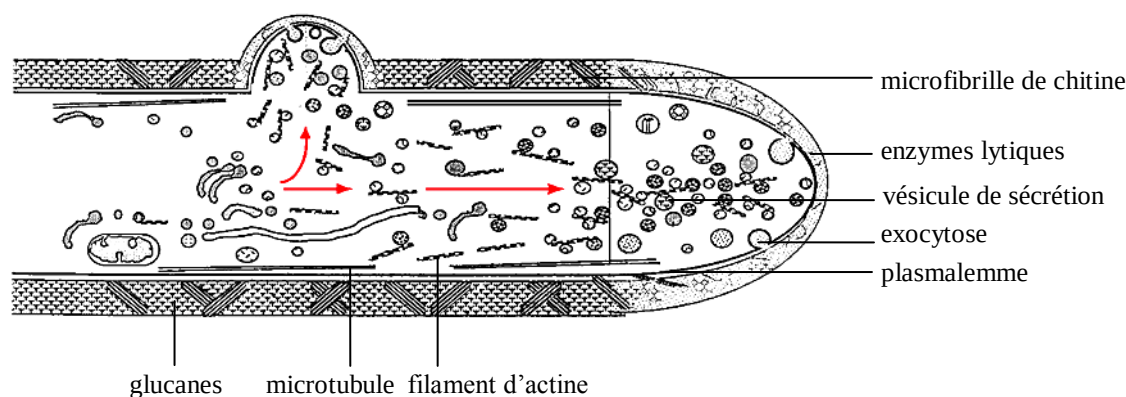


Figure 01 : Représentation schématique de l'extrémité d'un filament en période de croissance, montrant les organites typiques et d'autres structures (Roland et Vian, 1990).

I.1.3. Facteurs abiotiques influençant la croissance des moisissures

I.1.3.1. Eléments nutritifs

Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion commence dans le milieu extérieur par des enzymes extracellulaires, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996). L'absorption d'un élément nutritif particulier peut être réprimée par la présence d'un autre élément nutritif plus facile à absorber. Divers composés organiques

peuvent être utilisés comme sources de carbone par les champignons. Ils renferment des carbohydrates, des lipides, des protéines et des acides organiques en plus du dioxyde de carbone qui peut être fixé par certains champignons (Nasraoui, 2006). Tous les champignons peuvent métaboliser les acides aminés et l'urée (Botton et *al.*, 1990). La plupart d'entre eux assimilent l'azote inorganique comme l'ammoniaque sous forme de sels NH_4^+ , dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées. L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination, alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucun champignon filamenteux ne peut fixer l'azote atmosphérique. Pour leur croissance, les champignons nécessitent également la présence des éléments minéraux qui rentrent dans la composition des molécules actives, la stabilité cellulaire et leur fonctionnement. Il s'agit essentiellement de sulfate, de phosphore, de magnésium, de potassium et de sodium avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce. Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc. (Boiron, 1996)

I.1.3.2. Facteurs environnementaux

× Eau

L'eau est absolument nécessaire pour la croissance et le métabolisme des champignons, ils l'exigent pour la diffusion des substances nutritives dans les cellules et pour la libération des enzymes extracellulaires. La physiologie cellulaire des champignons est influencée par la rétention d'eau exercée par les forces extérieures qui renferment en particulier le potentiel osmotique (Kavanagh, 2005). Les moisissures représentent le groupe de microorganismes possédant les espèces les plus xérophiles. Dans des nombreux cas la xérophilie s'accompagne d'une osmotolérance, l'eau dans ce dernier cas présente mais immobilisée par des molécules ou des ions (NaCl, glucide...) (Botton et *al.*, 1990). La synthèse des polyols tels que le glycérol, le mannitol et l'arabitol qui sont des solutés compatibles ayant un effet faible sur les activités enzymatiques même en fortes concentrations est un moyen pour les champignons de maintenir leur pression osmotique intracellulaire (Kavanagh, 2005). Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation, leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de -4 MP_a . Les champignons filamenteux à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à -10 MP_a . Cependant, les *Aspergillus* et

les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MP_a (Davet, 1996).

× **Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores. La croissance fongique à différentes températures ne dépend pas seulement du patrimoine génétique de l'espèce, mais aussi de la prévalence des autres paramètres physiques de croissance et la disponibilité des nutriments (Kavanagh, 2005). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des températures optimales de croissance de 25 à 35 °C (Botton et *al.*, 1990). Cependant, certaines espèces fongiques sont thermophiles et sont capables de croître à des températures supérieures à 50 °C atteignant dans des cas extrêmes 60 °C (Nasraoui, 2006). Les champignons thermophiles se distinguent des thermotolérants par leur température minimale et maximale de croissance, dont les thermophiles ont une croissance minimale à une température égale ou supérieure à 20 °C, avec une température maximale de croissance égale ou supérieure à 50 °C. Cependant, les thermotolérants ont une température de croissance allant de >20 °C à 55 °C (Maheshwari, 2000). Les espèces psychrotolérantes sont capables de se développer à des températures basses et elles sont incapables de pousser au-dessus de 20 °C (Davet, 1996).

× **Potentiel des ions d'hydrogène (pH)**

Les champignons sont des microorganismes acidophiles et se développent mieux dans une zone de pH de 4 à 6, bien que plusieurs espèces soient capables de croître dans une large gamme de pH allant de 3 à 8 (Kavanagh, 2005). Quelques espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Fusarium* peuvent se développer à pH 2, cependant il n'existe pas des champignons filamenteux basophiles (Botton et *al.*, 1990). La concentration des ions d'hydrogène influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs, soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO₂ ou de NH₃ ou par production d'acides (Botton et *al.*, 1990 ; Boiron, 1996). Les milieux de culture acidifiés par des acides organiques sont plus inhibiteurs de la croissance levurienne par rapport à ceux acidifiés avec des acides minéraux, cela est due à la capacité des acides organiques d'abaisser même le pH intracellulaire. Beaucoup de champignons filamenteux peuvent modifier leur pH externe local

par absorption sélective et l'échange d'ions (NO_3 ou NH_4^+/H^+) ou par élimination d'acides organiques tels que l'acide oxalique. Ce pouvoir tampon leur permet de garder leur pH cytoplasmique stable (autour du 7) (Kavanagh, 2005).

× **Aération**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des champignons filamenteux est un facteur important de développement. Les espèces fongiques répondent à la disponibilité d'oxygène de diverses manières. La plupart des champignons sont aérobies et nécessitent obligatoirement de l'oxygène pour leur métabolisme et la production de l'énergie. Cependant, de nombreux champignons ont un métabolisme aérobie facultatif, ils peuvent fermenter les glucides comme *Mucor hiemalis*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certains champignons peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix frontalis* et colonisent des biotopes particuliers (Botton et al., 1990 ; Alexopoulos et al., 1996).

× **Lumière**

Les radiations du spectre visible n'ont pas en général d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. Beaucoup de champignons n'exigent pas de lumière pour sporuler. Cependant les photoréponses de la sporulation dans le bleu ont été décrites chez *Penicillium isariiforme* et *Alternaria tomato* (Botton et al., 1990). La lumière peut avoir un effet défavorable sur la croissance fongique soit par la destruction photochimique de constituants du milieu ou d'une action directe sur le métabolisme fongique. L'action la plus connue de la lumière sur le métabolisme est l'induction de la biosynthèse des caroténoïdes, ce qui rend plusieurs espèces de *Neurospora* orangées sous la lumière et blanches à l'obscurité (Kavanagh, 2005).

I.1.4. Environnements extrêmes

Des limitations physiques et chimiques des processus cellulaires permettent de définir la notion d'extrêmes vis-à-vis des organismes, la condition « extrême » peut aussi être définie par opposition aux conditions stables ou modérées. La température, le pH, les radiations, la pression, la salinité, la disponibilité en eau, les très faibles teneurs en nutriments ou encore les concentrations excessives en polluants sont des facteurs physicochimiques potentiellement limitants (Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Oren, 2006). Les microorganismes qui sont capables de survivre dans ces conditions sont qualifiés d'extrémophiles. Les produits fournis

par les extrêmophiles tels que les protéines, les enzymes (extrêmozymes) et les solutés compatibles sont d'un grand intérêt en biotechnologie alimentaire, agricole et médicale. Ce domaine d'études a attiré ainsi l'attention vers la recherche d'une probable vie extraterrestre (exobiologie). L'étude des extrêmophiles sert également à la compréhension de l'apparition de la vie (Satyanarayana et *al.*, 2005).

Les premiers organismes extrêmophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans la mer Morte (Garcia, 2002). Les halophiles appartiennent aux trois domaines des microorganismes, cependant les bactéries halophiles ont attiré plus d'attention que les champignons. Les champignons filamenteux diffèrent des procaryotes halophiles par leur capacité à survivre sans utiliser le sel, ils peuvent croître et ajuster le taux de salinité dans l'intervalle eau douce jusqu'aux solutions saturées en NaCl (Plemenitas et *al.*, 2008). Ils sont classés en plusieurs catégories selon leur comportement vis-à-vis du NaCl :

- × **Non halophiles** : ne tolèrent pas plus de 0.2 M de NaCl.
- × **Halotolérants** : tolèrent de 0.2 à 0.85 M de NaCl
- × **Halophiles** : supportent des concentrations en NaCl allant de 0.85 jusqu'à 3.4 M
- × **Halophiles extrêmes** : peuvent croître à des concentrations en NaCl de 3.4 à 5.1 M.

Les microorganismes thermophiles sont les plus étudiés des extrêmophiles (Gomes et Steiner, 2004). Parmi les organismes eucaryotes, seulement certaines espèces de champignons ont la capacité de prospérer à des températures entre 45 et 55°C, ils comprennent les formes thermophiles et thermotolérantes (Maheshwari et *al.*, 2000). Les enzymes produites par ces microorganismes ont présenté une stabilité étendue à l'égard du pH et divers produits chimiques dénaturants, elles ont également un potentiel de catalyse idéal des réactions biochimiques (Gomes et Steiner, 2004 ; Moretti et *al.*, 2012).

I.1.5. Méthodes d'analyse en écologie microbienne

I.1.5.1. Analyse des communautés fongiques par les méthodes classiques

Les techniques classiques de microbiologie contribuent d'une façon importante à l'étude des écosystèmes microbiens et à l'identification des genres fongiques. Parmi elles, la culture des microorganismes, l'observation microscopique et les tests biochimiques, sont des outils souvent utilisés dans ce type d'études.

× **Etude macroscopique des caractères cultureux**

Plusieurs caractères cultureux peuvent être examinés sur milieux sélectifs ; la vitesse de croissance apicale, la texture du mycélium (velouté, laineux, etc.), la couleur du mycélium (la pigmentation du mycélium, couleur des conidies), la couleur du revers de la culture, présence d'un pigment diffusible, l'odeur et la présence d'exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien) (Botton et *al.*, 1990). L'utilisation des milieux de cultures sélectifs pour étudier la composition spécifique des communautés microbiennes ou pour l'identification d'un isolat fongique spécifique fait l'objet de vifs débats. Ces méthodes permettent de reconnaître les traits caractéristiques des isolats qui sont génétiquement stables. Même si ces méthodes donnent des résultats peu représentatifs, elles sont toujours utilisées afin d'étudier la fonction et la contribution écologique de certaines espèces ou groupes particuliers de populations (Hill et *al.*, 2000).

× **Etude microscopique du mycélium et des structures reproductrices**

L'étude microscopique du mycélium repose sur la vérification de la présence ou l'absence de cloisons, la détermination de sa couleur, l'ornementation et la largeur de ses parois, ainsi que son mode de ramification. L'étude des structures reproductrices concerne la forme des organes différenciés, leur couleur, leur dimension, la texture de leur paroi et leur ornementation (Botton et *al.*, 1990 ; Kavanagh, 2005). Les caractères morphologiques malgré qu'ils soient à la base de la systématique des champignons restent insuffisants dans l'identification. Ces critères sont délicats à utiliser et requièrent une expérience confirmée dans la taxonomie des champignons et s'avère longue et fastidieuse. De plus, les caractéristiques morphologiques et physiologiques des champignons sont influencées par les conditions de culture et peuvent amener à des erreurs dans l'identification.

I.1.5.2. Tests biochimiques

L'analyse de la diversité métabolique peut être réalisée en examinant le comportement catabolique d'une moisissure ou d'une communauté vis à vis de plusieurs substrats. Les données concernant la dégradation de ces substrats peuvent être rassemblées formant ainsi un profil métabolique (Guiraud, 1998). Parmi les tests biochimiques utilisés pour caractériser les moisissures, les tests en galerie ou les tests en plaque BiologTM. La technologie BiologTM utilise des microplaques 96 puits prêtes à l'emploi avec 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque

substrat est mesurée par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux. Cette coloration est due à l'oxydation d'iodonitrotetrazolium par la respiration cellulaire des microorganismes. Le virage de couleur de certains puits crée une empreinte phénotypique qui est analysée par des logiciels spécifiques pour identifier ou caractériser un organisme. Les empreintes métaboliques générées par cette méthode, sont également à la base de plusieurs études en écologie microbienne. Le carbone étant un facteur clé dans plusieurs écosystèmes microbiens, l'utilisation de cette technique apparaît spécialement adaptée pour la détermination de la versatilité métabolique d'un échantillon environnemental (Insam, 1997).

I.1.5.3. Analyse par les méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes de la biologie moléculaire basée sur l'analyse directe de l'ADN a permis de développer des techniques d'identification des microorganismes plus fiables et plus spécifiques. Ces méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux. La nouveauté de ces approches est l'analyse génétique des espèces préalablement cultivées ou de l'ADN total directement extrait des échantillons environnementaux. Ce deuxième cas peut être particulièrement intéressant, car il permet d'appréhender des communautés microbiennes soit par des approches de type métagénomique à partir du séquençage de l'ADN directement extrait d'un échantillon, évitant ainsi des étapes de clonage ou d'amplification soit en ciblant des gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique : les gènes de l'ARN ribosomiques ou les gènes dits fonctionnels associés à des fonctions écologiques spécifiques (Shendure et Ji, 2008 ; Martins, 2012). Parmi différents marqueurs génétiques possibles, l'ADNr codant pour les ARN ribosomiques s'est avéré comme la cible moléculaire de choix pour les études écologiques. L'ADNr des champignons comprend quatre gènes: 18S (SSU), 5S, 5.8S, 25/28S (LSU) de taille comprise entre 8 et 12 kb (Figure 02), présent en plusieurs copies disposées les unes après les autres (répétition tandem) sur un ou plusieurs chromosomes. Ces gènes sont séparés par deux types de régions: espaceurs internes transcrits (ITS1 et ITS2) et des espaceurs intergéniques non transcrits (IGS). Les séquences ITS sont beaucoup polymorphes et présentent des variations interspécifiques importantes (Adachi et *al.*, 1996).



Figure 02: Représentation schématique des gènes d'ADNr de la cellule eucaryote (Singh et *al.*, 2014).

1.2. Données sur le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* a été introduit en 1794 par Persoon. Ces organismes cosmopolites appartiennent aux deutéromycètes et la forme parfaite est rattachée aux Ascomycota (Sordariomycètes, *Hypocreales*). Les espèces de *Trichoderma* sont remarquables par leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'un des trois prédominants des espèces fongiques. Il vient à la 3^{ème} position après le genre *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique (Landreau, 2001). Leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font les *Trichoderma* spp. des agents potentiels et une matière de choix pour l'exploitation industrielle et pour la lutte biologique (Roquebert, 1996 ; Kubicek et Harman, 2002).

1.2.1. Habitat

Grace à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Liu et al., 2008). Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons cosmopolites du sol. Ils colonisent une large gamme de niches terrestres des régions du climat tempéré et tropical. *Trichoderma* sont fréquemment les composants dominants de la mycoflore du sol dans des habitats considérablement variables (Kubicek et Harman, 2002). Il s'agit notamment des sols d'agriculture, verger, forestier, des pâturages et même désertiques (Kubicek et Harman, 2002 ; Samolski et al., 2012). La nature saprophytique du *Trichoderma* les rend généralement présents dans les horizons supérieurs du sol, il se retrouve couramment, dans la litière humide des feuilles mortes, sur le bois mort et les organes aériens des plantes (Bourguignon, 2008). Certaines espèces de *Trichoderma* ont également été retrouvées dans des environnements extrêmes tels que les mangroves, les marais salants et les sédiments de l'estuaire, dont les conditions osmotiques constituent un véritable défi pour la survie des champignons (Lee et Bakar, 1972 ; Gal-Hemed et al., 2011). Ces milieux sont largement colonisés par *T. viride* qui est probablement l'espèce la plus répandue de *Trichoderma* (Lieckfeldt et al., 1999). Certaines espèces du genre *Trichoderma* sont considérées comme des symbiotes endophytes de plantes multifonctionnelles en raison de leur capacité à coloniser les espaces intercellulaires de racines et de leurs multiples effets bénéfiques sur les plantes (Hermosa et al., 2012 ; Horwitz et al., 2013). Il est évident que le genre *Trichoderma* n'est pas limité à un habitat particulier; la plupart des niches écologiques sont susceptibles d'être colonisés par plusieurs espèces de ce genre.

1.2.2. Historique de la taxonomie

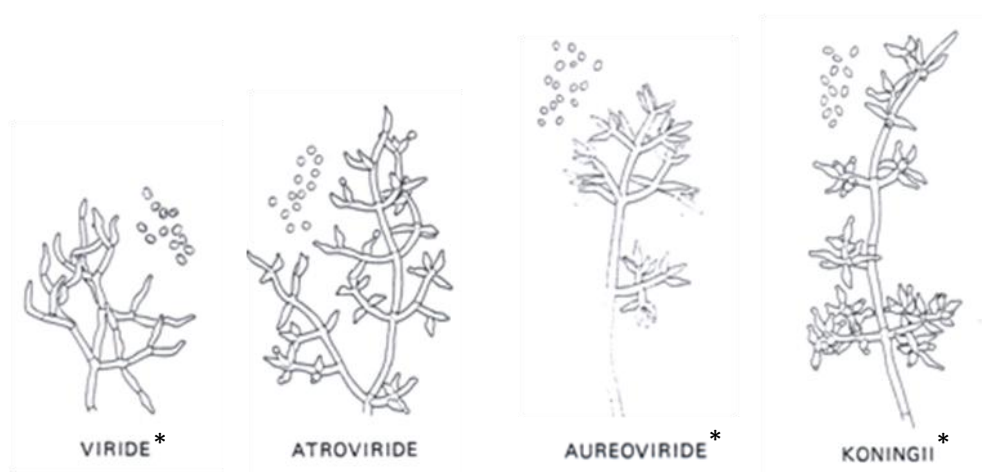
Bien que le genre *Trichoderma* soit connu depuis 1794, sa taxonomie est restée incertaine jusqu'à ces dernières années (Kubicek et Harman, 2002). En effet, le genre *Trichoderma*, avait été décrit pour la première fois par Persoon en 1794 sur la base de quatre espèces collectées en Allemagne. Parmi ces taxons seule *T. viride* est prouvée actuellement être une espèce de *Trichoderma*.

En 1865, les Frères Tulasne, ont fait le lien pour la première fois entre *Trichoderma viride* et sa forme téléomorphe *Hypocrea rufa*. Bisby (1939) a considéré que *Trichoderma* est composé d'une seule espèce, et ce concept est resté valable jusqu'à l'année 1969. Par conséquent, toutes les souches de *Trichoderma* qu'ont été isolées en cette période ont été nommées *T. viride* (Horwitz et al., 2013).

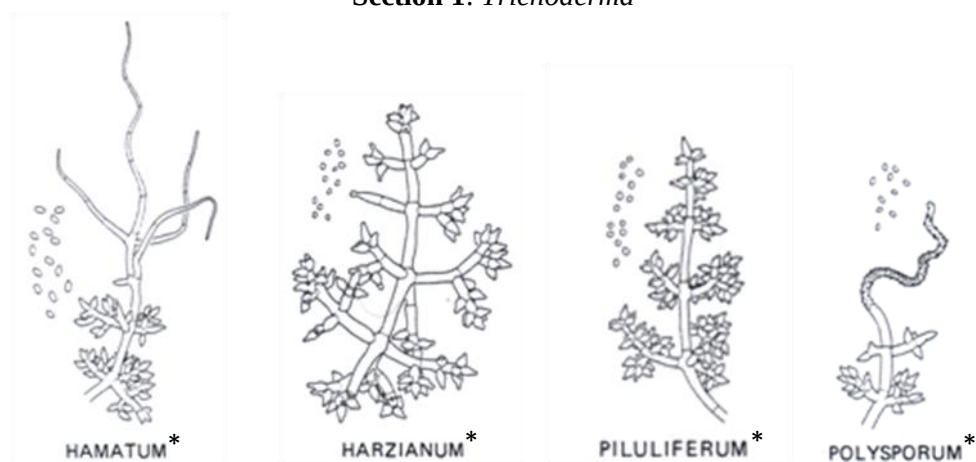
En 1969, Rifai a subdivisé le genre *Trichoderma* en 9 espèces agrégats, cet auteur avait bien reconnu que chaque espèce agrégat est hétérogène et comprend plus qu'une espèce biologique, mais il était incapable de définir les limites des espèces biologiques individualisées. Neuf espèces agrégées ont été décrites: *T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray, tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Kubicek et Harman, 2002 ; Horwitz et al., 2013).

Bissett (1991a) a essentiellement érigé les espèces de Rifai (1969) au rang de section, il a décrit les 5 sections ; *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* (Figure 03).

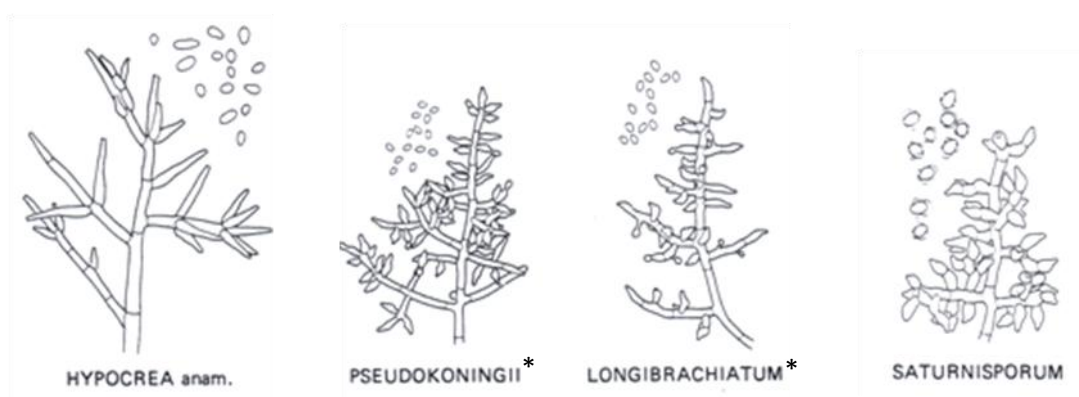
Gams et Bissett (1998) faisaient le lien entre les formes anamorphe et téléomorphe incluant aussi des espèces précédemment placées dans le genre *Gliocladium* (Jaklitsch, 2009). Ils ont montré définitivement que les distinctions morphologiques ne sont pas des indicateurs fiables du degré de divergence génétique entre les espèces, et que les observations morphologiques seules étaient insuffisantes pour une identification précise des espèces de *Trichoderma* (Hoyos-Carvajal et Bissett, 2011).



Section 1: *Trichoderma*



Section 2 : *Pachybasium*



Section 3 : *Hypocreanum*

Section 4 : *Longibrachiatum*

Section 5: *Saturnisporum*

Figure 03 : Présentation des cinq sections systématiques de *Trichoderma* reconnues par Bissett (1991a). * : Les espèces agrégées identifiées par Rifai (1969).

I.2.3. Méthodes d'identification des *Trichoderma*

I.2.3.1. Méthodes morphologiques

Au départ, la taxonomie de *Trichoderma* était basée en grande partie sur les caractères morphologiques et les travaux les plus importants étaient de Rifai (1969) et Bissett (1984, 1991a,b,c). Les deux auteurs par leurs travaux ont souligné les difficultés de la définition morphologique d'une espèce de *Trichoderma*. Samuels (1996) a également décrit les caractères morphologiques pouvant servir pour la différenciation de ces espèces. Il est important de noter que certains caractères morphologiques adoptés dans la reconnaissance des espèces chez les hyphomycètes sont en général soit non assez variables ou difficiles à décrire chez les *Trichoderma*. L'identification basées sur des caractères morphologiques et malgré leur grande plasticité, elle demeure la principale méthode et reste toujours à la base de toute identification (Kubicek et Harman, 2002).

En dehors des caractères morphologiques, l'identification de *Trichoderma* repose également sur l'étude des profils métaboliques et les approches de biologie moléculaire d'ADN (Hoyos-Carvajal et Bissett, 2011). Au cours des 20 dernières années le progrès de la biologie moléculaire a permis de développer des méthodes d'identification des microorganismes plus fiables et plus spécifiques.

I.2.3.2. Méthodes biochimiques

La première caractérisation des espèces de *Trichoderma* par l'analyse de leurs isoenzymes a été faite par Zamir et Chet (1985). Vingt-trois isolats de *T. harzianum* géographiquement différents ont été regroupés en cinq types selon les profils d'isoenzymes. Les résultats ont indiqué que l'électrophorèse enzymatique est utile pour distinguer entre les *Trichoderma* au niveau intra spécifique (sous espèce) (Kubicek et Harman, 2002, Bourguignon, 2008, Szekeres et al., 2006). Dans une étude similaire, 16 locus enzymatiques ont révélé 109 allèles correspondant à 71 souches distribuées entre cinq espèces de Rifai, (1969), à savoir *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* et *T. viride*. Les auteurs ont trouvé une petite corrélation entre la distribution des allèles et la morphologie (Szekeres et al. 2006).

Samuels et al. (1994) ont combiné les résultats électrophorétiques des isoenzymes avec les caractères morphologiques et culturelles pour déterminer la variabilité dans la forme anamorphe d'*Hypocrea schweinitzii* (*T. citrinoviride*). Les analyses isoenzymatiques qui ont été utilisées pour comparer les formes anamorphes des deux *Hypocrea* sp. ont permis de

distinguer entre les souches *T. longibrachiatum*, *T. reesei* et *T. pseudokoningii*, et également d'évaluer leur corrélation avec *Hypocrea schweinitzii*. Ces études ont été poursuivies par Leuchtmann et al. (1996) qui ont examiné 78 souches de *Trichoderma* de la section Longibrachiatum. Selon Szekeres et al. (2006), les résultats ont confirmé la taxonomie de cette section établie par Bissett (1991a). Grondona et al. (1997) in Szekeres et al. (2006) ont identifiés 15 isolats de *T. harzianum* sur la base de leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires, y compris les bandes de 99 isoenzymes révélées par PAGE avec six systèmes enzymatiques. Cette étude a révélé une corrélation entre les profils isoenzymatiques et la taxonomie de l'ADNr.

1.2.3.3. Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN et les amplifications par la PCR (*Polymerases Chain Reaction*), se sont montrées très utiles dans la caractérisation des isolats de ce genre, tant dans des études d'identification que dans l'élaboration des classifications phylogénétiques. L'analyse des séquences de l'ADNr, en particulier l'analyse des séquences des espaceurs internes transcrits (ITS1 et ITS2) a été utilisée dans l'identification moléculaire des *Trichoderma*. De nombreux gènes ont été étudiés pour résoudre les limites des analyses ITS. L'analyse d'une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation EF-1 α a permis de distinguer les espèces *T. viride* et *T. koningii* qui sont similaires par leur ITS. De ce fait cette analyse est considérée comme une approche complémentaire à l'identification par les ITS (Druzhinina et Kubicek, 2005). Récemment, de nombreux gènes ont été étudiés pour la caractérisation des isolats de *Trichoderma* tels que le gène codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase II (Rpb2), la chitinase 18-5 (ECH42), la calmoduline 1 (CALM1), l'actine, la β II tubuline (TUB β 2), la protéine nucléaire LAS1 et le gène codant pour la sous unité A d'ATP citrate lyase (ACLA) (Hoyos-Carvajal et Bissett, 2011).

1.2.4. Pouvoir antagoniste des espèces de *Trichoderma*

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. Les premières observations du potentiel antagoniste des *Trichoderma* ont été effectuées par Weindling, (1932). Il a décrit en détail le phénomène parasitaire exercé par *Trichoderma lignorum* contre *Rhizoctonia solani* qui se manifeste par l'enroulement des hyphes de l'antagoniste entour de celle du champignon pathogène; la pénétration, ainsi que la dissolution du cytoplasme de

l'hôte. Deux années plus tard Weinding (1934) a rapporté que la souche de *T. lignorum* produisait une substance toxique contre à la fois *R. solani* et *Sclerotinia americana* et la nommé gliotoxine. En 1936, Weindling et Emerson ont extrait cette substance à partir du filtrat d'une culture de *Trichoderma lignorum* qui a été récemment renommée comme *Trichoderma virens* (Howell, 2003). Depuis cette date et en particulier au début des années 80, des études successives et approfondies ont été effectuées sur le phénomène d'antagonisme des *Trichoderma* et de son application comme moyen de lutte à l'égard des agents phytopathogènes. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs travaux scientifiques s'intéressaient à la biologie de *Trichoderma*, son écologie ainsi que le potentiel en biocontrol d'un nombre important de ses espèces. En effet, *Trichoderma* est l'un des agents fongiques les plus étudiés dans la lutte biologique peut agir contre les agents pathogènes par divers modes d'action ; comprenant la compétition, le parasitisme, l'antibiose (Chet, 1987 ; Elad, 1993 ; Vinale et al., 1998). Néanmoins, actuellement, il devient de plus en plus évident que l'activité antagoniste est le résultat de différentes activités cellulaires.

I.2.4.1. Compétition

La compétition de *Trichoderma* qui se manifeste par une croissance et une germination rapide est basée sur son pouvoir à utiliser les mêmes ressources nutritives du milieu, l'espace de développement et les autres facteurs environnementaux que les champignons pathogènes, où ces ressources deviennent limitatives pour leur croissance (Chet et al., 1998). *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables qui peuvent inhiber ou réduire leur croissance. Les espèces de *Trichoderma* ont une grande capacité à coloniser le sol et à obtenir les éléments nutritifs par rapport à d'autres organismes, cette capacité est fortement influencée par les facteurs environnementaux, y compris, le pH du sol, la température et l'activité en eau (A_w). La compétition est donc considérée comme un moyen de lutte biologique efficace lorsque les conditions écologiques sont optimales pour la croissance et la germination des antagonistes (Bourguignon, 2008). Le potentiel de compétition de *Trichoderma* avec les autres organismes telluriques est expliqué par son pouvoir d'obtenir de l'ATP à partir du métabolisme du glucose résultant de la dégradation de la cellulose, la chitine et le glucane, ces polymères sont largement répandus dans les différents habitats fongiques. Les éléments clés du métabolisme du glucose comprennent des enzymes d'assimilation des glucides et des perméases, avec des protéines impliquées dans la membrane et la paroi cellulaire. Bien que le rôle du système de transport du glucose reste à découvrir, son efficacité est peut être cruciale dans la compétition (Benítez et al., 2004). Dans ce

contexte, des travaux ont montré qu'une corrélation peut exister entre l'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* se caractérisant par une capacité à survivre dans des milieux très pauvres en éléments nutritifs et le gène *Gtt1* qui code pour un transporteur de glucose à haute affinité, ce gène est réprimé en présence de concentrations élevées en glucose et fortement induit en carence de carbone (Delgado-Jarana et al., 2003 ; Benítez et al., 2004). Le potentiel de compétition de *Trichoderma* repose également sur la sécrétion des hydrolases extracellulaires (Benítez et al., 2004). La lutte biologique est rarement expliquée par la compétition seule. Cette dernière est généralement accompagnée par d'autres modes d'antagonisme à savoir le parasitisme, l'antibiose et la résistance des plantes-hôte (Steyaert et al., 2003).

I.2.4.2. Antibiose

Le terme antibiose désigne la production des substances qui agissent comme des antibiotiques vis-à-vis de l'agent pathogène (Howell, 1998). Les antibiotiques peuvent avoir une influence sur le champignon cible par différents mécanismes tels que l'inhibition de la croissance, la production de métabolites primaires, l'absorption de nutriments et la sporulation. Les espèces de *Trichoderma* sont capables de sécréter une grande variété de métabolites secondaires avec des propriétés antifongiques et antibactériennes. Plus de 100 métabolites secondaires produits par différentes souches de *Trichoderma* sont connues par leurs propriétés antibiotiques (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998). Après les enzymes lytiques, ils sont le deuxième grand groupe de molécules participant à l'action antagoniste (Manczinger et al., 2002). Leur production dépend de la souche de *Trichoderma*, des paramètres environnementaux comme le pH et la température et également du substrat colonisé (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998). Ces métabolites antibiotiques peuvent être divisés en trois grands groupes ; les composés ayant une pression de vapeur importante, ce qui les rend des métabolites volatils ; les métabolites hydrosolubles qui sont des composés non volatils et le groupe de peptaïbols amphiphiles qui sont des toxines peptidiques capables d'interagir avec les membranes cytoplasmiques (Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991; Vinale et al., 2008). Les deux premiers groupes dérivent de diverses voies métaboliques, leur production ne présente aucune corrélation chimiotaxonomique entre les espèces de *Trichoderma*. Des études taxonomiques basées sur ces marqueurs biochimiques n'ont pas donné de résultats fiables, des antibiotiques différents peuvent être produits par des souches étroitement apparentées et en parallèle des profils métaboliques d'antibiotiques semblables appartiennent à des souches de différentes espèces (Ghisalberti et Rowland, 1993). Cette

variabilité rend nécessaire, d'évaluer individuellement le spectre antimicrobien de chaque souche, ce qui peut permettre d'extrapoler l'identité de *Trichoderma* au niveau de la souche.

L'antibiose se produit généralement en synergie avec le mycoparasitisme, où les enzymes hydrolytiques permettent aux antibiotiques de pénétrer dans les cellules hôtes. À leur tour, les antibiotiques peuvent inhiber la synthèse de la paroi cellulaire et, par conséquent, d'améliorer l'action des enzymes hydrolytiques. Dans certains cas, la production d'antibiotique est en corrélation avec la capacité de lutte biologique, l'antibiotique purifié limite seul l'effet de l'agent pathogène. Plusieurs études ont prouvé que les souches de *T. virens* les plus efficaces comme agents de lutte biologique sont capables de produire la gliovirine. Cependant, certaines souches mutantes à surproduction en gliovirine donnent un contrôle similaire à celui de la souche sauvage de *T. virens* et même la mutante déficiente en gliovirine. En outre, les isolats de *T. harzianum* les plus efficaces contre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* sont les plus producteurs des antibiotiques de type pyrones (Benítez et al., 2004).

1.2.4.3. Stimulation de la croissance et induction de la résistance des plantes hôtes

La capacité des souches de *Trichoderma* à protéger les plantes contre les agents pathogènes a longtemps été attribuée à un effet antagoniste qui correspond à une stimulation indirecte de la croissance des plantes par l'inhibition des pathogènes et par conséquent, une augmentation du métabolisme de la plante. En outre, il a été révélé par les travaux effectués au cours des dernières décennies, que certaines souches de *Trichoderma* peuvent interagir directement avec les racines, en augmentant leur croissance, leur absorption des nutriments, le potentiel de germination des graines et de développement des plantes et par conséquent l'augmentation du rendement des cultures (Hermosa et al., 2012) et (Harman et al. 2004). La stimulation de la croissance des plantes par les espèces de *Trichoderma* peut être effectuée par divers mécanismes. Il a été rapporté que *T. hamatum* et *T. koningii* ont augmenté considérablement le rendement des cultures dans les champs et sous serre grâce à la sécrétion de substances activatrices de la croissance et de la germination. Avec la colonisation racinaire, les espèces de *Trichoderma* ont acquis la capacité de produire les mêmes substances ou des molécules analogues dotées des mêmes propriétés physiologiques que les phytohormones (l'auxine, la gibbérelline, et la cytokinine), avec comme effet de favoriser la prolifération des racines, la germination des graines et la croissance des plantes (Benítez et al., 2004, Hermosa et al., 2012). La fixation des souches de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise également l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs à partir du sol. Ces

souches acidifient le milieu environnant en sécrétant des acides organiques, tels que l'acide gluconique, l'acide citrique ou l'acide fumarique. Ces acides qui résultent notamment du métabolisme du glucose servent avec ce dernier à la solubilité du phosphate, les oligo-éléments et des cations minéraux comme le fer, le manganèse et le magnésium (Benítez et al., 2004). Il a été prouvé que *T. harzianum* est capable de solubiliser plusieurs éléments nutritifs des plantes. La colonisation des racines du concombre par *T. asperellum* a montré une amélioration de la disponibilité du fer et du phosphate, avec une augmentation significative du poids sec des plantes, leurs surfaces foliaires et la longueur des pousses (Hermosa et al., 2012).

Les espèces de *Trichoderma* ont également des effets bénéfiques contre le stress abiotique (Harman et al., 2004 ; Donoso et al., 2008), bien que les mécanismes par lesquels les plantes contrôlant les facteurs de stress sont encore inconnues. Récemment, Mastouri et al. (2010) ont indiqué que le traitement des semences de tomates par *T. harzianum* accélère la germination des graines, augmente la vigueur des plants et améliore leur tolérance à l'égard du stress hydrique, osmotique, salin, et thermique par l'induction de la protection physiologique dans les plantes contre les dommages oxydatifs.

Trichoderma n'a tiré l'attention comme inducteur des réactions de défense chez les végétaux qu'avec la publication de De Meyer et al. (1998) in Hermosa et al., (2012), décrivant l'efficacité de *T. harzianum* testée sur l'haricot et également la capacité de *T. asperellum* colonisant les racines du concombre à déclencher la résistance systématique acquise. La colonisation racinaire par les souches de *Trichoderma* protège les plantes contre de nombreuses classes d'agents pathogènes. Les agents pathogènes et les éliciteurs servent de signal pour l'activation de l'expression de gènes de résistance. Pour cette raison, les mécanismes de défense des plantes ne requièrent pas nécessairement une stimulation par l'organisme vivant (Benítez et al., 2004). Trois classes de composés sécrétés par *Trichoderma* induisant la résistance aux maladies sont identifiées. Ce sont des protéines à fonction enzymatique ou autres fonctions, des protéines homologues codées par des gènes d'avirulence, des oligosaccharides et, enfin, d'autres composantes de faible poids moléculaire qui sont libérées à partir des parois cellulaires (Harman et al., 2004). La sécrétion de ces molécules chimiques stimule la plante à produire de l'éthylène ou de terpènes, qui sont impliqués dans leur résistance aux agents pathogènes (Benítez et al., 2004). Au niveau moléculaire, la résistance des plantes se traduit par une augmentation de la concentration des métabolites et des enzymes liées aux mécanismes de défense, telles que la phénylalanine

ammonio-lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS), impliquées dans la biosynthèse de phytoalexines, les chitinases, les glucanases, ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Benítez *et al.*, 2004 ; Harman *et al.* 2004). Le genre *Trichoderma* a montré sa capacité d'induire une résistance à plusieurs espèces végétales telles que la tomate, le tabac, la laitue et le coton (Hermosa *et al.*, 2012).

I.2.4.4. Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est considéré comme l'attaque directe d'un champignon par un autre dans un but nutritionnel (Steyaert *et al.*, 2003). L'activité mycoparasitaire des espèces de *Trichoderma* est l'un des principaux mécanismes proposés pour expliquer leur activité antagoniste à l'égard des champignons phytopathogènes telluriques (Sivan et Chet, 1989a ; Schuster et Schmoll, 2010). Ce type d'antagonisme direct représente un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes séquentielles (Figure 04; Vinale *et al.*, 2008). La première étape est appelée stimulation chimiotropisme, dans laquelle l'antagoniste perçoit la présence de son hôte suite à sa sécrétion d'un stimulus chimique, ce qui dirige les hyphes du mycoparasite directement vers lui. La deuxième étape est la reconnaissance spécifique, où le champignon antagoniste identifie la surface cellulaire de l'agent pathogène. Elle se manifeste par une adhésion du mycoparasite aux parois de son hôte, l'attachement est dû à la présence des lectines sur le mycélium des champignons pathogènes qui se lient à des sucres spécifiques présents sur les parois cellulaires de l'antagoniste (liaison d'une agglutinine) (Davet, 1996, Steyaert *et al.*, 2003). La troisième étape peut impliquer deux processus distincts. L'un est l'enroulement, où les hyphes de *Trichoderma* entourent son hôte (Chet *et al.*, 1981; Davet, 1996). Alors que, le deuxième processus implique une interaction intime des hyphes, où les hyphes de *Trichoderma* poussent parallèlement le long des hyphes du pathogène. Ce type d'interaction mycoparasitaire peut être observé par microscope à balayage électronique ou par microscope à fluorescence (Chet *et al.*, 1998). Le contact au pathogène est renforcé par la formation des appressoriums par l'antagoniste, d'haustoria ou de structures en forme de crochet (Chet *et al.*, 1981; Davet, 1996). Dans la quatrième étape et lorsque cette interaction survient, la pénétration de *Trichoderma* peut se produire, et qui conduit à une granulation et une vacuolisation cytoplasmique, une perforation de la paroi cellulaire, une perte de turgescence et finalement la lyse cellulaire (Benhamou et Chet, 1997 ; Gupta *et al.*, 1999). Il a été rapporté que la dégradation de la paroi cellulaire du pathogène suit la production des enzymes lytiques extracellulaires et les peptaïbols, ce qui facilite à la fois l'entrée des hyphes de *Trichoderma* dans les hyphes du champignons hôte et l'assimilation de son contenu

cellulaire (Benítez et *al.*, 2004). Les interactions *Trichoderma*-pathogène ne comportent pas nécessairement toutes ces étapes, comme par exemple l'enroulement et la pénétration dans les hyphes du pathogène ne sont pas toujours observées. En outre, l'éclatement et l'effondrement des structures mycéliens peuvent avoir lieu suite à une sécrétion des enzymes lytiques ou des métabolites secondaires ayant une activité antibiotique même sans contact direct entre *Trichoderma* et le pathogène (Gupta et *al.*, 1999). L'activité mycoparasitaire de *Trichoderma* ne dépend pas seulement de la souche antagoniste, mais aussi du champignon phytopathogène, les *Trichoderma* sp. peuvent réagir de façons très différentes en fonction de l'agent pathogène (Haran et *al.*, 1996b).

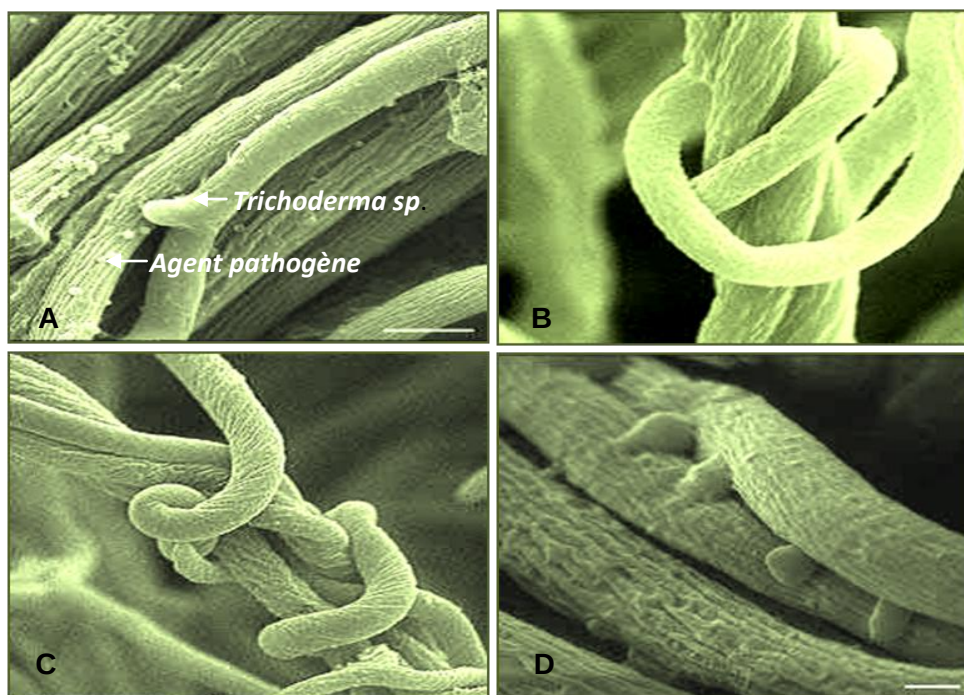


Figure 04: Mise en évidence du mycoparasitisme par microscope électronique.

A : hyphes de *Trichoderma* poussant parallèlement aux hyphes du pathogène, **B** et **C** : enroulement de *Trichoderma* autour des hyphes du pathogène, **D** : formation d'un appressorium par l'antagoniste (Kubicek et Harman, 1998).

I.3. Données sur le genre *Fusarium*

I.3.1. Description générale

Le genre *Fusarium* a été décrit par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fuscus* (fuseau) en rapport avec la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées. Le genre anamorphe *Fusarium* appartient au groupe artificiel des « **deutéromycètes** ». La plupart des espèces téléomorphes associées avec le genre *Fusarium* sont membres des **Hypocreales (Sordariomycètes, Ascomycota)** et sont pour la plupart rattachées au genre *Gibberella* (Botton et al., 1990; Watanabe, 2002 ; Leslie et Summerell, 2006).

Les champignons du genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces pathogènes pour les plantes, l'homme et les animaux (Leslie et Summerell, 2006). Ces espèces sont très répandues dans la nature et peuvent être isolées de la plupart des sols, des insectes, de l'eau courante, des racines, des graines. Les espèces pathogènes toxigènes les plus répandues sur le blé sont *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* ainsi que *Fusarium verticillioides* (Parry et al., 1995).

I.3.2. Fusariose du blé

La culture du blé (*Triticum durum* et *T. aestivum*) est soumise à une intense pression parasitaire, dont la fusariose est considérée parmi les contraintes majeures de sa production à travers le monde. La fusariose est une maladie fongique affectant les céréales à petits grains telles que le blé, l'orge, l'avoine, le riz, le sorgho et également le maïs qui sévit à travers le monde (Sutton, 1982 ; Parry et al., 1995). Elle est associée à un complexe d'espèces fongiques regroupant deux genres de champignons phytopathogènes: *Fusarium* et *Microdochium* (Arseniuk et al., 1999 ; Pirgozliev et al., 2003). La maladie sous des conditions climatiques favorables peut attaquer à tous les stades de développement, tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis, et il est possible de distinguer plusieurs types de fusarioses (Parry et al., 1995).

I.3.2.1. Brulure des plantules « *Seedling blight* »

Cette maladie est due à des semences contaminées, et elle est fréquente dans les régions humides où la fusariose de l'épi prédomine. 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). Elle provoque des manques à la levée. Un nombre des agents fongiques qui

causent la fonte des semis, provoquent également la pourriture des racines « *root rot* » des plantes matures (Pirgozliev et *al.*, 2003; Agrios, 2005). En effet, la germination a lieu mais les racines meurent au cours de leur développement ou elles sont partiellement nécrosées (Gargouri et *al.*, 2001).

I.3.2.2. Pourriture des racines « *root rot* ou *common root rot* »

La pourriture racinaire nommée également la pourriture commune est une maladie grave touchant les plantes matures, apparaissant par l'infection de leurs parties souterraines. L'infestation est due à un complexe de communautés fongiques (*Bipolaris* et *Fusarium*), qui provient de l'inoculum présent dans le sol, des débris végétaux infectés ainsi que de semences contaminées (Garver, 2009). La pourriture racinaire a lieu dans les régions où la pluviométrie est faible. Cette maladie conduit à la destruction des tissus racinaires, 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 du 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 ; Hajieghrari, 2009). Cette maladie peut conduire à des pertes de 25% de rendement en grain, malgré ça la pourriture commune a tiré moins d'attention que la fusariose d'épi et les autres maladies foliaires (Garver, 2009).

I.3.2.3. Pourriture du collet « *foot rot* »

La pourriture du collet ou la pourriture du pied est une maladie virulente qui se caractérise par la nécrose de ces tissus. Cette maladie est très fréquente dans les régions arides et semi-arides et peuvent toucher des grandes cultures des céréales et des plantes fourragères, ce qui conduit par la suite à des pertes graves du rendement. L'inoculum primaire pour l'initiation de cette maladie provient principalement du champignon présent sous forme de chlamydospores dans le sol, de mycélium et débris des plantes infestées enfouis dans la couche superficielle du sol. Les pathogènes pénètrent par le coléoptile, le rhizome ou les racines secondaires. 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. Lorsque l'attaque du collet est précoce, le champignon peut attaquer les différentes gaines et détruire le jeune plant (Gargouri, 2003).

I.3.2.4. Fusariose de l'épi «*Fusarium head blight*»

Affectant l'épi de la plante adulte, cette maladie est soit accompagnée ou précédée par des attaques sur le collet «*foot rot*» et les racines. Il est également connu que les espèces responsables de la fusariose de l'épi peuvent également causer la brûlure des plantules et les pourritures racinaires (Agrios, 2005).

I.3.3. Agents pathogènes

I.3.3.1. *Fusarium graminearum* Schwabe

Fusarium graminearum Schwabe est l'espèce du genre *Fusarium* la plus présente sur blé dans plusieurs régions du monde. Ce champignon est considéré comme l'agent pathogène principale responsable de la fusariose de l'épi sur blé (Parry et al., 1995), et il est également impliqué dans la fusariose du collet et la pourriture racinaire, chez le blé et d'autres céréales (Smiley et Patterson, 1996 ; Liu et al., 2012). Généralement, il se caractérise par un mycélium rose, parfois avec teinte jaune, la sporodochie n'est pas toujours bien développée (Botton et al., 1990 ; Ripert, 2013). *F. graminearum* se trouve sous deux formes en fonction du mode de reproduction. *Gibberella zeae*, le téléomorphe de *F. graminearum*, est le seul cas d'homothallisme du genre connu à ce jour. La signification biologique de cet homothallisme est encore inconnue. La forme téléomorphe se manifeste par la formation des périthèces et la production d'ascospores résultant de la reproduction sexuée. La reproduction asexuée se manifeste par la production de conidies et de chlamydospores. La forme anamorphe produit uniquement des macroconidies, les microconidies étant absentes (Leslie et Summerell, 2006). La virulence de cette espèce ne semble pas être liée au mode de reproduction, bien que l'étude de Paulitz, (1996) a suggéré que la libération des ascospores et de des périthèces à la fin du printemps forme la première source d'inoculum influe sur l'installation de la maladie.

F. graminearum en conditions défavorables se comporte comme saprophyte sur des résidus de cultures et survit sous forme de mycélium ou chlamydospores (Sutton, 1982). L'inoculum primaire pour l'initiation des maladies provient principalement de débris de plantes infectées et il peut également provenir d'adventices ou de semences infectées (Figure 05 ; Parry et al., 1995, Champeil et al., 2004). Cet inoculum peut infecter les semis et conduire à une fonte des semis et une pourriture du collet (Pirgozliev et al., 2003). Au printemps, lorsque les conditions deviennent favorables, le champignon se développe et permet la formation de périthèces et de macroconidies mais également d'ascospores (Paulitz, 1996). Ces derniers

avec les macroconidies représentent les formes principales d'inoculum primaire (Champeil et *al.*, 2004). Les spores parviennent jusqu'aux épis et causent l'infection. La période critique pour l'infection des épis débute à l'épiaison et s'étend sur les quelques jours suivants. Pendant cette période, les facteurs climatiques comme la pluie ou l'humidité, associés à la chaleur auront le plus important impact sur le niveau d'infection (Sutton, 1982).

Au moment de la sortie des étamines, la fleur du blé est largement ouverte, ce qui la rend plus susceptible à l'invasion par l'agent pathogène. *F. graminearum* peut infecter également les racines des plantes adultes et induire la pourriture racinaire, elle apparaît plus particulièrement dans les zones semi-arides et durant les années à faible pluviométrie (Hajieghrari, 2009).

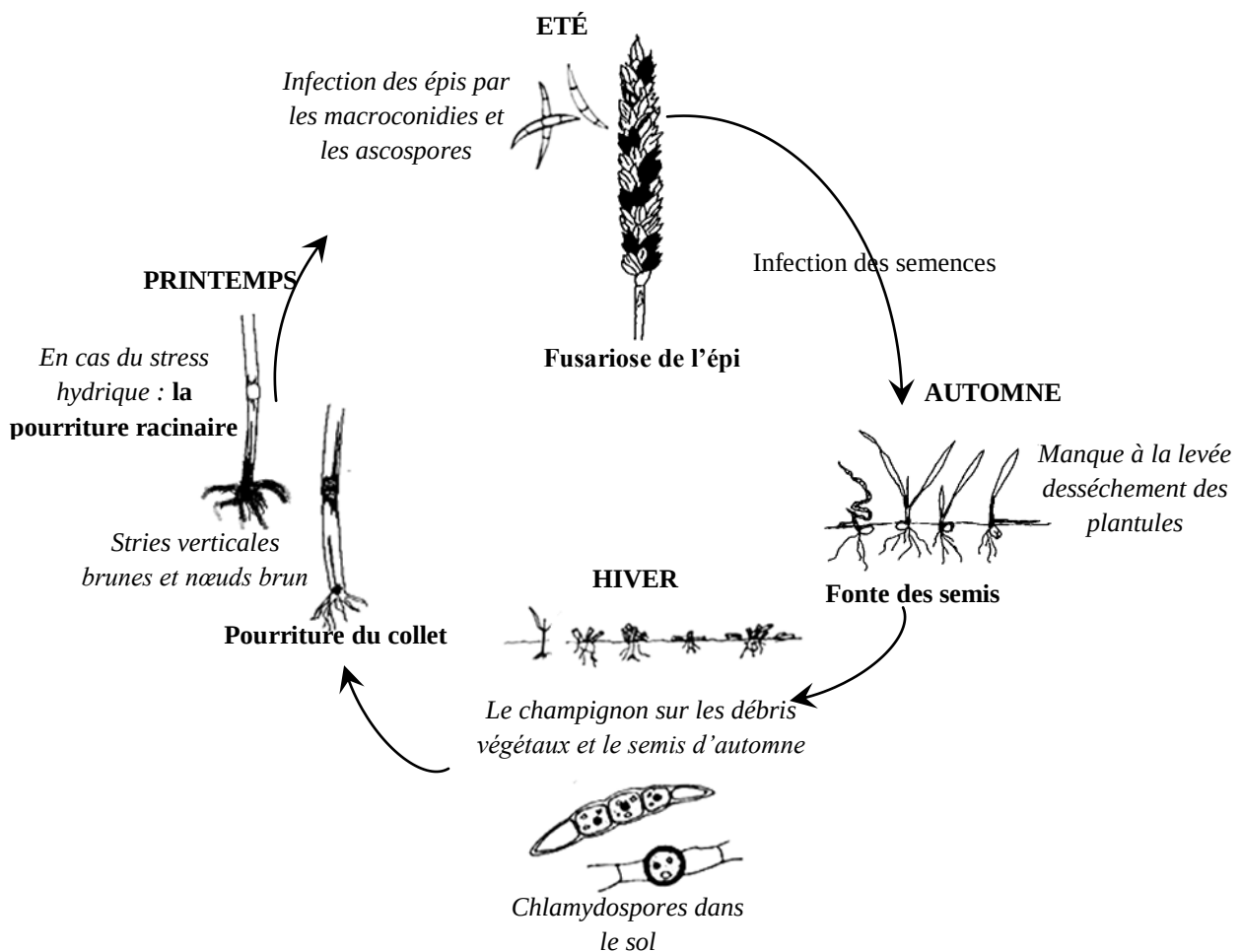


Figure 05: Cycle biologique de *Fusarium* du blé (Parry et *al.*, 1995).

Les champignons du genre *Fusarium* produisent une large gamme de mycotoxines. Les plus connues sont la famille des trichothécènes, divisée en 4 groupes A, B, C et D. *Fusarium graminearum* est le principal producteur des trichothécènes B, le déoxynivalénol (DON) qui appartient à ce groupe est la mycotoxine la plus répandue sur les céréales (Nicholson et al., 2003; Ripert, 2013). Les trichothécènes sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des cellules eucaryotes, et ils peuvent provoquer également des altérations au niveau du foie, des reins, du système nerveux central, des dérèglements hormonaux ou même une réduction des défenses immunitaires (Nakajima, 2010; Ripert, 2013). Chez les plantes, les trichothécènes conduisent à une réduction de l'activation des gènes de défense (Wagacha et Muthomi, 2007). *Fusarium graminearum* est également producteur de la zéaralénone et d'autres métabolites secondaires plus ou moins toxiques. Les zéaralénones sont classées comme mycoestrogène qui présente suffisamment de ressemblance avec l'hormone œstrogène humaine pour se fixer sur ses récepteurs, d'où sa toxicité (Bennett et Klich, 2003; Desjardins, 2006).

3.3.2. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo

Fusarium culmorum Saccardo dont la forme sexuée n'a pas été mise en évidence, appartient à la section taxonomique Discolor, section à laquelle appartient également *F. graminearum* (Leslie et Summerell, 2006). *Fusarium culmorum* est un agent phytopathogène responsable de divers symptômes tels que la fonte des semis, la pourriture racinaire, la fusariose de l'épi, la pourriture de la tige, etc. chez de nombreuses espèces de plantes mono et dicotylédones, en particulier chez les céréales (Smiley et Patterson, 1996 ; Leslie et Summerell, 2006 ; Liu et al., 2012). Ce champignon avec *F. graminearum* sont les espèces pathogènes majeures responsables de la fusariose du blé (Mascher et al., 2005). Il cause des pertes de rendement significatives en régions humides et survit mieux aux extrêmes de sécheresse et aux gelées que *F. graminearum* (Nicholson et al., 2003). *F. culmorum* se caractérise par un thalle à croissance rapide, d'abord blanc à jaunâtre ou rose à rouge brunâtre avec un revers rouge à pourpre. Les microconidies sont absentes. Les phialides sont courtes et larges formées sur le mycélium aérien. Les macroconidies sont fusiformes et les chlamydospores sont intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies (Botton et al., 1990 ; Ripert, 2013). Les espèces de *F. culmorum* sont de producteurs importants de trichothécènes du groupe B incluant le deoxynivalénol (DON), aussi appelé vomitoxine, ses formes 15- et 3-acétylées et le nivalénol (NIV). Ces espèces produisent également la zéaralénone (Popovski et Celar, 2012). Le cycle infectieux du blé par *F. culmorum* est commun avec les autres espèces de *Fusarium* illustré dans la figure 05.

I.3.3.3. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

Fusarium verticillioides (synonyme : *F. moniliforme*) est l'anamorphe de *Gibberella moniliformis* Wineland. Ce champignon est un agent pathogène de plusieurs graminées cultivées, d'un très grand nombre des mono et des dicotylédones et des céréales. Bien que *F. graminearum* et *F. culmorum* sont les espèces de *Fusarium* les plus pathogènes du blé, il est évident de souligner que d'autres espèces telles que *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* et *F. verticillioides* peuvent être d'une importance dans des situations particulières. *F. verticillioides* est généralement considéré comme un agent pathogène du maïs, mais également il a été isolé à partir de blé. *F. verticillioides* était décrit comme un endophyte facultatif du maïs, ce qui le rend relativement insensible aux fongicides (Nicholson et al., 2003). Il infecte la plante à différents stades de développement en provoquant la fonte des semis, la pourriture des racines, la brûlure des plantules, la pourriture de la tige et des épis (Venturini et al., 2013). Chez le blé, les espèces de *F. verticillioides* provoquent la fonte des semis, la brûlure des plantules et la pourriture racinaire (Liu et al., 2012). Ce champignon qui n'a pas de chlamydospores, se caractérise par un thalle blanc à pêche ou rose saumon devenant violacé, à mycélium aérien dense et floconneux, d'aspect poudreux. Les microconidies se disposent en chaînes, et sont fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées. Les macrophialides sont groupées par 2-3 sur une ramification courte. Les macroconidies qui sont rares chez certains isolats, sont en fuseau allongé, septées (Botton et al., 1990 ; Ripert, 2013). Les fumonisines, qui sont chimiquement des aminopolyalcools dérivés de l'alanine, sont produites essentiellement par *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* et *F. graminearum* (Branham et Plattner, 1993). Les fumonisines de type B (FB) sont fréquemment identifiées sur l'avoine, le blé, le maïs et aussi sur le riz (Ripert, 2013). Quelques études toxicologiques ont démontré les propriétés hépatotoxiques des fumonisines et leur implication dans le cancer de l'oesophage chez l'homme. Il semble également que la FB₁ soit génotoxique et neurotoxique. De nombreux travaux ont démontré que les fumonisines altèrent le métabolisme lipidique des cellules et bloquent la voie métabolique des sphingolipides (Carratù et al., 2003 ; Marasas et al., 2004).

I.3.4. Moyen de lutte

Le risque de fusariose peut généralement être réduit en adaptant le système de rotation des cultures, les méthodes de travail du sol et l'utilisation de variétés résistantes (Sutton, 1982 ; Parry et al., 1995 ; Pirgozliev 2003). Une variété de blé ne doit donc pas seulement

résister à l'infection mais aussi à l'accumulation de mycotoxines dans les grains. La sélection de telles variétés est une tâche de longue durée exigeant le développement de méthodes de sélection très poussées. En plus, il n'existe aucune variété résistante totalement à la fusariose. Si pour une raison ou une autre ces facteurs ne peuvent pas être modifiés, il peut être nécessaire d'utiliser un traitement fongicide pour minimiser le taux de contamination. Plusieurs fongicides ont été utilisés pour réduire l'infection primaire de blé par la fusariose. Toutefois, dans la pratique, la lutte chimique contre la maladie donne souvent des résultats insuffisants et n'évite pas l'accumulation de mycotoxines dans les grains (Champeil, 2004 ; Mascher et *al.*, 2005).

Actuellement, la lutte biologique est apparue comme méthode prometteuse contre la fusariose par son efficacité et l'élimination des problèmes causés par la lutte chimique (Schisler et *al.*, 2002 ; Riungu et *al.*, 2007). Ces dernières années, il a été démontré par des études menées sous serre et aux champs que des agents antagonistes fongiques, en particulier du genre *Trichoderma* (Dal Bello et *al.*, 2002 ; Saharan et *al.*, 2008 ; Foroutan, 2013 ; Scherm et *al.*, 2013) et bactériens (*Bacillus*, *Cryptococcus*) ont pu réduire la sévérité des symptômes de fusariose causés par des espèces de *Fusarium* (Diamond et Cooke, 2003 ; Khan et *al.* 2004).

CHAPITRE II

IMPACT DES FACTEURS ECOLOGIQUES SUR LA REPARTITION DES MOISSURES DANS LES SOLS SALINS

II.1. Introduction

Les avancées scientifiques en biologie moléculaire et l'intérêt croissant, sur les sujets concernant l'environnement ont permis de révéler les profils de répartition des champignons et leur diversité dans les différents écosystèmes et tous les environnements, y compris les milieux extrêmes salins. L'intérêt des champignons peuplant ces environnements est dû non seulement à la nécessité de comprendre les mécanismes d'adaptation aux multiples stress et la détection de leur diversité, mais aussi à leur possible application en biotechnologie industrielle et agricole. Les milieux salins offrent la possibilité d'isolement des champignons avec une tolérance accrue à la salinité, dont l'osmotolérance est considérée comme un critère de choix pour leur utilisation agricole dans les régions arides, caractérisées par la salinité du sol et de l'eau d'irrigation.

L'isolement des champignons à partir des milieux salins a fait l'objet de nombreuses études, à titre d'exemple la Russie, la Mer Morte, la France, la Namibie, le Portugal, la Slovaquie, l'Espagne et de la République dominicaine (Cantrell et *al.*, 2006). Cependant, en Algérie des études similaires restent encore modestes, malgré celles effectuées par Hacène et *al.* (2004) sur la diversité microbienne du lac salé d'El Goléa (El Meniâa) et celle de Boutaïba et *al.* (2011) sur les deux lacs salés (Sidi Ameur et Himalatt) de Boussaâda. Outre ces deux lacs, l'Algérie recèle un grand nombre des milieux salins comprenant : Chott Merouane, Melghir, Hamraia, Eddar, Tighdidine et Tindla (Bensaci et *al.*, 2013; Demnati et *al.*, 2012; Houhamdi et *al.*, 2008). Malgré que les deux premiers chotts sont désignés dans la liste des zones humides d'importance internationale de Ramsar et considérés comme les plus grands lacs salés d'Algérie, peu d'étude ont été consacrées à ces chotts à l'exception des travaux de Houhamdi et *al.* (2008); Samraoui et *al.* (2010) in Demnati et *al.* (2012), bien que ces travaux portent sur la biodiversité faunistique, le côté champignon n'a fait l'objet d'aucune étude, d'où l'intérêt du présent travail.

Pour étudier l'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la répartition et la diversité des *Trichoderma* spp. nous avons procédé dans un premier temps à une collecte des échantillons du sol suivie par une analyse microbiologique présentée par l'énumération et l'identification des isolats fongiques et bactériens. Les échantillons du sol sont collectés de huit sites différents correspondant à deux entités écologiques ; la région des Ziban (Biskra) et la région d'Oued Righ (Figure 06). Dans un second temps et pour compléter l'étude microbiologique, nous avons effectué une analyse physicochimique du sol présentant les facteurs abiotiques.

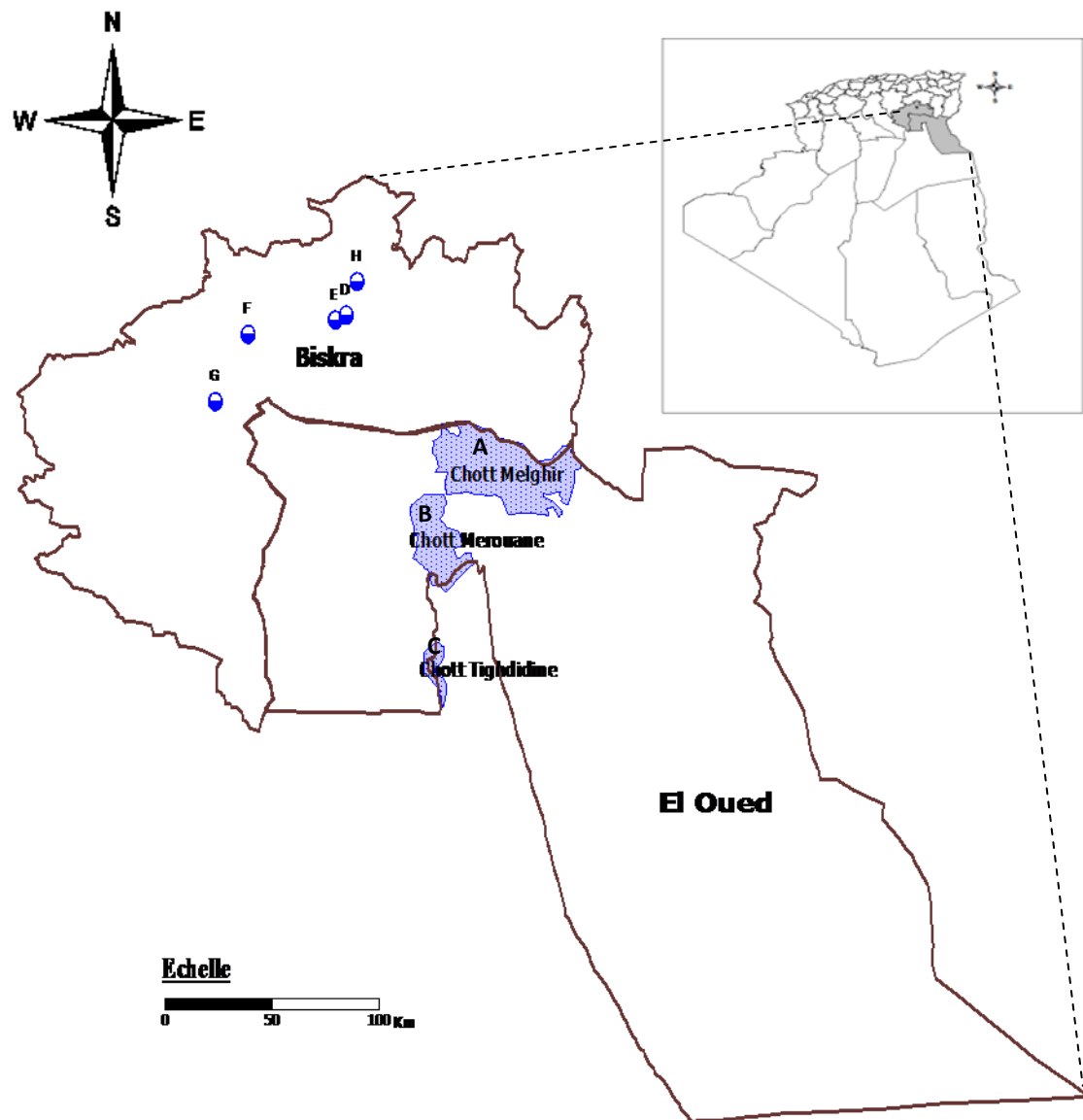


Figure 6 : Situation géographique des sites de prélèvements. **Region de Oued Righ (El-Oued):** A: chott Merouane, B: chott Melghir, C: chott Tighdidine. **Region des Ziban (Biskra):** D: Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Présentation de la région d'étude

Les prélèvements du sol ont été effectués à partir de deux régions, la région d'Oued Righ regroupant trois sites et la région des Ziban regroupant cinq sites. La localisation des sites de prélèvements des deux régions d'étude est présentée dans le tableau 1.

II.2.1.1. Région d'Oued Righ (El-Oued)

Trois sites appartenant à la région d'Oued Righ sont choisis pour les prélèvements du sol, il s'agit de chott Merouane, Melghir et Tighdidine. La région d'Oued Righ est située dans le Grand Erg Oriental au Nord-est du Sahara Algérien entre 32° 45' de latitude et 5° 45 et 6° 15 Est de longitude. La précipitation annuelle moyenne dans cette région est très faible et estimée à environ 90-120 mm, elle ne dépasse jamais les 200 mm/an, la température moyenne du mois le plus chaud (juillet) peut atteindre 47 °C. Chott Merouane et Melghir ont été désignés dans la liste de Ramsar depuis 2001 et 2003 respectivement. Cependant, chott Tighdidine n'est pas encore inclus dans cette liste. Les deux premiers chotts qui sont considérés parmi les principales zones humides de la vallée d'Oued Righ couvrent de grandes superficies de 337700 et 523426 ha respectivement. Leurs teneurs en sel très élevées, expliquent l'installation d'entreprises d'extraction du sel de table. Ces deux chotts ont des altitudes basses, où chott Merouane atteint dans certains endroits 40 m au-dessous du niveau de la mer, considéré comme le point le plus bas d'Afrique du nord (Demnati et *al.*, 2012).

II.2.1.2. Région des Ziban (Biskra)

Aux portes du Sahara Algérien se situe l'oasis saharienne de Biskra. Elle est localisée à environ 400 km au sud-est de la capitale et située entre 4°15' et 6°45' Est de longitude et entre 35°15' et 33°30' degré Nord de latitude. Son altitude varie entre 29 et 1600 mètres par rapport au niveau de la Méditerranée. Biskra constitue une partie de la transition entre le domaine atlasique plissé du Nord et les étendues plates et désertiques du Sahara. La région des Ziban est soumise à un climat saharien caractérisé notamment par la faiblesse et l'irrégularité des précipitations, une luminosité intense, une forte évaporation et de grands écarts de température (Ozenda, 1991). Selon l'étude de Khachai (2001), la région des Ziban est divisée en trois classes pédologiques, dont les sols calci-magnésiques sont les plus répandus. Ces sols se localisent dans le Sud et l'Est de la wilaya, qui comprend 33 communes dispersées sur une surface de 21671 km².

Tableau 01: Localisation et caractéristiques des sites de prélèvements des sols

Site	Code	Localisation			
		Wilaya	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Chott Merouane	A	El Oued	28	34°02.433'	5°58.748'
Chott Melghir	B	El Oued -Biskra	-24	34°10.631'	06°17.322'
Chott Tighdidine	C	El Oued	-	33°31.366'	06°02.181'
Ain Ben Naoui	D	Biskra	110	34°48'	5°39'
El Hadjeb	E	Biskra	139	34°47'	5°36'
Foughala	F	Biskra	244	34°44'	5°12'
Doucen	G	Biskra	200	34°30'	5°3'
Loutaya	H	Biskra	188	34°55'	5°42'

II.2.2. Collection des échantillons du sol

Les échantillons du sol des chotts ont été collectés pendant le mois d'octobre de 2010, 2011 et 2012. Après avoir écarté les trois premiers centimètres du sol, des échantillons de 100 à 200 g du sol ont été mis dans des sacs de polyéthylène stériles de manière aseptique à partir de cinq points du sol environnant chaque chott et à une profondeur de 10 à 30 cm. Cinq échantillons ont été pris de chaque point. L'ensemble des échantillons collectés pour les analyses microbiologiques et physicochimiques est transporté au laboratoire, où ils ont été conservés à 4°C pendant une période ne dépassant pas 48 h. Selon la même méthode, vingt cinq échantillons des sols non cultivés ont été prélevés à partir de 5 sites différents de la région des Ziban, en octobre 2012 et 2013.

II.2.3. Analyses du sol

Le pH et la conductivité électrique des échantillons du sol ont été mesurés dans des suspensions de sol-eau (1p/5v) à 25 °C. La teneur en humidité des échantillons a été déterminée par séchage de 10 g du sol dans un dessiccateur à 105 °C pendant une nuit. Pour les analyses chimiques, les échantillons ont été séchés tout d'abord à l'air libre, le sol est tamisé à travers un tamis de 0.2 mm. L'azote total a été déterminé par la méthode de Kjeldahl. Le carbone organique a été déterminé par oxydation avec le dichromate de potassium. Le chlorure est mesuré selon la méthode de Mohr (Aubert, 1978). Les éléments minéraux (Ca, Mg, K et Na) sont dosés selon la méthode décrite par Rodier (2005).

II.2.4. Isolement

La méthode de suspension-dilution décrite par Davet et Rouxel (1997) a été adoptée. Une quantité de 10 g de chaque échantillon du sol est suspendue dans 90 ml d'une solution de NaCl (0.85 et 1%) stériles. Les suspensions du sol ont été vigoureusement agitées pendant 20 min afin de libérer les conidies et les hyphes adhérant aux particules du sol. Après la préparation d'une série de dilutions décimales et dans le cas d'isolement des moisissures, les dilutions sont ensemencées à raison de 1 ml par dilution dans des boîtes de Pétri contenant préalablement le milieu PDA, le TSM et le TME (annexe 01) semi refroidi (45 °C), contenant 50 ppm de gentamicine (Botton et *al.*, 1990). Dans le cas d'isolement des levures, les dilutions sont ensemencées en surface du milieu PDA. Pour l'isolement des bactéries, les dilutions sont ensemencées sur des milieux gélosés sélectifs (annexe 01) ; le milieu Kuster amidon pour l'isolement des actinomycètes, les milieux King A et B pour l'isolement des espèces du genre *Pseudomonas* et le milieu TCA pour l'isolement des *Bacillus*. Chaque milieu est additionné de 16.6 mg/l de cyclohexymide afin d'inhiber la croissance fongique. Des répliques de trois boîtes sont effectuées pour chaque dilution. Après 48 à 72 h d'incubation à 28±2°C, nous avons procédé à l'isolement du maximum de colonies d'apparences différentes qui ont poussé sur les différents milieux. Les colonies fongiques ont été repiquées sur milieu PDA, cependant celles des bactéries sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu TSA. Les isolats de champignons non sporulant ont été cultivés sur de l'eau gélosée pour induire leur sporulation (Grishkan et Nevo, 2010). Après la purification des isolats par la méthode monospore, leur conservation est réalisée sur milieu PDA incliné en tubes à 4°C (chaque isolat est repiqué chaque deux mois pour s'assurer de sa viabilité et de sa pureté). Ils sont conservés également à -20°C dans une solution de glycérol stérile à 20 %, de chlorure de sodium à 0.95 % et de Tween 80 à 0.2 % (Prevot, 2013).

II.2.5. Identification

Les colonies apparues sur milieu PDA et possédant un aspect visqueux sont observées au grossissement×40 pour confirmer leur appartenance aux levures. Cependant celles possédant un aspect filamenteux sont soumises à une identification morphologique et physiologique.

II.2.5.1. Identification morphologique des moisissures

Les moisissures isolées sont soumises à une identification préliminaire réalisée par examen cultural des colonies (aspect colonie, forme, relief, couleur) sur milieux gélosés PDA, CYA,

et Czapec Dox (annexe 01), et un examen microscopique. Ce dernier est effectué selon la méthode de drapeau de Roth en appliquant à l'aide d'une pince un morceau de scotch par sa face collante sur la colonie à identifier, examiné ensuite en présence de bleu coton au lactophénol. L'observation microscopique est réalisée au grossissement $\times 40$. Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium et de spores, ainsi que l'existence des organes de reproduction sexuée. Cette identification est basée sur des comparaisons avec des données descriptives dans la littérature taxonomique (Botton et *al.*, 1990; Watanabe, 2002).

II.2.5.2. Caractérisation physiologique des moisissures

L'étude de l'effet de la température et de la salinité sur la croissance est effectuée selon la technique décrite par Guiraud (1998). Un volume de 50 ml du milieu Czapec Liquide Modifié (CLM ; annexe 01) est inoculé par un disque de 5 mm de la culture à examiner âgée de 5 à 7 jours. Les cultures sont incubées à différentes températures allant de 15 à 60 °C avec un intervalle de 5 °C. Le test de salinité est effectué, en préparant des milieux CLM à diverses concentrations de NaCl allant de 0 à 4 M avec un intervalle de 0.5 M. Les cultures ont été incubées à la température optimale de chaque classe. La croissance des champignons filamenteux a été estimée par mesure de leur biomasse après 7 jours d'incubation. Les isolats thermophiles et thermotolérants se distinguent sur la base de leur température de croissance minimale et maximale (Maheshwari et *al.*, 2000). Les isolats halophiles se distinguent par leur incapacité à se développer en absence de NaCl et de leur exigence en salinité (≥ 1.5 M) pour une croissance optimale (Cantrell et *al.*, 2006 ; Batista-Garcia et *al.*, 2014).

II.2.5.3. Identification des bactéries

L'appartenance des colonies énumérées sur les milieux bactériens sélectifs aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et aux Actinomycètes est effectuée par observation microscopique ($\times 100$) et avec les tests classiques de bactériologie tels que ; la coloration de gram, les tests enzymatiques (oxydase et catalase), test de dégradation de mannitol (annexe 02).

II.2.6. Analyses statistiques

La densité microbienne est exprimée en unité formant colonie (UFC) par gramme de sol en poids humide. L'abondance relative (R) des champignons est employée pour déterminer l'occurrence des espèces dans les sites selon la formule illustrée dans la page suivante, décrite par Banakar et *al.* (2012).

R (%) = n/N où **n**: nombre des isolats d'une même espèce, **N** : nombre total des isolats.

Les paramètres physicochimiques sont traités statistiquement par l'analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur pour déterminer les différences entre les moyennes, suivie par le test de comparaison multiple de Tukey. La corrélation entre la densité de la population des champignons filamenteux et les paramètres physicochimiques du sol est analysée par l'utilisation du coefficient de corrélation de Pearson. Les valeurs de $P < 0.01$ et 0.05 sont considérées comme significatives. L'analyse statistique est réalisée par SPSS, version 21. L'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur la répartition des *Trichoderma* spp. est étudiée par l'analyse canonique des correspondances (ACC) réalisée par XLSTAT 2015.

II.3. Résultats

II.3.1. Analyses du sol

L'analyse statistique du sol résumée dans le tableau 2 a montré des différences significatives entre les différents sites. Les valeurs de l'humidité du sol les plus élevées sont notées dans les deux premiers sites, cependant la teneur la plus faible est notée à chott Tighdidine. Le sol des deux régions d'étude est légèrement alcalin à alcalin. Les teneurs les plus élevées de la conductivité électrique (CE), de chlore et de sodium sont enregistrées dans les chotts comparées aux sites de la région des Ziban. Les teneurs de carbone organique (C%) et d'azote total (N‰) les plus élevés sont trouvées à Foughala, Doucen et Loutaya comparées aux chotts et les deux autres sites des Ziban. Tous les sites sont caractérisés par la dominance des ions de sodium et de chlorure.

II.3.2. Isolement et énumération des colonies fongiques et bactériennes

L'ensemencement des différentes dilutions du sol sur les trois milieux gélosés a permis d'obtenir un nombre variant entre 100 à 250 UFC/g de champignons filamenteux dans chaque site. La répartition des colonies selon leur apparition dans le milieu gélosé d'isolement est présentée dans la figure 7. Pour la plupart des sites, le nombre des colonies le plus élevé est obtenu sur PDA puis sur TSM et TME, même pour les isolats appartenant au genre *Trichoderma*.

Tableau 2: Analyses physicochimiques du sol

Site	Humidité (%)	pH	CE à 25°C (ms/cm)	C (%)	N (‰)	Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	Cl (mg/g)
A	13.28 ^{ab} ±0.27	7.63 ^a ±0.12	25.30 ^e ±0.21	0.43 ^b ±0.11	0.55 ^{ab} ±0.00	8.78 ^c ±0.32	2.29 ^c ±0.09	1.27 ^b ±0.16	0.22 ^a ±0.00	13.31 ^d ±0.41
B	12.40 ^a ±0.12	7.79 ^{abc} ±0.09	27.45 ^f ±0.66	0.15 ^a ±0.02	0.23 ^a ±0.00	12.47 ^d ±0.56	5.43 ^d ±0.33	5.04 ^c ±0.62	1.57 ^{bc} ±0.06	16.40 ^e ±1.09
C	03.00 ^a ±0.70	8.97 ^e ±0.17	14.44 ^d ±0.15	0.17 ^a ±0.02	0.40 ^a ±0.00	2.31 ^a ±0.13	1.26 ^b ±0.14	0.93 ^{ab} ±0.05	5.23 ^e ±0.30	09.69 ^c ±0.31
D	03.78 ^{ab} ±0.16	8.02 ^d ±0.14	02.40 ^a ±0.22	0.26 ^{ab} ±0.02	0.68 ^{ab} ±0.01	1.74 ^a ±0.41	0.09 ^a ±0.01	0.82 ^{ab} ±0.09	1.23 ^b ±0.07	02.12 ^a ±0.11
E	03.98 ^c ±0.09	7.81 ^{abcd} ±0.07	03.66 ^b ±0.29	0.36 ^b ±0.04	0.92 ^{bc} ±0.01	3.33 ^b ±0.34	0.08 ^a ±0.00	0.96 ^{ab} ±0.04	2.59 ^d ±0.12	03.71 ^b ±0.18
F	06.36 ^c ±0.33	7.92 ^{bcd} ±0.07	02.55 ^a ±0.33	2.08 ^d ±0.16	2.46 ^e ±0.04	1.72 ^a ±0.10	0.09 ^a ±0.01	0.70 ^a ±0.10	1.49 ^{bc} ±0.11	02.27 ^a ±0.16
G	05.01 ^{bc} ±0.25	7.73 ^{ab} ±0.07	03.79 ^b ±0.14	1.02 ^c ±0.12	1.64 ^d ±0.02	1.72 ^a ±0.27	0.08 ^a ±0.00	0.69 ^a ±0.06	1.68 ^c ±0.34	02.39 ^a ±0.19
H	05.09 ^{bc} ±0.20	7.97 ^{cd} ±0.11	05.20 ^c ±0.15	0.97 ^c ±0.13	1.18 ^c ±0.04	2.35 ^a ±0.17	0.20 ^a ±0.00	0.73 ^a ±0.22	1.34 ^{bc} ±0.13	03.71 ^b ±0.33

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type. Les valeurs de la même colonne suivies par des lettres différents sont statistiquement différentes (P>0.05).

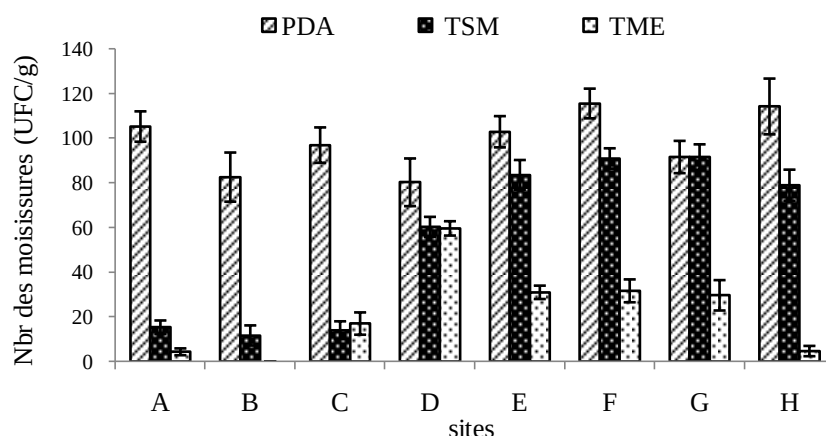


Figure 7: Nombre de colonies de moisissures énumérées sur les trois milieux gélosés. A: Chott Merouane, B: Chott Melghir, C: Chott Tighdidine, D: Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya

Dans le cas des bactéries, *Bacillus* est le genre dominant dans tous les sites de la région des Ziban. Les actinomycètes qui sont distingués macroscopiquement des colonies appartenant aux *Bacillus* et *Pseudomonas* par leur aspect filamenteux sont apparus beaucoup plus dans chott Merouane et Melghir, où *Streptomyces* est le genre dominant.

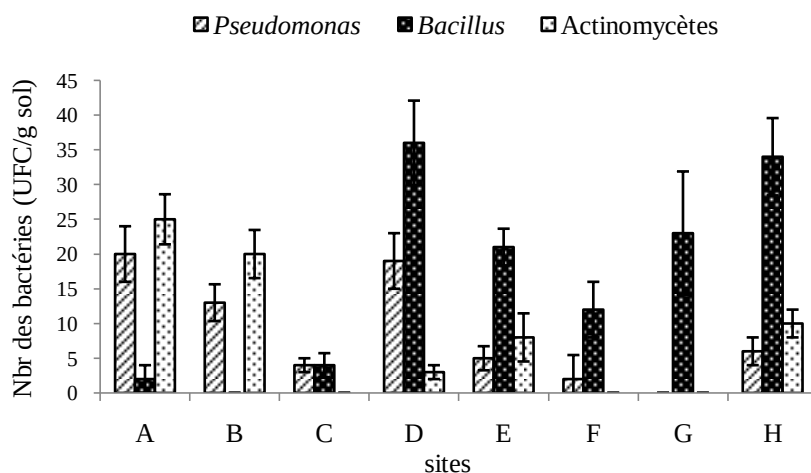


Figure 8: Nombre des colonies bactériennes isolées de chaque site. A: Chott Merouane, B: Chott Melghir, C: Chott Tighdidine, D: Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya

II.3.3. Distribution et abondance relative des moisissures

L'identification préliminaire des isolats apparus a permis de les grouper selon leurs genres correspondant. Après la détermination du genre, les isolats obtenus ont été rangés en six groupes dominants (Figure 9), dont la majorité des souches isolées de chaque site sont des mycètes mélanisés. Ces dernières se caractérisent par des spores et de mycélium sombres. Il s'agit des espèces appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Curvularia*, *Phialophora*, *Aureobasidium* et *Stachybotrys*. Le genre *Aspergillus* représente également un groupe dominant dans tous les sites suivi par le genre *Penicillium* ou la classe des Zygomycètes. Les formes imparfaites des Ascomycètes « Deutéromycètes » et qui ne correspondent pas aux mycètes mélanisées, ni aux *Aspergillus* et *Penicillium* représentent le troisième groupe dominant à Doucen et Loutaya et le deuxième groupe à El-Hadjeb. Par contre, les Ascomycètes ne représentent qu'un groupe mineur dans tous les sites (Les caractéristiques morphologiques de chaque classe des champignons sont présentées dans l'annexe 03). En effet, après l'identification préliminaire et à l'intérieur du genre, on a trouvé des espèces qui ont des caractères spécifiques de second rang par rapport à ceux du genre. Chaque espèce de moisissure est caractérisée non seulement par sa couleur, son apparence et son mode de reproduction, mais aussi par ses exigences spécifiques d'ordre physiologique. Suite à la caractérisation morphologique et physiologique qui a permis de classer les isolats en espèce, ils sont groupés par ordre d'importance numérique et par la suite l'abondance relative de chacune d'elles est calculée, le tableau 3 présente plus de détail que la figure 9 en terme de diversité. Non seulement *Aspergillus* et *Penicillium* sont des groupes dominants, mais aussi ils sont les plus diversifiés dans tous les sites.

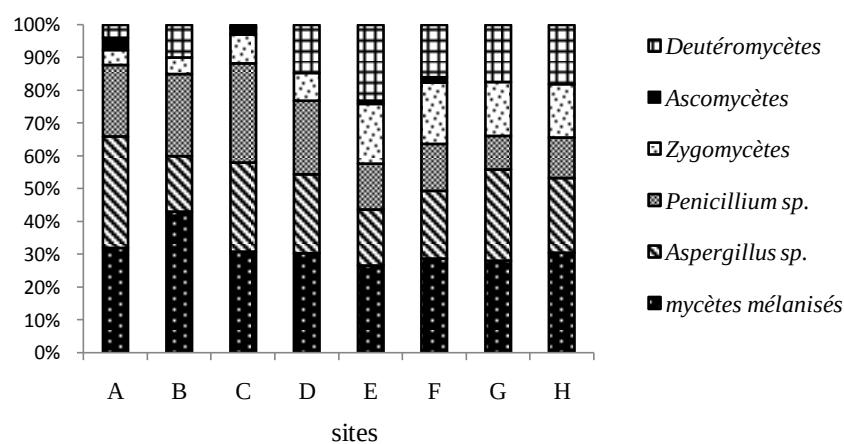


Figure 9: Pourcentage des groupes dominants des moisissures isolées de chaque site. A: Chott Merouane, B: Chott Melghir, C: Chott Tighdidine, D: Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya

Tableau 3: Abondance relative (%) des moisissures isolées de chaque site pendant 2010-2013

Champignon	sites							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Zygomycètes								
<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	1.47	-	3.98	-	0.92
<i>Mucor</i> sp.1	2.56	3.00	-	1.96	3.49	2.39	-	-
<i>Mucor</i> sp.2	-	-	5.88	-	1.75	-	3.75	3.24
<i>Rhizopus</i> sp.1	-	2.00	2.94	4.90	6.99	7.97	-	6.01
<i>Rhizopus</i> sp.2	1.92	-	-	-	6.11	-	12.67	7.87
Ascomycètes								
<i>Chaetomium</i> sp.	1.28	-	1.47	-	0.87	1.59	-	-
<i>Pseudallescheria</i> sp.	2.56	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eurotium</i> sp.10	-	-	-	1.47	3.06	1.19	2.34	1.38
<i>Eurotium</i> sp.11	-	2.00	-	2.45	3.93	-	0.46	2.31
<i>Talaromyces</i> sp.7	-	-	-	2.94	2.62	3.58	-	-
Anamorphe d'Ascomycètes								
<i>Acremonium</i> sp.	1.92	-	0.73	-	0.87	3.98	-	4.62
<i>Alternaria</i> sp.1	1.92	9.00	6.62	3.92	3.06	8.37	5.63	2.77
<i>Alternaria</i> sp.2	5.77	-	-	4.90	2.62	2.39	6.57	10.64
<i>Aspergillus</i> sp.1	9.61	2.00	5.15	3.43	2.18	2.79	-	0.92
<i>Aspergillus</i> sp.2	3.85	2.00	0.73	1.96	0.87	1.99	3.75	4.16
<i>Aspergillus</i> sp.3	-	5.00	2.20	2.45	3.49	3.19	-	2.31
<i>Aspergillus</i> sp.4	5.77	9.00	2.20	3.92	2.18	4.38	8.45	5.09
<i>Aspergillus</i> sp.5	2.56	-	1.47	-	-	2.39	5.16	-
<i>Aspergillus</i> sp.6	6.41	2.00	0.73	2.94	1.31	2.39	3.28	-
<i>Aspergillus</i> sp.7	-	-	8.09	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.8	3.85	3.00	2.94	1.96	-	1.19	4.22	3.70
<i>Aspergillus</i> sp.9	1.92	-	3.68	3.43	-	1.19	-	2.77
<i>Aureobasidium</i> sp.	2.56	2.00	2.94	4.90	0.87	-	0.93	-
<i>Cladosporium</i> sp.1	9.61	9.00	2.94	3.92	-	2.39	0.93	-
<i>Cladosporium</i> sp.2	-	7.00	3.68	-	3.06	2.79	-	4.16
<i>Cladosporium</i> sp.3	-	-	6.62	-	-	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	0.64	2.00	-	6.37	-	3.98	4.69	3.70
<i>Fusarium</i> sp.1*	-	-	-	5.88	1.31	2.39	10.79	-
<i>Fusarium</i> sp.2*	-	-	-	-	-	4.78	-	2.77
<i>Geotrichum</i> sp.	-	-	-	-	1.75	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	8.00	-	-	5.24	-	1.40	2.31
<i>Penicillium</i> sp.1	7.69	4.00	10.29	4.90	5.68	3.19	-	2.31
<i>Penicillium</i> sp.2	2.56	2.00	3.67	4.41	-	3.58	6.10	4.16
<i>Penicillium</i> sp.3	1.92	7.00	3.68	4.41	3.93	-	-	2.31
<i>Penicillium</i> sp.4	3.85	2.00	3.68	-	3.06	2.79	4.22	4.16
<i>Penicillium</i> sp.5	5.77	-	2.94	-	-	1.99	-	3.24
<i>Penicillium</i> sp.6	-	2.00	5.88	5.88	7.86	3.58	-	-
<i>Phialophora</i> sp.	1.92	6.00	5.15	-	4.37	7.97	-	-
<i>Phoma</i> sp.1	5.13	-	0.73	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.2	-	3.00	-	6.37	-	0.79	-	4.62
<i>Sclerotium</i> sp.	-	2.00	-	2.45	-	3.98	-	-
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1.92	-	-	5.88	3.93	-	2.81	1.38
<i>Stachybotrys</i> sp.	4.49	5.00	2.20	-	12.66	-	9.38	4.62
<i>Trichoderma</i> sp.1	-	-	0.73	0.49	0.44	0.39	1.4	1.38
<i>Trichoderma</i> sp.2	-	-	-	-	0.44	-	0.46	-
<i>Trichoderma</i> sp.3	-	-	-	-	-	0.39	0.46	-
Nombre total des isolats	156	100	136	204	229	251	213	216

A: Chott Merouane, B: Chott Melghir, C: Chott Tighdidine, D: Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya. *: isolés des échantillons du sol différents de ceux à partir de quels sont isolés les *Trichoderma* sp.

II.3.4. Caractérisation physiologique

Un nombre de 60 à 89 isolats dans chaque site a été examiné pour la caractérisation physiologique. Deux grandes catégories de champignons filamenteux ont été identifiés dans les trois chotts sur la base de la définition des champignons halotolérants et halophiles. La majorité des isolats examinés dans tous les sites ont présenté leur aptitude à se développer dans l'intervalle de 0-2.5M de NaCl, ce qui a permis de les classer comme des halotolérants (Figure 10A). Les halophiles n'ont pas pu croître en absence de NaCl, il s'agit beaucoup plus des isolats correspondant aux genres *Alternaria* et *Cladosporium*. Cette catégorie des champignons est largement apparue dans les chotts que les sites de la région des Ziban (Biskra). En parallèle, trois catégories de champignon ont été identifiées dans chaque site en fonction de leur température optimale et limite de croissance (Figure 10B). Les isolats thermophiles ont présenté un développement minimum à une température égale ou supérieure à 20 °C et une température maximale de croissance à 50 °C ou 55°C. Les isolats examinés dans la présente étude et qui sont classés comme des thermotolérants ont un intervalle thermique de croissance allant de 15 à 55 °C, dont la plupart de ces isolats ont une croissance optimale à 35 et 40 °C, ils ont un faible taux de croissance à 15 et 50 °C. Les isolats thermophiles examinés dans cette étude ont le même intervalle thermique pour leur croissance optimale que les thermotolérants, bien qu'ils n'aient pas montré une croissance à 15°C. Les mésophiles sont les isolats qui ont une température optimale de croissance entre 20 et 45 °C, ils représentent une catégorie majeure dans les sites de la région des Ziban.

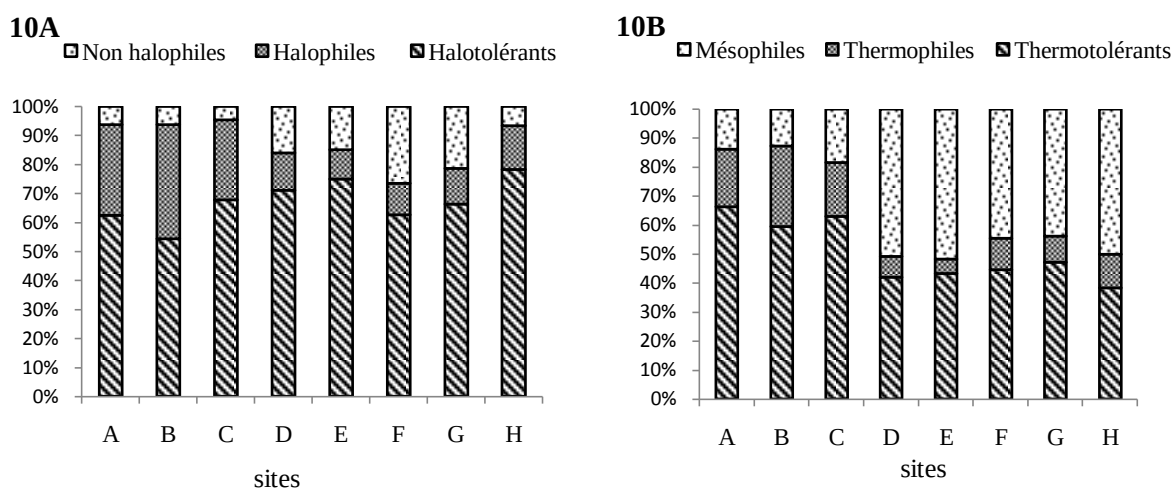


Figure 10: Fluctuation en pourcentage des moisissures selon la température et la salinité. 10A : test de salinité, 10B : test de température. A : Chott Merouane, B : Chott Melghir, C : Chott Tighdidine, D : Ain Ben Naoui, E : El-Hadjeb, F : Foughala, G :

II.3.5. Corrélation entre la densité des moisissures et les paramètres édaphiques

Les résultats de la corrélation entre la densité de la population des moisissures en unité formant colonie par gramme du sol (UFC/g) et les paramètres édaphiques des mêmes échantillons du sol sont résumés dans le tableau 4. Ces résultats montrent que la densité de la population dans la plupart des sites n'est pas corrélée avec la teneur en calcium. Une corrélation positive est notée entre la densité de la population, le carbone organique et l'azote total dans tous les sites, elle est significative à chott Melghir et Foughala pour le carbone et l'azote, significative que pour le carbone dans chott Merouane et que pour l'azote à Loutaya. Une corrélation non significative positive ou négative est notée entre la densité de la population, le pH et l'humidité. La densité de la population est corrélée négativement avec le sodium et le chlore, dont la signification statistique diffère d'un site à un autre. Une corrélation non significative est notée également entre la densité de la population des moisissures et le potassium, elle est négative à Ain Ben Naoui et positive à chott Melghir et Tighdidine. Une corrélation positive est marquée avec la teneur de magnésium dans la plupart des sites de la région des Ziban et chott Tighdidine, cependant elle est négative à chott Merouane et Melghir.

Tableau 4: La corrélation entre la densité de la population des moisissures et les paramètres édaphiques calculée par le coefficient de corrélation de Pearson

Site	H (%)	pH	CE (ms/cm)	C (%)	N (%)	Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	Cl (mg/g)
A	-0.547	0.359	-0.798	0.879*	0.776	-0.891*	-0.472	-0.683	0.330	-0.817*
B	-0.365	0.471	-0.690	0.863*	0.894*	-0.902*	0.605	-0.788	0.225	-0.891*
C	0.610	-0.352	-0.814*	0.810	0.741	-0.452	0.781	0.906*	-0.067	-0.913*
D	0.534	0.004	0.574	0.728	0.824	-0.602	-0.839	0.665	-0.724	-0.334
E	0.146	-0.340	0.311	0.636	0.875	-0.925*	-0.470	0.036	0.062	0.231
F	-0.568	-0.033	0.427	0.883*	0.949*	-0.863	-0.218	0.899*	-0.237	-0.866
G	0.739	-0.247	0.631	0.726	0.754	-0.280	0.025	0.904*	0.605	-0.805
H	-0.376	0.585	-0.578	0.851	0.901*	-0.041	0.438	0.946*	-0.655	0.462

H (%): pourcentage d'humidité, **: la corrélation est significative à 0.01, *: la corrélation est significative à 0.05.

A : Chott Merouane, B : Chott Melghir, C : Chott Tighdidine, D : Ain Ben Naoui, E: El-Hadjeb, F: Foughala, G: Doucen, H: Loutaya

II.3.6. Influence des différents facteurs sur la répartition des *Trichoderma* spp.

Cette étude a été effectuée par analyse canonique des correspondances (ACC). Les résultats du test de permutation ont permis de montrer que le p -value calculé (0.041) est inférieur au niveau de signification au seuil de $\alpha=0.05$, donc on a rejeté l'hypothèse nulle H_0 et on a retenu l'hypothèse alternative H_a , dont le risque de rejeter l'hypothèse nulle H_0 est inférieur à 4.10 %. Autrement, cela signifie que les données sites/groupe microbien sont liées linéairement aux données sites/paramètres édaphiques avec niveau de signification de 5%. De plus, il serait intéressant de déterminer si cela est le cas pour toutes les variables, ou si certaines sont plus performantes que d'autres. La représentation graphique de l'analyse canonique des correspondances (Figure 11) permet de visualiser simultanément les objets (dans notre cas les groupes microbiens qui représentent les facteurs biotiques), les sites, et les variables (les analyses du sol qui représentent les facteurs abiotiques). On peut voir sur ce graphique que pour les *Trichoderma*, les Ascomycètes et les levures, les effectifs élevés sont associés à un taux de matière organique élevé et une faible salinité, une faible teneur de sodium et de chlore. Les Deutéromycètes semblent plus sensibles à la variation de la matière organique. Les *Pseudomonas* semblent préférer une teneur de magnésium élevée, alors que les Actinomycètes semblent préférer des teneurs de salinité, de sodium et de chlore élevées. En parallèle, le graphique montre clairement que la présence des *Trichoderma* est éloignée de la présence des *Pseudomonas* et les Actinomycètes.

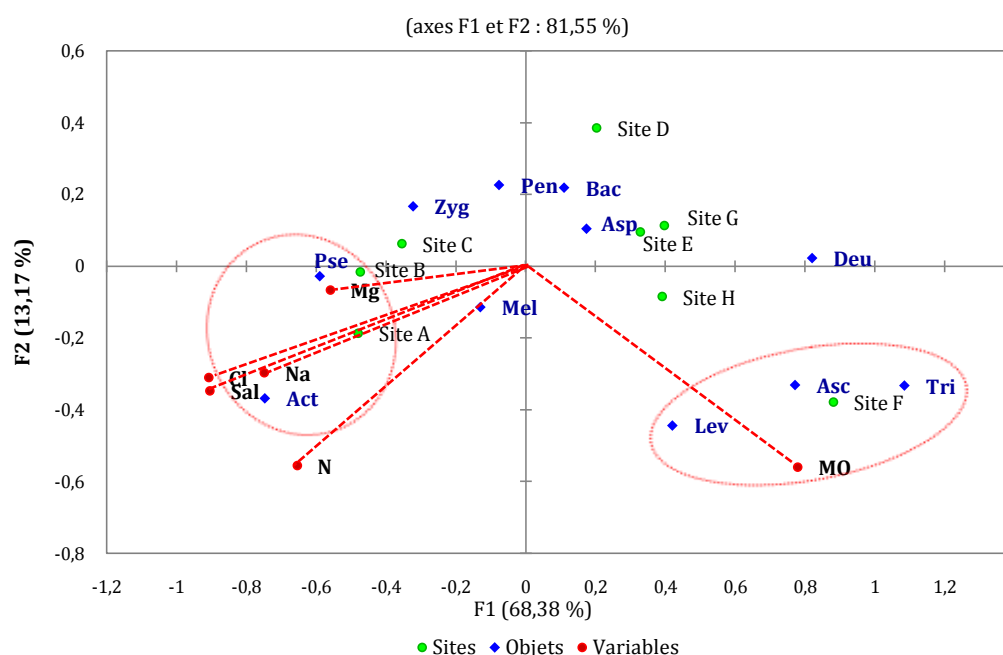


Figure 11 : Représentation graphique de l'analyse canonique des correspondances (ACC). Le groupe microbien est présenté par les trois premières lettres de sa nomination.

II.4. Discussion

Il est intéressant de noter que l'ensemble des échantillons examinés représentent des milieux particuliers par la présence très réduite de végétation notée lors des échantillonnages au cours des années d'étude (2010 jusqu'à 2013). Cela justifie le taux faible de carbone organique dans tous les sites avec un maximum de 2.08 % caractérisant le site de Foughala (Région des Ziban). Par ailleurs, et selon les normes établies par Calvet et Villemain (1986), l'analyse édaphique a révélé que les sols des trois chotts sont très pauvres en azote total, avec des valeurs égales ou inférieures à 0.5 ‰, par contre les sols des sites de la région des Ziban montrent une forte variabilité en azote totale, variant entre pauvre à Ain Bennaoui et El-Hadjeb, moyennement pauvre à Loutaya et riche dans le cas de Foughala et Doucen. Selon Lee et Hwang (2002), nos résultats présentent une forte humidité dans les sites chott Merouane et Melghir avec une faible humidité dans les autres sites avec des valeurs comprises entre 2 et 9 %. Les échantillons du sol de chotts Merouane et Melghir ont été pris des points près d'eau, où chott Melghir a été en plein eau pendant toutes les visites, à l'inverse de chott Tighdidine qui a été sec le long des années d'étude. Le sol de tous les sites est alcalin, dont les valeurs de pH sont supérieures à 7.5 et inférieures à 8.7, le sol de chott Tighdidine est considéré selon Aubert (1978) comme fortement alcalin avec un pH supérieur à 8.5. En se basant sur les résultats de la conductivité électrique et d'après l'échelle de salure d'Aubert (1978), les sols de trois chotts sont classés comme extrêmement salés, et ceux de la région des Ziban (Biskra) varient entre salés (Ain Ben Naoui) à très salés pour les autres sites. L'analyse édaphique a montré que les sols de tous les sites se caractérisent par une prédominance des ions de sodium et de chlorure, suivis par des ions de magnésium et de potassium dans chott Merouane et Melghir. Bien que la teneur en calcium est supérieure à celle du potassium et du magnésium dans les autres sites. L'analyse physicochimique du sol nous a permis de constater d'une part que les sites de la région d'Oued Righ représentent un milieu extrême par rapport à la salinité. D'une autre part, chaque site (des deux régions d'étude) est considéré comme milieu particulier par rapport au moins à l'un des paramètres suivants ; la salinité élevée, l'alcalinité du sol, la teneur faible en humidité et/ou en matière organique. Ces conditions présentent l'avantage d'isoler des extrémophiles qui vivent très souvent dans des milieux présentant plusieurs conditions physicochimiques extrêmes (Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Oren, 2006). Bien qu'il soit bien connu auparavant que les déserts sont extrêmement sec, présentent des environnements chauds ou froids, exposés aux extrêmes des radiations d'UV, ils présentent aussi un milieu où l'eau est toujours un facteur limitant pour la vie.

La première étape dans le processus d'étude des relations entre les microorganismes et leur environnement est généralement la détermination des densités microbiennes. Pour l'isolement, la quantification et les études qui s'intéressent aux fonctions des microorganismes du sol, la méthode de culture sur milieux nutritifs est considérée plus efficace que les méthodes non cultivables. Cependant, seulement un pourcentage de 1% de la microflore du sol est cultivable, même par utilisation d'un ensemble des milieux de culture. Par conséquent, les résultats de la densité de la population microbienne sont directement influencés par le choix des milieux de culture. Pour cela, la sélection d'un milieu adéquat est une étape très importante (Vargas Gil et *al.*, 2009). Dans notre étude, trois milieux gélosés ont été utilisés pour l'isolement des champignons filamenteux, le PDA comme milieu non sélectif utilisé fréquemment pour l'isolement des champignons, le TSM et TME comme des milieux sélectifs pour *Trichoderma* (Papavizas et *al.* 1982). En effet, une grande difficulté est rencontrée à l'énumération des colonies des champignons filamenteux ainsi qu'à la discrimination de certaines espèces du même genre. Le nombre le plus élevé des souches de *Trichoderma* est isolé sur milieu PDA. Malgré que le milieu PDA est un milieu non sélectif et il convient au développement d'une gamme importante d'espèces fongiques, plusieurs études ont rapporté son utilité pour l'isolement des espèces de *Trichoderma* (Vargas Gil et *al.*, 2009; Zachow et *al.*, 2009). Cependant, d'autres travaux ont décrit l'isolement de ces espèces sur des milieux sélectifs tels que TSM d'Elad et *al.* (1981), RB-S-F de McFadden et Sutton (1975) et le milieu de Davet (1979) in Davet et Rouxel (1997). Papavizas et *al.* (1982) ont rapporté l'efficacité des TSM et TME pour l'isolement des *Trichoderma* spp. à partir des sols qui ne contiennent pas des moisissures envahissantes comme *Rhizopus* et *Mucor*. Dans la même référence, ces deux milieux sont décrits comme semi-sélectif. Vargas Gil et *al.* (2009) qui ont trouvé des résultats similaires que nos résultats sur les mêmes milieux gélosés ont justifié leurs résultats par la richesse du milieu PDA possédant une base nutritionnelle complète. C'est probablement la raison pour laquelle le développement des colonies est plus rapide comparé à d'autres milieux. En effet, comme le PDA est un milieu complexe, il est difficile de déterminer le nutriment favorisant le développement de ces espèces.

La plupart des souches isolées dans la présente étude sont des deutéromycètes appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium* ou sont des mycètes mélanisées, appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Curvularia*, *Phialophora*, *Aureobasidium* et *Stachybotrys*. Selon Demirel et *al.* (2005) ; Banakar et *al.* (2012) la prédominance des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* est expliquée par leur grande vitesse de production des spores

et leur aptitude de dispersion ainsi que leur résistance aux conditions extrêmes. Les mycètes mélanisés qui représentent le groupe dominant dans la plupart des sites, ont été rapporté également par plusieurs références dans des environnements similaires (Cantrell et *al.*, 2006 ; Abdel-Hafez, 1982 ; Abdullallah et *al.*, 1986 ; Grishkan et *al.*, 2003). Les mycètes mélanisés peuvent tolérer la déshydratation et le rayonnement solaire mieux que les autres champignons, dont les cellules sont dépourvues de mélanine. A des concentrations élevées en sel, les granules de mélanine se condensent pour protéger les cellules fongiques. Des modifications dans la composition des acides gras formant les phospholipides membranaires représentent également une stratégie d'adaptation aux environnements hypersalins. A forte concentration en sel, la membrane cellulaire doit être plus fluide pour surmonter la pression osmotique élevée, cette fluidité est obtenue en augmentant le rapport phospholipide acides gras insaturé/stérol (Cantrell et *al.*, 2006). En revanche, les lipides membranaires des thermophiles contiennent des chaînes droites en acides gras saturés plus que les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des hautes températures nécessaires au bon fonctionnement de la membrane cellulaire (Satyanarayana et *al.*, 2005).

Les Ascomycètes n'ont représenté qu'un groupe mineur dans tous les sites. Cantrell et *al.* (2006) ont rapporté que la plupart des champignons qui peuvent être trouvés dans des environnements extrêmes appartiennent au stade imparfait des Ascomycota (Deutéromycètes). Ce résultat peut être aussi justifié par la méthode d'isolement, dont la méthode de suspension dilution a certaines limitations telles que la surestimation des espèces sporulantes et la sous-estimation des espèces rares, qui ne peuvent croître sur des milieux de culture et/ou qui sont moins sporulantes. Malgré ces limites, cette méthode reste une technique très utile dans la caractérisation initiale des communautés fongiques en écologie. Elle est particulièrement applicable aux sols désertiques, où les champignons peuvent exister pendant une longue période en stade dormant (spores) (Grishkan et Nevo, 2010).

Les propriétés du sol sont l'un des facteurs écologiques les plus importants, qui régissent la distribution des champignons du sol (Kanaujia et Singh, 1977 ; Saravanakumar et Kaviyarasan, 2010). Nos échantillons de sol ont été analysés, d'une part pour déterminer la qualité du sol et d'autre part pour étudier l'influence de ses caractères physico-chimiques sur la distribution des champignons, en calculant le coefficient de corrélation. Une corrélation positive entre le carbone organique, l'azote total et le nombre d'isolats de moisissures est montrée dans tous les sites, ce qui reflète le rôle majeur de ces éléments dans la détermination de l'abondance relative des espèces fongiques. Les études de Banakar et *al.* (2012) ; Joshi,

(1983) ; Wu et *al.* (2006) ont confirmé que la matière organique a une grande influence sur l'abondance fongique. La teneur d'azote totale a été rapporté également comme un facteur déterminant la distribution et l'occurrence des champignons du sol dans un sens positif (Joshi et Chauhan, 1982 ; Aguilera et *al.*, 1999). En effet, une teneur importante en azote total augmente la sporulation, la production de pigments anthraquinoniques antifongiques et le taux de croissance des hyphes (Aguilera et *al.*, 1999).

Une corrélation non significative entre la densité de la population des champignons filamenteux et l'humidité est trouvée dans tous les sites, elle est négative avec des teneurs supérieures à 6 %. L'importance d'humidité pour les champignons a été rapportée par des nombreux travaux, bien que dans certains cas, une corrélation évidente n'a pas été observée (Joshi et Chauhan, 1982).

Le pH du sol dans tous les sites est légèrement alcalin à alcalin, ce résultat est similaire à des études qui ont rapporté que les sols des régions arides et semi-arides sont généralement alcalins (Abduallah et *al.*, 1986 ; Grishkan et Nevo, 2010). Malgré que de nombreuses études ont décrit l'influence du pH sur la répartition des champignons du sol (Joshi et Chauhan, 1982 ; Okoth et Odhiambo, 2009), aucune corrélation n'a été détectée dans la présente étude à l'exception de Loutaya. En effet, il est connu que les champignons préfèrent généralement les milieux légèrement acide, bien qu'ils soient capables de se développer dans une large gamme de pH (Botton et *al.*, 1990; Grantina et *al.*, 2011), les sols acides facilitent la croissance des champignons et la biodégradation (Banakar et *al.*, 2012).

Une corrélation positive non significative est observée entre la conductivité électrique et la densité de la population des champignons filamenteux à Ain Ben Naoui et Doucen, la corrélation est négative à une valeur supérieure à 5 ms/cm. La salinité et l'humidité du sol jouent un rôle important dans la détermination de la variation de la conductivité électrique (Aubert, 1978). Aucune corrélation n'a été notée entre le nombre des isolats des champignons filamenteux et la teneur du calcium dans la plupart des sites, ces résultats concordent avec ceux obtenus par Joshi et Chauhan (1982). Une corrélation positive significative a été marquée entre le magnésium et la densité de la population fongique à chott Tighdidine et la majorité des sites de Biskra, où la teneur de magnésium varie entre 0.70 et 0.96 mg/g du sol. La corrélation est négative et non significative statiquement à chott Merouane et Melghir qui se caractérisent par les teneurs les plus élevées en magnésium (Carlile et *al.*, 2001).

Le magnésium et le calcium sont des éléments nécessaires à la croissance fongique en très faible concentration, dans notre étude, la concentration de ces deux éléments est plus élevée par rapport aux exigences des champignons. Malgré les effets stimulants de potassium aux champignons telluriques qu'ont été confirmés par de nombreux mycologues (Banakar et *al.*, 2012), aucune corrélation n'a été notée entre la concentration de cet élément et la densité de la population des champignons filamenteux dans la plupart des sites. Une corrélation positive mais non significative a été notée qu'à chott Melghir et Tighdidine, présentant les valeurs les plus élevées de potassium, par contre une corrélation négative et non significative statiquement est marquée à Ain Ben Naoui où on a noté une valeur faible de potassium. La présente étude a révélé une corrélation négative entre le chlore, le sodium et la densité de la population des moisissures dans la plupart des sites, elle est statiquement significative à chott Merouane et Melghir pour ces deux éléments. Cela peut être justifié par la teneur du chlore et du sodium dépassant les besoins des champignons filamenteux. Le sodium est un élément nécessaire pour les champignons marins et ceux existant dans les lacs, où il peut être conventionnellement fournis sous forme de chlorure (Carlile et *al.*, 2001).

Comme il est bien connu que les paramètres environnementaux soient des facteurs abiotiques (caractéristique du sol) ou des facteurs biotiques (flore microbienne du sol) peuvent avoir une influence sur l'efficacité de la lutte biologique, nous avons essayé de préciser l'influence de ces facteurs sur la distribution et la diversité de *Trichoderma* spp. afin de mettre en place une stratégie de lutte adaptée. La compréhension de l'impact des facteurs physicochimiques du sol sur la distribution et la diversité des *Trichoderma* spp. est étudiée par l'analyse canonique des correspondances utilisée fréquemment en écologie (Zachow et *al.*, 2009 ; Bruelheide et Udelhoven, 2005 ; Liu et *al.*, 2008). Cette analyse a montré comment ces facteurs abiotiques ont une influence sur la distribution des microorganismes, ainsi que sur l'interaction de ces facteurs avec les différents groupes microbiens qui peuvent fournir des informations sur les mécanismes de biocontrôle et leur régulation. L'analyse canonique des correspondances a montré clairement que la présence de *Trichoderma* est liée aux Ascomycètes et aux levures en présence des teneurs importantes en matière organique, en parallèle l'occurrence de *Trichoderma* spp. est éloignée de l'occurrence des *Pseudomonas* et des actinomycètes qui semblent préférer des teneurs élevées en salinité. Bae et Knudsen (2000) ont rapporté que la présence de certaines populations microbiennes telle que *Pseudomonas* et avec leur production des métabolites toxiques peut limiter l'activité antagoniste des *Trichoderma* spp. Une étude réalisée par Bourguignon (2008) a montré que la

présence de *Trichoderma* dans la rhizosphère d'oignons est corrélée négativement à la présence de *Penicillium*. Dans la même référence, l'auteur a signalé que la compétition entre *Penicillium* et les isolats de *Trichoderma* est très limitée malgré la capacité des espèces de *Penicillium* à produire une large gamme de substances inhibitrices. La présente étude a révélé le regroupement des *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bacillus* et les zygomycètes loin de groupe de *Trichoderma* spp. Dans notre étude, la matière organique est montrée comme facteur gérant la présence de *Trichoderma*. En effet, le site de Foughala a montré le niveau de matière organique le plus élevé, est apparu le plus diversifié avec le nombre le plus élevé des isolats de *Trichoderma*. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Rahman et *al.* (2011) qui ont prouvé que la matière organique est parmi les facteurs édaphiques les plus influençant sur la diversité des espèces de *Trichoderma*. Dans le même contexte et selon les mêmes auteurs, le pH, l'humidité, l'azote, le magnésium et le fer ont un rôle important dans la distribution et la diversité de ces espèces. Bien qu'il soit important de noter que dans la présente étude, le nombre faible des souches de *Trichoderma* isolées correspondant à chaque espèce est apparu insuffisant pour bien comprendre et dévoiler l'effet des facteurs édaphiques sur la diversité de cette population. A l'inverse de la matière organique, la densité de la population de *Trichoderma* est corrélée négativement à la salinité. Des études ont rapporté que l'une des limites les plus cruciales de l'utilisation des souches de *Trichoderma* comme biofongicides est leur faible osmotolérance (Luard et Griffin, 1981 ; Magan, 1988; Abdel-Latif et Haggag, 2006). En revanche, Woo et *al.* (2005) ont signalé que les espèces de *Trichoderma* possèdent une haute capacité de reproduction, une habilité à survivre dans des conditions très défavorables, une efficacité dans l'utilisation des nutriments, et une capacité de modifier la rhizosphère. Cela peut justifier l'apparition de *Trichoderma* dans chott Tighdidine, où la souche isolée est identifiée ultérieurement comme *T. harzianum* (l'identification des isolats de *Trichoderma* spp. est étudiée dans le chapitre III. Les espèces de *T. viride* et *T. polysporum* sont limitées aux régions où les températures sont basses, d'autre part, *T. harzianum* est le plus souvent trouvé dans les régions à climat chaud (Danielson et Devey, 1973). Cependant, les espèces de *T. hamatum* et *T. koningii* sont à large distribution, isolées des zones de différentes conditions climatiques (Roiger et *al.*, 1991).

II.5. Conclusion

Les résultats obtenus ont permis d'identifier quelques différences parmi les trois chotts examinées et aussi à l'intérieur des sites de la région des Ziban, dont les deux régions représentent deux biotopes différents. La présente étude a montré que les champignons du sol

possèdent des stratégies d'adaptations remarquables aux conditions climatiques et édaphiques extrêmes caractérisant les régions désertiques et salines, ces stratégies sont traduites par la dominance des mycètes mélanisés qui possèdent des mécanismes d'adaptations structurelles et chimiques, leur permettant de survivre et de croître dans ces milieux. La présence des mycètes mélanisés dominants dans les sites des deux régions n'a pas une influence sur la répartition de la population de *Trichoderma* spp. dont leur présence est liée à des teneurs importantes de matière organique et plus sensible à la salinité. La densité de la population de *Trichoderma* est apparue plus limitée par la présence de *Pseudomonas* et des actinomycètes que les autres groupes microbiens.

CHAPITRE III

IDENTIFICATION DES ISOLATS DE

TRICHODERMA spp.

III.1. Introduction

Les espèces du genre *Trichoderma* sont largement utilisées dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. La caractérisation exacte et l'identification des souches au niveau d'espèce est la première étape pour l'utilisation de leur potentiel dans des applications spécifiques (Lieckfeldt et *al.*, 1999). Le genre *Trichoderma* avait été introduit à l'origine par Persoon en 1794, mais la taxonomie et l'identification de ses espèces est restée incertaine jusqu'à ces dernières années.

L'identification préliminaire des espèces de *Trichoderma* sur la base des caractéristiques morphologiques peut être effectuée en utilisant les descriptions décrites par Bisset (1984, 1991a, b et 1992) ; Gams et Bissett (1998) in Kubicek et Harman (1998). Bisset (1991a) avait décrit 5 sections et dans chaque section, il a rangé les espèces possédant les caractéristiques des conidiophores et des phialides les plus semblables. La majorité des espèces de *Trichoderma* sont morphologiquement très similaires et difficiles à distinguer et elles ont été confondues pendant de nombreuses années à l'espèce *T. viride*. Les tests biochimiques, dont le principe repose généralement sur le suivi de l'assimilation du carbone, de l'activité mitochondriale et la capacité d'assimilation d'azote peuvent servir à la distinction entre les espèces appartenant au genre *Trichoderma* (Danielson and Davey, 1973 ; Jackson, et *al.*, 1991). Par ailleurs, des caractéristiques clés examinées sur milieux sélectifs prenant en considération le taux de croissance à différentes températures, la présence de pigment et d'odeur distinctive peuvent compléter l'étude morphologique et même constituer une alternative à une identification moléculaire (Chaverri et *al.*, 2003).

Les méthodes moléculaires basées sur l'analyse des séquences ITS1 et ITS2 se sont montrées très utiles dans l'identification des isolats de *Trichoderma*. Néanmoins pour certains taxa, la comparaison des séquences ITS est restée insuffisante. Dans ce contexte, plusieurs travaux ont montré l'utilité de la combinaison des analyses moléculaires des séquences ITS et les caractères phénotypiques pour une identification exacte des isolats appartenant à ce genre.

Dans cette étude nous avons procédé dans un premier temps à une analyse des caractères morphologiques basés sur la morphologie du conidiophore, des phialides, des conidies et des chlamydospores, à une caractérisation culturale portée en particulier sur la détermination de la vitesse de croissance aux différentes températures, aux différents pH et diverses concentrations de NaCl, la présence de pigmentation et d'odeur distinctive, ainsi qu'au suivi du profil métabolique du carbone et de l'azote. Afin de lever l'ambiguïté sur l'identification

basée sur les critères morphophysologiques et biochimiques de nos isolats, nous avons réalisé un séquençage du gène de la région ITS.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Identification morphologique

Les isolats de *Trichoderma* spp. ont été soumis à une identification morphologique approfondie. Des explants des cultures âgées de 7 jours sont inoculés sur des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu PDA et incubés à 28 °C à l'obscurité. Les caractéristiques culturales de chaque isolat sont prises en considération ; l'aspect et la couleur de la colonie et de son revers, la vitesse de croissance, présence de pigmentation et d'odeur. Des lames sont préparées au lactophénol bleu coton à partir des cultures âgées de 4 à 7 jours ainsi que de 14 jours et observées au grossissement $\times 40$. L'observation vise à déterminer la morphologie des conidiophores, des phialides et des conidies ainsi que la taille des phialides et des conidies. Les mensurations ont été effectuées par microscope optique étalonné sur 40 conidies ou phialide/isolat. L'identification de ces isolats a été effectuée sur la base des descriptions décrites par Rifai (1969) ; Bissett (1984, 1991a, b et 1992) et Lieckfeldt et *al.* (1999).

III.2.2. Caractérisation physiologique

Dans le but d'évaluer l'influence de la température, du pH et de la salinité sur le développement mycélien des isolats de *Trichoderma* spp. et de leurs sécrétions, le milieu PDA est inoculé par un disque de 5 mm de diamètre de la culture à examiner âgée de 5 à 7 jours. Les cultures sont incubées à différentes températures : 15, 20, 25, 28, 30, 33, 35, 38 et 40 °C. Le développement des isolats a été estimé par des mesures quotidiennes de leur croissance radiale pendant 7 jours. Selon la même méthode décrite pour le test de température, le test de salinité avait été effectué, en préparant des milieux PDA à diverses concentrations de NaCl allant de 0 à 2 M avec un intervalle de 0.5 M. Pour le test de pH, le milieu PDA est tamponné à différents pH de 3.5 jusqu'à 8 avec un intervalle de 0.5, par l'addition des solutions K_2HPO_4/KH_2PO_4 (0.1 M).

III.2.3. Caractérisation biochimique

Cette étude consiste à suivre l'assimilation du carbone et de l'azote fournis par des sources différentes additionnées au milieu Czapek Liquide Modifié (CLM). Les sources de carbon

testées sont : le glucose, le saccharose, l'amidon, l'acide gallique et le sorbitol. Les sept sources d'azotes testées sont ; le sulfate d'ammonium, l'urée, les peptones, le nitrate de calcium, de potassium et d'ammonium ainsi que le phosphate d'ammonium. L'acide aminé glycine est également testé, il sert comme une source de carbone et d'azote. La biomasse humide et sèche sont estimées après 7 jours.

III.2.4. Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp.

III.2.4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique a été extrait selon la technique décrite par Liu et *al.* (2000) légèrement modifiée, à partir d'une culture jeune de 4 jours de *Trichoderma* spp. Le mycélium de la souche fongique est raclé ensuite transféré dans un tube Eppendorf contenant 500 µl du tampon de lyse. Le mycélium a été écrasé dans le tampon. Le mélange est ensuite incubé pendant 1 heure à la température ambiante, puis additionné de 150 µl de tampon d'acétate de potassium (pH 4.8). Après homogénéisation du mélange et centrifugation à 12000 rpm à 4°C pendant 8 min, un volume égal d'isopropanol froid a été ajouté. Après une deuxième homogénéisation et centrifugation à 12000 rpm à 4 °C pendant 5 minutes, l'ADN a été précipité avec 300 µl d'éthanol froid et récolté par centrifugation à 12000 rpm à 4 °C pendant 5 min. Cette opération a été effectuée en double. L'éthanol a été séché pendant 1 heure dans un *speed vac*. L'ADN a été remis en suspension par l'ajout de 40 µl d'eau ultra pure puis incubé à 37°C pendant 30 min. La concentration d'ADN est estimée en mesurant l'absorbance à 260 nm. Les échantillons d'ADN sont stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

III.2.4.2. L'amplification par PCR

Les régions espaceurs internes transcrits du gène codant pour l'ARN ribosomale ont été amplifiés en utilisant deux amorces ITS1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') décrites par White et *al.* (1990). La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant: 1 µl d'ADN (50 ng/µl), 2.5 µl de tampon de PCR 10X, 1.5µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTP (10 mM), 0.5 µl de chaque amorce (100 mM), 18.7 µl de MQ H₂O et 0.2 µl (2 U/µl) de l'ADN polymérase. Le programme d'amplifications est composé de trois étapes de 35 cycles ; une dénaturation à 94°C, suivie d'une étape d'hybridation à 58 °C et une étape d'élongation à 72 °C dans un thermocycleur Biometra. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans le TBE 1 X et colorés avec 5 µl de bromure d'éthidium à 10 mg/ml. Les amplifias sont visualisés sous

lumière UV et photographiés. Les séquences obtenues sont analysées par comparaison avec des séquences existantes dans les bases de données (GenBank) à l'aide du programme Blast du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), où seules les séquences ayant un pourcentage d'identité supérieur à 98 % ont été retenues.

III.3. Résultats

III.3.1. Identification morphologique des isolats de *Trichoderma* spp.

Quatorze isolats de *Trichoderma* spp. ont été isolés du sol de 5 sites des Ziban et de sol environnant, chott Tighdidine. L'appartenance de ces isolats au genre *Trichoderma* est basée sur les caractères morphologiques établis par Rifai (1969); Bisset (1984, 1991a, b et 1992); Gams et Bissett (1998).

En se basant sur les critères microscopiques en particulier des conidiophores, nos isolats sont divisés en deux grands groupes, dont le premier groupe renferme les isolats T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9, T10, T11, T12 et T14. Ces isolats ont présenté des conidiophores avec des branches relativement courtes, en structure pyramidale fortement ramifiés, ce qui correspond à la description de la section *Pachybasium*. Le deuxième groupe (G2) renferme les isolats T6 et T13 dont les conidiophores se présentent avec des branches longues moins ramifiés comme ceux de la section *Trichoderma*. Selon les mensurations des phialides et des conidies, le premier groupe lui-même est divisé en deux groupes, le premier sous groupe (1-S-G1) renferme les isolats T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T12 et T14. Tandis que les isolats T3 et T7 correspondent au deuxième sous groupe (2-S-G1).

Macroscopiquement les isolats des deux groupes sont doués d'un mycélium à croissance rapide. Les colonies sont initialement de couleur blanche et deviennent verdâtres pour la plupart à partir du 4^{ème} jour, elles ont une couleur variant entre le vert à vert-jaune pour les isolats du 1S-G-1, le vert-olivâtre et le vert-bleu pour les isolats du 2-S-G-1 et le G2 respectivement. Les colonies présentent un aspect en cercles concentriques pour la majorité des isolats en particulier T3, T6, T7 et T13. Les cultures âgées du 1-S-G-1 présentent des feutrages épais de spores qui se superposent d'une manière homogène sur toute la colonie. Cependant les isolats T3 et T7 se caractérisent par la condensation des spores en particulier dans la marge de la boîte de Pétri et au niveau de l'explant mycélien et le reste de la colonie apparait translucide. Les colonies de T6 et T13 se caractérisent souvent par la condensation des spores d'une manière concentrique. Une pigmentation jaune à jaune-orangé est observée

chez les isolats du 1-S-G-1 sauf l'isolat T2. Les isolats T3, T6, T7 et T13 ne sécrètent aucun pigment à différentes températures, leurs colonies apparaissent avec des revers incolores.

Les observations microscopiques présentées dans les figures 12, 13 et 14 ont montré que les isolats possèdent des hyphes hyalins et septés, les conidiophores du premier groupe sont ramifiés avec des branches relativement courtes comme celles de la section de *Pachybasium*. Les conidiophores sont organisés selon une structure pyramidale et se terminent par des phialides lagéniformes gonflées au milieu et en paires ou en groupes, mais le plus souvent verticillées en 3 ou plus. Cependant les isolats T6 et T13 ont des conidiophores avec des branches étroites et flexueuses comparables à la section *Trichoderma*, ils présentent des conidiophores en structure pyramidale moins ramifiés que ceux observés chez le premier groupe, portant des phialides lagéniformes solitaires, en paire ou verticillées en 3 (le plus souvent) et tendent à être sigmoïdes. Les isolats de ce groupe se distinguent également par la forme de leurs conidies. Les conidies du premier groupe sont globuleuses à subglobuleuse et lisses, bien que les isolats T6 et T13 possèdent des conidies subglobuleuses verruqueuses observées au grossissement $\times 100$. C'est les mensurations des conidies et des phialides qui ont permis de diviser le premier groupe en deux sous groupes, dont la taille des phialides du 2-S-G-1 est inférieure que celle du 1-S-G-1 (Tableau 05). A l'inverse des conidies qui sont plus grandes.

Tableau 05: Intervalle de dimensions des phialides et des conidies des isolats de *Trichoderma* spp.

Isolats	Phialides	Conidies	
	Mesure (µm)	Forme	Mesure (µm)
1^{er} S-Groupe 1			
T1	3.8-6.5×2.5-3.5	globuleuse	2.2-3.0×2.2-3.0
T2	4.8-7.3×3.0-3.8	globuleuse	2.4-3.3×2.4-3.3
T4	5.5-7.3×2.5-3.6	globuleuse	2.4-3.3×2.4-3.3
T5	5.5-7.5×2.8-3.5	globuleuse	2.4-3.3×2.4-3.3
T8	5.8-7.5×3.2-3.8	subglobuleuse	2.6-3.9×2.5-3.5
T9	5.5-7.5×2.5-3.6	subglobuleuse	2.8-3.3×2.3-2.6
T10	5.5-7.3×2.8-3.5	globuleuse	2.8-3.9×2.8-3.9
T11	5.5-7.3×2.8-3.5	subglobuleuse	2.6-3.2×2.3-2.6
T12	5.8-7.5×3.2-3.8	subglobuleuse	2.6-3.2×2.3-2.6
T14	5.5-7.3×2.8-3.5	subglobuleuse	2.6-3.2×2.3-2.6
2^{eme} S-Groupe 1			
T3	3.5-5.5×2.5-3.5	subglobuleuse	3.2-4.5×2.0-2.5
T7	3.5-5.5×2.5-3.5	subglobuleuse	3.2-4.5×2.0-2.5
Groupe 2			
T6	8.5-12.5×2.5-3.0	subglobuleuse	2.5-3.9×2.5-3.5
T13	8.5-12.5×2.5-3.0	subglobuleuse	2.5-3.9×2.5-3.5

Dimension : longueur × largeur

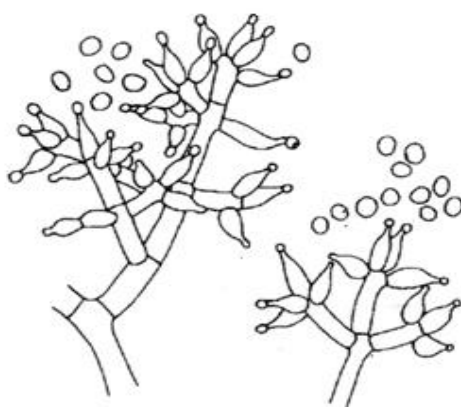
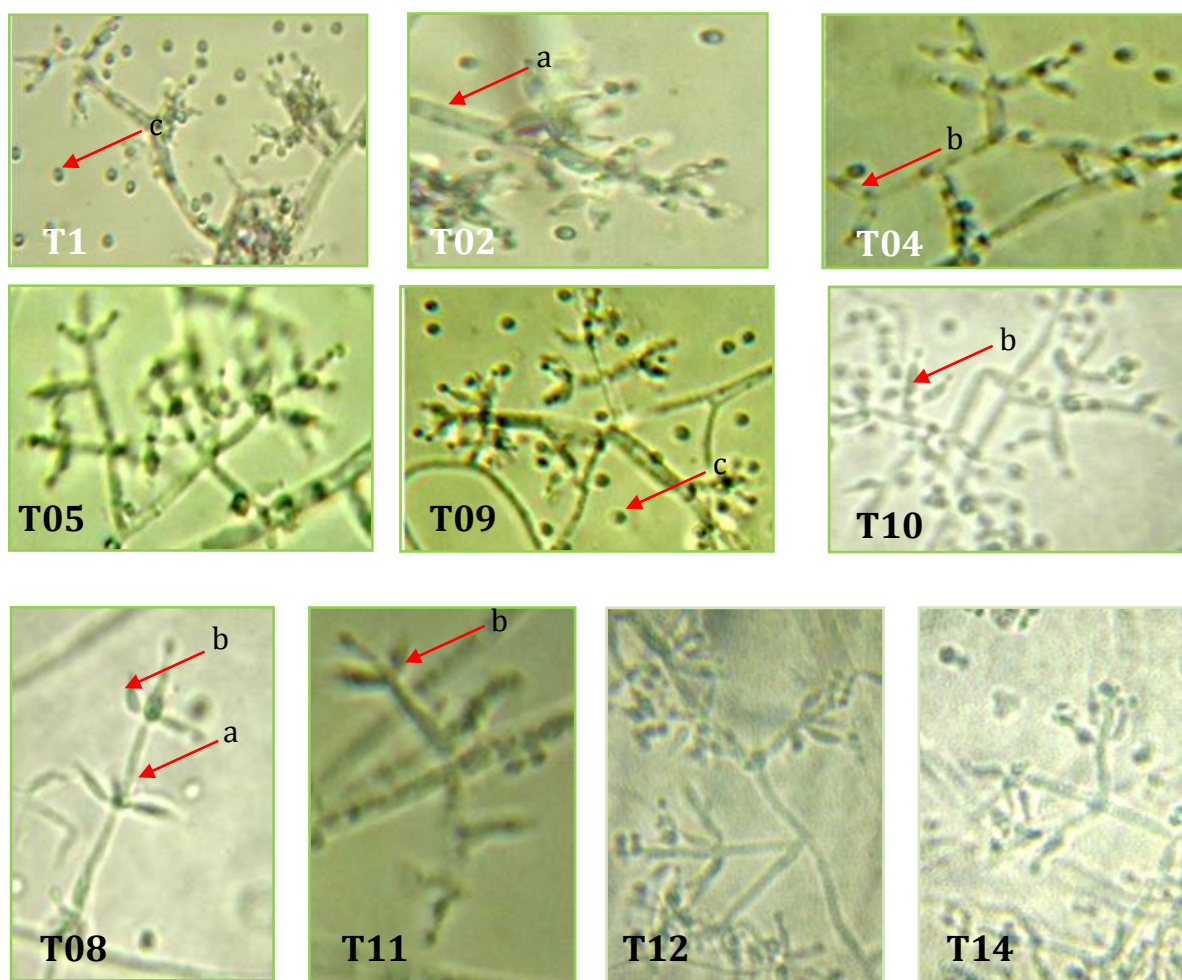


Figure 12: Morphologie des isolats du premier sous groupe 1 avec un Schéma représentant l'aspect microscopique de *T. harzianum* Rifai (Kubicek et Harman, 1998).
a : conidiophore, b : phialides, c : conidies.

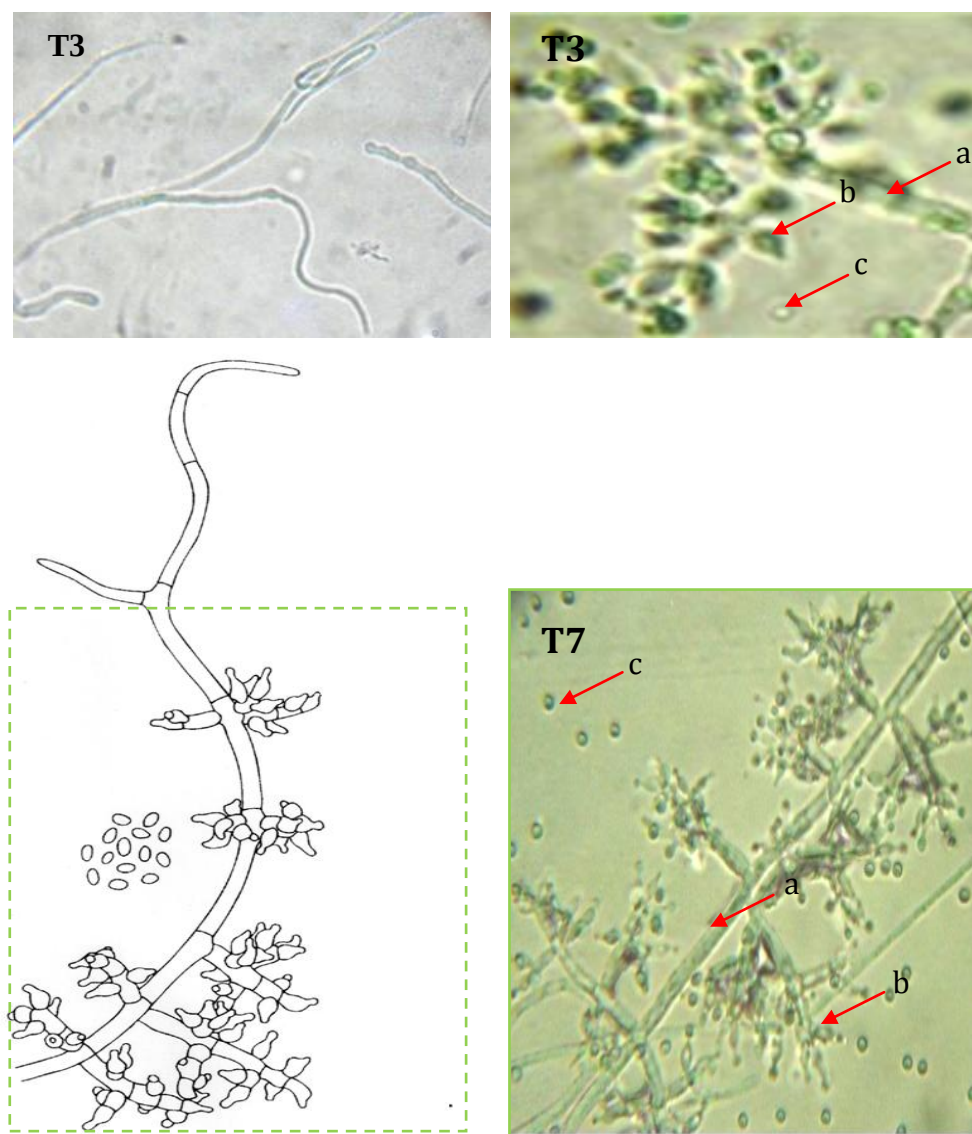


Figure 13 : Morphologie des isolats du deuxième sous groupe 1 avec un schéma représentant l'aspect microscopique de *T. hamatum* (Bon.) Bain (Kubicek et Harman, 1998). a : conidiophore, b : phialide, c : conidie.

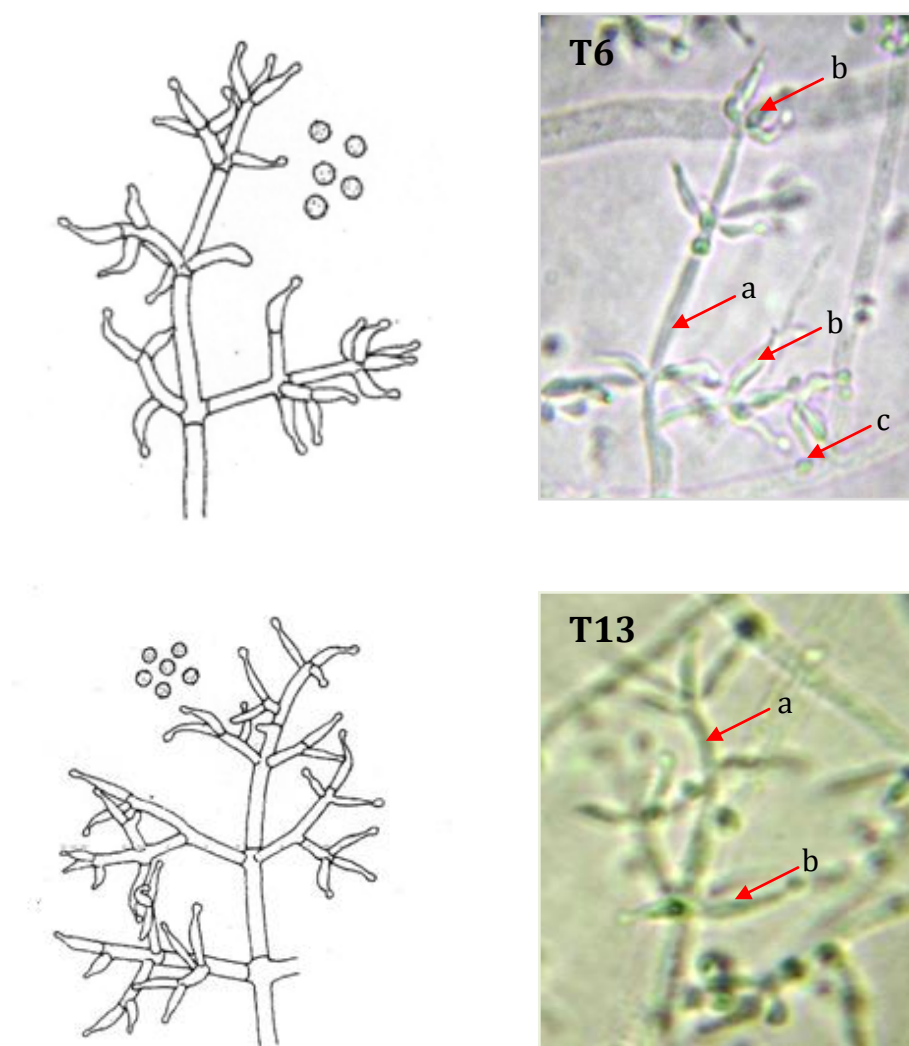


Figure 14: Morphologie des isolats du deuxième groupe avec un schéma représentant l'aspect microscopique de *T. viride* Pers. ex S. F. Gray Okuda et *al.* (1982). a: conidiophore, b : phialide, c : conidie.

III.3.2. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats de *Trichoderma* spp.

Les résultats des caractérisations physiologiques et biochimiques sont présentés dans le tableau 06. La majorité des isolats de *Trichoderma* spp. sont classés comme halotolérants, ces isolats peuvent se développer sur PDA à 0.2 M en NaCl avec une bonne croissance en absence du sel et une diminution du taux de croissance avec des concentrations croissantes de chlorure de sodium. Les isolats T3, T7 et T14 sont considérés comme non halophiles, ils n'ont pas poussé dans les milieux contenant plus de 0.2 M (Cantrell et *al.* 2006; Gal-Hemed et *al.*, 2011). A une concentration égale ou supérieure à 0.85 M en NaCl, on a observé l'absence de germination des spores chez tous les isolats de *Trichoderma* spp., dont la croissance radiale du mycélium diffère d'un isolat à un autre selon la concentration du sel. Tous les isolats de *Trichoderma* spp. examinés n'ont pas pu pousser à plus de 1.5 M de NaCl, même T10 isolé du sol environnant chott Tighdidine.

Selon le test de température, tous les isolats de *Trichoderma* spp. sont classés comme mésophiles. Ils ont une température de croissance optimale entre 25 et 30 °C avec une croissance limitée pour T3 et T7 à 35 °C et l'absence de croissance pour tous les isolats à 40°C. Les isolats T4, T5, T8, T12 et T14 ont bien poussé également à 35 °C. Tous les isolats qui ont poussé à 35 °C ont formé des cercles concentriques mêmes ceux qui n'ont pas apparus avec cette forme à ≤ 28 °C. Ces colonies apparaissent plus compactes, plates (absence de mycélium aérien) et moins cotonneuses.

La plupart des isolats ont une croissance optimale à un pH de 4.5 à 6.5 avec des valeurs de pH situées entre 4 et 5 pour un optimum de sporulation. Les isolats du premier groupe ont une tendance à bien pousser même au pH légèrement alcalin (7.5). Les isolats T2 et T13 ont un pH optimum à 4.0.

En général, toutes les sources de carbones et d'azote testées sont assimilées par tous les isolats de *Trichoderma* spp. avec une variation considérable de leur biomasse selon le groupe dès les premiers jours de leur inoculation. Pour le glucose, on a noté la biomasse la plus élevée chez les isolats du G2 (T6 et T13) suivie par ceux appartenant au 1-S-G-1 (T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T12 et T14) puis le 2-S-G-1 (T3 et T7). Les isolats T6 et T13 ont assimilé faiblement le saccharose contrairement aux isolats du premier groupe. Une assimilation variable est notée à l'intérieur du premier groupe par rapport à la glycine. Les isolats du premier groupe ont présenté également un optimum de croissance sur les milieux à

base d'amidon et de sorbitol à l'inverse des isolats du deuxième groupe qui ont pu croître d'une manière optimale en présence d'acide gallique. Tous les isolats de *Trichoderma* spp. examinés ont présenté leur optimale de croissance avec le nitrate d'ammonium, bien que le maximum de sporulation est observée en présence de peptone. Le sulfate d'ammonium est apparu plus assimilable par les isolats du premier groupe que ceux du deuxième groupe.

Tableau 6 : Caractérisations physiologique et biochimique des isolats de *Trichoderma* spp.

Isolat	Tm	T°	pH°	[NaCl]°	Source de carbone						Source d'azote						
					G	S	Gl	Am	AG	So	SA	U	Pe	NC	NA	NP	PA
T1	40	25	6.5	0.2	++	+	++	+	±	++	++	++	++	+	++	+	+
T2	40	25	4.0	0	++	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+
T3	38	30	6.0	0	++	++	±	+	++	±	+	+	++	+	++	++	++
T4	40	30	6.5	0	+	++	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++	±
T5	40	30	6.0	0	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	+	+
T6	38	30	5.5	0	++	±	±	±	++	+	±	±	++	±	++	++	++
T7	38	30	6.5	0	+	++	±	++	++	+	++	±	++	+	+	++	++
T8	40	30	6.0	0	++	++	++	+	±	++	++	++	+	±	+	++	+
T9	38	25	5.5	0	++	++	+	+	+	++	++	++	+	++	+	+	+
T10	40	30	6.0	0	+	±	+	±	+	+	++	+	++	+	++	+	+
T11	40	25	6.5	0	+	++	+	+	±	++	++	++	±	±	+	+	+
T12	40	30	6.0	0	++	++	++	+	+	++	±	±	+	+	++	+	+
T13	38	30	4.0	0	++	±	+	±	++	+	±	±	++	±	++	+	++
T14	40	25-30	6.5	0	+	++	±	++	±	+	++	++	+	±	+	++	+

T° : température optimale, Tm : température maximale, [NaCl] ° : concentration molaire optimale de NaCl, G : glucose, S : saccharose, Gl : glycine, Am : amidon, AG : acide gallique, So: sorbitol, SA : sulfate d'ammonium, U : urée, Pe : peptone, NC : nitrate de calcium, NA : Nitrate d'ammonium, NP : nitrate de potassium, PA : phosphate d'ammonium, ++ : bonne assimilation, + : moyennement assimilable, ± faiblement assimilable, - : non assimilable

III.3.3. Identification moléculaire

L'identification phénotypique est suivie par une identification moléculaire par l'amplification de la région ITS en utilisant deux amorces ITS1 et ITS4. Les amplifiats de PCR ont été soumis à une migration sur gel d'agarose-TBE et photographiés sous lumière UV (Figure 15). La séquence de la région ITS d'ADNr de 14 isolats de *Trichoderma* spp. a été comparée à celles d'autres champignons de la base de données GenBank. La séquence nucléotidique de la région ITS de 14 isolats est présentée dans l'annexe 4. Les analyses de similitude (BLAST) effectuées sont présentées dans le Tableau 07, qui résume les résultats de l'identification phénotypique et moléculaire.

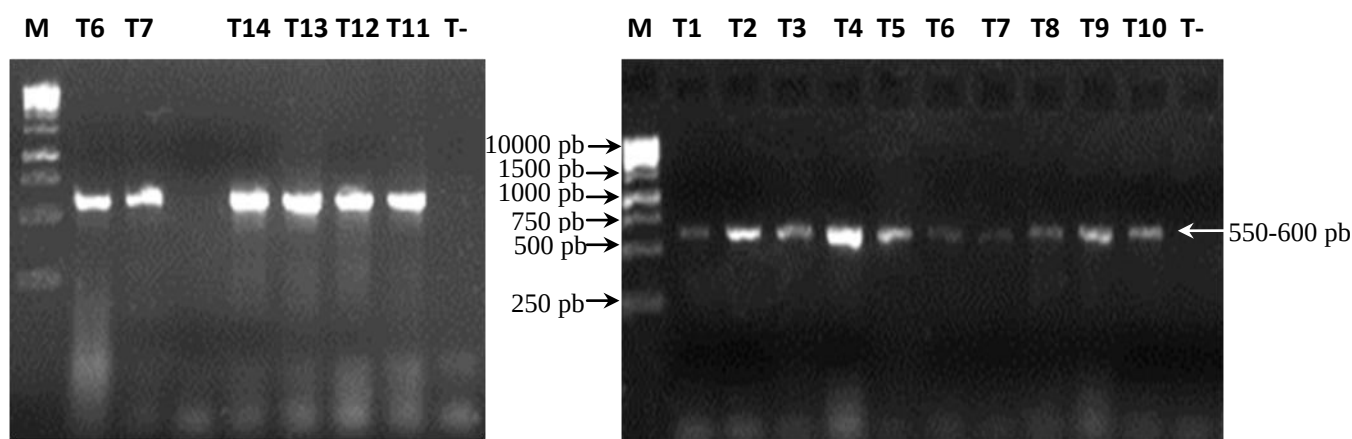


Figure 15 : Gel d'électrophorèse des amplifiats de PCR (M : marqueur de poids moléculaire, T⁻ : témoin négatif, T1 jusqu'à T14 sont des isolats de *Trichoderma* spp).

Tableau 07: Résultats de l'identification des isolats de *Trichoderma* spp.

Code	Identification par ITS*	Identification physiologique	Identification morphologique	Identification finale
T1	<i>Hypocrea lixii</i> HE649454 (100%)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma inhamatum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma inhamatum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T2	<i>Hypocrea lixii</i> JX173847 (99%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T3	<i>Hypocrea</i> sp. KF746146 (99%) <i>Trichoderma harzianum</i> KC478545 (99%)	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
T4	<i>Trichoderma harzianum</i> KC576690 (98%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T5	<i>Hypocrea lixii</i> HE649454 (99%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T6	<i>Hypocrea</i> sp. JQ388261 (99%)	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma viride</i>
T7	<i>Hypocrea</i> sp. KF746146 (99%) <i>Trichoderma harzianum</i> KC576741 (99%)	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
T8	<i>Trichoderma harzianum</i> KC576701 (100%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T9	<i>Hypocrea lixii</i> JX069199 (99%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T10	<i>Trichoderma harzianum</i> KC576701 (99%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma aureoviride</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T11	<i>Hypocrea lixii</i> HE649454 (99%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T12	<i>Hypocrea</i> sp. KF746146 (100%) <i>Trichoderma harzianum</i> / KC478545 (100%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
T13	<i>Hypocrea</i> sp. FJ434202 (99%)	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma viride</i>
T14	<i>Hypocrea lixii</i> JX069199 (100%)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>

* l'identification par ITS est présentée avec le numéro d'accension et le pourcentage de similitude entre parenthèse.

III.4. Discussion

Dans un premier temps l'identification des isolats de *Trichoderma* spp. a été basée sur des critères morphologiques afin de regrouper les différents isolats selon leur section et par la suite de déterminer ou au moins de les rapprocher à leurs espèces. Selon la description générale des conidiophores et ses ramifications décrites dans la littérature taxonomique de Gams et Bissett (1998), on a pu classer nos isolats en deux groupes, dont le premier groupe comprend les isolats T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9, T10, T11, T12 et T14 possédant des conidiophores avec des branches courtes et fortement ramifiés comparables à ceux de la section *Pachybasium*. Les isolats T6 et T13 présentent des conidiophores avec des branches longues comme ceux de la section *Trichoderma*.

Chez le premier groupe et sur le plan de la morphologie des conidiophores, des phialides et des conidies, les isolats T2, T4, T5, T9, T10, T11, T12 et T14 peuvent correspondre à l'espèce *T. harzianum*. Bien que les isolats T1 et T8 peuvent être confondu avec *T. inhamatum* et *T. atroviride* respectivement par rapport à la mensuration et la forme de leurs conidies, sachant que *T. atroviride* appartient à la section *Trichoderma*. L'isolat T8 ressemble à *T. atroviride* non seulement par les dimensions de ses conidies décrites par Bissett (1991b), mais également par le groupage de ses phialides en paire ou en triplet. A l'inverse des autres isolats de ce groupe (section *Pachybasium*), dont leurs phialides sont souvent verticillées en 3. Néanmoins, l'isolat T8 présente des dimensions des phialides similaires aux isolats T2, T4, T5, T9, T10, T11, T12 et T14 comparés à celles décrites par Gams and Meyer (1998) pour *T. harzianum*. L'isolat T1 présente des conidies globuleuses avec des tailles inférieures légèrement à celles de *T. harzianum* décrite par les mêmes auteurs. Le même isolat présente des phialides avec des tailles légèrement inférieures aux isolats du même groupe mais elles restent toujours dans l'intervalle de taille de *T. harzianum*. L'isolat T10 qui appartient au premier groupe correspondant à la section *Pachybasium* présente une morphologie proche à l'espèce *T. aureoviride* et *T. atroviride* par les mensurations de ses conidies qui se chevauchent avec ces deux espèces mentionnées dans la littérature taxonomique de Lieckfeldt et *al.* (2001) et Bissett (1991a, b) respectivement. Cependant il se distingue de ces deux espèces par la forme de ses conidies et beaucoup plus par les mensurations de ses phialides. D'une autre part, il a été rapporté par Kubicek et Harman, (1998) que les espèces de *T. aureoviride* se caractérisent par leur capacité à sécréter un produit cristallin jaune intense considéré comme un caractère clé de *T. aureoviride*. Ce produit cristallin qui peut rendre le revers des colonies jaune et les autres parties apparaissent incolores est un antifongique de la famille des anthraquinones. Au

cours de notre étude, l'isolat T10 n'a sécrété qu'un pigment jaune-orangé caractéristique des espèces de *T. harzianum* avec un revers crème à brun homogène. Cela a permis d'éloigner encore la possibilité que l'isolat T10 appartienne à l'espèce *T. aureoviride*.

Les isolats T3 et T7 ont des conidies et des phialides subglobuleuses de taille différente des autres isolats et sont similaires à celle de *T. hamatum* rapporté par Bissett (1991b). Ces deux isolats se distinguent également des autres isolats du 1-S-G1 par le nombre des phialides verticillées variant entre 3 à 5 sur le conidiophore formant une structure pyramidale plus intense et par leur aspect cultural, ce qui ressemble à *T. hamatum* selon le même auteur.

Dans le deuxième groupe (Section *Trichoderma*) et selon les observations microscopiques, les deux isolats T6 et T13 sont liés à l'espèce *Trichoderma viride*. En effet, il a été rapporté souvent que les espèces de *T. viride* peuvent être confondues avec *T. koningii* et *T. atroviride* formant un complexe similaire même par rapport à leurs régions ITS. Nos isolats nommés comme *T. viride* sont différents de *T. koningii* par la morphologie des phialides et leur disposition et beaucoup plus par leurs conidies. Les phialides de *T. viride* selon Meyer and Plaskowitz (1989) sont disposées d'une manière solitaire, paire ou verticillée en 3, cette description est similaire à ce qui a été observée chez ces deux isolats. Cependant, les espèces de *T. koningii* présentent des phialides disposées en paires et souvent verticillées en 3 à 4 ressemblant à *T. harzianum*. *T. viride* est connu également par ses conidies subglobuleuses proches de *T. atroviride* mais verruqueuses, ce qui a été observé au grossissement $\times 100$. Les phialides des isolats T6 et T13 sont aussi différentes légèrement de *T. atroviride* décrites par Bissett (1992) qui a cité que les espèces de *T. atroviride* possèdent des phialides lagéniformes solitaires ou verticillées 2 à 4 et souvent courbées, alors que nos mensurations sont proches de celles décrites par Lieckfeldt *et al.* (1999) qui avait rapporté que *T. atroviride* possède des phialides avec une moyenne de longueur de 8.5 μm . En revanche, la comparaison de nos résultats de la morphologie et la mensuration des conidies nous ont permis de constater que la description des conidies de la même espèce diffère d'une référence à une autre. Malgré ça la morphologie des isolats T6 et T13 se rapprochent beaucoup plus de *T. viride* et *T. atroviride* que *T. koningii*. Sur le plan cultural les isolats T6 et T13 ont présenté des colonies de couleur vert-bleu ou vert-gris sur PDA caractéristiques des espèces de *T. koningii* et *T. viride* (Botton *et al.*, 1990) et ils n'ont présenté aucune odeur distinctive avec l'absence des chlamydospores. Dans l'étude de Lieckfeldt *et al.* (1999) sur les espèces *T. viride*, *T. atroviride* et *T. koningii*, les auteurs ont marqués l'odeur de noix de coco chez certaines souches de *T. viride*, chez toutes les souches de *T. atroviride* et aucune souche de *T. koningii*. L'odeur de noix de coco

est caractéristique de l'antibiotique volatil 6-pentyl- α -pyrone (Dodd et al., 2003 ; Schuster et Schmoll, 2010). Pour les chlamydospores et selon Lieckfeldt et al. (1999), les cultures âgées de *T. viride* n'ont pas présentées des chlamydospores à l'inverse des souches de *T. atroviride* présentant des chlamydospores intermédiaires après 7 jours. L'absence de chlamydospores chez les espèces de *T. viride* a été remarquée également par Kamala et al. (2015).

Sur le plan physiologique et par rapport au test de température, tous les isolats de *Trichoderma* spp. ont présenté une croissance mycélienne presque identique dans l'intervalle thermique de 20 à 30 °C avec une croissance relativement lente des isolats du 2-S-G-1 (T3 et T7) par rapport aux autres isolats à toutes les températures. En effet, la capacité des isolats à croître à 35 °C est considérée comme une clé d'identification de certaines espèces de *Trichoderma* (Samuels et al., 2006), où les espèces de *T. atroviride* se distinguent des espèces de *T. harzianum* par leur croissance limitée à cette température (Samuels et al. 1998). Le même comportement est observé chez *T. hamatum* par Chaverri et al. (2003). Dans notre étude, tous les isolats de *Trichoderma* spp. ont présenté leur aptitude à croître à 35 °C, sauf les isolats du 2-S-G-1 (T3 et T7). Ce résultat nous a permis d'éloigner la possibilité que l'isolat T8 soit *T. atroviride* et de corréliser encore les isolats T3 et T7 à l'espèce *T. hamatum*. Dans le même contexte la possibilité que l'isolat T10 soit *T. aureoviride* ou *T. atroviride* est éloignée selon son comportement différent à ce qui a été observé par Kubicek et Harman (1998) et Jaklitsch (2009) disant que les espèces de *T. aureoviride* possèdent une température optimale de 25 °C et une température maximale de 35 °C. En comparant nos résultats avec ce qui a été rapporté par Jaklitsch (2009) et par Samuels et al. (2006) concernant la température optimale et maximale de croissance des espèces de *T. harzianum* et *T. koningii* respectivement, les tests de température renforcent les résultats morphologiques obtenus pour les isolats du premier sous groupe et le deuxième groupe. Nos résultats sont proches également à ceux de Gams and Meyer (1998) qui ont rapporté que la température maximale de croissance des espèces de *T. harzianum* est de 35 et 36 °C. Les isolats du deuxième groupe, dont leur morphologie ressemble aux espèces de *T. viride* ont présenté un maximum de croissance à 25 et 30 °C avec une croissance limitée à 38 °C. Selon Lieckfeldt et al. (1998), les espèces de *T. koningii* ont une température maximale de croissance de 33 °C avec un optimum de croissance de 24 °C. Dans une autre étude, Lieckfeldt et al. (1999) ont distingué *T. koningii* et *T. atroviride* de *T. viride* par leur croissance faible à 30 °C avec leur inaptitude à croître à 35 °C. Nos résultats sont également comparables à une étude récente sur des espèces de *Trichoderma* isolées d'une région indienne réalisée par Kamala et al. (2015), qui ont trouvé que les espèces de *T.*

harzianum et *T. hamatum* ont une température optimale de 30 °C. Dans la même référence les auteurs ont trouvé que les espèces de *T. viride* présentent leur optimum de croissance dans l'intervalle thermique de 25 à 30 °C.

En dehors de la température, le pH est considéré aussi parmi les facteurs abiotiques les plus importants influençant la croissance mycélienne des agents antagonistes (Kredics et *al.*, 2004). En effet, les résultats obtenus de l'étude de pH n'ont pas fourni assez d'information pour la différenciation entre les espèces de *Trichoderma*, où la majorité des isolats ont présenté leur optimum de croissance à des valeurs de pH proches situées entre 4.0 et 6.5. Kamala et *al.* (2015) ont trouvé que les espèces de *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. atroviride* et de *T. viride* possédant tous des valeurs de pH optimal de 4. Nos résultats sont proches également à ceux de Kredics et *al.* (2004) qui ont montré que les espèces de *T. viride* ont un optimum de croissance à pH de 4. Cependant les deux auteurs ont trouvé des résultats contradictoires concernant *T. harzianum*, ceux de Kredics et *al.* (2004) ont montré que le pH optimum de leurs isolats de *T. harzianum* est de 4, alors que Kamala et *al.* (2015) ont montré que le pH optimum de cette espèce est entre 7 à 8. Ces derniers auteurs ont différencié *T. harzianum* de *T. inhamatum* par le pH optimum de ces dernières à 4. Par ailleurs, Hadar et *al.* (1984) ont montré que des isolats correspondants aux espèces de *T. harzianum* ont montré leur croissance optimale à un pH de 4.5.

Selon le pouvoir d'assimilation des différentes sources de carbone et d'azote, une corrélation relative entre le profil métabolique et le groupe d'espèce est mise en évidence. Les isolats de *Trichoderma* spp. correspondant au 1-S-G-1 (T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T12 et T14) ont présenté une assimilation remarquable de saccharose, d'amidon et de sorbitol à l'inverse des isolats du G2 (T6 et T13) qui ont un pouvoir d'assimilation important d'acide gallique, de glucose et de phosphate d'ammonium. Les isolats du 2-S-G-1 (T3 et T7) ont présenté un profil métabolique commun avec les deux groupes par rapport au saccharose et l'acide gallique. Le profil métabolique du 1-S-G-1 est proche au résultat rapporté par Nelson et *al.* (1988) sur le pouvoir d'assimilation des polysaccharides et des polyalcools par l'espèce de *T. harzianum*. Par ailleurs Okuda et *al.* (1982) ont montré que des souches de *Trichoderma viride* et *T. hamatum* ont la capacité d'assimiler l'acide gallique contrairement aux souches de *T. koningii*. En effet, des biomasses différentes entre les deux groupes sont obtenues en présence du sulfate d'ammonium. Khattabi et *al.* (2004) ont montré également que le sulfate d'ammonium est la meilleure source d'azote pour *T. harzianum* comparée au nitrate de potassium, d'acide glutamique et d'urée. En comparaison, les profils métaboliques des isolats

du premier groupe sont pratiquement similaires, leurs différences métaboliques sont équivoques, où seul la glycine et l'acide gallique ont permis la distinction entre les deux sous groupes. Monga (2001) a montré que *T. harzianum* a présenté le maximum de biomasse en présence de glycine comparée à *T. viride*, *T. koningii* et *T. virens*. Le même auteur a montré que *T. harzianum* et *T. viride* assimilent faiblement le saccharose. En comparant les profils métaboliques de T6 et T13 avec ceux de Jayaswal et al. (2003) par rapport aux souches correspondant à l'espèce de *T. viride*, on constate que nos résultats sont similaires par rapport à l'assimilation du phosphate d'ammonium, du nitrate de calcium, de l'urée et des peptones. Néanmoins, les deux isolats diffèrent clairement de *T. viride* par rapport au saccharose et même le sorbitol.

Le séquençage de la région ITS de 14 isolats de *Trichoderma* spp. a montré que les isolats T1, T8 et T14 ont présenté des séquences identiques (100% de similarité) avec des séquences de *Trichoderma harzianum* et son téléomorphe *Hypocrea lixii*. Les isolats T2, T4, T5, T9, T10 et T11 ont présenté des séquences ITS avec le pourcentage de similarité le plus élevé 99 % et 98 % avec des séquences de *T. harzianum* et son téléomorphe *H. lixii*. Bien que l'isolat T12 identifié également comme étant *T. harzianum* a présenté une séquence ITS identique avec deux séquences l'une (KC478545) correspondant à *T. harzianum* et l'autre (KF746146) correspondant au téléomorphe de *Trichoderma* sp. Les deux isolats T3 et T7 identifiés sur la base de leurs caractères phénotypiques comme des *T. hamatum* ont présenté des séquences avec un pourcentage de similarité de 99% avec une séquence (KF746146) correspondant au téléomorphe de *Trichoderma* sp. et deux séquences (KC478545 et KC576741) correspondants à *T. harzianum*. Les isolats T6 et T13 identifiés comme *T. viride* sont similaires avec un pourcentage de 99 % à deux séquences correspondants au téléomorphe de *Trichoderma* sp.

Grace au séquençage ITS1 et ITS2, l'isolat T1 est confirmé qu'il correspond à *T. harzianum*. Cet isolat qui se chevauche par la taille de ses conidies à *T. inhamatum* a présenté une séquence ITS similaire à 100 % à une séquence (HE649454) correspondant à *T. harzianum*. En effet, *T. inhamatum* est proche même par rapport à la séquence de la région ITS à *T. harzianum*, elles peuvent être distinguées par la différence de deux nucléotides dans la séquence ITS1 ribosomale (Howard, 2003).

Plusieurs références ont décrit que les espèces *Trichoderma viride*, *T. atroviride* et *T. koningii* appartenant à la section *Trichoderma* ont des séquences ITS très similaires. Selon Kindermann et al. (1998) les variations entre les séquences ITS de ces trois espèces est entre 0.3 et 2.0 % et peut être la raison pour la quelle *T. viride*, *T. atroviride* et *T. koningii* sont prises comme une seule espèce. Druzhinina et Kubicek (2005) ont rapporté également que le séquençage des séquences ITS ne permettent pas la distinction entre *T. viride*, *T. koningii* et *T. atroviride*. Il est important de noter que les trois espèces de la section *Trichoderma*, *T. viride*, *T. atroviride* et *T. koningii* présentant des variations ITS très limitées sont distinguables facilement par l'ornementation et la morphologie des conidies (Kindermann et al. 1998). Dans notre étude, les isolats T6 et T13 se distinguent clairement de *T. koningii* par la morphologie des conidies, la température optimale et maximale de croissance ainsi que par leurs profils métaboliques. Les mêmes isolats sont différents de l'espèce *T. atroviride* par la morphologie des conidies et la température optimale et maximale de croissance.

Au complexe *Trichoderma viride* se surajoute aussi *T. hamatum* et *T. asperellum* ainsi que leurs téléomorphes appropriés (Lübeck et al., 2004). Kindermann et al. (1998) ont également cité que *T. hamatum* est étroitement lié par leur ITS à la section *Trichoderma* qu'à la section *Pachybasium*. Par ailleurs, il a été rapporté récemment par Kubicek et al. (2011) que *T. hamatum* est phylogénétiquement étroitement lié à *T. atroviride*. Selon Druzhinina et Kubicek (2005), l'analyse des séquences d'une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation (EF-1 α) permet de distinguer les espèces appartenant au complexe *viride*. De ce fait l'analyse des séquences (EF-1 α) est considérée comme une approche complémentaire à l'identification par les ITS.

En considérant l'ensemble des caractères de similarité des séquences ITS par rapport aux isolats de références et des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous pouvons constater que :

Les isolats T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T12 et T14 appartiennent à l'espèce *T. harzianum*.

Les isolats T3 et T7 appartiennent à l'espèce *T. hamatum*.

Les isolats T6 et T13 appartiennent à l'espèce *T. viride*.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTAGONISTE

IN VITRO ET IN VIVO

IV.1. Introduction

Après la publication de Weindling en 1932 in Kubicek et Harman (1998) sur *Trichoderma lignorum* (identifiée plus tard comme *T. atroviride*), la recherche sur les propriétés antagonistes de *Trichoderma* spp. est progressée rapidement. Aujourd'hui, les espèces les plus importantes dans ce domaine sont *T. atroviride* (rapporté dans certains travaux comme *T. harzianum*), *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* et *T. reesei*. Bien que cette dernière a servi beaucoup plus comme un organisme modèle en biologie moléculaire (formation des souches recombinantes). *Trichoderma* spp. sont en mesure de contrôler les ascomycètes, les basidiomycètes, et les oomycètes, récemment, leur effet sur les nématodes a été également signalé (Schuster et Schmoll, 2010).

Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre les champignons phytopathogènes à l'aide de produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène, c'est pourquoi des tests de l'activité antagoniste doivent être réalisés *in vitro* entre les deux agents. D'une autre part, une des caractéristiques essentielles chez un agent de lutte biologique qui doit être pris en considération est son aptitude à survivre dans un milieu différent de son milieu d'origine et à coloniser les racines des plantes afin de les protéger contre les pathogènes (Nemec et *al.*, 1996)

L'objectif présenté et traité dans ce chapitre est l'étude *in vitro* et *in vivo* de l'aptitude antagoniste de quatorze isolats de *Trichoderma* à l'égard de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides* agents de la fusariose du blé. Cette étude comporte également la recherche d'une corrélation entre les deux types de tests afin de déterminer les isolats les plus performants.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Matériel fongique

IV.2.1.1. Agents antagonistes

Les isolats de *Trichoderma* utilisés dans cette étude sont isolés du sol saharien de la région de Biskra et du sol environnant du chott Tighdidine appartenant administrativement à la wilaya d'El-Oued. Le tableau 8 présente l'origine de chaque isolat et la date de son isolement.

Tableau 08: Origine des isolats de *Trichoderma* spp. et la date de leur isolement

isolat	Espèce	Origine	Année d'isolement
Thr.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ain Ben Naoui	2012
Thr.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Doucen	2012
Thm.3	<i>Trichoderma hamatum</i>	Foughala	2012
Thr.4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Foughala	2012
Thr.5	<i>Trichoderma harzianum</i>	Foughala	2012
Tv.6	<i>Trichoderma viride</i>	Foughala	2012
Thm.7	<i>Trichoderma hamatum</i>	El-Hadjeb	2012
Thr.8	<i>Trichoderma harzianum</i>	Doucen	2013
Thr.9	<i>Trichoderma harzianum</i>	Loutaya	2013
Thr.10	<i>Trichoderma harzianum</i>	chott Tighdidine	2013
Thr.11	<i>Trichoderma harzianum</i>	El-Hadjeb	2013
Thr.12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Foughala	2013
Tv.13	<i>Trichoderma viride</i>	Doucen	2013
Thr.14	<i>Trichoderma harzianum</i>	Loutaya	2013

IV.2.1.2. Agents pathogènes

Les trois isolats de *Fusarium* qui ont fait l'objet de cette étude ont été fournis par le laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), El-Harrach, Alger. Les trois isolats correspondant aux espèces *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. verticillioides* sont isolés à partir de plants de blé dur présentant les symptômes typiques de la pourriture racinaire et du collet. Les isolats ont été conservés sur milieu PDA à 4 °C et subcultivés chaque deux mois.

IV.2.2. Matériel végétal

La variété de blé dur Vitron est utilisée pour les tests *in vivo*, cette variété est connue par sa sensibilité à la fusariose.

IV.2.3. Activité antagoniste *in vitro*

IV.2.3.1. Confrontation directe

La technique suivie pour la réalisation de ce test est celle décrite par Benhamou et Chet (1996). Elle consiste à mettre en confrontation l'agent antagoniste et le pathogène dans une boîte de Pétri de 90 mm contenant préalablement le milieu PDA. Deux disques de 5 mm de diamètre des protagonistes prélevés de cultures âgées de 7 jours sont déposés en même temps selon un axe diamétral à 4 cm et équidistant du centre de la boîte (Figure 16). Des répétitions à raison de trois sont réalisées pour chaque combinaison de *Trichoderma*/*Fusarium* et même pour un témoin contenant uniquement l'agent pathogène. L'incubation est réalisée à 25 °C à l'obscurité pendant 7 jours. Des notations sur l'inhibition de la croissance des colonies du *Fusarium* et leur envahissement par les isolats de *Trichoderma* sp. sont effectuées quotidiennement par des mesures. De plus, des observations microscopiques au grossissement $\times 40$ sont effectuées au niveau de la zone de contact des deux champignons révélant l'effet direct de l'agent antagoniste sur le mycélium de l'agent pathogène. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercé par les isolats de *Trichoderma* sont calculés selon la formule suivante :

$$I(\%) = (D_T - D_{PA} / D_T) \times 100$$

I(%) : Pourcentage d'inhibition

D_T : croissance diamétrale du témoin

D_{PA} : croissance diamétrale de l'agent pathogène en présence de l'antagoniste

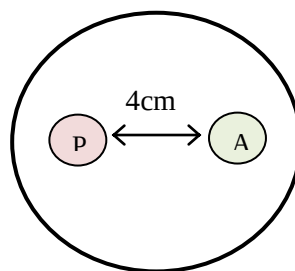


Figure 16 : Schéma présentant la confrontation directe. **A** : antagoniste, **P** : pathogène

IV.2.3.2. Confrontation indirecte

La confrontation indirecte est réalisée selon la méthode décrite par Dennis et Webster (1971). Cette méthode consiste à ensemencer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes de Pétri séparées contenant préalablement le milieu PDA, par la suite un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma* en bas et le *Fusarium* en haut (Figure 17). La jonction entre les deux boîtes est assurée par du Parafilm afin d'éviter toute perte en substances volatiles. Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant un disque de *Fusarium*, alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA. Des répétitions à raison de trois sont effectuées pour les combinaisons *Trichoderma/Fusarium* et pour le témoin. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation directe. La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée avant que les filaments mycéliens de *Trichoderma* spp. atteignent la colonie de *Fusarium* en haut (assurant l'absence d'un contact direct). L'évaluation de l'inhibition exercée par l'agent antagoniste est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la même formule décrite préalablement pour la confrontation directe.

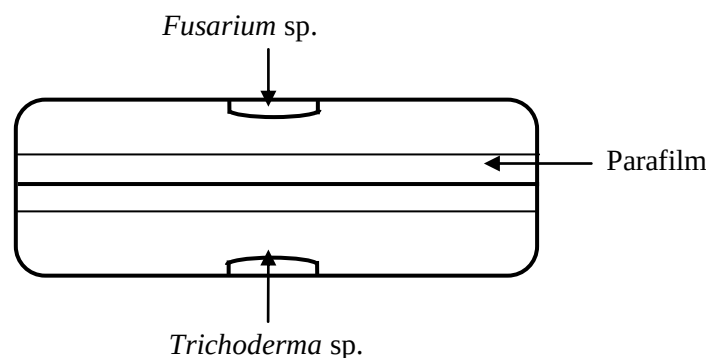


Figure 17: Schéma présentant la confrontation indirecte (Hibar et *al.*, 2005)

IV.2.3.3. Effet de l'agent antagoniste sur la sporulation de l'agent pathogène

Ce test est réalisé selon la technique décrite par Ibrahim et *al.* (1996), qui consiste à prendre des fragments de 5 mm à partir des boîtes de Pétri où sont réalisées les confrontations directes. Les prélèvements sont effectués au 7^{ème} jour, à une distance de 1 cm du front de confrontation pour les colonies du *Fusarium*, et de la périphérie pour les témoins. Les fragments sont mis dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée stérile et après agitation, la concentration en spores est déterminée à l'aide de la cellule de Malassez.

IV.2.4. Activité antagoniste *in vivo*

IV.2.4.1. Préparation de l'inoculum de *Fusarium*

Pour la préparation de l'inoculum, des flacons de 250 ml contenant 54 g d'un substrat à base de blé humidifiée avec 22 ml d'eau distillée et stérilisés dans les conditions standards sont inoculés à raison de 5 disques (5 mm de diamètre) de culture âgée de 7 jours de l'agent pathogène. Les flacons sont incubés à 25 °C sous lumière continue pendant 15 jours, et agités une fois tous les 4 à 5 jours pour assurer une bonne homogénéisation de l'inoculum.

IV.2.4.2. Traitement de la semence par les isolats de *Trichoderma*

La technique préconisée est celle décrite par Harman et *al.* (1989), qui consiste à tremper les graines de blé dans une solution de spores d'une concentration de 10^6 - 10^7 spores/ml et à raison de 1 ml/4g de semence. Les graines traitées sont ensuite incubées pendant 24 h à 25 °C.

IV.2.4.3. Inoculation du sol par l'agent pathogène

L'inoculation du sol par l'agent pathogène est réalisée selon la technique de Khalifa (2006). Cette méthode consiste à ensemercer l'agent pathogène dans un substrat stérile constitué d'un mélange de terre, de terreau et du sable avec les mêmes proportions. Le substrat est réparti dans des pots à raison de 60 g/pot. Les graines de blé semées à raison de 5 graines par pot sont couvertes avec une couche de 2.5 g d'inoculum à une distance de 2 cm au dessus des graines ensuite couvert par le sol. Quatre pots sont utilisés pour chaque type de traitement

Deux types de témoins ont été réalisés :

- × Graines de blé non traitées et semées dans un sol inoculé par l'agent pathogène (Témoin positif)
- × Graines de blé non traitées et semées dans un sol non inoculé par l'agent pathogène (Témoin négatif)

IV.2.4.4. Notation et analyse des résultats

Les plants sont observés régulièrement pour suivre l'apparition et l'évolution des lésions noir ou brun, étendant sur la surface du collet. Les premières notations sont effectuées au moment de la germination, les deuxièmes sont effectuées après un mois. L'évaluation de la sévérité des symptômes est exprimée selon une échelle de notation à 4 degrés, allant de 0 à 3 (Figure 18)

0 : Absence de symptôme

1 : noircissement ou coloration marron de 1- 25 % de la surface de collet.

2 : noircissement ou coloration marron de 26 – 50 de la surface du collet

3 : noircissement ou coloration marron > 50% du collet

La réaction moyenne est évaluée par le rapport suivant :

$$IM = (0 \times F_0 + 1 \times F_1 + 2 \times F_2 + 3 \times F_3) / N.$$

IM : indice de la maladie.

F : nombre de plants pour chaque degré dans l'échelle de notation de 0 à 3.

N : nombre total de plants analysés.



Figure 18 : Echelle de notation

IV.2.5. Analyses statistiques

Les résultats relatifs aux tests *in vitro* et *in vivo* sont interprétés après une analyse de la variance à un seul facteur. Les différences entre les isolats pour les paramètres étudiés sont comparées par le test de comparaison multiple de Tukey. La corrélation entre les différents paramètres étudiés est déterminée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson. Les valeurs de $P < 0.01$ et $P < 0.05$ sont considérées comme significatives. L'analyse statistique a été réalisée par SPSS, la version 21.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Action antagoniste de *Trichoderma* spp. en confrontation directe

Les tests de confrontation directe ont permis de monter le pouvoir antagoniste de chaque isolat de *Trichoderma* spp. à l'égard des agents pathogènes testés comparés aux témoins. Selon les résultats présentés dans le tableau 09, le taux de croissance des pathogènes varie significativement en fonction de l'isolat de *Trichoderma* spp. en confrontation. Parmi les isolats de *Trichoderma* testés, *T. harzianum* Thr.4 a conféré les pourcentages de réduction de la croissance les plus élevés à l'égard de *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. verticillioides* avec 70.68%, 67.05% et 70.57% respectivement. En effet, les trois isolats Thr.4, Thr.10 et Thr.8 correspondant à *T. harzianum* ont montré leur potentiel d'activité antagoniste contre les trois agents pathogènes, leur croissance mycélienne est inhibée avec un pourcentage supérieur à 60%. Un taux de croissance faible des trois agents pathogènes par rapport aux témoins est observé également en confrontation avec l'isolat *T. viride* Tv.6.

Tableau 09 : Effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des agents pathogènes de *Fusarium* en confrontation directe

isolats	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	Diamètre de colonie (mm)	% de réduction	Diamètre de colonie (mm)	% de réduction	Diamètre de colonie (mm)	% de réduction
Thr.1	37.00 de	55.42	40.00 de	54.02	41.33 h	46.32
Thr.2	38.33 e	53.81	36.00 c	58.62	32.66 d	57.58
Thm.3	42.00 fg	49.39	44.33 f	49.04	39.33 fg	48.92
Thr.4	24.33 a	70.68	28.66 a	67.05	22.66 a	70.57
Thr.5	33.33 c	59.84	37.66 cd	56.71	31.66 cd	58.88
Tv.6	30.00 b	63.85	35.66 c	59.01	30.66 c	60.18
Thm.7	41.33 f	50.20	51.66 h	40.62	40.33 gh	47.62
Thr.8	32.33 c	61.04	32.33 b	62.83	27.33 b	64.50
Thr.9	35.66 d	57.03	44.00 f	49.42	32.33 cd	58.01
Thr.10	28.66 b	65.46	31.33 ab	63.98	24.33 a	68.40
Thr.11	43.66 h	47.39	48.00 g	44.82	46.66 i	39.40
Thr.12	43.00 gh	48.19	43.66 f	49.81	31.33 cd	59.31
Tv.13	33.66 c	59.44	48.66 gh	44.06	37.66 f	51.09
Thr.14	41.00 f	50.60	41.33 ef	52.49	35.33 e	54.11
Témoin	83.00 i	-	87.00 i	-	77.00 j	-

Les valeurs de la même colonne suivies par des lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test de Tukey au seuil de 5%.

En outre, les tests de confrontation directe ont montré la capacité des isolats Thr.4, Thr.8 et Thr.10 de *T. harzianum* et l'isolat *T. viride* Tv.6 à envahir et sporuler au-dessus de la colonie de *F. culmorum*. Par contre, aucun envahissement n'a été observé avec les isolats de *F. graminearum* et *F. verticillioïdes* qui ont montré la formation ou non d'une zone de lyse dans la zone de contact entre l'agent antagoniste et l'agent pathogène (Figure 19). Les observations microscopiques de la zone de contact entre l'agent antagoniste et le pathogène ont permis la mise en évidence du phénomène mycoparasitaire exercé par les isolats de *Trichoderma* spp. qui ont présenté leur capacité de s'enrouler autour des hyphes du pathogène, leur segmentation et à la fin une lyse totale (Figure 20).

Le test de confrontation directe a servi d'une autre part à la visualisation du pouvoir inhibiteur de sporulation des pathogènes par les isolats de *Trichoderma* spp. Ces derniers ont présenté une efficacité marquée à l'égard des trois agents pathogènes testés avec une variabilité entre les isolats de la même espèce. Une inhibition totale est marquée avec les isolats *T. harzianum* Thr.4 et *T. viride* Tv.6 (Tableau 10).

Tableau 10 : Effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* sur la sporulation des agents pathogènes de *Fusarium* en confrontation directe

isolats	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioïdes</i>	
	Concentration spores 10 ⁴ /ml	% de reduction	Concentration spores 10 ⁴ /ml	% de reduction	Concentration spores 10 ⁴ /ml	% de reduction
Thr.1	03.33b	92.75	07.33c	84.72	05.00bc	84.38
Thr.2	04.33bc	90.58	05.00bc	89.58	01.67bc	94.79
Thm.3	04.67bc	89.86	03.33ab	93.06	03.67ab	88.54
Thr.4	00.00a	100.00	00.33a	99.31	00.00a	100.00
Thr.5	12.67 ^e	72.46	12.33d	74.31	00.33c	98.96
Tv.6	00.33a	99.28	00.33a	99.31	00.00a	100.00
Thm.7	09.67d	78.99	03.33ab	93.06	09.33ab	70.83
Thr.8	02.33ab	94.93	11.67d	75.69	05.33c	83.33
Thr.9	02.67ab	94.20	02.33ab	95.14	03.67a	88.54
Thr.10	02.33ab	94.93	14.33de	70.14	08.33d	73.96
Thr.11	14.00 ^e	69.57	19.00f	60.42	09.33d	70.83
Thr.12	05.00bc	89.13	03.67ab	92.36	03.67bc	88.54
Tv.13	11.33de	75.36	20.00f	58.33	17.00 ^e	46.88
Thr.14	06.67c	85.51	17.67ef	63.19	01.67d	94.79
témoin	46.00f	-	48.00g	-	32.00f	-

Les valeurs de la même colonne suivies par les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Tukey au seuil de 5%.

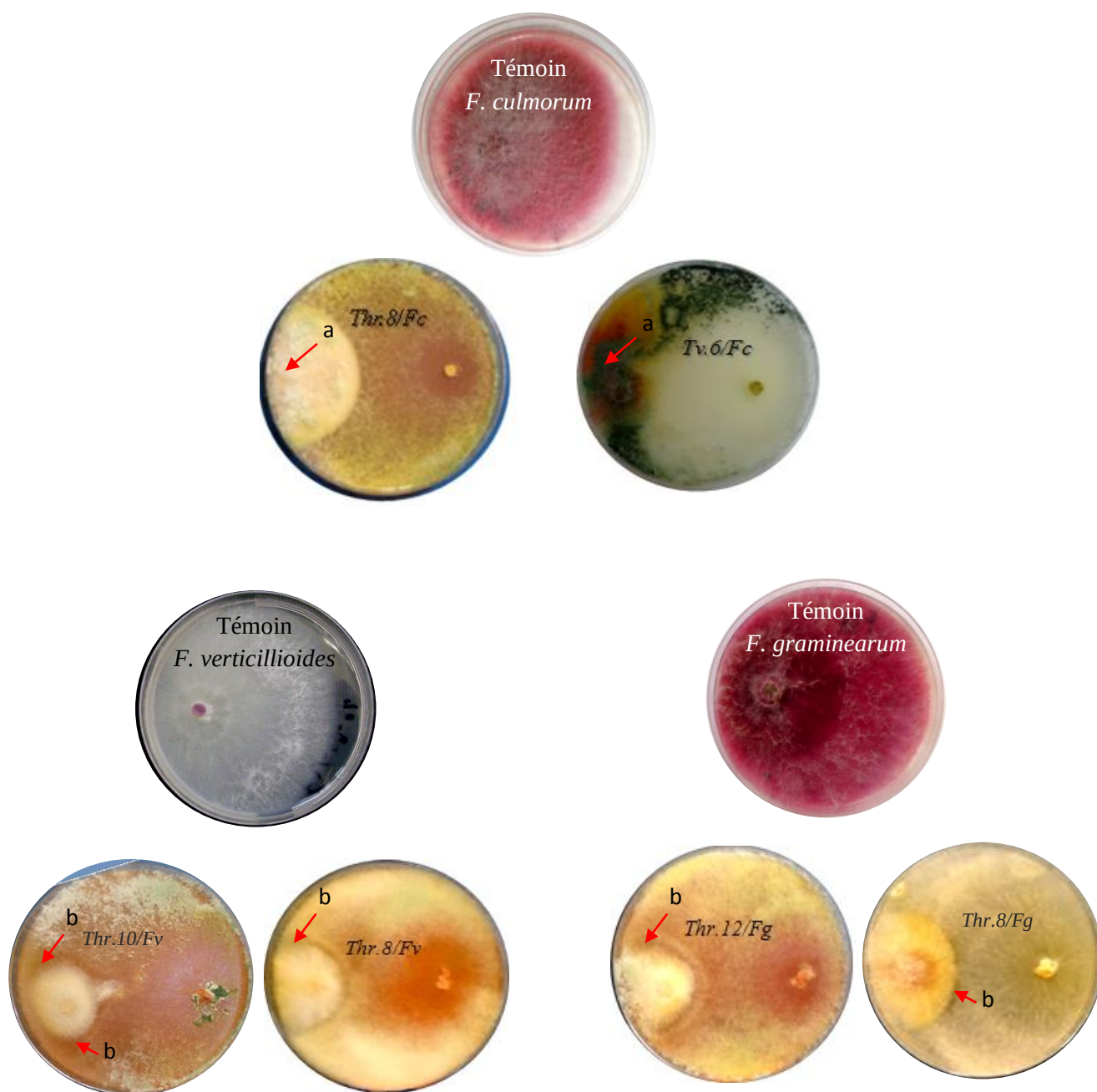


Figure 19 : Confrontation directe entre l'antagoniste et le phytopathogène après 6 jours. Fc: *F. culmorum*. Fg : *F. graminearum*. Fv: *F. verticillioides*. Thr: *T. harzianum*. Tv: *T. viride*. **a** : envahissement et sporulation de *Trichoderma* spp. au dessus de la colonie du pathothogène. **b** : zone de lyse

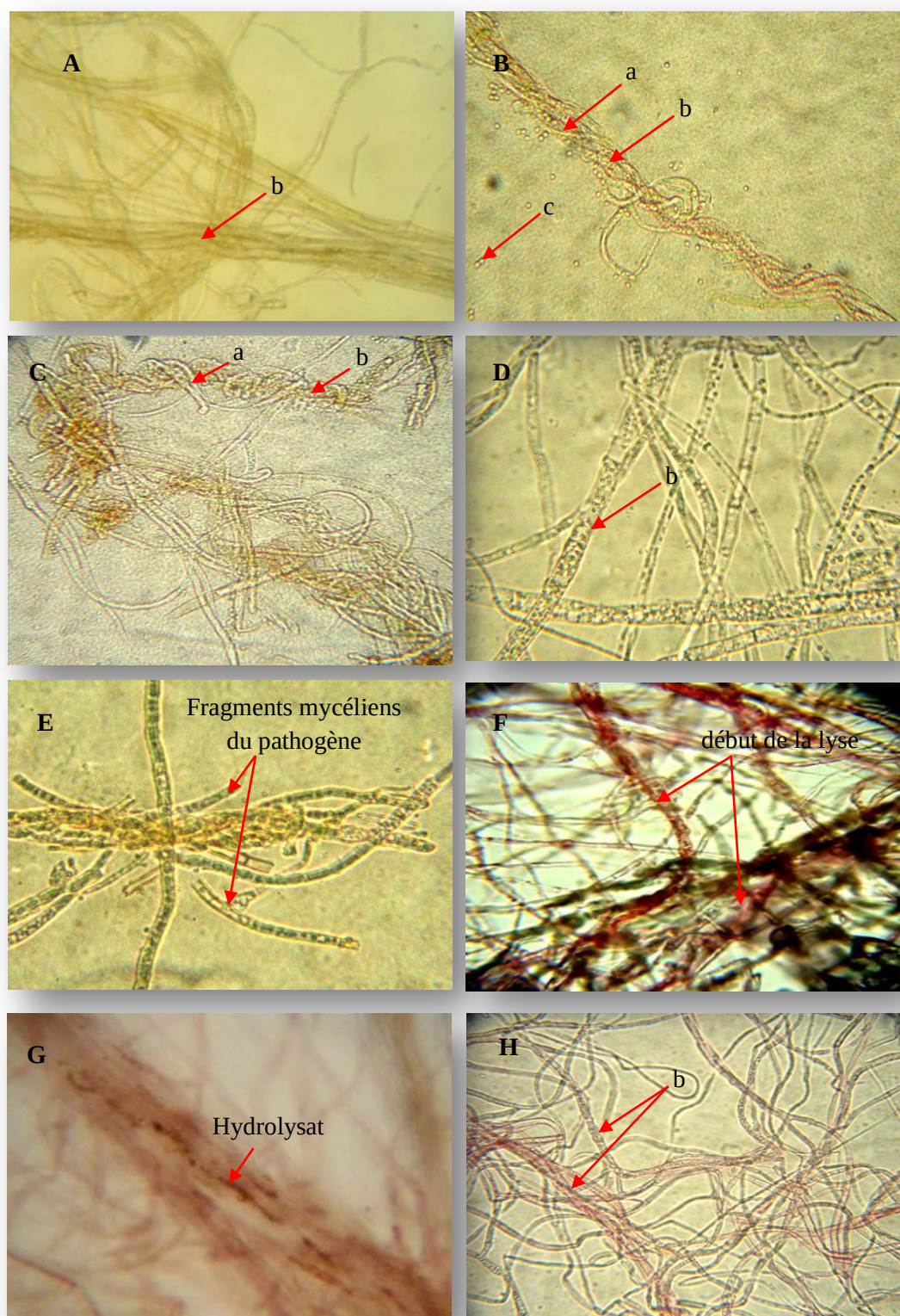


Figure 20: Présentation du pouvoir mycoparasitaire des antagonistes

A. Formation d'un cordon : l'antagoniste pousse parallèlement au pathogène, **B** et **C.** Enroulement, **D** : granulation et vacuolisation cytoplasmique, **E** : Segmentation des hyphes du pathogène, **F** et **G** : Lyse cellulaire des hyphes du pathogène, **H** : inhibition de sporulation, a : hyphe de *T. harzianum* Thr.4, b : hyphe de *F. graminearum*, c : spore de *T. harzianum* Thr.4.

IV.3.2. Action antagoniste de *Trichoderma* spp. en confrontation indirecte

Les mesures relatives aux diamètres des colonies des trois isolats de *Fusarium* cultivés en présence ou en absence de l'antagoniste ont permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance des isolats de *Trichoderma* spp. Les résultats présentés dans le tableau 11 montrent une réduction significative du diamètre moyen des colonies des trois agents pathogènes en présence de l'antagoniste par rapport aux témoins. Les isolats Thm.3, Thr.4, Tv.6, Thm.7 et Tv.13 se sont montrés les plus efficaces par la production de substances antifongiques volatiles efficaces à l'égard des trois agents pathogènes testés (Figure 21). L'isolat *F. culmorum* s'est montré le plus sensible aux substances volatiles sécrétées par les différents antagonistes par rapport aux deux autres pathogènes. Après quatre jours d'incubation, une inhibition de l'ordre de 50 % est notée avec Tv.6. L'observation microscopique de la périphérie de la colonie de *F. culmorum* en présence de *T. viride* Tv.6 et *T. hamatum* Thm.3 a montré une transformation remarquable et une stérilité par rapport aux témoins (Figure 22).

Tableau 11: Effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des agents pathogènes de *Fusarium* en confrontation indirecte

Isolats	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	Diamètre de colonie (mm)	% de reduction	Diamètre de colonie (mm)	% de reduction	Diamètre de colonie (mm)	% de reduction
Thr.1	53.67d	32.91	55.33de	34.91	50.33e	28.10
Thr.2	51.67d	35.41	57.33ef	32.55	56.67g	19.04
Thm.3	48.33c	39.59	50.33b	40.79	41.67bc	40.47
Thr.4	48.33b	39.59	44.33a	47.85	31.33a	55.24
Thr.5	61.00f	23.75	59.00f	30.59	60.67h	13.33
Tv.6	35.67a	55.41	42.33a	50.20	30.00a	57.14
Thm.7	43.33b	45.84	56.00e	34.12	42.33c	39.53
Thr.8	56.67g	29.16	67.67g	20.39	53.67f	23.33
Thr.9	47.00c	41.25	53.33cd	37.26	49.67de	29.04
Thr.10	52.67d	34.16	56.33e	33.73	55.67g	20.47
Thr.11	52.00d	35.00	56.67e	33.33	49.00de	30.00
Thr.12	58.33e	27.09	71.00h	16.47	48.33d	30.96
Tv.13	44.00b	45.00	52.67c	38.04	40.33b	42.39
Thr.14	62.33f	22.09	76.00i	10.59	59.00h	15.71
témoin	80.00h	-	85.00j	-	70.00i	-

Les valeurs de la même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Tukey au seuil de 5%.



Figure 21: Confrontation indirecte (durant 4 jours) entre l'antagoniste et le phytopathogène.
 Fc: *F. culmorum*, Fg: *F. graminearum*, Fv: *F. verticillioides*, Thr: *T. harzianum*, Thm. *T. hamatum*, Tv: *T. viride*.

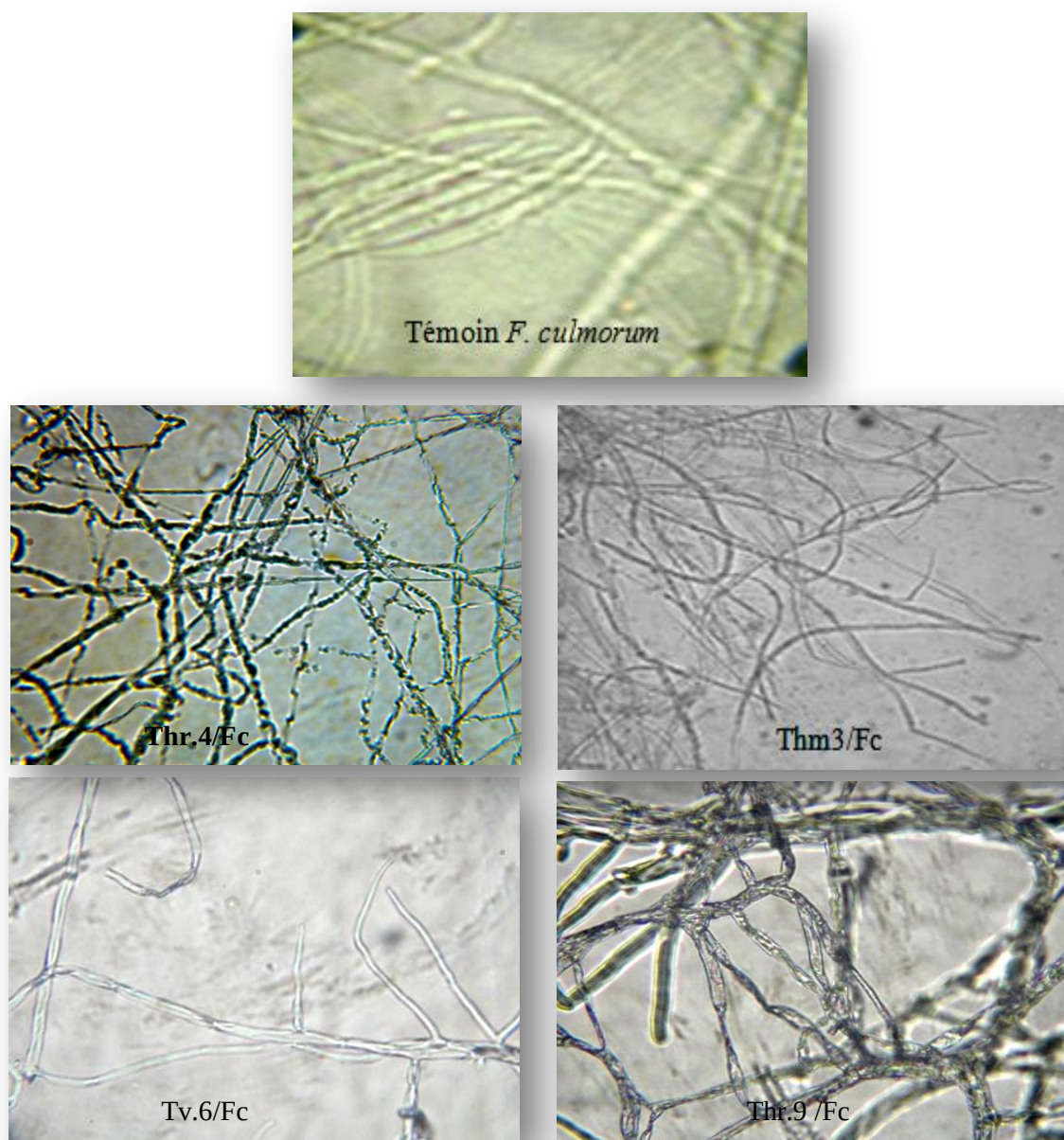


Figure 22: Modification morphologique affectant le mycélium du *F. culmorum* (durant 4 jours) en confrontation indirecte. Fc: *F. culmorum*, Thr: *T. harzianum*, Tv: *T. viride*, Thm: *T. hamatum*.

IV.3.3. Etude *in vivo*

L'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la protection du blé contre la pourriture racinaire et du collet est évaluée sous serre (en pots). La notation des symptômes est réalisée 30 jours après le semis après arrachage et lavage des plants et leur répartition en 4 classes en fonction du degré des symptômes sur le collet et le système racinaire évaluée selon l'échelle de notation de 0 à 3. L'indice de la maladie des plants traités par *Trichoderma* spp. est significativement inférieur que le témoin inoculé seulement avec le pathogène (Tableau 12). L'isolat de l'espèce *F. graminearum* s'est montré le plus agressif suivi par *F. verticillioides* et *F. culmorum* avec un indice de maladie de 3.00, 2.89 et 2.65 respectivement (Figure 23). Le traitement des semences avec *T. harzianum* Thr.4 a donné le pourcentage de réduction le plus élevé contre les trois agents pathogènes, suivi par *T. viride* Tv.6 et *T. harzianum* Thr.10. Les isolats Thr.5, Thr.8 de *T. harzianum*, Thm.3, Thm.7 de *T. hamatum* et *T. viride* Tv.13 ont montré également une protection de l'ordre de 60% contre les trois agents pathogènes testés. Notre étude a montré en outre une variabilité dans la capacité antagoniste des isolats appartenant aux espèces de *T. harzianum* et *T. viride* par rapport à *T. hamatum* à l'égard du même agent pathogène.

Tableau 12 : Pourcentage de réduction de l'indice de maladie (IM) par les différents isolats de *Trichoderma*.

Isolats	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	IM	% de reduction	IM	% de reduction	IM	% de reduction
Thr.1	1.25 de	52.83	1.93 ef	35.66	1.69 de	41.52
Thr.2	1.60 g	39.62	2.40 g	20.00	1.45 d	49.82
Thm.3	0.99 c	62.64	1.17 c	61.00	1.10 c	61.93
Thr.4	0.27 a	89.81	0.48 a	84.00	0.30 a	89.61
Thr.5	1.05 cd	60.37	1.24 c	58.66	1.12 c	61.24
Tv.6	0.33 a	87.54	0.60 a	80.00	0.64 b	77.85
Thm.7	1.03 cd	61.13	1.15 c	61.66	1.14 c	60.55
Thr.8	0.98 c	63.01	1.24 c	58.66	1.15 c	60.20
Thr.9	1.56 fg	41.13	1.68 d	44.00	1.48 d	48.78
Thr.10	0.64 b	75.84	0.85 b	71.66	0.75 b	74.04
Thr.11	1.96 h	26.03	2.11f	29.66	1.86 e	35.64
Thr.12	1.78 gh	32.83	2.01 ef	33.00	1.51 d	47.75
Tv.13	1.05 cd	60.37	1.24 c	58.66	1.13 c	60.89
Thr.14	1.35 ef	49.05	1.90 e	36.66	1.86 e	35.64
Témoin	2.65 i	-	3.00 h	-	2.89 f	-

Les indices de maladies suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différents selon le test Tukey au seuil de 5%.

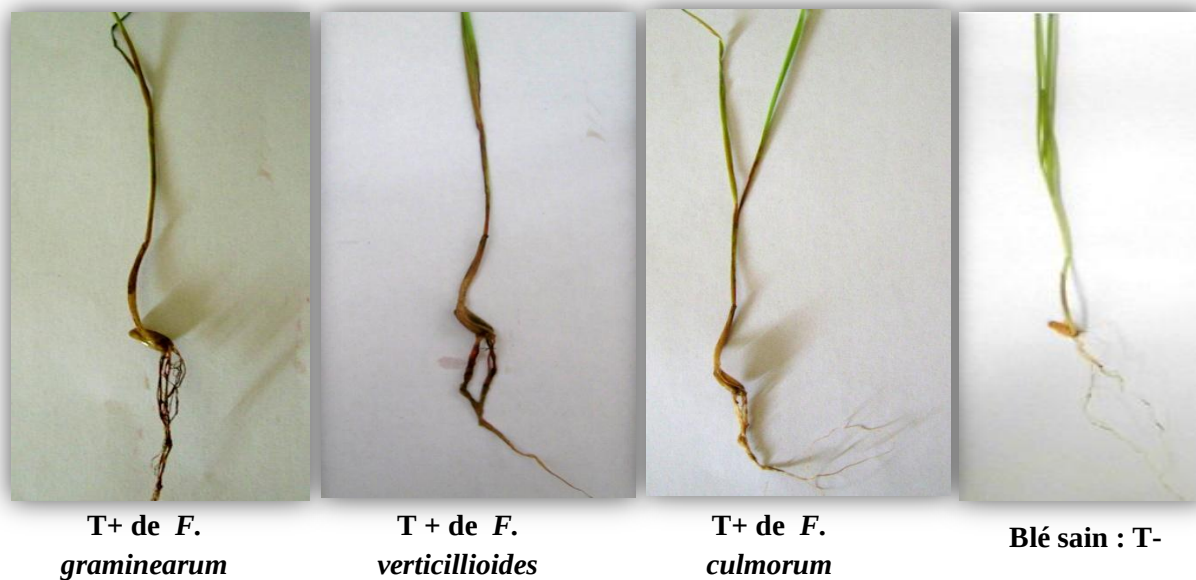


Figure 23 : Les témoins de trois agents pathogènes

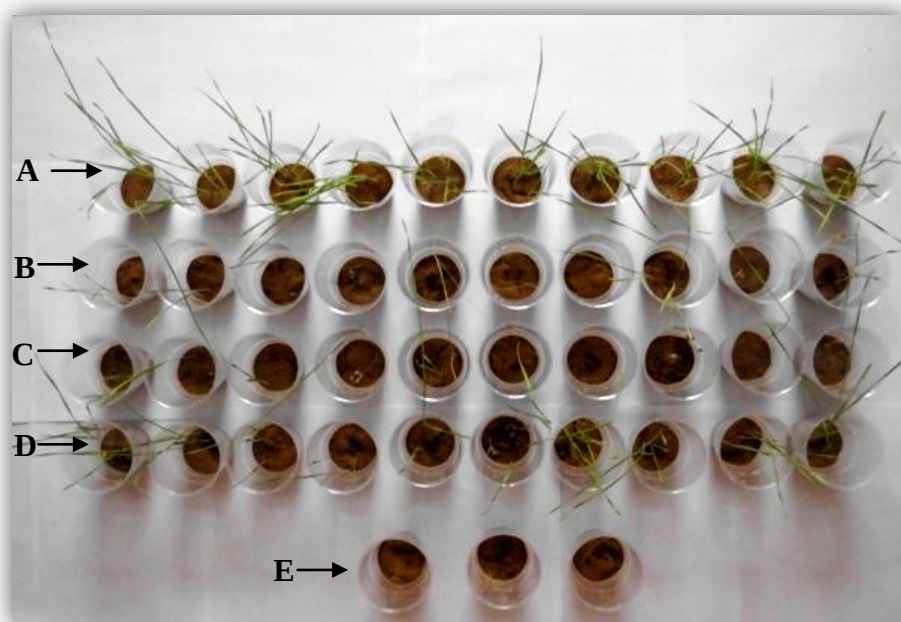


Figure 24 : A : Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la stimulation de la croissance du blé dur. B : Effet antagoniste des *Trichoderma* spp. contre *F. graminearum*. C : Effet antagoniste des *Trichoderma* spp. contre *F. verticillioides*. D : Effet antagoniste des *Trichoderma* spp. contre *F. culmorum*. E : Témoin positifs.

IV.3.4. Analyse comparative de l'efficacité des agents antagonistes *in vivo* et *in vitro*

Les coefficients de corrélations de Pearson calculés entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne en confrontation directe et indirecte, la sporulation et l'indice de maladie de chaque agent pathogène ont permis de montrer que parmi 18 coefficients de corrélation calculés 7 sont statistiquement significatifs. l'indice de la maladie (IM) est corrélé positivement avec la croissance mycélienne étudiée *in vitro* en confrontation directe et indirecte en présence de l'agent antagoniste. Une corrélation positive est statistiquement significative est notée également entre la réduction de l'indice de maladie de *F. culmorum* et la réduction de la sporulation.

- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.567$ au seuil de 1% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. graminearum* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation indirecte.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.390$ au seuil de 5% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. culmorum* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation indirecte.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.588$ au seuil de 1% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. verticillioides* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation indirecte.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.386$ au seuil de 5% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. graminearum* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation directe.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.792$ au seuil de 1% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. culmorum* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation directe.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.670$ au seuil de 1% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie de *F. verticillioides* et la réduction de la croissance mycélienne en confrontation directe.
- × Un coefficient de corrélation positive de $r = 0.472$ au seuil de 5% est obtenu entre l'effet de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie de *F. culmorum* et la réduction de la sporulation.

IV.4. Discussion

Les confrontations directes entre les isolats de *Trichoderma* et les trois isolats de *Fusarium* ont mis en évidence une réduction significative de la croissance du pathogène par rapport aux témoins

Une différence significative de la capacité antagoniste est montrée entre les isolats de la même espèce de *Trichoderma*. Cependant, tous les isolats de *Trichoderma* ont pu inhiber la croissance mycélienne du pathogène comparés aux témoins.

La croissance rapide des isolats Thr.4, Thr.8 et Thr. 10 de *T. harzianum* et *T. viride* Tv.6 par rapport aux agents pathogènes et les autres agents antagonistes reflète également leur haut potentiel de compétition pour les nutriments et l'espace. La compétitivité de *Trichoderma* spp. basée sur la croissance rapide et la germination est un élément déterminant de l'antagonisme (Camporota, 1985; Chet et al, 1998). Elle est étroitement corrélée à la capacité de dégradation liée à la capacité de production d'antibiotiques et d'enzymes (Chet et al, 1998 ; Kubicek et Harman, 1998).

D'une autre part les isolats de la même espèce ont présenté des comportements relativement proches à l'égard du même pathogène. Un pouvoir hautement mycoparasitaire est marqué avec les isolats appartenant à l'espèce de *T. harzianum* en particulier, Thr. 4, Thr. 8 et Thr. 10 présentant leur aptitude à envahir complètement les colonies de *F. culmorum* et même de sporuler au-dessus d'elle. Ces observations sont notées également avec l'isolat *T. viride* Tv.6. à l'égard du même pathogène. L'envahissement du mycélium du pathogène par *T. harzianum* a également été observé par Benhamou et Chet (1997) en confrontation directe entre cet antagoniste et le champignon tellurique *Pythium ultimum* et ce au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation. En outre, Krishnamurthy et al. (1999) ont rapporté que les souches de *T. harzianum* et *T. viride* qui ont été capables d'inhiber et envahir le champignon phytopathogène *Rhizoctonia solani* sont considérées les plus efficaces en biocontrôle.

Une zone de lyse est observée au niveau de la zone de contact avec les isolats de *T. viride* et pratiquement avec tous les isolats de *T. harzianum* en combinaison. Le diamètre de la zone de lyse est plus important dans le cas de *F. graminearum* et *F. verticillioides* que *F. culmorum*. La production d'une zone de lyse au niveau de la zone de contact entre les colonies de l'agent pathogène et *Trichoderma* spp. peut être expliquée par la production

d'enzymes hydrolytiques extracellulaires plutôt que la production de substances inhibitrices de la croissance (Benhamou et Chet 1993 ; Haran *et al.*, 1996a).

L'étude microscopique de la zone d'interpénétration des deux colonies a révélé l'existence d'altération au niveau du mycélium du pathogène, présentée par une transformation des filaments mycéliens en cordons et un enroulement du mycélium de *Trichoderma* autour de celui du pathogène. Une constatation comparable est observée par Hibar *et al.* (2005) avec *T. harzianum* à l'égard de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Javis et Schoem. Nos observations microscopiques ont montré également une granulation des hyphes du pathogène qui deviennent plus transparents indiquant une perte du contenu cellulaire, ainsi que des cassures des hyphes et une lyse totale. Des résultats similaires sont observés par Camporota (1985) en confrontation directe entre des isolats appartenant à l'espèce *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. viride* contre *R. solani*. Nos observations microscopiques ont montré également que les isolats Thm.3 et Thm.7 de *T. hamatum* ont présenté un enroulement moins intense par rapport aux autres isolats. Dans le même sens, Elad *et al.* (1982) ont décrit que l'enroulement des hyphes de *T. hamatum* (Bon.) Bain à l'égard de *R. solani* est accompagné avec une dégradation partielle de ce dernier, les mêmes auteurs ont observé une lyse du mycélium de *Sclerotium rolfsii* Sacc en présence de l'antagoniste *T. harzianum*. Selon Camporota (1985), les souches rapidement détruites sont celles les plus touchées par le mycoparasitisme.

La technique de confrontation indirecte a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance des isolats de *Trichoderma* exercé sur les trois agents pathogènes de *Fusarium*. Une réduction significative de la croissance avec tous des isolats antagonistes par rapport au témoin est notée, avec une différence significative du taux d'inhibition entre les isolats à l'égard du même pathogène.

Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et les isolats de *Trichoderma* spp. ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *Fusarium*. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de *Trichoderma* spp. à produire des substances antifongiques volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Howell, 2003 ; Hibar *et al.*, 2005).

Les taux d'inhibition les plus importants sont enregistrés avec les deux isolats Tv.6 et Tv.13 appartenant à l'espèce *T. viride* et l'isolat Thm.3 et Thm.7 de *T. hamatum*, ainsi que les isolats Thr.4 et Thr.9 de *T. harzianum* qui ont présenté des taux relativement comparables à

ceux de *T. viride* et *T. hamatum*. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Camporota (1985) montrant un effet d'inhibition plus marqué de *T. viride* par rapport à *T. harzianum* à l'égard de *R. solani* suite à la production des métabolites volatiles. D'une autre part, Dubey et Patel (2001) ont rapporté que la réduction de la croissance mycélienne de *R. solani* exercée sous l'action des composés volatiles produits par *T. viride* est plus marquée que celle obtenue avec les isolats de *T. harzianum*. Plusieurs travaux ont montré le potentiel d'inhibition des substances volatiles des souches de *T. viride* et *T. harzianum* à l'égard des *Fusarium* (Calistru et al. 1997 ; Rajeswari et Kannabiran, 2011).

Il est important de noter que les espèces de *Trichoderma* sont connues par leur potentiel de production d'une large gamme d'antibiotique, où le 6-pentyl- α -pyrone (6-PAP) est le composant antifongique le plus étudié chez ces espèces (Aneja et al., 2005 ; Siddiquee et al., 2012). Certains travaux ont corrélé la suppression ou la limitation de sporulation des pathogènes à l'action de 6-PAP (Pezet et al., 1999) produit par les espèces de la section *Trichoderma* (Dodd et al., 2003). Aneja et al. (2005) ont montré que le potentiel d'inhibition de la germination et la croissance mycélienne de *Crinipellis perniciosa* Stahel et *Moniliophthora roreri* Cif. H.C.Evans exercé par *T. harzianum* est dû à la sécrétion d'acide nonanoïque plutôt qu'à la présence de 6-pentyl- α -pyrone (6-PAP), où les deux composés sont définis comme des antibiotiques volatiles. Par ailleurs, Le 1-hydroxy-3-méthylanthraquinone de *T. harzianum* a montré une forte capacité à limiter le développement de plusieurs champignons pathogènes du sol (Vinale et al., 2008). Des acides gras insaturés volatils produits par des *Trichoderma* sont rapportés également comme des inhibiteurs de la croissance mycélienne des champignons (Aneja et al., 2005 ; Siddiquee et al., 2012).

Pour certains isolats de *Trichoderma* spp. les différences de réaction à l'égard des trois isolats de *Fusarium* en confrontation indirecte sont relativement nettes. *F.culmorum* se distingue des deux autres pathogènes par plus de sensibilité à l'action des substances volatiles, ce même agent pathogène est apparu plus touché par le mycoparasitisme en confrontation directe. L'effet inhibiteur inégale pour le même isolat de *Trichoderma* à l'égard des trois isolats de *Fusarium* pourrait s'expliquer par des mécanismes de détoxification mis en place par le pathogène (Barak et al., 1985 ; Elad, 1993).

L'observation microscopique réalisée à la périphérie des colonies du pathogène en présence de *Trichoderma* lors de la confrontation indirecte a montré des transformations morphologiques importantes des pathogènes apparues sous forme des filaments stériles. Il est

important de noter que mêmes les isolats de *T. harzianum* présentant un taux d'inhibition moins important comparés aux autres isolats ont permis de provoquer des perturbations et en particulier une stérilité remarquable au niveau des hyphes des *Fusarium* en combinaison. Le même résultat est confirmé par Cherif et Benhamou (1990) qui ont rapporté que des altérations et des pertes cytoplasmiques sont notées par *T. harzianum* au niveau des hyphes de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* même en absence de contact directe entre les deux champignons.

Le suivie de la croissance mycélienne des trois agents pathogènes lors de la confrontation indirecte, nous a permis d'observer comment les isolats Thr.4, Thr.8 et Thr.10 de *T. harzianum* ont ralentie la croissance mycélienne du pathogène sans contact avec lui comparée aux témoins. Cette constatation prouve que ces isolats exercent leur activité antagoniste par plus d'un mode d'action, la sécrétion des substances volatiles et le mycoparasitisme précédé par la sécrétion des substances diffusibles appréciées souvent par une pigmentation jaune caractéristique de l'espèce, cette pigmentation est soupçonnées être des antibiotiques (Kubicek et Harman (1998). D'une autre part, la confrontation indirecte a montré nettement que la croissance des hyphes de l'antagoniste est dirigée par l'agent pathogène même à distance, prouvée par la formation intense du mycélium aérien dirigé vers le haut chez les antagonistes en combinaison par rapport à ceux en absence du pathogène. Une étude effectuée par Chet (1987) a montré que l'antagoniste *T. harzianum* perçoit la présence de son hôte suite à sa sécrétion d'un stimulus chimique, ce qui dirige les hyphes du mycoparasite directement vers lui. Au niveau microscopique des ramifications intenses des hyphes des mêmes isolats et d'autres sont observées.

Parallèlement à l'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe, les quatorze isolats de *Trichoderma* testés ont inhibé efficacement la sporulation des trois agents pathogènes de *Fusarium* à des degrés variables. L'action des substances volatiles et/ou diffusibles a engendré une inhibition significative de la sporulation par rapport aux témoins non traités. Les isolats *T. harzianum* Thr.4 et *T. viride* Tv.6 ont donné une inhibition de la sporulation voisine ou égale à 100 % vis-à-vis des trois isolats de *Fusarium*. Des taux d'inhibition de la sporulation de l'ordre de 47 à 83% ont été rapportés par Biles et Hill (1998) avec *T. harzianum* contre *Cochliobolus sativus*. L'espèce *T. harzianum* s'est montrée efficace même à l'égard des chlamydospores de *F. oxysporum* (Sivan et Chet, 1989b).

L'évaluation du niveau de la protection du blé par les quatorze isolats de *Trichoderma* spp. est basée sur l'estimation de l'intensité des symptômes de la maladie, qui se présente par un brunissement au niveau des racines et/ou sur le collet et par la suite leur comparaison avec les témoins (de l'échelle de notation). En comparant les témoins positifs des trois agents pathogènes, *F. graminearum* s'est apparue le plus agressif suivie par *F. verticillioides*.

Le traitement de la semence du blé par les spores des isolats de *T. harzianum* Thr.4 ou *T. viride*. Tv.6 ou *T. harzianum* Thr.10 a entraîné une forte réduction de l'intensité de la maladie provoquée par les trois agents pathogènes. L'antagonisme des microorganismes saprophytes contre la pourriture racinaire et du collet chez le blé a été étudié par plusieurs travaux (Kempf et Wolf, 1989 ; Teperi et al., 1998 ; Schisler et al., 2002 ; Zhao et al., 2014). *T. harzianum* a pu réduire l'agressivité de *F. graminearum* avec des pourcentages plus au moins importants (Dal Bello et al., 2002 ; Foroutan, 2013). D'autres travaux ont montré également l'efficacité de *T. viride* (Saharan et al., 2008).

En effet, l'enrobage de la semence ou le traitement du sol par les souches de *Trichoderma*, leur permet de coloniser le système racinaire des plantes. Suite à la colonisation racinaire ou de la rhizosphère, les agents antagonistes peuvent agir de deux manières ; leur contact direct avec l'agent pathogène développe leurs capacités inhibitrices. Les mécanismes mis en jeu par *Trichoderma in vivo* sont les mêmes que ceux mis en évidence *in vitro*, à savoir le mycoparasitisme, la sécrétion des substances antifongiques et la compétition pour l'espace et les nutriments (Dandurand et Knudsen, 1993 ; Howell, 2003). Cela peut expliquer d'une part la corrélation significative existante entre l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo*, et d'une autre part la différence entre le pourcentage de protection des isolats testés à l'égard du même pathogène. Il est évident que les isolats de *Trichoderma* spp. les plus antagonistes en confrontation directe et/ou indirecte sont les mêmes montrés les plus efficaces par le test *in vivo*. Cependant l'isolat *T. harzianum* Thr.5 qui a montré un pouvoir antagoniste relativement faible en confrontation directe et indirecte à l'égard des trois agents pathogènes a montré une bonne protection du blé. En effet, l'aptitude à la colonisation des racines diffère d'une souche antagoniste à une autre, dont certaines souches peuvent coloniser uniquement quelques sites localisés au niveau des racines (Metcalf et wilson, 2001), mais d'autres peuvent coloniser la surface entière des racines (Harman, 2000).

Les isolats de *Trichoderma* peuvent agir également à l'égard du pathogène d'une manière indirecte. La colonisation racinaire par *Trichoderma* provoque des changements cytologiques

et biochimiques au niveau de la plante (Yedidia et *al.*, 1999 ; Harman et *al.*, 2004). Selon Rajeswari (2014) les filtrats des isolats de *T. harzianum* et *T. viride* ont conduit à une accumulation des composés phénoliques chez *Arachis hypogaea*. L (groundnut) montrant leur toxicité contre *F. oxysporum*. Dans le même contexte, Howell et *al.* (2000) ont montré les propriétés toxiques des composés terpéniques à l'égard de *Rhizoctonia solani* accumulés autour des racines du coton suite à leur colonisation par *T. virens* ou par son filtrat. Les auteurs ont rapporté également que le biocontrôle exercé par *Trichoderma* est corrélé directement à la synthèse des composés terpéniques, même chez les souches de *T. virens* déficientes du mycoparasitisme et de l'antibiose. Il a été rapporté également que la pénétration des hyphes de *T. harzianum* dans l'épiderme du concombre augmente l'activité des peroxydases associée souvent à la production des composants mycotoxines (Howell, 2003).

Plus de l'effet antagoniste direct et indirect vis-à-vis du pathogène, les souches de *Trichoderma* spp. peuvent stimuler le système de défense de la plante. Ces antagonistes colonisent l'épiderme des racines et les couches corticales externes et avec leurs sécrétions métaboliques peuvent aboutir à une induction d'une résistance systémique ou localisée chez la plante (Harman et *al.*, 2004, Vinale et *al.*, 2008). Selon Harman et *al.* (2004) les modifications biochimiques *in vivo* traduites par la libération des molécules bioactives telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique, les enzymes hydrolytiques (glucanase, chitinase), les enzymes antioxydantes (peroxydases et polyphénol oxydases) et les phytoalexines sont comme des éliciteurs responsables de l'activation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse de défense chez la plante.

V.5. Conclusion

L'efficacité *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. examinés est montrée en confrontation directe par une réduction significative de la croissance mycélienne des trois agents pathogènes, ainsi que la réduction de leur pouvoir de sporulation comparés aux témoins, dont l'isolat *T. harzianum* Thr.4 a présenté les pourcentages de réduction les plus élevés suivi par Thr8 et Thr10 de *T. harzianum* et *T. viride* Tv.6. Les mêmes isolats ont montré leur haut potentiel mycoparasitaire traduit par leur aptitude à envahir et de sporuler au-dessus des colonies de *F. culmorum*. Microscopiquement, le haut potentiel mycoparasitaire de ces isolats est traduit par une intensité d'enroulement autour des hyphes du pathogène comparé aux isolats de *T. hamatum* qui sont considérés relativement les moins efficaces dans ce test.

Une zone de lyse est formée au niveau de la zone de contact des deux champignons, expliquée par la production d'enzymes lytiques. Le diamètre de cette zone est plus important en contact de la colonie de *F. graminearum* et *F. verticillioides* par rapport à *F. culmorum*.

En confrontation indirecte, les isolats Thm.3 et Thm.7 de *T. hamatum* et Tv.6 et Tv.13 de *T. viride* se sont montrés les plus efficaces par leur sécrétion en substances volatiles par rapport même aux isolats de *T. harzianum*. Ce test a confirmé la sensibilité de *F. culmorum* par rapport aux deux autres pathogènes.

L'efficacité *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp. est confirmée par une réduction significative de l'indice de la maladie comparée aux témoins, en apportant l'agent antagoniste par traitement de la semence. Ce test a permis également de rejoindre les travaux qui ont rapporté que les mécanismes mis en jeu par *Trichoderma in vivo* sont les mêmes que ceux mis en évidence *in vitro*, dont les isolats de *Trichoderma* spp. qui ont présenté un potentiel antagoniste important au moins dans l'un des tests *in vitro* sont les mêmes démontrés efficaces par le test *in vivo*. Bien que, l'isolat *T. harzianum* Thr.5 qui a montré un pouvoir antagoniste relativement faible en confrontation directe et indirecte à l'égard des trois agents pathogènes a montré des indices de maladies nettement faibles.

CHAPITRE V

ACTIVITES ENZYMATIQUES DES ISOLATS

DE TRICHODERMA spp.

V.1. Introduction

La plupart des espèces de *Trichoderma* ont été démontrées comme des producteurs efficaces des enzymes hydrolytiques. Elles sont impliquées dans la lyse des composants de la paroi cellulaire ou dans la dégradation des enzymes de pathogénicité de l'agent pathogène. D'autres enzymes peuvent dégrader les exsudats végétaux qui stimulent la germination des spores de champignons phytopathogènes (Howell, 2002).

Au cours des dernières décennies, la production et la régulation des enzymes hydrolytiques, et en particulier les chitinases, les glucanases et les protéases, ont été largement étudiées (Lorito et *al.*, 1998 ; Manczinger et *al.*, 2002; Vinale et *al.*, 2008). La production de ces enzymes hydrolytiques augmente de façon significative lorsque *Trichoderma* spp. est cultivé dans un milieu supplémenté avec un mycélium autoclavé ou la paroi de cellules fongiques (Elad et *al.*, 1982a; Geremia et *al.*, 1993), et une corrélation entre la capacité antagoniste de *Trichoderma* spp. et les activités hydrolytiques a été rapportée (Flores et *al.*, 1997; Herrera-Estrella et Chet, 1999).

L'objectif de cette étude est l'analyse de la production de trois enzymes à savoir ; la chitinase, la β -1,3 glucanase et la protéase chez quatorze isolats de *Trichoderma*, dont leur identification et activités antagonistes ont déjà été présentés dans les chapitres précédents. Nous focalisons ainsi sur la relation entre leur capacité à réduire l'indice de la maladie et l'activité de leurs enzymes dégradants la paroi cellulaire du pathogène. De même une approche de l'étude de l'influence des facteurs environnementaux sur la production de ces enzymes est envisagée.

La **chitine** est un polysaccharide homogène non ramifié formé de plus de 200 à 400 unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) liées par des ponts β -1,4 (Figure 25 ; Braun et Calderone, 1978 ; Lesage et Bussey, 2006). C'est le deuxième polymère abondant dans la biosphère, après la cellulose. Les plantes, les vertébrés et les procaryotes ne contiennent pas ce polysaccharide. La chitine représente un polymère structurel abondant chez la plupart des insectes et des champignons, parmi eux les champignons phytopathogènes (Haran et *al.*, 1996b). Chez les champignons filamenteux, la chitine peut représenter jusqu'à 60 % du contenu pariétal. Cette molécule est synthétisée par la chitine synthétase et sa fonction principale est de contribuer à la rigidité des éléments structuraux des organismes (Ruiz-Herrera, 1992).

Les chitinases qui sont des enzymes dégradantes de chitine sont rencontrées dans tous les règnes vivants (Perrakis et *al.*, 1994). Le nombre de publications sur le rôle des chitinases dans le contrôle biologique et les mécanismes de défense chez les plantes ne cesse de s'étendre depuis le début des années 80 (Haran et *al.*, 1996b). Les enzymes chitinolytiques de différentes espèces de *Trichoderma* et en particulier *T. harzianum* sont fréquemment rapportées comme des antifongiques plus efficaces que les autres enzymes hydrolytiques (Herrera-Estrella et Chet, 1999). Ainsi par les chitinases les *Trichoderma* attaquent non seulement les structures chitineuses des hyphes du pathogène, mais aussi les conidies, les chlamydospores et les sclérotes (Lorito et *al.*, 1998).

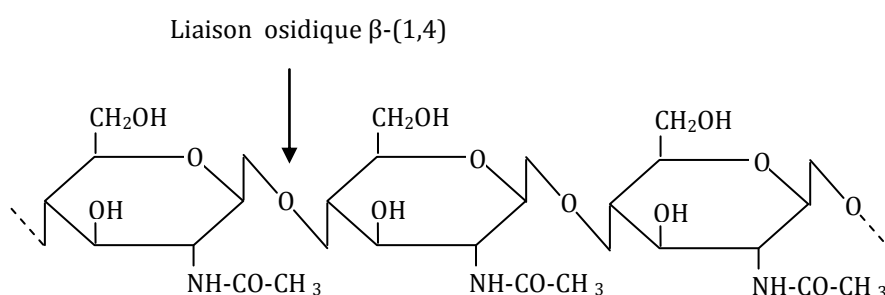


Figure 25: Représentation générale de la structure de chitine.

Selon Duo-Chuan (2006), les chitinases fongiques peuvent être divisées en deux grandes catégories;

➤ **Endochitinases (EC. 3.2. 1. 14)** : Ces enzymes catalysent de manière aléatoire le clivage des liaisons internes de la chaîne de chitine, ce qui donnera de polymères solubles de faible poids moléculaire de GlcNAc tel que les chitotetraoses, les chitotrioses et des dimères de diacétylchitobiose comme produit prédominant.

➤ **Exochitinases** : Elles mêmes peuvent être divisées en deux sous catégories, à savoir les chitobiosidases et les β -(1,4) N-acétylglucosaminidases ;

- **Chitobiosidases (EC.3.2.1.29)** : appelée également chitin-1,4- β -chitobiosidase, ces enzymes coupent la chitine progressivement à partir de la première liaison glycosidique (extrémité non réductrice) en libérant seulement des diacétylchitobioses sans production de monomère (GlcNAc) ou des oligomères.

- **β -(1,4)-N-Acétyle-glucosaminidases (GLcNAcase, EC.3.2.1.30) :** appelée encore chitobiase, elles agissent sur les diacetylchitobiose et les oligomères, incluant les chitotetraoses, les chitotrioses pour libérer des monomères de GlcNAc.

Les **β -glucanes**, dont la cellulose, constituent la classe la plus abondante de polysaccharides. Ce sont des polymères homogènes de D-glucose formés par des liens glucosidiques de type β . Chimiquement, ils sont très variés, certains sont des molécules relativement simples, composés de chaînes linéaires de résidus glycosyle reliés par des liaisons du même type, par contre d'autres sont plus complexes et peuvent être constitués d'une variété de liaisons (Fayad, 1997 ; Haran et *al.*, 1996a). Ces molécules qui sont synthétisées par des nombreux champignons sont soit extracellulaires ou cytoplasmiques, bien qu'elles soient généralement localisées dans la paroi cellulaire. Les β -glucanes assurent divers rôles, qui dépendent de leur taille, leur structure, leurs propriétés physicochimiques et en particulier leur localisation cellulaire. Les β -glucanes de la paroi fongique sont considérés principalement comme des polymères structuraux, maintenant la rigidité et conférant la protection aux champignons. Ce rôle est assuré également par d'autres composants de la paroi, en particulier la chitine, mais aussi par les α glucanes, les homo et les hétéropolysaccharides. Cependant, la nature et la localisation des β -glucanes dans la paroi, suggèrent qu'ils peuvent être aussi dégradés et utilisés comme source nutritive, après épuisement des nutriments externes, ou des changements dans la composition de la paroi cellulaire au cours de la morphogénèse (Haran et *al.*, 1996a). Les β -1,3 glucanes sont des constituants essentiels de la paroi cellulaire des champignons filamenteux de la division Ascomycota et la classes des Deutéromycètes. Ces molécules sont organisées sous forme de longs polymères linéaires de glucose avec quelques branchements en β -(1,6) (Figure 26). Chaque chaîne de β -1,3 glucane est constituée d'environ 1500 unités de glucose. Avec leur structure microfibrillaire, ces polymères peuvent participer à la rigidité des parois cellulaires. Les β -1,3 glucanes peuvent être liés covalamment à d'autres composés de la paroi, les régions non réductrices des chaînes de glucanes peuvent se lier aux extrémités réductrices de chaînes de chitine via des liaisons β -(1,4) (Lesage et Bussey, 2006).

Les glycosyle hydrolases qui agissent sur les β -glucanes sont produites par une grande variété d'organisme, chez les champignons qui sont les plus producteurs de ces enzymes, elles sont impliquées dans le développement, la signalisation et dans la lyse des parois cellulaires fongiques. Ces enzymes sont classées selon le type de liens β glycosidiques clivés et selon le mécanisme d'action sur le substrat. De façon générale, une β 1,3-glucanase scinde les liens β

(1,3) d'un polymère, une β -1,6-glucanase scinde les liens β (1,6), bien que les β -1,3-glucanase peuvent agir également sur les liaisons des β -(1,6)-glucanes mais avec une efficacité moindre (Fayad, 1997).

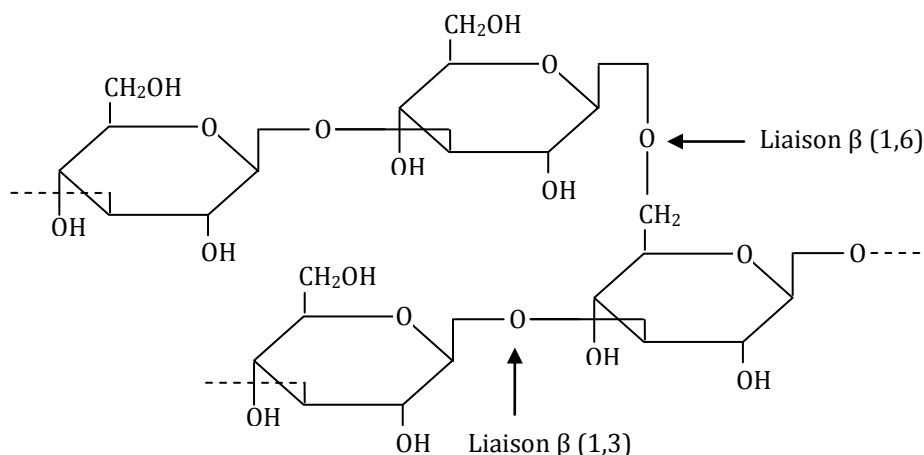


Figure 26 : Représentation générale de la structure de β -glucane.

➤ **β -1,3-glucanases** : Ces hydrolases sont rencontrées chez les plantes supérieures et les champignons, où elles participent dans leur développement normal et dans de nombreux processus biologiques. Elles sont impliquées dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes fongiques. Les β -1,3-glucanases sont synthétisées également chez les animaux marins et les bactéries (Lesage et Bussey, 2006 ; Cheng et *al.*, 2013). L'importance de ces enzymes dans la lutte biologique a été rapportée par de nombreux travaux. Ils ont montré que les β -1,3 glucanases avec les chitinases jouent un rôle crucial dans la dégradation des parois cellulaires et les sclérotés des champignons phytopathogènes, et elles sont corrélées souvent au mycoparasitisme (Mauch et *al.*, 1988 ; El-Katatny et *al.*, 2000). La caractérisation et la purification des β -1,3-glucanases extracellulaires produites par *Trichoderma* a fait l'objet de plusieurs études. Il a été prouvé que l'enzyme β -1,3-glucanase de *T. harzianum* même seule (purifiée) a pu inhiber la germination des spores et l'élongation des germes de *Botrytis cinerea* (Haran et *al.*, 1996a). Sur la base de leur mécanisme d'hydrolyse du substrat, les β -1,3-glucanases sont classées en deux types ;

- **Exo-1,3- β -D-glucanases (EC 3.2.1.58)** : qui libèrent des résidus glucose de l'extrémité non réductrice du substrat.

- **Endo-1,3- β -D-glucanases (EC. 3.2.1.6 et EC. 3.2.1.39) :** qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β -1,3-glucosidiques internes sur des sites aléatoires et libèrent des oligosaccharides courts (Cheng et *al.*, 2013).
 - **β -1,6-glucanases (EC 3.2.1.75):** Toutes les β -1,6-glucanases microbiennes purifiées montrent un mécanisme endoglucanolytique et la plupart possèdent une activité sur la laminarine (β -1,3-glucane mais qui contient aussi des liaisons de types β -1,6). Chez *Trichoderma harzianum*, la β -1,6-glucanase lytique purifiée libère seulement du gentiobiose comme produit final, contrairement aux autres β -1,6 glucanases lytiques (Lora et *al.*, 2005). Haran et *al.*, (1996a) ont rapporté que *Trichoderma harzianum* est capable de produire au moins deux enzymes de β -1,6-glucanases. L'une de ces deux enzymes a été purifiée, une synergie a été démontrée entre cette enzyme, les β -1,3-glucanases et les chitinases dans l'inhibition de la croissance des champignons testés et la dégradation de leur paroi cellulaire. *T. harzianum* est rapporté également comme productrice de l'exo- α -1,3-glucanases présentant des propriétés antifongiques (Ait-Lahsen et *al.*, 2001).

Les **protéines** constituent l'une des composantes majeures de la paroi cellulaire à côté des polysaccharides. Elles peuvent être associées à la paroi de façon covalente ou non covalente (Figure 27). Les CWP (*cell wall proteins*) sont des protéines associées de façon covalente à la paroi cellulaire et possèdent une teneur élevée en mannose polymérisé d'où l'appellation de mannoprotéines. Ces protéines jouent un rôle structural, participant au maintien du squelette cellulaire par leur association avec la chitine et les β -glucanes (Lesage et Bussey, 2006). Les CWP sont représentées par deux classes, dont la classe majeure est représentée par des protéines qui subissent un processus de glycosylation et d'ancrage aux membranes, via l'attachement d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). La liaison covalente des protéines GPI-CWP dans les parois des ascomycètes est établie par une liaison directe aux β -(1,6)-glucanes, qui relie les GPI-CWP aux β -(1,3)-glucanes. La deuxième classe de CWP contient des protéines avec des répétitions internes, les Pir-CWP (*protein with internal repeats*: Pir). Leur présence chez les ascomycètes et les deutéromycètes semble être universelle. Les Pir-CWP semblent être liées directement aux molécules de β -(1,3)-glucanes sans interconnexion avec les β -(1,6)-glucanes (Lesage et Bussey, 2006). La surface de la paroi fongique est recouverte de phosphopeptidomannane (PPM) non lié de manière covalente.

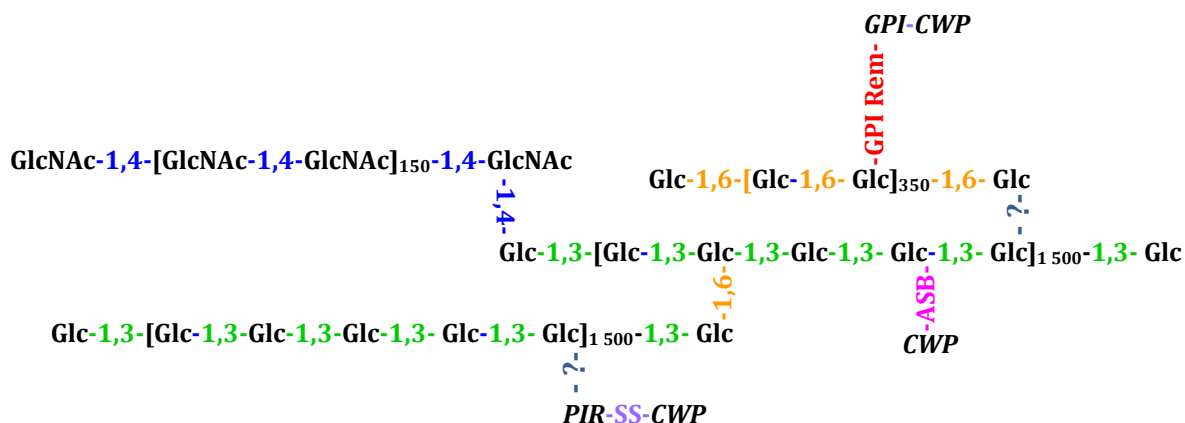


Figure 27: Architecture de la paroi cellulaire fongique (Lesage et Bussey, 2006).

Les liaisons glucosidiques β -(1,3), β -(1,4) et β -(1,6) sont présentées en vert, bleu et orange respectivement. Les mannoprotéines de la paroi cellulaire (CWP) peuvent être liées au β -1,3-glucane par des liaisons sensibles à l'alcalinité (ASB) ou à des PIR protéines (PIR) via une liaison disulfure (SS). GPI protéines de la paroi cellulaire (GPI-CWP) sont fixées à la β -1,6 glucane par une ancre GPI (GPI Rem). Les liens entre β -1,3-glucane et β -(1,6) ou Pir protéines sont encore non caractérisés.

Les mannoprotéines peuvent aussi être enzymatiques (hydrolases, lipases), contribuant à l'élaboration et aux modifications de la paroi, ou permettant la digestion des substrats dont la cellule a besoin pour sa croissance. Elles possèdent également une fonction majeure dans les processus de transition morphologique (Ruiz-Herrera et *al.*, 2006). Les protéases fongiques peuvent jouer un rôle important dans les activités antagonistes par la lyse de la paroi cellulaire au cours des interactions pathogène-hôte (Haran et *al.*, 1996a). Elles sont impliquées également dans l'inactivation des enzymes des pathogènes responsables aux infections des plantes (Protease pathogène). Pour la dégradation des protéines et les chaînes peptidiques, les espèces de *Trichoderma* produisent un large éventail d'enzymes protéolytiques extracellulaires à faible spécificité vis-à-vis de substrat, permettant puis à absorber les petits fragments d'acides aminés et de les utiliser comme sources d'azote et de soufre. Les enzymes protéolytiques identifiées chez les espèces de *Trichoderma* sont de multiples formes de sérlylprotéase et aspartylprotéase qui sont très communes dans la plupart des champignons saprophytes (Griffin, 1994). Sivan et Chet (1989a) ont trouvé qu'un prétraitement des hyphes de *Fusarium oxysporum* avec des enzymes protéolytiques de *Trichoderma harzianum* augmente leur susceptibilité à la lyse par la chitinase et la β -1,3-glucanase. Le système protéolytique extracellulaire de *Trichoderma harzianum*; acide, neutre et alcaline a été

largement étudié, ainsi que son importance dans l'activité des antagoniste est corrélé souvent à leur pouvoir mycoparasitaire (Szekeres et *al.*, 2004).

V.2. Matériel et méthodes

V.2.1. Matériel fongique

Les isolats testés dans la présente étude pour leurs activités en chitinase, protéase et β -1, 3-glucanase sont les quatorze isolats de *Trichoderma* spp. précédemment identifiés et caractérisés par rapport à leurs activités antagonistes, à savoir 10 isolats de *T. harzianum*, 2 isolats de *T. hamatum* et 2 isolats de *T. viride*. Les isolats pathogènes sont *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. verticillioides* présentés déjà dans le chapitre IV.

V.2.2. Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires

V.2.2.1. Production des enzymes hydrolytiques sur milieu semi-synthétique

Pour la production des enzymes hydrolytiques par les quatorze isolats de *Trichoderma* spp. nous avons utilisé un milieu synthétique minéral (MSM ; annexe 01) additionné de la source de carbone appropriée pour l'induction de la production de chaque enzyme. La culture est réalisée dans des erlens de 250 ml à raison de 50 ml du milieu contenant 1% de l'une des sources de carbone suivantes ; la laminarine, la chitine ou la caséine pour l'induction de la production de β -1,3 glucanase, la chitinase ou la protéase respectivement. Chaque erlen estensemencé par 4 disques (5 mm de diamètre) de l'une des cultures de *Trichoderma* spp. âgée de 5 à 7 jours, cultivée précédemment sur PDA. Les milieuxensemencés sont incubés à 30 °C pendant 7 jours sous agitation continue à 100 rpm. Les expérimentations sont répétées trois fois. Après 7 jours, les cultures sont filtrées sur papier Whatman 1 dans un bain de glace et les filtrats ont servi aux dosages des activités enzymatiques.

V.2.2.2. Production des enzymes hydrolytiques sur milieu complexe

Le milieu MSM est additionné de 1% du mycélium du pathogène servant comme une source de carbone et inducteur de la production des enzymes hydrolytiques par les isolats de *Trichoderma* spp. La paroi cellulaire de chaque champignon pathogène est préparée selon la méthode décrite par Sivan et Chet (1989a). Cette méthode consiste à inoculer chaque agent pathogène dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml d'un bouillon à base de dextrose de pomme de terre (PDB ; annexe 01). Les cultures sont incubées ensuite à 25 °C pendant 7

jours sous agitation. Le mycélium est recueilli ensuite par filtration, lavé soigneusement avec l'eau distillée stérile et homogénéisé dans la glace avec l'ultra turrax pendant 5 min à la vitesse maximale. La suspension du mycélium est ensuite centrifugée à 30000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot (les pellettes) est resuspendu dans l'eau distillée et soumis à une sonication par ultrasons dans la glace trois fois pendant 5 min. La suspension est centrifugée à 800 g pendant 10 min à 4°C plusieurs fois, le culot est ensuite recueilli et séché. La conduite de production et la récupération des extraits enzymatiques sont réalisées selon la même méthode décrite précédemment.

V.2.3. Détermination de l'activité spécifique de chaque enzyme

V.2.3.1. Dosage des protéines

La teneur en protéines dans les filtrats de culture a été évaluée par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le sérum d'albumine bovine (SBA ; annexe 05) comme protéine standard. Le principe de cette méthode repose sur l'interaction en milieu acide, entre les protéines et le colorant Bleu Brillant Coomassie G 250. La forme libre du colorant a une absorbance de 465 nm, elle devient de 595 nm après la formation du complexe colorant-protéines. Les données d'absorbance peuvent être utilisées avec la loi de Beer Lambert afin de déterminer la concentration en protéines ainsi que leur taux dans une solution donnée.

V.2.3.2. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par Kembhavi et *al.* (1993) en utilisant la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est composé de 0.5 ml du filtrat de culture et 0.5 ml de la solution de caséine (1% de caséine dans 50 mM de tampon phosphate, pH 7.0). Des témoins enzymes et caséines sont préparés. Les tubes des témoins et des mélanges réactionnels sont incubés à 50 °C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 ml de TCA à 20%. La lecture spectrophotométrique est effectuée à 288 nm. Une unité d'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µg de tyrosine par minute selon les conditions réactionnelles. L'activité spécifique est exprimée en unité enzymatique (U) par mg de protéine.

V.2.3.3. Dosage de chitinase et de β-1, 3-glucanase

Pour l'estimation de la production de chitinase et de β-1, 3-glucanase extracellulaires de chaque isolat de *Trichoderma* spp., nous avons adopté la méthode de Miller (1959) décrite in

Saadoun et *al.* (2009) et Lakshmi et Narasimha (2012) respectivement. Dans le cas de chitinase, le mélange d'essai est constitué de 1 ml du filtrat de culture et 1 ml de la suspension colloïdale de chitine (0.5% dans du tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0). Le mélange est incubé à 37 °C avec une agitation constante, un contrôle avec un substrat sans enzyme a été maintenu. Après 30 min, la réaction est arrêtée par l'addition de 2 ml de DNS, le développement de couleur est effectué au bain Marie bouillant pendant 5 min. La lecture spectrophotométrique est réalisée à 540 nm, où une unité d'activité enzymatique (U) est définie par la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole de N-acétylglucosamine par minute par ml du milieu selon les conditions réactionnelles. L'activité de β -1,3-glucanase est dosée en remplaçant la suspension de chitine colloïdale par 0.5 % de laminarine suspendu dans le même tampon. Le mélange réactionnel est incubé à 50 °C pendant 30 min, dont la réaction est arrêtée par l'addition de 2 ml de DNS suivie par une incubation au bain Marie bouillant pendant 5 min. Après le refroidissement, l'absorbance est mesurée à 540 nm et la quantité de sucre réducteur libéré a été calculée selon une courbe d'étalonnage du glucose réalisée préalablement (annexe 05)

V.2.4. Effet des paramètres abiotiques sur la production des enzymes

L'influence de la température et la salinité sur la production de chitinase, de β -1, 3-glucanase et de protéase extracellulaires par trois isolats de *Trichoderma* spp. sélectionnés selon leurs activités enzymatiques dosées dans les conditions standards et leurs capacités de protection de blé *in vivo*, est effectuée selon la méthode de Guiraud (1998). Les isolats de *Trichoderma* spp. sont incubés aux différentes températures (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 et 60°C) et l'activité spécifique de chaque enzyme est déterminée selon la méthode décrite préalablement. Le test de salinité est effectué, par la préparation du milieu PDB à diverses concentrations de NaCl allant de 0 à 2 M avec un intervalle de 0.25 M.

V.2.5. Etude de l'activité antifongique *in vitro*

L'activité antifongique des extraits enzymatiques produits par les isolats de *Trichoderma* spp. en milieu semi-synthétique est testée *in vitro* selon la méthode décrite par Lorito et *al.* (1993) avec quelques modifications. Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA supplémenté à 10 % avec le filtrat (stérilisé par filtration avec une membrane 0.2 μ m) de l'un des antagonistes, un disque de 5 mm de l'agent pathogène âgé de 5 à 7 jours cultivé préalablement sur milieu PDA est inoculé au centre de la boîte. Le témoin est préparé par

l'addition de l'eau distillée à la place de l'extrait enzymatique. Les boîtes sont incubées à 25 °C avec quatre répétitions pour chaque traitement. Le diamètre radial des colonies est mesuré quotidiennement jusqu'à que le témoin atteigne la périphérie de la boîte de Pétri, et le pourcentage de l'activité antifongique est calculée.

V.2.5. Analyse statistique

La corrélation entre l'activité hydrolytique de chaque enzyme produite en présence de l'un des *Fusarium* spp. et l'indice de maladie provoquée par l'agent pathogène correspondant est analysée par l'utilisation du coefficient de corrélation de Pearson. Les valeurs de $P < 0.01$ et $P < 0.05$ sont considérées comme significatives. L'analyse statistique a été réalisée par SPSS, la version 21.

V.3. Résultats

V.3.1. Activités enzymatiques

La production des enzymes hydrolytiques par les isolats de *Trichoderma* a été testée en utilisant deux milieux l'un synthétique et l'autre complexe à base de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogènes comme seule source de carbone. La paroi cellulaire des champignons pathogènes est dégradée par tous les isolats de *Trichoderma* et les activités spécifiques ont été calculées (Figure 28 et 29). Les activités chitinolytiques et protéolytiques les plus élevées sont obtenues par Thr.4 et Thr.8 de *T. harzianum* suivies par *T. hamatum* Thm.3 dans le cas de *F. graminearum*. Lorsque Thr.4, Thr.8 et Thm.3 sont cultivés sur ce milieu, les niveaux de chitinase sont de l'ordre de 4.10, 3.75 et 3.22 U/mg respectivement. En outre, l'activité protéolytique spécifique de *T. harzianum* Thr.4 (7.90 U/mg) est plus élevée que celle de *T. harzianum* Thr.8 (7.25U/mg) et *T. hamatum* Thm.3 (5.81 U/mg). Des activités protéolytiques et chitinolytiques élevées ont été également obtenues par *T. viride* Tv.6 et *T. harzianum* Thr.10 dans le même milieu. Ces deux isolats se sont avérés les plus producteurs de protéase et de chitinase en présence de *F. verticillioides*. Cependant, les activités enzymatiques les plus faibles sont observées avec *F. culmorum* chez la plupart des isolats de *Trichoderma*. Les activités spécifiques protéolytiques et chitinolytiques de *T. hamatum* Thm.7 sont les plus faibles avec la paroi cellulaire de trois isolats de *Fusarium*. L'isolat *T. viride* Tv.6 a montré l'activité spécifique en glucanase la plus élevée dans le cas de *F. graminearum* et *F. verticillioides* avec une production estimée à 5.78 et 3.84 U/mg respectivement. L'isolat *T.*

viride Tv.13 a présenté une activité glucanolytique importante sur les trois milieux complexes.

Les résultats obtenus après incubation des isolats de *Trichoderma* sur milieu MSM additionné de la source de carbone appropriée de l'enzyme à produire, ont montré des activités plus faibles que celles obtenues sur MSM additionné de la paroi cellulaire du *F. graminearum* et *F. verticillioides* pour les trois enzymes. En plus, le milieu synthétique a montré une faible variabilité inter et intraspécifique pour les trois enzymes comparé au milieu complexe. Les valeurs les plus élevées en protéase et chitinase sont enregistrées chez l'isolat *T. harzianum* Thr.4 avec une production estimée à 2.52 et 0.95 U/mg respectivement. Bien que dans le cas de la glucanase, c'est l'isolat *T. viride* Tv.13 qui a montré la valeur la plus élevée avec une production estimée à 2.32 U/mg (Figure 30).

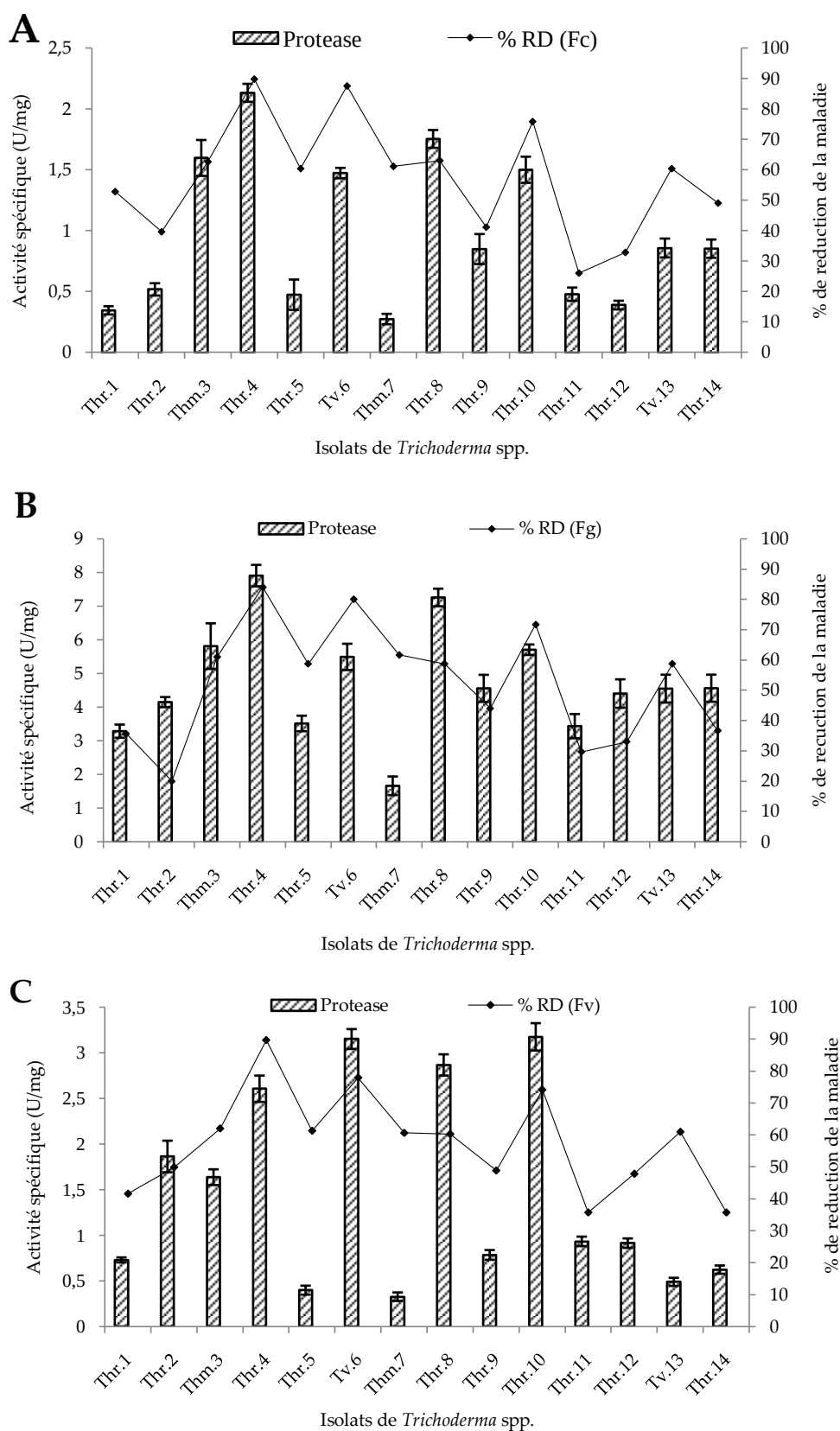


Figure 28: L'activité protéolytique spécifique des isolats de *Trichoderma* spp. sur MSM additionné de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogènes, (A): *F.culmorum*. (B): *F. graminearum*. (C): *F. verticillioides*. Thr. *T. harzianum*, Thm. *T. hamatum*, Tv. *T. viride*. % RD: % de réduction de la maladie. Chaque résultat est la moyenne de trois reliquats $\pm$ SD.

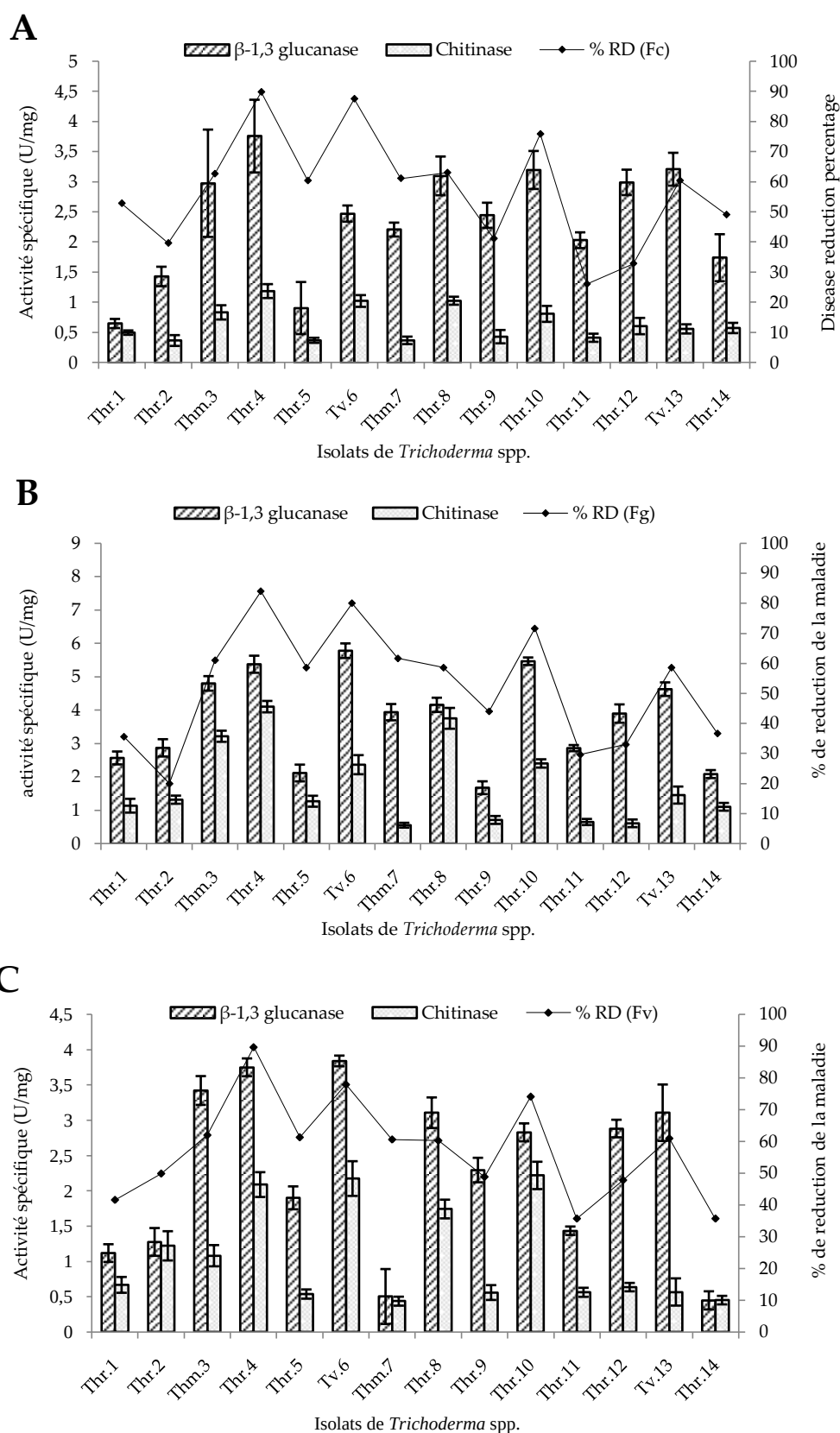


Figure 29: L'activité glucanolytique et chitinolytique produites par les isolats de *Trichoderma* spp. sur MSM additionné de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogène, (A): *F.culmorum*. (B): *F. graminearum*. (C): *F. verticillioides*. Thr. *T. harzianum*% RD: pourcentage de réduction de la maladie. Chaque résultat est la moyenne de 3 répliques $\pm$ SD

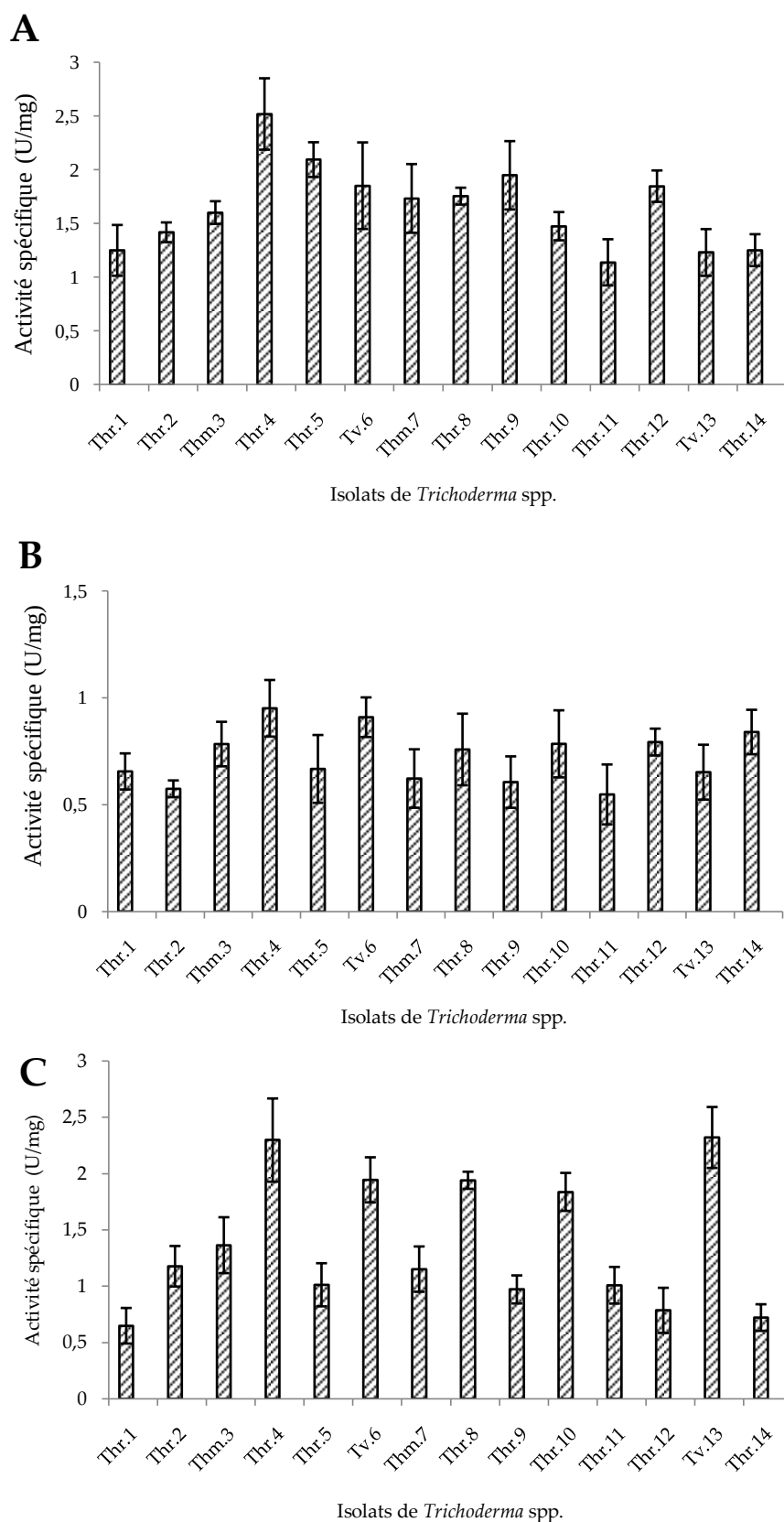


Figure 30: L'activité spécifique des trois enzymes produites par les isolats de *Trichoderma* spp. sur MSM. A : Protéase, B : Chitinase, C : β -1,3 glucanase. Thr. *T. harzianum*, Thm. *T. hamatum*, Tv. *T. viride*. Chaque résultat est la moyenne de trois réplicas $\pm$ SD.

V.3.2. Influence des paramètres abiotiques sur la production des enzymes

L'influence de la température et la salinité sur la production des hydrolases extracellulaires par trois isolats de *Trichoderma* spp a été évaluée *in vitro*. Les isolats *T. harzianum* Thr.4 et Thr.10 et *T. viride* Tv.6 ont été sélectionnés sur la base de leur pouvoir de protection de blé évalué *in vivo* et également leurs activités hydrolytiques testées sur deux milieux. L'analyse des résultats présentés dans les Figure 31 et 32 montre que la température et la salinité influencent grandement la sécrétion des hydrolases extracellulaires chez les trois isolats de *Trichoderma* spp. examinés.

La température optimale de sécrétion de protéase chez les deux isolats de *T. harzianum* Thr.4 et Thr.10 est de 40 °C avec une diminution notable de sa sécrétion à une température de 50 °C. Dans le cas de *T. viride* Tv.6, la production optimale de protéase est également notée à 40 °C, cependant une production très faible est enregistrée au delà de 45 °C. La température de sécrétion de chitinase chez les trois isolats de *Trichoderma* spp. testés est voisine de 35 °C avec une diminution considérable de sa production à partir de 45 °C. Dans le cas de β -1, 3-glucanase, les trois isolats de *Trichoderma* spp. ont présenté la même température optimale (40 °C) pour la sécrétion de cette enzyme avec une production très faible à 50 °C.

L'effet du facteur salinité sur la production des hydrolases extracellulaires par les trois isolats de *Trichoderma* spp. sélectionnés est étudié par l'addition des concentrations croissantes en NaCl au milieu de culture PDB et à la température optimale pour chaque isolat et chaque enzyme. Une concentration de NaCl de 1 M a abouti à une production maximale des hydrolases extracellulaires chez *T. harzianum* Thr.4 et *T. viride* Tv.6. Cependant, l'isolat *T. harzianum* Thr.10 isolé du sol environnant chott Tighdidine a montré une sécrétion maximale en protéase et β -1, 3-glucanase à une concentration de 1 et 1.25 M de NaCl respectivement. A 1.75 M, l'isolat *T. harzianum* Thr.10 garde plus de 50 % de sa production en protéase et glucanase. En parallèle et à une concentration de 1.75 M en NaCl, l'isolat *T. viride* Tv.6 ne garde que 32% de sa production optimale en protéase notée à 1 M de NaCl, le même isolat ne garde que 20 % approximativement de sa production maximale en chitinase et glucanase.

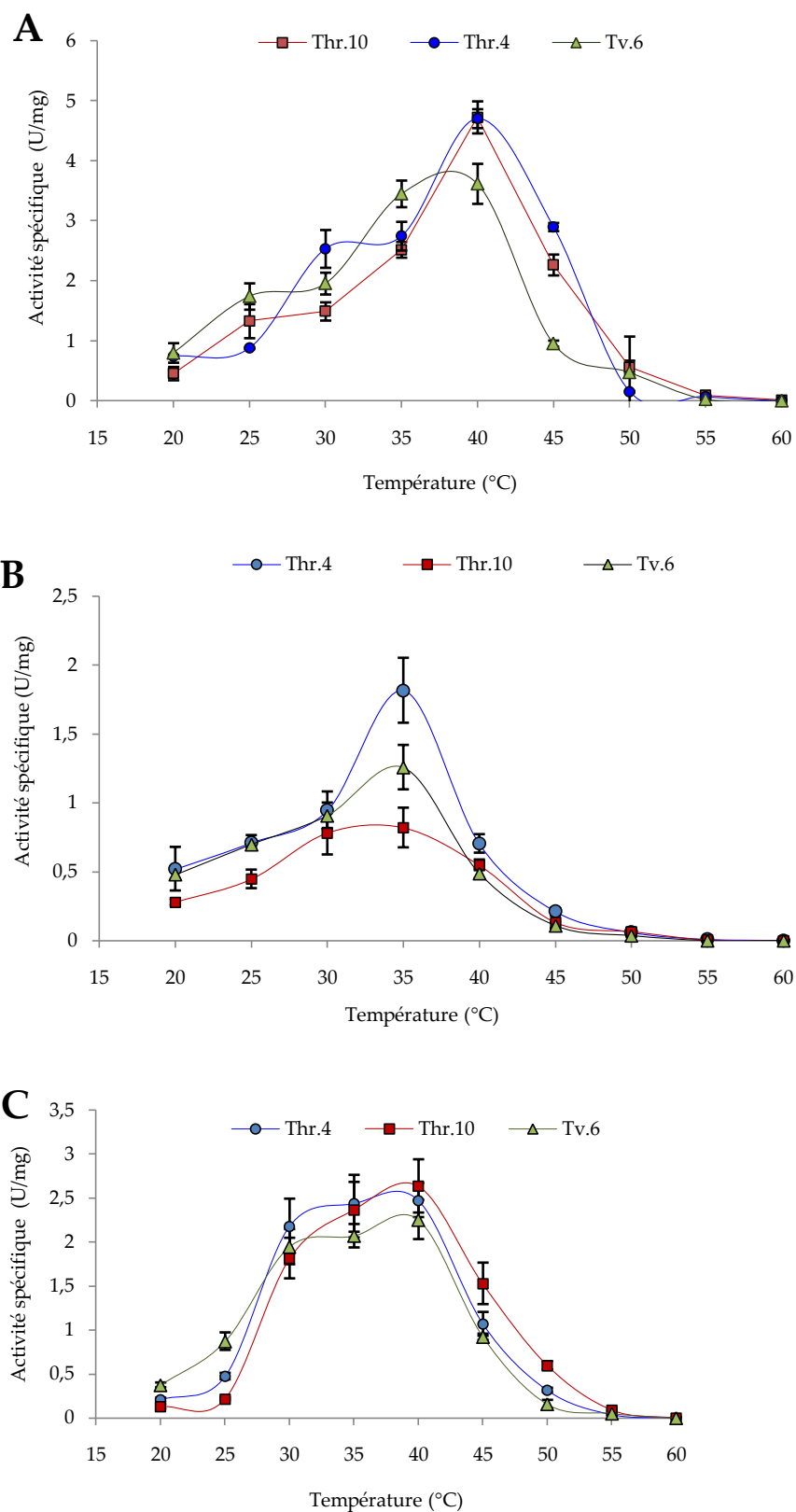


Figure 31: Effet de la température sur la production des hydrolases extracellulaires (A : Protéase, B : Chitinase, C : β-1, 3-glucanase) par les isolats *T. harzianum* Thr.4, *T. harzianum* Thr.10 et *T. viride* Tv.6. Chaque résultat est la moyenne de 3 réplicas $\pm$ SD.

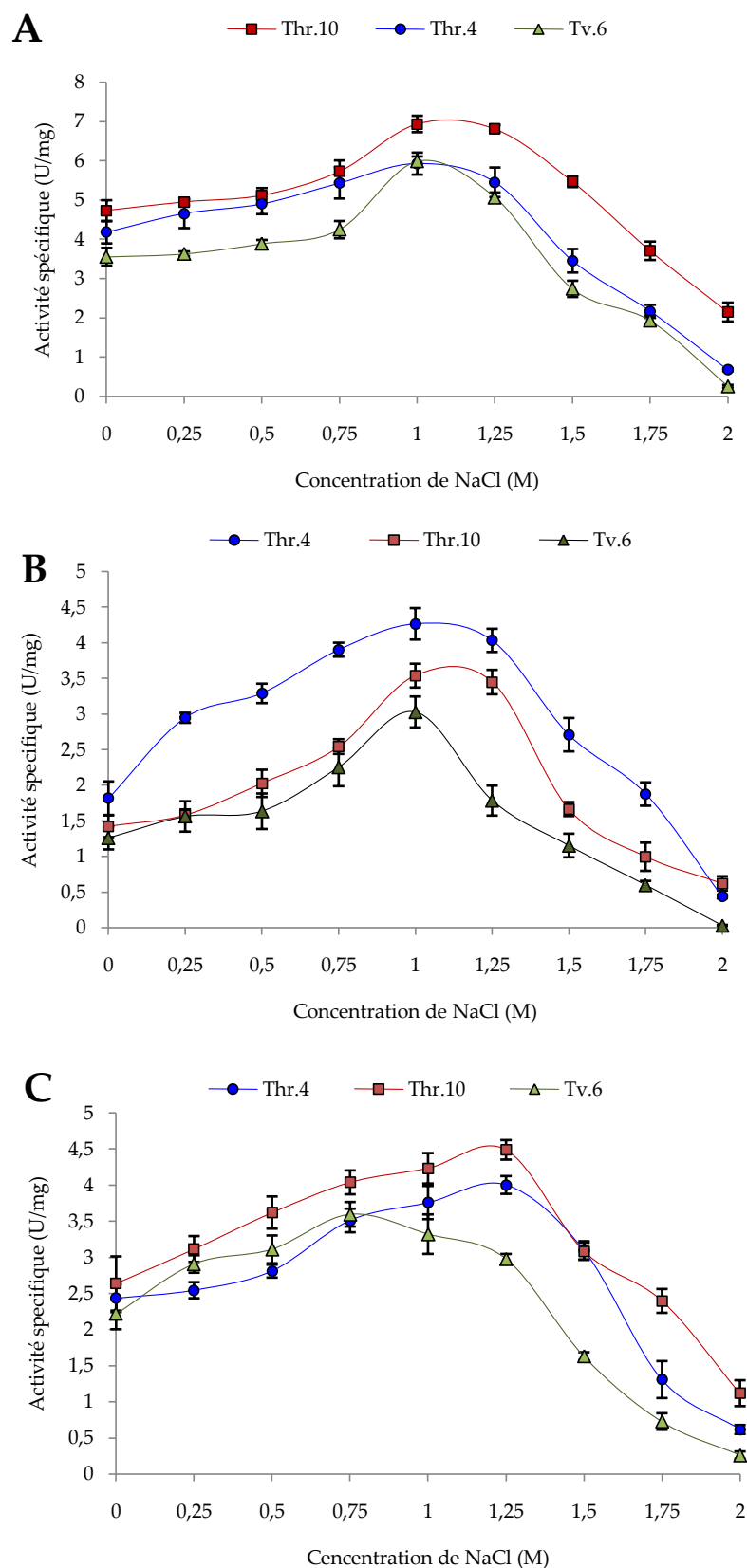


Figure 32: Effet de la salinité sur la production des hydrolases extracellulaires (A : Protéase, B : Chitinase, C : β -1, 3-glucanase) par les isolats *T. harzianum* Thr.4, *T. harzianum* Thr.10 et *T. viride* Tv.6. Chaque résultat est la moyenne de 3 répliques $\pm$ SD.

V.3.3. Activités antifongiques des extraits enzymatiques

Les résultats des activités antifongiques testées sur milieu solide vis-à-vis des trois isolats de *Fusarium* spp. ont montré que la plupart des extraits enzymatiques testés seuls n'ont pas exercé une action inhibitrice de la croissance mycélienne du pathogène (Tableau 13). A l'inverse, les extraits enzymatiques testés ensemble ont montré une réduction de la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. à partir du troisième jour comparés aux témoins. Les isolats *T. harzianum* Thr.4 et *T. viride* Tv.6 avec le mélange de leurs extraits enzymatiques ont présenté les pourcentages de réduction de la croissance mycélienne les plus élevés (de l'ordre de 30% à l'égard des trois pathogènes). En parallèle, une inhibition de la sporulation est observée, elle est plus au moins importante selon l'agent antagoniste. De même des modifications morphologiques sont enregistrées, telles que les changements de couleur des colonies, la viscosité, l'absence du mycélien aérien. Microscopiquement, l'extrait chitinolytique a provoqué les altérations morphologiques les plus importantes au niveau des hyphes des pathogènes par rapport aux extraits protéolytiques et glucanolytiques.

Tableau 13: Activité antifongique des extraits enzymatiques testés *in vitro*.

isolat	<i>F. culmorum</i>				<i>F. graminearum</i>				<i>F. verticillioides</i>			
	C	G	P	CGP	C	G	P	CGP	C	G	P	CGP
Thr.1	-	+	-	+	-	-	-	++	-	+	-	+
Thr.2	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Thm.3	-	+	-	++	-	-	+	++	+	-	-	+
Thr.4	-	+	-	++	+	+	-	+++	+	+	-	++
Thr.5	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Tv.6	+	-	-	+++	+	-	-	+	+	-	-	+++
Thm.7	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Thr.8	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	++
Thr.9	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	+	+
Thr.10	+	-	+	++	+	+	+	+	+	-	-	++
Thr.11	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Thr.12	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Tv.13	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	+	+
Thr.14	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	++

Thr : *Trichoderma harzianum*, Thm : *Trichoderma hamatum*, Tv: *Trichoderma viride*.

C : chitinase, G : β -1,3 glucanase, P : protéase, CGP : mélange des trois extraits enzymatiques, - : absence d'activité, + : >10 %, ++ : 10 à 20 %, +++: 20 à 30 %.

V.3.4. Corrélation entre l'activité enzymatique et le pouvoir de réduction de la maladie

Les coefficients de corrélation calculés entre l'activité hydrolytique des trois enzymes dosées à savoir ; la chitinase, la β -1,3 glucanase et la protéase et le pourcentage de réduction de la maladie provoquée par les trois isolats de *Fusarium* spp. sont résumés dans le tableau 14. Ces résultats montrent qu'une corrélation statistiquement significative existe entre toute activité enzymatique dosée en présence de la paroi cellulaire du champignon pathogène comme seule source de carbone et le pourcentage de réduction de la maladie provoquée par l'agent pathogène correspondant. Ces résultats montrent également que la signification est au seuil de 1% entre les trois activités enzymatiques étudiées et le pourcentage de réduction de la maladie dans le cas de *F. graminearum* et *F. verticillioides*, par contre elle est moins significative (au seuil de 5%) dans le cas de *F. culmorum* avec les trois enzymes.

Tableau 14: Coefficients de corrélation de Pearson calculés entre les activités enzymatiques et le pourcentage de réduction de la maladie.

* : corrélation au seuil de 5%, ** : corrélation au seuil de 1%.

Activité enzymatique	Pourcentage de réduction de la maladie		
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. verticillioides</i>
Protéase	0.701*	0.502**	0.523**
Chitinase	0.679*	0.662**	0.650**
β -1,3 glucanase	0.365*	0.708**	0.653**

V.4. Discussion

La production des enzymes hydrolytiques par les isolats de *Trichoderma* spp. sur MSM additionné de la paroi cellulaire de l'un des isolats de *Fusarium* spp. comme seule source de carbone, a indiqué son utilité comme inducteur de la production de ces enzymes. L'utilité du mycélium fongique dans l'induction de la production des enzymes par *Trichoderma* spp. a été également rapportée par Elad et al. (1982a), Sivan et Chet (1989a) et Geraldine et al. (2013). La plupart des isolats de *Trichoderma* spp. testés dans cette étude ont été capables de produire un niveau élevé de chitinase, de β -1,3 glucanase et de protéase lorsqu'ils sont cultivés en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum*, tandis que les parois cellulaires de *F. verticillioides* et notamment de *F. culmorum* se sont montrées moins efficaces comme inducteurs de la production des trois enzymes testées. Sivan et Chet (1989a) ont expliqué la différence en hydrolases produites par *T. harzianum*, en présence de la paroi cellulaire de l'une des espèces suivantes ; *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* ou des espèces de *Fusarium* par la teneur en protéines dans la paroi cellulaire de ces pathogènes. Dans la même référence, les auteurs ont rapporté que la paroi cellulaire des espèces de *Fusarium* contient plus de protéines (7-28%) que les autres champignons. Les études de la composition chimique des hyphes de *F. culmorum* ont indiqué que cette espèce contient plus de protéines que l'espèce *F. graminearum*, où dans cette dernière la teneur en protéine ne dépasse pas 4.5% (Laborda et al, 1974; Barbosa et Kemmelmeier, 1993). L'isolat *F. culmorum* qui a montré une résistance particulière à l'hydrolyse enzymatique dans cette étude, elle-même a montré une zone de lyse très réduite par rapport aux deux autres pathogènes en confrontations directes avec les différents antagonistes, sachant que la zone claire est expliquée selon Benhamou et Chet (1993) et Haran et al. (1996a) par une lyse enzymatique.

L'analyse des résultats du dosage de l'activité enzymatique obtenus après l'incubation des isolats de *Trichoderma* spp. sur les deux types de milieux a montré que les activités des trois enzymes produites sur MSM additionné de chitine, ou de laminarine ou de caséine sont plus faibles que celles produites sur MSM additionné de la paroi cellulaire de *F. graminearum* ou de *F. verticillioides*. Cependant, la paroi cellulaire de *F. culmorum* a conduit à des activités protéolytiques et chitinolytiques relativement comparables à celles obtenues en présence de caséine et de chitine respectivement. Il a été rapporté que certains gènes codant pour les enzymes impliquées dans la lyse du pathogène ne s'expriment qu'en contact avec ce dernier, certains sont exprimés avant le contact entre les deux champignons (antagoniste et pathogène) et d'autres après celui-ci (Carsolio et al., 1999 ; Zeilinger et al., 1999).

En parallèle, plusieurs études ont montré que la production de certaines enzymes lytiques est induite lors de l'interaction parasitaire entre *Trichoderma* spp. et certains champignons pathogènes (Carsolio et al., 1999). Le mycélium autoclavé ou la paroi des cellules fongiques peuvent remplacer la présence du pathogène et conduire à une production significative des hydrolases par *Trichoderma* spp. (Elad et al, 1982a; Geremia et al, 1993). Cela peut expliquer les teneurs élevées en activités hydrolytiques obtenues dans cette étude en présence de la paroi du pathogène par rapport aux autres substrats. Néanmoins et selon Benítez et al. (2004) la paroi cellulaire des agents pathogènes et la chitine peuvent induire le gène *nag1* codant pour la N-acétylglucosaminidase, mais son expression exige le contact avec le pathogène. Cependant, le gène *chit36Y* n'a pas besoin du contact direct avec l'agent pathogène pour qu'il s'exprime (Benítez et al., 1998). En effet, les chitinases de *T. harzianum* avec les gènes *nag1* et *ech42* ont été suivies lors de l'attaque de *Rhizoctonia solani* par fusion avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Le gène *ech42* codant pour l'endochitinase de 42-kDa, est exprimé avant le contact entre les deux champignons et *nag1* après celui-ci, où l'induction d'*ech42* est provoquée aussi en présence de la paroi cellulaire de *R. solani* (Zeilinger et al., 1999). Il a été montré également que le gène *chit33* codant pour une endochitinase impliquée dans le mycoparasitisme entre *T. harzianum* et *R. solani* est exprimé uniquement pendant leur contact et non pas avant la phase d'envahissement de ce pathogène. Dans la même étude, le gène *chit33* est montré être inductible soit par une carence du carbone ou d'azote et aussi par les conditions de stress thermique (De las Mercedes Dana et al., 2001).

Shakeri et Foster (2007) ont rapporté que chez deux souches de *T. harzianum*, la biomasse du champignon pathogène *Botrytis cinerea* est la meilleure source de carbone pour l'induction de la biosynthèse des chitinases comparée même à la chitine. Bien que, la caséine est montrée le substrat le plus inducteur de la production de protéases chez les mêmes souches de *T. harzianum* comparé à la paroi cellulaire de *B. cinerea*. En revanche, De laCruz et al. (1993) ont prouvé que la chitine est la meilleure source pour l'induction de la production de chitinase par *T. harzianum* par rapport à la paroi purifiée de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Botrytis cinerea* qui sont considérés également comme des inducteurs de la production de glucanases. Selon Vazquez-Garciduenas et al. (1998) l'activité la plus élevée de β -1,3 glucanase produite par *T. harzianum* sur un milieu minéral supplémenté de différentes sources de carbone y' compris la paroi mycélienne de *Mucor rouxii* ou *S. cerevisiae* est obtenue en présence de laminarine.

En outre, le milieu complexe a permis mieux de mettre en évidence la variabilité inter et intraspécifique des isolats avec les trois enzymes que le milieu semi-synthétique. Avec ce dernier, la plupart des antagonistes ont montré des valeurs proches en activité hydrolytique et en particulier en chitinase. Steyaert et *al.* (2004) ont rapporté que l'expression de différents gènes liés au mycoparasitisme chez les espèces de *Trichoderma* est hautement variable. Leur étude qui a été effectuée sur les espèces de *T. harzianum* et *T. hamatum* a révélé une variation interspécifique dans l'expression des trois gènes, à savoir *chit42*, *prb1* et *lam1.3* codant pour l'endochitinase, la protéinase et β -1,3-glucanase respectivement en réponse au même substrat le glycérol. Une variabilité intraspécifique est observée également entre les profils de sécrétion des enzymes extracellulaires correspondant aux souches de *T. harzianum* en réponse à des polysaccharides et des parois des cellules hôtes (Elad et *al.* 1982a, Mach et *al.* 1999). Selon Carsolio et *al.* (1999), le système chitinolytique de *T. harzianum* se compose en fonction de la souche elle-même de cinq à sept enzymes distinctes. Dans les meilleurs cas des *Trichoderma* spp. caractérisés, ce système est composé de deux β - (1,4)-N-acétylglucosaminidases (102 et 73 kDa) et quatre endochitinases. Les différents composants du système chitinolytique de *T. harzianum* impliquent probablement des modes d'action complémentaires des enzymes constitutives. Toutefois, l'ensemble du système peut être nécessaire pour une efficacité maximale. D'une autre part, dans tous les surnageants analysés chez *T. harzianum*, les protéases neutres ont été présentes, alors que la croissance de *T. harzianum* en présence des parois cellulaires fongiques stimule spécialement la synthèse et/ou la sécrétion de la protéase basique *prb*. Des polymères tels que la laminarine, pustulane et cinerean n'ont pas induit le gène *prb1*. Alors que, la chitine colloïdale a induit la sécrétion de protéase. Des niveaux élevés d'expression de *Prb1* ont été détectés lors de l'interaction de *T. harzianum* avec *R. solani* ou lorsque *T. harzianum* est cultivé en présence de la paroi cellulaire fongique (Kubicek et Harman, 1998). Une co-expression des deux gènes *chit42* et *prb1* est observée chez *T. hamatum* à l'inverse de *T. harzianum* dans les mêmes conditions (Steyaert et *al.*, 2004),

Plusieurs études ont décrit l'importance de β -1, 3 glucanase, des chitinases et des protéases des *Trichoderma* spp. dans la destruction des agents phytopathogènes au cours du phénomène mycoparasitaire. Ces enzymes sont responsables de la dégradation de la paroi des cellules fongiques qui contient de la chitine et la glucane noyées dans une matrice protéique (Elad et *al.* 1982a; Sivan et Chet, 1989a; Peberdy, 1990 ; Benítez et *al.*, 1998 ; Vazquez-Garciduenas et *al.*, 1998). Howell (2003) a rapporté que les protéases de *Trichoderma* spp. ne participent

pas seulement dans la destruction des protéines membranaires de champignons pathogènes mais aussi dans l'inactivation de leurs enzymes hydrolytiques.

La comparaison des résultats obtenus *in vivo* avec les activités enzymatiques testées en présence de la paroi cellulaire du pathogène comme seule source de carbone montre qu'une relation peut exister entre ces deux paramètres. Cette relation est confirmée par l'analyse statistique en calculant le coefficient de corrélation de Pearson. Malgré cette constatation, il n'est pas évident de résumer la capacité de lutte biologique des isolats examinés uniquement dans leur sécrétion enzymatique et négliger l'effet inhibiteur des autres métabolites et les autres modes d'action. En effet, il est intéressant de noter que les isolats de *T. harzianum* Thr.5, *T. hamatum* Thm.7, et *T. viride* Tv.13, qui ont montré une réduction importante de la maladie ($\approx 60\%$), ont montré des faibles niveaux d'activité hydrolytique, sachant que les deux derniers isolats sont démontrés efficaces par leur métabolites volatiles en confrontation indirecte. Cela peut être expliqué par le phénomène de synergisme, où plusieurs études ont rapporté que l'efficacité des enzymes lytiques dans la lutte biologique est due à leur fonctionnement en synergie avec d'autres métabolites secondaires ayant une activité antibiotique (Burmeister, 2008 ; Vinale *et al.*, 2008). La synergie peut être la raison, pour laquelle les souches de *Trichoderma* spp. peuvent être des agents potentiels dans la lutte biologique, bien que les activités de ses enzymes testées séparément ne sont pas suffisantes pour contrôler le champignon pathogène. En outre, ces enzymes peuvent améliorer en synergie l'effet des antibiotiques réduisant ainsi la quantité de fongicides nécessaires pour contrôler les agents pathogènes. La participation des métabolites volatiles avec la sécrétion des hydrolases extracellulaires a été également montrée chez des isolats de *T. harzianum* en contrôle biologique (Schirmböck *et al.*, 1994). Cela peut expliquer également les pourcentages de réduction de la maladie proches entre *F. culmorum* et *F. graminearum* obtenus avec les différents antagonistes, dont la première souche est apparue la plus sensible au mycoparasitisme et aux métabolites volatiles en confrontation directe et indirecte, par contre elle s'est montrée la plus résistante à l'hydrolyse enzymatique. A l'inverse, *F. graminearum* a présenté une résistance particulière aux métabolites volatiles avec une sensibilité à l'hydrolyse enzymatique.

Kapat *et al.* (1998) et Elad et Kapat (1999) ont suggéré que la capacité de lutte biologique de *T. harzianum* T39 à l'égard de *B. cinerea* peut être due en partie à l'action de ses enzymes protéolytiques. Les proteases décomposent les enzymes hydrolytiques de *B. cinerea* en chaînes peptidiques et/ou leurs acides aminés constitutifs, et répriment ainsi leur capacité

d'agir sur les cellules végétales. Les auteurs ont montré que des solutions de protéases produites par *T. harzianum* T39 appliquées sur les feuilles d'haricots infectées par l'agent pathogène ont désactivé leurs enzymes hydrolytiques et ont réduit l'incidence de la maladie avec un pourcentage de réduction de 56 à 100%. Une absence de biocontrôle est observée en présence des inhibiteurs de protéases. Les travaux de Woo et *al.* (1999) qui ont été réalisés sur deux souches de *T. harzianum*, l'une sauvage (P1) et l'autre mutée déficiente en endochitinase (*chi42*) ont montré que cette dernière a présenté le même effet de biocontrôle contre *Pythium ultimum* que la souche sauvage P1, bien que le potentiel antagoniste de la souche mutante à l'égard de *B. cinerea* testé sur les feuilles d'haricot a été significativement réduit de 33 % par rapport à la souche P1. A l'inverse, la souche déficiente en endochitinase a présenté un pouvoir antagoniste mieux que la souche sauvage avec une amélioration de 16 % de survie dans le sol infesté par le champignon tellurique *Rhizoctonia solani*. Ces résultats confirment que l'interaction antagoniste entre chaque souche antagoniste et les trois agents pathogènes est basée sur des mécanismes différents. Par ailleurs, il a été rapporté que la formation parallèle ou le synergisme de plusieurs hydrolases et les antibiotiques a un rôle important dans l'action d'antagonisme des *T. harzianum* à l'égard des champignons pathogènes (Kubicek et Harman, 1998). Cela peut expliquer les pourcentages faibles d'activité antifongique obtenus dans cette étude même en présence des trois enzymes, par rapport aux pourcentages de réduction de la croissance mycélienne calculés en confrontation directe (chapitre IV).

Le synergisme peut expliquer également l'activité antifongique élevée des trois enzymes testée ensemble par rapport à l'activité de chaque enzyme testée séparément à l'égard des trois souches de *Fusarium*. Mauch et *al.* (1988) ont montré également que le mélange de l'extrait pur de chitinase et β -1,3-glucanase a inhibé tous les champignons pathogènes testés, bien que l'extrait pur de chaque enzyme testé individuellement a inhibé que quelques champignons testés. Le test de l'activité antifongique a montré également que l'extrait chitinolytique de chaque isolat à l'égard des trois agents pathogènes est le plus efficace pour l'inhibition de la sporulation par rapport aux extraits protéolytiques et glucanolytiques. Lorito et *al.* (1993) qui ont testé l'activité antifongique des endochitinase et exochitinase (chitobiosidase) purifiées produites par la souche *T. harzianum* P1 ont expliqué leur efficacité par le synergisme de leur mode d'action. L'efficacité de ces enzymes est évaluée par rapport à leur capacité d'inhibition de la germination des spores et l'élongation des tubes germes à l'égard des différentes espèces fongiques. Les auteurs ont constaté que le degré d'inhibition de ces deux paramètres est proportionnel avec la teneur de chitine dans la paroi cellulaire des

champignons. Néanmoins nos résultats ont montré que l'activité antifongique ne dépend pas de l'agent pathogène, bien que celle de la protéase et de la chitinase dépendent relativement de l'activité hydrolytique de ces deux enzymes dosées en présence de la paroi cellulaire du pathogène correspondant comme seule source de carbone.

L'estimation de l'activité hydrolytique de la protéase, de la chitinase et de la β -1, 3-glucanase en fonction de différentes concentrations de NaCl et différentes températures d'incubation a permis de montrer le rôle majeur de ces facteurs abiotiques sur la sécrétion de ces enzymes. Chez les trois isolats de *Trichoderma* spp. (Thr.4, Thr.10 et Tv.6) sélectionnés selon leur capacité de biocontrôle et leurs activités hydrolytiques testées dans les conditions standards, la production maximale des hydrolases est estimée à une température variant entre 35 et 40 °C avec une production faible à 50 °C. En effet, la température de 40 °C notée comme optimale pour la sécrétion de β -1,3-glucanases et de protéases est montrée limitative pour la croissance mycélienne des différents isolats de *Trichoderma* spp. (Résultat présenté dans le chapitre III). Des résultats similaires ont été rapportés par Saravanakumar et Kathiresan (2014) pour la production de protéase par *T. estonicum*, de chitinase par *T. asperellum* (Kumar et al., 2012) et de β -glucanase (Gautam et al., 2011). La sécrétion des enzymes hydrolytiques par les trois isolats de *Trichoderma* spp. est affectée également par le facteur salinité. La concentration idéale de NaCl pour une production maximale de protéase, de β -1,3-glucanase et de chitinase est autour de 1 à 1.25 M. Selon certains travaux, une production maximale que nos même enzymes testées et proche à nos résultats est observée à une concentration en NaCl de 3%, ce qui correspond à une concentration molaire d'environ 0.5 M (Gautam et al., 2011; Kumar et al., 2012 ; Saravanakumar et Kathiresan 2014). Au cours de notre étude d'identification des isolats de *Trichoderma* spp. (chapitre III) on a noté qu'une concentration de 1 M de NaCl est limitative pour la croissance mycélienne, où on a enregistré une très fiable croissance chez tous les isolats même *T. harzianum* Thr.10 isolé du sol environnant chott Tighdidine, avec absence totale de croissance à 1.5 M. Cela nous a permis de conclure que la concentration idéale pour la production des hydrolases extracellulaires par les trois isolats de *Trichoderma* spp. examinés est limitative à leur croissance mycélienne. Cette constatation est rapportée par Kredics et al. (2004) en étudiant l'influence de l'activité en eau (a_w) sur la sécrétion des hydrolases extracellulaires par différentes souches de *Trichoderma* spp.

V.5. Conclusion

Les activités hydrolytiques de chitinase, de β , 1-3 glucanase et de protéase dosées dans les filtrats de cultures de chaque agent antagoniste en présence de substrats inductibles ou de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogènes comme seule source de carbone a permis de mettre en évidence un niveau élevé d'activité en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum* et *F. verticillioides* par rapport à *F. culmorum*. Par ailleurs, une corrélation plus significative au seuil de 1% est trouvée entre la capacité des isolats de *Trichoderma* spp. en biocontrôle et leurs activités enzymatiques dégradants la paroi cellulaire de *F. graminearum* et *F. verticillioides* par rapport à celle trouvée dans le cas de *F. culmorum*. Cela reflète le rôle essentiel du système enzymatique extracellulaire des isolats de *Trichoderma* spp. en biocontrôle.

Pour mettre en place une stratégie de lutte adaptée contre la pourriture racinaire et du collet de blé, il était nécessaire d'étudier l'influence de la température et la salinité comme facteurs abiotiques sur la sécrétion d'hydrolases extracellulaires par trois isolats de *Trichoderma* spp. sélectionnés selon leur capacité de biocontrôle et leur activité enzymatique testée dans les conditions standards. La présente étude a montré que la sécrétion maximale des trois enzymes testées s'effectue dans les conditions défavorables à la croissance mycélienne des isolats examinés. Notre étude a révélé également des informations utiles pour une application efficace de nos isolats dans les sols agricoles des régions arides dans le cadre d'une lutte biologique.

CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES

Pour une stratégie de lutte biologique efficace, il est indispensable de préciser l'influence des facteurs écologiques sur l'antagoniste. Ce travail de thèse qui est abordé pour la première fois est réalisé dans le but d'étudier l'impact des facteurs écologiques sur la répartition des *Trichoderma* spp. dans les sols Sahariens, ainsi que sur leur activité antagoniste, ce qui permet d'augmenter les possibilités d'isolement des antagonistes a tolérance accrue aux conditions environnementales défavorables, et/ou d'augmenter leur efficacité d'application dans les régions arides. La caractérisation des isolats de *Trichoderma* spp., l'étude de leur activité antagoniste et hydrolytique à partir d'expérimentations en conditions contrôlées, ont permis de mettre en évidence des éléments clés nécessaires à la compréhension de leur efficacité comme agent de lutte biologique contre trois isolats d'espèces différentes de *Fusarium* spp. causant la pourriture racinaire et de collet de blé dur. Ces éléments sont synthétisés et discutés de façon plus générale dans cette dernière partie.

La première conclusion qu'il convient de tirer est que les espèces des moisissures les plus fréquentes dans les sols du Sahara Algérien sont similaires à celles décrites dans d'autres environnements désertiques et hypersalins. Cependant, le genre *Trichoderma* faisant l'objet de notre étude et malgré sa citation comme un genre dominant dans les sols des régions arides, n'a montré qu'une faible abondance relative dans tous les sites, et en particulier dans le premier biotope groupant les trois chotts avec une absence totale dans les sites hypersalins. Pour comprendre comment certains facteurs écologiques président la distribution et la diversité des *Trichoderma* spp. par rapport à d'autres facteurs, nos données sont traitées préalablement par l'analyse de corrélation suivie par l'analyse canonique des correspondances. Cette dernière analyse a mis en évidence une corrélation nette entre l'abondance des *Trichoderma* spp. et la teneur de la matière organique, à l'inverse une corrélation négative existe avec la teneur en sel. Bien que pour sortir avec une conclusion concernant l'impact des facteurs édaphiques analysés sur la diversité des espèces de *Trichoderma*, il serait nécessaire de disposer d'un grand nombre d'isolats appartenant à chaque espèce, avec une collection plus importante de cette dernière. La présente étude ayant porté sur seulement trois espèces, avec une abondance relative très faible de l'espèce *T. viride* et de *T. hamatum*. Il est difficile alors de répondre à cette question, mais l'isolement d'autres souches, peut permettre d'étayer ce sujet. En parallèle des facteurs abiotiques, les facteurs biotiques les plus significatifs (corrélation négative) sont apparus des bactéries ; qui sont des *Pseudomonas* et des actinomycètes, confirmant leur aptitude à produire des métabolites antagonistes qui peuvent menacer ou même inhiber la présence des *Trichoderma* spp. Cela a

permis d'émettre l'hypothèse que la réunion de ce facteur avec le facteur abiotique « salinité » peut être la raison pour laquelle les *Trichoderma* spp. sont absents des sols de chott Melghir et Merouane qui sont les plus salés et les plus peuplés par ces bactéries.

Dans la première partie de ce travail nous nous sommes intéressés à l'identification de chaque isolat de *Trichoderma* spp. au niveau d'espèce. Sur le plan taxonomique, nous avons enregistré que les espèces du genre *Trichoderma* étant très difficiles à classer systématiquement. Les caractères morphologiques n'étant pas entièrement sélectifs à cause de la grande similitude qui existe entre les espèces, ces critères sont doués d'une grande plasticité et la taxonomie basée uniquement sur les critères morphologiques chez le genre *Trichoderma* n'est pas suffisante. L'analyse de profil métabolique (carbone et d'azote) de chaque isolat ainsi que le suivi de leur comportement vis-à-vis de la température sont exploités comme outil taxonomique supplémentaire. En plus, nous avons envisagé d'approcher cet aspect par un séquençage de la région ITS (ITS1, 5.8 et ITS2). Le principe reposé sur la combinaison de techniques standardisées d'analyse moléculaire à celles phénotypiques est avéré très utile pour clarifier l'identité de nos isolats de *Trichoderma* spp. En effet, à la fin de cette partie, il est apparu que ces méthodes sont délicates, laborieuses et longues. Pour ces raisons, il nous a paru intéressant le séquençage ultérieurement d'une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation de la traduction des protéines EF-1 α (*Elongation Factor*).

Afin de réaliser le second objectif de cette thèse, l'activité antagoniste de nos isolats de *Trichoderma* spp. est étudiée préalablement par des tests *in vitro* qui ont permis de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec les trois isolats de *Fusarium*. Nous avons enregistré une variabilité du pouvoir antagoniste entre les isolats de la même espèce, qui ont des comportements relativement proches. La plupart des isolats de *T. harzianum* ont démontré leur pouvoir mycoparasitaire, cependant les isolats appartenant à l'espèce de *T. hamatum* et *T. viride* sont les plus efficaces par leur sécrétion en substances volatiles. Par ailleurs, des mécanismes de détoxification qui diffèrent selon l'agent pathogène peuvent expliquer l'effet inhibiteur inégal entre les trois espèces de *Fusarium* à l'égard du même agent antagoniste. En parallèle, nous avons enregistré la sensibilité de *F. culmorum* au mycoparasitisme et aux métabolites volatiles des agents antagonistes comparés à *F. verticillioides* et *F. graminearum*, cette dernière est apparue la plus agressive *in vivo*. De même l'étude de l'activité antagoniste nous a permis de déduire qu'une relation peu exister

entre le potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp *in vitro* et leur efficacité dans la protection du blé *in vivo*. Cependant, aucune relation n'existe entre le potentiel antagoniste de nos isolats et leurs origines.

Actuellement, il est bien connu que les enzymes sont parmi les biomolécules les plus importantes qui permettent la compréhension d'adaptation écologique des organismes aux multiples stress, elles mêmes sont décrites comme étant des éléments clés dans l'activité antagoniste des différentes espèces de *Trichoderma*. Dans ce cadre, une recherche des activités enzymatiques (chitinase, β , 1-3 glucanase et protéase) est effectuée dans les filtrats de cultures de chaque agent antagoniste en présence de substrats inductibles ou de la paroi cellulaire de l'un des agents pathogènes comme seule source de carbone, cette recherche a permis de mettre en évidence la sécrétion des enzymes responsables de la dégradation des constituants de la paroi de *Fusarium* spp. Par ailleurs, nous avons enregistré une corrélation statistique entre l'activité catalytique des trois enzymes dosées en présence de la paroi du pathogène et la capacité de protection de blé par les antagonistes testée *in vivo*. Cette corrélation est moins significative dans le cas de *F. culmorum* qui est apparue la plus sensible lors des tests d'activité antagoniste *in vitro*, mais la plus résistance à l'hydrolyse enzymatique, à l'inverse de *F. graminearum* qui a montré une résistance particulière lors des tests *in vitro*, une agressivité *in vivo* et une sensibilité à l'hydrolyse enzymatique. Ces résultats reflètent clairement le rôle essentiel de ces hydrolases dans la lutte biologique. Nous avons également déduit une nette influence de la température et la salinité sur la production des hydrolases et on a conclu que le facteur abiotique «salinité» n'a pas uniquement une influence sur la distribution des *Trichoderma* spp. mais aussi sur leur sécrétion enzymatique qui jouent un rôle primordial dans leur activité antagoniste.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Abdel-Hafez, S.I.I.** 1982. Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soil of Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 80: 15-20.
- Abdel-Latif, H. & Haggag, W.** 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:181-191.
- Abduallah, S.K., Al-khesraji, T.O. & Al-Edany, T.Y.** 1986. Soil mycoflora of the southern desert of Iraq. *Sydowia*, 39: 8-16.
- Adachi, M., Sake, Y. & Ishida, Y.** 1996. Analysis of Alexandrium (dinophyceae) species using sequences of the 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions1. *Journal of Phycology*, 32: 424-432.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De la Cruz, J., Monte, E. & Llobell, A.** 2001. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5833–5839.
- Agrios, G. N.** 2005. Plant pathology. 5 ed. Academic Press. 922 p.
- Aguilera, L. E. Gutierrez, J. R. & Meserve, P. L.** 1999. Variation in soil microorganisms and nutrients underneath and outside the canopy of *Adesmia bed welli* (papilionaceae) shrubs in arid coastal chile following drought and above average rainfall. *Journal of Arid Environments*, 42: 61-70.
- Alexander, M.** 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic press, New York. 302p.
- Alexopoulos, C. J. & Mims, C.W.** 1979. Subdivision *Zygomycotina*. In "Introductory Mycology". John Wiley & Sons. New York, pp : 127-171.
- Aneja, M., Gianfagna, T.J. & Hebbar, P.K.** 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 304-307.
- Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T. & Chelkowski, J.** 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147: 577-590.
- Aubert, G.** 1978. Méthode d'analyse des sols. CRDP., Marseille, 191 p.

-B-

- Banakar, S.P, Thippeswamy, B., Thirumalesh, B. V. & Naveenkumar, K.J.** 2012. Diversity of soil fungi in dry deciduous forest of Bhadra Wildlife Sanctuary, western ghats of southern India. *Journal of Forestry Research*, 23: 631-640.
- Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D. & Chet, I.** 1985. Lectins: A possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 75: 458-462.

- Barbosa, I. P. & Kemmelmeier, C.** 1993. Chemical composition of the hyphal wall from *Fusarium graminearum*. *Exp. Mycol.*,17: 274-283.
- Batista-Garcia, R.A, Balcazar-Lopez, E., Miranda-Miranda, E., Sanchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztan-Hernandez, K., Morales-Herrera, C., Rodriguez-Hernandez, R. & Folch-Mallol, J.** 2014. Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0105893.
- Benhamou, N. & Chet, I.** 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*, 83: 1062-1071.
- Benhamou, N. & Chet, I.** 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Benhamou, N. & Chet, I.** 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2095–2099.
- Benítez, T., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Rey, M. & Limón, MC.** 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai, S.G. (ed.): Recent research developments in microbiology (vol. 2). Research Signpost, Trivandrum, pp: 129-150.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. & Codón A. C.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7:249-260.
- Bennett, J.W. & Klich, M.** 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16:497-516.
- Bensaci, E., Saheb, M., Nouidjem, Y., Bouzegag, A. & Houhamdi, M.** 2013. Biodiversité de l'avifaune aquatique des zones humides sahariennes : cas de la dépression d'Oued Righ (Algérie). *physio-geo* 7 :211-222.
- Biles, C.L. & Hill, J.P.** 1988. Effect of *Trichoderma harzianum* on sporulation of *Cochliobolus sativus* on excised wheat seedling leaves. *Phytopathology*, 78: 656-659.
- Bissett, J.** 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec.nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- Bissett, J.** 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.
- Bissett, J.** 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2373-2417.

- Bissett, J.** 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany, 70: 639-641.
- Boiron, P.** 1996. Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris, pp : 19-79.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. & Veau P.** 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. 488 p.
- Bouchet, P., Ghignard, J.L., Pouchus, Y.F., Villard, J.** 1999. Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée, 2^{ème} édition, Masson. 190 p.
- Bouregghda, H., Djeghmoum, C. & Bouroubi, N.** 2010. Study of *In vitro* growth and pathogenecity of some isolates of *Fusarium* spp. causal agent of *Fusarium* head scab and root rot of Wheat. Abstract Book of 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union .20-25 June 2010, Rome, Italy.
- Bourguignon, E.** 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Thèse de doctorat, Université de Lincoln-Canterbury, New Zealand, 235 p.
- Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K. A. & Maupin- Furiow, J.A.** 2011. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. J. Arid. Environ., 75: 909-916.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem.,72: 248-54.
- Branham, B.E. & Plattner, R.D.** 1993. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia, 124: 99-104.
- Braun, P.C. & Calderone, R.A.** 1978. Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. J. Bacteriol., 133: 1472-1477.
- Bruelheide, H. & Udelhoven, P.** 2005. Correspondence of the fine-scale spatial variation in soil chemistry and the herb layer vegetation in beech forests. Forest ecology and management, 210: 205-223.
- Burmeister, L.** 2008. The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. These de doctorat, université de gottfried wilhelm Leibniz, hanovre, Allemagne, 135p.

-C-

- Calvet, G. & Villemain, P.** 1986. Interprétation des analyses des terres, SCPA., France, 25 p.
- Calistru, C., McLean, M. & Berjak, P.** 1997. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. Mycopathologia, 137: 115-124.

- Camporota, P.** 1985: Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie* 5, 613-620.
- Cantrell, S. A., Casillas-Martinez, L. & Marirosa, M.,** 2006. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, 110: 962-970.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. & Gooday, G. W.** 2001. *The fungi*, Academic press, London, 588 p.
- Carratù, M.R, Cassano, T., Coluccia, A., Borracci, P. & Cuomo, V.** 2003. Antinutritional effects of fumonisin B1 and pathophysiological consequences. *Toxicology Letters*, 140-141: 459-463.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A.** 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 929-935.
- Champeil, A., Dore, T., & Fourbet, J. F.** 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166: 1389-1415.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A. Overton, B.E. & Samuels, G.J.** 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95:1100-1140.
- Cherif, M. & Benhamou, N.** 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 80: 1406-1414.
- Chet, I., Benhamou, N. & Haran, S.** 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman, G.E. & Kubicek, C.P. (Eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London, pp:153-172.
- Chet, I., Harman, G. E. & Baker, R.** 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7: 29-38.
- Chet, I.** 1987. *Trichoderma* applications, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (ed.): *Innovative approaches to plant disease control*. John Wiley and Sons, New York, pp: 137-160.
- Cheng, R., Chen, J., Yu, X., Wang, Y., Wang, S. & Zhang, J.** 2013. Recombinant production and characterization of full-length and truncated β -1,3-glucanase PglA from *Paenibacillus* sp. S09. *BMC Biotechnology*, 13:105-115.
- Cook, R. J.** 1980. *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 64: 1061-1066.

-D-

- Dal Bello, G. M., Monaco, C. I. and Simon, M. R.** 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 627-636.
- Dandurand, L.M. & Knudsen, G.R.** 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere. *Phytopathology*, 83: 265-270.
- Danielson, R.M. & Davey, C.B.** 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 505-515.
- Davet, P.** 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.
- Davet, P. & Comporota, P.** 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. & Rouxel, F.** 1997. Détection et isolement des champignons du sol. INRA., Paris, 203 p.
- De la Cruz, J., Rey M., Lora, J.M. Hidalgo-Gallego, A., Dominguez, F., Pintor-Toro, J.A. Liobell, A. Benitez, T.** 1993. Carbone source control on β -glucanase, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol.*, 159: 316-322.
- De las Mercedes Dana, M., Limón, M.C., Mejías, R, Mach, RL, Benítez, T, Pintor-Toro, JA, Kubicek, CP.** 2001. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet.* 38: 335-42.
- Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M.A., Benítez, T.** 2003. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. *Euk Cell*, 2:708-717.
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, MA., Jiménez-Bremont, J.F. & Flores, J.** 2011. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biol.* 13:154-159.
- Demirel, R., Ilhan, S., Asan, A., Kinaci, E. & Oner, S.** 2005. Microfungi in cultivated fields in Eskisehir provience, J. Basic. Microbiol., 45 : 279-293.
- Demnati, F., Allache, F., Ernoul, L. & Samraoui, B.** 2012. Socio-economic stakes and perceptions of wetland management in an arid region: A case study from Chott Merouane, Algeria. *AMBIO.*, 41: 504-512.
- Dennis, C. & Webster, J.** 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57: 41-48.

- Desjardins, A. E.** 2006. *Fusarium* mycotoxins chemistry, genetics and biology. The American Phytopathol Soc; APS Press, pp: 13-19.
- Diamond, H. & Cooke, B.M.** 2003. Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protection*, 22: 99-107.
- Dodd, S. L., Lieckfeldt, E. & Samuels, G. J.** 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.
- Donoso, E. P., Bustamante, R. O., Carú, M. & Niemeyer, H. M.** 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1412-1417.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C.P.** 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B:100-112. DOI:10.1631/jzus.2005.B0100.
- Dubey S.C. & Patel, B.** 2001. Evaluation of fungal antagonists against *Thanatephorus cucumeris* causing web blight of urd and mung bean. *Indian Phytopath.*, 54: 206-209.
- Duo-Chuan, L.** 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161: 345-60.

-E-

- Elad, Y.** 1993. Mycoparasitism. In: Singh, U.S., Kohmoto, K., Singh, R.P. (eds.): Pathogenesis and host specificity in plant diseases (Volume II). Pergamon Publishers, pp. 289-307.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. & Henis, Y.** 1982. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Physiology and Biochemistry*,
- Elad, Y., Chet, I. & Henis, Y.** 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9: 59-67.
- Elad, Y., Chet, I. & Henis, Y.** 1982a. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28, 719-725.
- Elad, Y. & Kapat, A.** 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra1, K.-H., El-Katatny, M. S. & Gübitz1, G. M.** 2000. Production of chitinase and β -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food technol. biotechnol.*, 38: 173-180.

-F-

- Fayad, K. P.** 1997. La $\beta(1,6)$ -Glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14, un actinomycète antagoniste à *Phytophthora* spp. : Production, Purification et Caractérisation. Mémoire de maître ès sciences (M.Sc). Université de Sherbrooke-Québec, Canada.
- Flores, A. Chet, I. & Herrera-Estrella, A.** 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. Curr. Genet., 31: 30-37.
- Foroutan, A.** 2013. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of wheat *Fusarium* foot and root rot. Romanian Agricultural Research, 30: 335-342.

-G-

- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A. & Yarden, O.** 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. Applied and Environmental Microbiology 77: 5100–5109.
- García, L.** 2002. La vie dans les milieux extrêmes. Texte de la 433^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs : 1.
- Gargouri, S., Hajlaoui, M.R. Guermech, A. & Marrakchi, M.** 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.
- 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, Tunisie, 94 p.
- Garver B.F.** 2009. Wheat science and Trade. Wiley-Blackwell. England. 616 p.
- Gautam, S.P. Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M. K. & Sarsaiya S.** 2011. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solidwaste residue by two novel cellulolytic fungi. Biotechnology Research International, doi:10.4061/2011/810425
- Geraldine, A. M., Lopes, F.A.C., Carvalho, D.D.C., Barbosa, E.T., Rodrigues, A.R., Brandão, R.S., Ulhoa, C.J. & Lobo Junior, M.** 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biol. Control., 67: 308-316.
- Geremia, R., Goldman, G., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S., Van Montagu, M. & Herrera-Estrella, A.** 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding

- gene *prb1* related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.*, 8: 603-613.
- Gomes J. & Steiner W.** 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extrêmozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 223–235.
- Ghisalberti E. L. & Rowland, C.Y.** 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.*, 56: 1799-1804.
- Ghisalberti, E. L. & Sivasithamparam, K.** 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* sp. *Soil. Biol. Biochem.*, 23: 1011-1020.
- Grantina, L., Seile, E., Kenigvalde, K., Kasparinskis, R., Tabors, G. Nikolajeva, V., Jungerius, P. & Muiznieks, I.** 2011. The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. *Environmental and Experimental Biology*, 9: 9-21.
- Griffin, D. H.** 1994. *Fungal Physiology*, 2nd edn. New York: Wiley-Liss.
- Grishkan, I., Nevo, E.** 2010. Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Roman area, central Negev desert, Israel. *Fungal ecology*, 3: 326-337.
- Grishkan, I., Nevo, E., Wasser, S. P.** 2003. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel, *Mycological Progress*, 2: 19-28.
- Guiraud, J. P.** 1998. *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, 330 p.
- Gupta, V.P. Tewari S.K. Govindaiah, & Bajpai, A.K.** 1999. Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. *J. Phytopathol.*, 143: 391-401.

-H-

- Hacene, H., Fatima, R., Naila, C., Boutaiba, S., Tej, B., Baratti, J., Ollivier, B.** 2004. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58:273–284.
- Hadar, Y., Harman, G.E., & Taylor, A.G.** 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 74:106-110.
- Hajieghrari, B.** 2009. Wheat crown and root rotting fungi in Moghan area, Northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 8: 6214-6219.
- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M.R. & Davari, M.** 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7: 967-972.

- Haran, S., Schickler, H. & Chet, I.** 1996a. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Haran, S. Schichler, H. Oppenheim, A. & Chet, I.** 1996b. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86: 980-985.
- Harman, G. E.** 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M.** 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56.
- Harman, G.E., Taylor, G. & Starz, T. E.** 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. *Plant Disease*, 73: 631- 637.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E.** 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158: 17-25.
- Herrera-Estrella, A. & Chet, I.** 1999. Chitinases in biological control. In: Jolles P. and Muzzarelli R.A.A. (eds): *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Publishing, Ltd. Basel, Switzerland, pp: 171-184.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Khiareddine, H. & El Mahjoub, M.** 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 9: 163-171.
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lyncha, S.T. & Nelson E.B.** 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15: 25-36.
- Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kubicek, C.P.** 2013. Genomics of soil and plant associated fungi. *Soil biology*, DOI 10.1007/978-3-642-39339-6.
- Houhamdi, M., Bensaci, T., Nouidjem, Y., Bouzegag, A., Saheb, M. & Samraoui, B.** 2008. Eco-éthologie du flamant rose (*Phoenicopterus roseus*) hivernant dans les oasis de la vallée de l'Oued Righ. *Avas*, 45 :15-27.
- Howard, D.H.** 2005. *Pathogenic fungi in humans and animals (Mycology)*. Marcel Dekker, New York, pp: 444-446.
- Howell, C.R.** 1998. The role of antibiosis. In: Harman, G.E. & Kubicek, C.P. (Eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 173-184.
- Howell, C.R.** 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 92: 177-180.
- Howell, C. R.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.

Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., & Pukhar, L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248-252.

Hoyos-Carvajal, L. & Bissett, J. 2011. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics In Grillo, O. and Venora, G. (eds.). *The dynamical processes of biodiversity - Case studies of evolution and spatial distribution*. ISBN 978-953-307-772-7. pp.303-320.

-I-

Ibrahim, I. A. M., Ragab, M. M., Sahab, A. F. & Mougy, N. S. M. 1996. Biocontrol of tomato root and wilt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 24: 45-56.

Insam, H. 1997. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insam, H., & Ragger, A. (eds.): *Microbial communities-functional versus structural approaches*, pp 259-260.

-J-

Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M. & Bazin, M.S. 1991. Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol science and technology*, 1: 43-51.

Jaklitsch, W. M. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology* 63: 1-91. DOI:10.3114/sim.2009.63.01

Jayaswal, R. K., Singh, R. & Lee, Y.S. 2003. Influence of physiological and environmental factors on growth and sporulation of an antagonistic strain of *Trichoderma viride* RSR 7. *Mycobiology*, 31: 36-41.

Joshi, I.J. 1983. Investigations into the soil mycoecology of chambal ravines of India. *Plant and soil*, 73: 177-186.

Joshi, I.J. & Chauhan, R. K. S. 1982. Distribution of soil microfungi in various soil types of chambal ravines. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.*, 48: 525-533.

-K-

Kamala, Th., Indira Devi, S., Chandradev Sharma, K. & Kennedy, K. 2015. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to manipur. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/285261>

Kanaujia, R.S. & Singh, C. S. 1977. Studies on certain ecological aspects of soil fungi, fungi in relation to locality type, cover vegetation and physico-chemical characters of the soil. *Sydowia*, 30: 112-121.

- Kapat, A., Zimand, G., & Elad, Y.** 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol., Plant Pathol.*, 52:127-137.
- Kavanagh, K.** 2005. *Fungi : Biology and applications*. John Wiley & Sons. England. 252 p.
- Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., Pant, A.A.** 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No 64. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38: 83-92.
- Kempf, H.J. & Wolf, G.** 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* on wheat. *Phytopathology*, 79: 990-994.
- Khachai, S.** 2001. Contribution à l'étude du comportement hydro physiques des soles des périmètres d'I.T.D.A.S, plaine de l'Outaya. Thèse Magister. Université de Batna, 223 p.
- Khalifa, M.** 2006. Common root rot of wheat in Syria and DNA variability within *Fusarium* spp. as a major pathogen. These de doctorat. University of Aleppo. Syria, 109 p.
- Khan, N.I., Schisler, D.A., Boehm, M.J., Lipps, P.E. & Slininger, P.J.** 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, 29: 245-255.
- Khattabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. & Oihabi, A.** 2004. Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*. *Agronomie*, 24: 281–288.
- Kindermann, J. El-Ayouti, Y., Samuels, G.J. & Kubicek, C.P.** 1998. Phylogeny of the Genus *Trichoderma* Based on Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region 1 of the rDNA Cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 24: 298–309.
- Kredics L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. & Nagy E.** 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41 : 37-42.
- Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei F. & Nagy, E.** 2004. *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology* 96 : 491-498.
- Krishnamurthy, J., Samiyappan, R., Vidhyasekaran, P., Nakkeeran, S., Rajeswari, E, Raja, J. A. J. & Balasubramanian, P.** 1999. Efficacy of *Trichoderma* chitinases against *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *J. Biosci.*, 24: 207-213.
- Kubicek, C.P. & Harman, G.E.** 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, pp. 153-172.
- Kubicek, C. P. & Harman, G. E.** 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1: Basic biology, taxonomic and genetics. Taylor & Francis, London, pp: 4-60.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., et al.** 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.*, 12: R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.

Kumar, D.P., Singh, R.K., Anupama, P.D., Solanki, M.K., Kumar, S., Srivastava, A.K., Singhal, P.K. & Arora, D.K. 2012. Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization. Indian J. Microbiol., 52: 388–395.

-L-

Laborda, F., Garcia Acha, I., Uruburu, F. & Villanueva, J.R. 1974. Structure of conidial walls of *Fusarium culmorum*. T. Brit. Mycol. Soc., 62, 557-566.

Lakshmi, A. S. & Narasimha, G. 2012. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil. Ann. For. Res., 55: 85-92.

Landreau, A. 2001. Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Thèse de doctorat, Université de Nantes France, 201 p.

Larkin, R.P. & Fravel, D.R. 1999. Mechanisms of action and Dose-Response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of Tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology, 89: 1152-1161.

Lee, B.K.H. & Bakar, G.E. 1972. Environment and the distribution of microfungi in a Hawaiian mangrove swamp. Pacific Science, 26: 11-19.

Lee, J.Y. & Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48: 407-417.

Lesage, G. & Bussey, H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70:317-343. DOI:10.1128/MMBR.00038-05.

Leslie J.F. & Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C.M., Kubicek, C.P., Samuels, G.J. & Börner, T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. Mycological Research, 33: 313-322.

Lieckfeldt, E., Samuels, G.J. Börner, T. & Gams, W. 1998. Neotypification of *Trichoderma koningii*, and its *Hypocrea koningii* teleomorph. Can. J. Bot.,76:1507-1522.

Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H.I. & Petrini, O. 1999. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species. Appl. Environ. Microbiol., 65: 2418-2428.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38: 471.

Liu, B., Glenn, D. & Buckley, K. 2008. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. Soil Biology & Biochemistry, 40: 1124-1136.

- Lora, J. M., De la Cruz, J., Llobell, A., Benitez, T. & Pmter-Toro. J. A.** 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.*, 247: 639-445.
- Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes C.K., Woo, S.L. & Harman, G.E.** 1993. Antifungal synergetic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*, 83: 721-728.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B. Zoina, A., Tuzun, S. & Scala, F.** 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7860-7865.
- Lounaci, L. & Athmani-Guemouri, S.** 2014. Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie. *Algerian Journal of Natural Products* 2 : 35-42.
- Luard, E.J. & Griffin, D.M.** 1981. Effect of water potential on fungal growth and tirgor. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 76: 33-40.
- Lübeck, M., Bulat, S., Alekhina I., Lieckfeldt, E.** 2004. Delineation of species within the *Trichoderma viride/atroviride/koningii* complex by UP-PCR cross-blot hybridization. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 255-260.
- M-**
- Mach, R.L, Peterbauer, C.K, Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L, Zeilinger, S., Kullnig, C.M, Lorito, M., Kubicek, C.P.** 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1858-1863.
- Madelin, T.M.** 1994. Fungal aerosols: A review. *Journal of aerosol science*. 25: 1405-1412.
- Magan, N.** 1988. Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 90: 97-107.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G. & Bhat, M.K.** 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 461-488.
- Manczinger, L., Antal, Z, and Kredics, L.** 2002; Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49: 1-14.
- Marasas, W.F.O., Riley, R.T., Hendricks, K.A. Stevens, V.L., Sadler, T.W., Waes, G.J., Missmer, S.A. Cabrera, J. Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martinez, C. Joyce Maddox, J. Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., & . Merrill, A.H.** 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition*, 134: 711-716.

- Martins, G.** 2012. Communautés microbiennes de la baie de raisin : Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 2, France, 250 p.
- Mascher, F., Michel V. & Bowne R. A.** 2005. Sélection de variétés de blé et de triticales résistantes à la fusariose sur épi. *Revue suisse Agric.*, 37: 189-194.
- Mastouri, F., Björkman, T. & Harman, G. E.** 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100: 1213-1221.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. & Boller, T.** 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.*, 88: 936-942.
- Metcalf, D. A. & Wilson, C. R.** 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma Koningii*. *Plant Pathology*, 50: 249-257.
- Meyer, R.J. & Plaskowitz, J. S.** 1989. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia*, 81: 312-317.
- Monga, D.** 2001. Effect of carbon and nitrogen sources on spore germination, bio-mass production and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Indian Phytopath.*, 54: 435-437.
- Moretti, M.M.S., Bocchini-Martins, D.A., Da Silva, R., Rodrigues, A., Sette, L.D. & Gomes, E.** 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulase and xylanase under solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 43:1062-1071.
- Moumene, K., Bouakaz, K. D., Guedider, F., Oussaid, Y., Oualid, F., Derradji, A., Chaabi, H., Hasnaoui, N., Daoudi, R., Haddadi, Y., Meddah, D., Guedider, F., Bellahouene, N. & Tartoura, M.** 2013. Problématique de la fusariose des céréales en Algérie: Identification des espèces et leur répartition dans les zones potentiellement céréalières. 1^{er} Workshop international sur la Fusariose des céréales en Algérie. Alger 2 Octobre 2013
- Moya-Elizondo, A. E.** 2013. *Fusarium* crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Cien. Inv. Agr.* 40: 235-252.

-N-

- Nakajima, T.** 2010. Fungicides application against fusarium head blight in wheat and barley for ensuring food safety.
- Nasraoui, B.** 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées : Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Centre de publication universitaires. Tunisie, pp : 3-61.
- Nelson, E. B. Harman, G.E & Nash, G.T.** 1988. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Biol. Biochem.*, 20: 145-150.

Nelson, P.E., Desjardins, A.E., & Plattner, R.D. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 233-252.

Nemec, S., Datnoff, L.E. & Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Prot.*, 15: 735-742.

Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R.C., Gosman, N.E., Simpson, D.R., Thomsett, M. & Wilson, A.H. 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 691-703.

-O-

Okoth, S.A. Okoth, P. & Muya, E. 2009. Influence of soil chemical and physical properties on occurrence of *Trichoderma* spp. in EMBU, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11: 303-312.

Okuda, T., Fujiwara, A. & Fujiwara, M. 1982. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46:7, 1811-1822.

Oren, A. 2006. Life at high salt concentrations In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H & Stackebrandt E. (eds): *Prokaryotes*. Springer. pp: 263-282.

Ozenda, P. 1991. Flore de sahara. CNRS. Paris, 662 p.

-P-

Papavizas, G.C. & Lumsden R.D. 1982. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant disease*, 66: 1019-1020.

Parry, D.W., Jenkinson, P. & Mcleod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Plant Pathol.* 44: 207-238.

Paulitz, T.C. 1996. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant disease*, 80: 674-678.

Peberdy, J. F. 1990. Fungal cell wall-a review. In: Kuhn, P. J. Trinci, A. P. J. Jung, M. J. Goosey, M.M & Cooping, I. G. (eds.): *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp: 5-24.

Perrakis A. Tews I. Dauter Z. Oppenheim A. B. Chet I. Wilson K.S. & Vorgias E.C. 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3Å resolution. *Structure*, 2: 1169-1180

Pezet, R., Pont, V. & Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochem. Anal.*, 10: 285-288.

- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C. & Jenkinson, P.** 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 731-742.
- Plemenitas, A., Vaupotic, T., Lenassi, M., Kogej, T. & Gunde-Cimerman, N.** 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud. Mycol.* 61: 67-75.
- Popovski, S. & Celar F.A.** 2012. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production – a review. *Acta agriculturae Slovenica*, 101: 105-116.
- Prabavathy, V.R., Mathivanan, N., Sagadevan E., Murugesan, K. & Lalithakumari, D.** 2006. Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. *Bioresource Technology* 97: 2330–2334.
- Prescott, L. M., Harley, J.P. & Klein, D.A.** 2010. Microbiologie. DE Boeck et Larcier SA. Bruxelles. 1088 p.
- Prevot, V.** 2013. Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne, France. 158 p.
- R-**
- Rahman, A., Begum, M.F., Rahman, M., Bari, M.A., Ilias, G. N. M. & Alam, M.F.** 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. *Turk J. Biol.*, 35: 183-194.
- Rajeswari, P.** 2014. Role of phenols and antioxidant enzymes in biocontrol of *Fusarium oxysporum* causing *Fusarium* wilt of *Arachis hypogaea. L* (groundnut). *International Journal of Agricultural Science and Research*, 4: 95-104.
- Rajeswari, P. & Kannabiran, B.** 2011. *In vitro* Effects of Antagonistic Microorganisms on *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Synd & Hans Infecting *Arachis hypogaea L. J. Phytol.*, 3: 83-85.
- Rey, M., Delgado-Jarana, J. & Benitez, T.** 2001. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Applied Microbiology & Biotechnology* 55: 604-608.
- Rifai, M. A.** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Ripert, C.** 2013. Mycologie médicale. Lavoisier Tec and Dec. Paris. 690 p.
- Riungu, G.M., Muthomi, J.W. & Narla, R.D.** 2007. Effect of antagonistic microorganisms on severity of fusarium head blight of wheat and grain yield. *African Journal Crop Science Conference Proceeding*, 8: 827-832.
- Rodier, J.** 2005. L'analyse de l'eau, Dunod, Paris, 1383 p.

- Roiger, D.J, Jeffers, S.N. & Caldewell, R.W.** 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and wood land soils. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 353-359.
- Roquebert, M.F.** 1996. Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. *Compte-rendu des 4^{èmes} Rencontres en Toxinologie*, Paris, pp : 13-15.
- Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L.** 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. CRC Press, Boca Raton.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E. & Sentandreu, R.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.*, 6: 14-29.

-S-

- Saadoun, I., Al-Omari, R., Jaradat, Z. & Ababnech, Q.** 2009. Influence of culture conditions of *Streptomyces* sp. (Strain S242) on chitinase production. *Polish Journal of Microbiology*, 58: 339-345.
- Saharan, M.S., Sharma, A.K. & Singh S.** 2008. Management of head scab (*Fusarium* spp.) of wheat (*Triticum aestivum*) with bioagents. *Indian Council of Agricultural Research*, 78: 328-332.
- Samolski, I., Rincon, A.M., Pinzon, L.M., Viterbo, A. & Monte, E.** 2012. The qid 74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158: 129-138.
- Samuels, G.J., Dodd, S., Lu, B.S. Petrini, O., Schroers, H.J. & Druzhinina, I.** 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56: 67–133.
- Samuels, G.J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. and Kubicek, C.P.** 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. *Study in Mycology*, 41: 1-52.
- Saravanakumar, K. & Kaviyarasan, V.** 2010. Seasonal distribution of soil fungi and chemical properties of montane wet temperate forest types of Tamil Nadu. *Afr. J. Plant Sci.*, 4: 190-196.
- Saravanakumar, K. & Kathiresan, K.** 2014. Statistical optimization of protease production by mangrove-derived *Trichoderma estonicum* and its potential on blood stain removal. *IJBMR.*, 3: 15-21.
- Satyanarayana, T., Chandralata, R. & Shivaji, S.** 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89: 78-90.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E & Kubicek, C.P.** 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics molecular mechanisms involved in the antagonistic

- action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4364-4370.
- Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J. & Slininger, P.J.** 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. Plant Dis., 86:1350-1356.
- Schuster, A. & Schmoll, M.** 2010. Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 87: 787-799. DOI 10.1007/s00253-010-2632-1.
- Shakeri, J. & Foster, H.A.** 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenic to insects. Enz. Microb. Technol., 40: 961-968.
- Shendure, J. & Ji, H.** 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology 26: 1135-1145.
- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K., Kausar, H. & Hasan, M.M.** 2012. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. Journal of Chromatographic Science, 50: 358-367.
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., Kumar, V.** 2014. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. Virology and Mycology, 31: 127-134.
- Sivan, A. & Chet, I.** 1989a. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., 135:675-682.
- Sivan, A. & Chet, I.** 1989b. The possible role of competition between *T. harzianum* and *F. oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology, 79: 198-203.
- Sivasithamparam, K & Ghisalberti, E. L.** 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. in: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Kubicek, C.P., and Harman G.E. (eds.), Taylor & Francis, London, UK., pp: 139-191.
- Smiley, R.W. & Patterson, L.M.** 1996. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific NorthWest. Plant disease 80: 944-949.
- Steyaert, J.M., Ridgway, H. J., Elad, Y. Stewart, A.** 2003. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 31: 281-291.
- Steyaert, J.M., Stewart, A., Jaspers, M.V., Carpenter, M. & Ridgway, H.J.** 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. Mycologia, 96: 1245-1252.
- Sutton, J. C.** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 4: 195-209.

Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F. & Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters, 233 : 215-222.

-T-

Teperi, E., Keskinen M., Ketoja E. & Tahvonen, R. 1998. Screening for fungal antagonists of seed borne *Fusarium culmorum* on wheat using *in vivo* tests. European Journal of Plant Pathology, 104: 243-251.

Tunali, B., Nicol, J. M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M. A. & Bağcı, S. A. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Dis. 92: 1299-1306.

-V-

Vargas Gil, S., Pastor, S. & March, G.J. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. Microbiological Research, 164: 196-205.

Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C.A. & Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 64: 1442–1446.

Venturini, G., Assante, G., Toffolatti, S.L. & Vercesi, A. 2013. Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy. Mycoscience, 54: 285-290.

Vinale, F., Sivasithamparam, K. Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry, 40:1-10.

-W-

Wagacha, J.M & Muthomi, J.W. 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop Protection, 26: 877-885.

Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Boca Raton, CRC Press, 484 p.

White, T.J, Bruns, T., Lee, S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA, pp: 315-322.

Wiese, M.V. 1987. Common (dryland) root and foot rot and associated leaf and seedling diseases. In: Wiese, M.V. (ed): Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society. APS Press, pp. 53-55.

Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C.P., Del Sorbo, G. & Lorito, M. 1999. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects

biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal (MPMI). 12: 419-429.

Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. & Lorito, M. 2005. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96: 181-185.

Wu, N., Wang, H., Liang, S., Nie, H. & Zhang, Y. 2006. Temporal-spatial dynamics of distribution patterns of microorganism relating to biological soil crusts in the Gurbantunggut desert. Chinese Science Bulletin, 51: 124-131.

-Y-

Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 65:1061-70.

-Z-

Zachow, C., Berg, C., Müller, H., Meincke, R., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S. Kubicek, C.P. Berg, G. 2009. Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. ISME Journal, 3: 79-92.

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genet Biol., 26: 131-140.

Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M.E. & Liu, Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 9(3): e92486. doi:10.1371/journal.pone.0092486

PUBLICATIONS

EDAPHIC FACTORS AFFECTING DISTRIBUTION OF SOIL FUNGI IN THREE CHOTTS LOCATED IN ALGERIAN DESERT

DENDOUGA WASSILA⁽¹⁾, BOUREGHDA HOUDA⁽²⁾, BELHAMRA MOHAMED⁽³⁾

^(1, 3) Laboratory of Biodiversity of Ecosystem and Dynamic Production of Agriculture System in Arid Regions, University of Biskra, Algeria.

⁽²⁾ Department of Botany, National High School for Agronomy (ENSA), El-Harrach, Algiers, Algeria

w.dendouga@univ-biskra.dz

ABSTRACT

A total of 327 colonies of fungi were isolated from three chotts located in the Northeast of Algerian Sahara (Chott Merouane, Melghir and Tighdidine). Twenty eight species representing thirteen genera were recorded in Chott Merouane, twenty two species representing eleven genera were isolated from Chott Melghir and twenty five species corresponding to eleven genera were recorded in Chott Tighdidine. The most common genera were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium*. Statistical analysis revealed a significant positive correlation between fungal population and number of edaphic factors, especially organic carbon and nitrogen contents. Fungal population showed negative correlation with chloride and sodium. The most species isolated in this study were melanized fungi.

KEYWORDS: Fungi, distribution, hypersaline soil, edaphic factors.

RESUME

Trois cent vingt sept colonies de champignons filamenteux sont isolées à partir de trois chotts localisés dans le Nord-est du Sahara Algérien (Chott Merouane, Melghir et Tighdidine). Vingt-huit espèces de 13 genres ont été isolées de Chott Merouane. Vingt-deux espèces de 11 genres ont été isolées de Chott Melghir et vingt-cinq espèces correspondant à 11 genres ont été obtenues de Chott Tighdidine. Les genres les plus abondants sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*. L'analyse statistique a révélé une corrélation positive significative entre la densité de la population fongique et un nombre des facteurs édaphiques, en particulier la teneur en carbone organique et l'azote. La densité de la population fongique a montré une corrélation négative avec la teneur de chlorure et de sodium.

MOTS CLES: Champignons filamenteux, distribution, sol hypersalin, facteurs édaphiques.

1 INTRODUCTION

Fungi are the largest group of organisms. They are remarkable for their antiquity, diversity, ubiquitous distribution and longevity and are known to occur in almost all environments [1].

A variety of fungi inhabit same the extreme environments. These extremophilic organisms have evolved several structural and chemical adaptations, which allow them to survive and grow in these habitats. The products obtained

from extremophiles such as proteins, enzymes (extremozymes) and compatibles solutes are of great interest to biotechnology [2].

Algeria contains a great number of wetlands, including freshwater and brackish marshes, lakes, and salt pans. The largest wetland surface area is made up of salt pans, spread out from the coastal area to the northern Saharan fringes and across the High Plateaus [3]. The largest Algerian Chotts, which is an Arabic term for dry, salt depression are located in the Great Oriental Erg, in the north-east of the

Sahara [3,4]. Most of the studies of fungi in extreme salt conditions have been performed in the northern latitudes, in the region of Russia and Dead Sea. Butinar et al. (2005) described fungi isolated from several natural and man-made hypersaline environments including those found in France, Namibia, Portugal, Slovenia, Spain, and Dominican Republic [5]. However, few studies exist on the microbial diversity in the Algerian Sahara and even on saline soils in this area, with the exception of this of Boutaiba et al. (2011); they studied the physicochemical and microbial properties of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes in the south of Algeria. Their results of eukaryal community composition are not surprising, where no fungus has been detected [6].

Up to now, no previous reports on fungi have been documented from saline habitats in the Algerian Sahara. In this study, an attempt has been made to review the diversity and distribution of fungi that occurs in Chott Merouane, Chott Melghir and Chott Tighdidine, which are wetlands in arid regions; administratively they are attached to the Wilaya of El Oued. These chotts represent the most suitable areas for the search of organisms adapted to high temperatures and salinities.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Site description

The study was conducted in Oued Righ (33°19'59''N, 6°52'59''E) also called Bas-Sahara (80m altitude). The region of Oued Righ is located in the Great Erg Oriental at the south-east of the country, more precisely about 700 Km south-east of Algiers (Fig.1). The climate in this region is extremely arid, with only sporadic rainfall varies between 80 to 100 mm per year.

Mean annual temperature is 23°C; the means of the coldest month (Jan.) and warmest month (Jul.) are 08°C and 40°C, respectively. The present investigation was carried out in three different Chotts of Oued Righ viz. Chott Merouane, Chott Melghir and Chott Tighdidine (Fig.1). The first two Chotts were designated as a RAMSAR site and are classified as an Important Bird Areas (IBA). However, Chott Tighdidine is not yet included in the list of this convention.

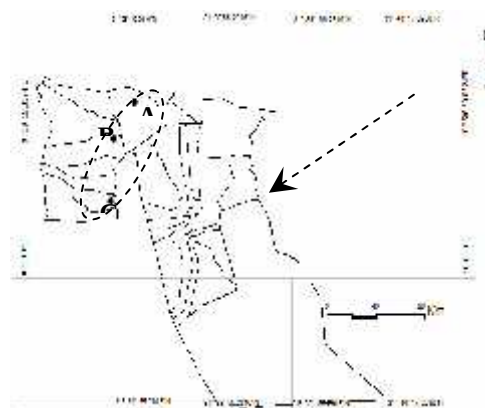


Figure 1: Study location and map of El Oued area showing three sampling sites (A: Chott Merouane, B: Chott Melghir and C: Chott Teguedidine)

2.2 Soil sample collection

Soil samples were collected aseptically from five sampling points around each site at a depth of 10 to 30cm. The collections were made in October (2011 and 2012). The soil samples collected from each chott was transported in sterile polythene bags to the laboratory where they were stored at 4°C for no longer than 24 to 48 h. for isolation of fungi and physic-chemical analysis.

2.3 Edaphic parameters

The pH and electrical conductivity of the soil samples were determined in 1:5 (w/v) soil-water suspensions. Soil moisture content was determined by drying 10 g of fresh soil overnight in a hot air at 105°C. For chemical analysis, samples were air dried, ground, and sieved through a 0.2 mm sieve. Total nitrogen was determined by the Kjeldahl method. Total organic carbon was determined by oxidation with dichromate. The chloride was determined by Mohr method [7]. Available nutrients such as calcium, magnesium, potassium and sodium were determined according to Rodier (2005). The first two elements were assayed in the presence of EDTA. However the latter two were determined with flame photometer [8].

2.4 Fungal isolation and identification

The dilution plate method was adopted for the isolation of fungi [9]. The soil sample (10 g) was suspended in 90 ml of a sterile solution of NaCl (1%). One ml of each dilution was inoculated on potato dextrose Agar (PDA) supplemented with NaCl (1%) and chloramphenicol (50 mg/L) to suppress bacterial growth [10]. Triplicate plates were used for each sample. The plates were incubated at 30°C, and examined daily for developing colonies. All fungal colonies appearing on the plates were counted and subcultured for purification and further taxonomic

identification. Taxonomic identification of fungal isolates

was based on their morphological and cultural characteristics. All names of species are cited by consulting taxonomic monographs [10, 11].

2.5 Data analyses

Density of fungal isolates was expressed as colony forming units (CFU) per g wet weight soil. Edaphic parameters were analyzed statistically to identify any differences among the means by analysis of variance (ANOVA). Tukey test was performed to compare means. Correlation coefficients (r) between fungal population and various edaphic characteristics were analyzed by using Pearson's correlation coefficient. P values <0.01 and 0.05 were considered as significant. Statistical analysis was performed by SPSS, version 21.

3 RESULTS

Results of edaphic parameters are listed in table 1. Soil parameters varied significantly by sites. The soil in the studied area is slightly alkaline to alkaline, with maximal and minimal pH in Chott Merouane and Tighdine, respectively. The soil of the first two Chotts were extreme in salinity, whereas the last site has the lowest value (14.41ms/cm), Chott Tighdine was classified as the less salty [7]. Organic carbon (C %) and total nitrogen (N %) contents were highest in Chott Merouane, however the three sites are very poor in these two elements.

The soil in the studied areas is characterized by a dominance of sodium and chloride ions. In Chott Merouane and Melghir, they are followed by magnesium and potassium ions. However, in Chott Tighdine, the content of calcium is higher than potassium and magnesium.

Table 1: Edaphic parameters over three sites

Site	pH	EC (25°C) (ms/cm)	OC (%)	N (%)	Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	Cl (mg/g)	DF (UFC/g)
A	$7.63^a \pm 0.1$	$25.32^b \pm 0.2$	$0.45^b \pm 0.1$	$0.05^c \pm 0.0$	$8.74^b \pm 0.3$	$1.27^b \pm 0.2$	$1.37^a \pm 0.1$	$0.22^a \pm 0.0$	$13.36^b \pm 0.4$	134
B	$7.80^a \pm 0.1$	$27.43^c \pm 0.7$	$0.15^a \pm 0.0$	$0.02^a \pm 0.0$	$12.32^c \pm 0.5$	$4.92^c \pm 0.6$	$4.79^b \pm 0.6$	$1.59^b \pm 0.1$	$16.25^c \pm 1.1$	81
C	$9.00^b \pm 0.2$	$14.41^a \pm 0.1$	$0.17^a \pm 0.0$	$0.04^b \pm 0.0$	$2.29^a \pm 0.1$	$1.25^a \pm 0.1$	$0.93^a \pm 0.0$	$5.21^c \pm 0.3$	$9.71^a \pm 0.3$	112

Note: Mean $\pm$ Standard Deviation (SD). Site **A**: Chott

Merouane, Site **B**: Chott Melghir and Site **C**: Chott Tighdine. Non significant differences between sites are shown by identical letters, ($P>0.05$). EC: electric conductivity, OC: organic carbon, N: total nitrogen, Na: sodium, K: potassium, Mg: magnesium, Ca: calcium, Cl: chloride, DF: density of fungal.

A total of 327 colonies of fungi, were recovered during the present study in all soils of the different chotts. Most of isolates were melanized fungi such as *Auriobasidium*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*, *Phoma* and species belonging to *Aspergillus*, *Rhizopus* and *Penicillium*. Twenty eight species of 13 genera were recorded in Chott Merouane (Fig. 2); twenty two species of 11 genera were isolated from Chott Melghir and 25 species of 11 genera were recorded in Chott Tighdine.

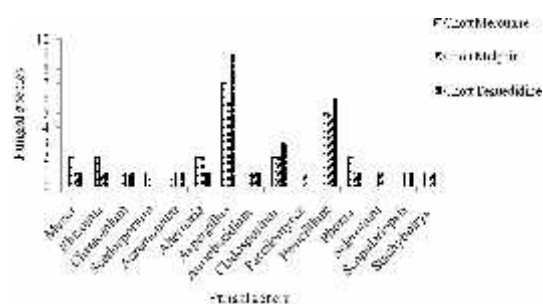


Figure 2: Graphical representation shows the occurrence of fungal species over different chotts

The results of the correlation between different edaphic factors and the density of fungal population are presented in table 2. The population density in different chotts was not correlated with both soil electric conductivity and calcium. The population density was significantly positively correlated with organic carbon and nitrogen in the three chotts, significantly negatively correlated with chloride. The fungal population in Chott Tighdine was significantly correlated with potassium, but no correlation was observed

in Chott Merouane and Chott Melghir. The population density was not correlated with sodium in Chott Melghir

negatively correlated in Chott Merouane. In this latter no correlation was observed between the pH and magnesium with the fungal population. However, they were significantly positively correlated in Chott Melghir and Chott Tighdidine.

and Chott Tighdidine, while they were significantly

Table 2: Pearson's (r) correlation coefficient between fungal population and edaphic parameters in each site

Site	pH	EC at 25°C	OC	N	Na	K	Mg	Ca	Cl
		(ms/cm)	(%)	(%)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
A	0.447	-0.311	0.943*	0.904*	-0.891*	-0.760	-0.865	-0.025	-0.921*
B	0.995**	0.071	0.995**	0.947*	-0.847	0.572	0.893*	0.406	-0.981**
C	0.935*	0.865	0.987**	0.958*	-0.516	0.883*	0.921*	0.001	-0.948*

** : correlation is significant at the 0.01 level, * : correlation is significant at the 0.05 level. A: Chott Merouane, B: Chott Melghir and C: Chott Tighdidine. EC: electric conductivity, OC: organic carbon, N: total nitrogen, Na: sodium, K: potassium, Mg: magnesium, Ca: calcium, Cl: chloride.

4 DISCUSSION

Species belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera were common to all chotts. Several studies reported the dominance of these two genera, explained by their greater rate of spore production and dispersal [12, 13]. The present study showed also the dominance of melanized fungi that were reported from similar environment [5, 14, 15]. Melanized fungi can tolerate dehydration, and solar radiation better than the moniliaceous fungi whose cells are devoid of melanin [5].

Soil conditions are one of the most important ecological factors, which govern the distribution of the soil fungi [16, 17]. The soil samples of the three Chotts have been analyzed, firstly to determine the quality of soil and on the other hand to study the influence of edaphic factors on fungi distribution on the grounds of calculated correlation coefficients. We found significant positive correlation between organic carbon, total nitrogen and fungal population in all the Chotts which reflects the major role played by these elements in changing the relative abundance of fungal species. Several studies confirmed that organic matter had a great influence on fungal abundance [13, 18, 19]. Quantity of nitrogen has been reported also to affect the fungal number in a positive direction [20, 21]. High total nitrogen availability increased sporulation, production of antifungal anthraquinone pigments and hyphal growth rate [21]. Numerous studies have revealed the influence of soil pH on the distribution of fungal populations [20, 22]. Significant positive correlation was noted between the fungal

population and soil pH in Chott Melghir and Tighdidine, however, no significant correlation was observed in Chott Merouane, which was characterized by the lowest soil pH and the higher number of colonies compared to the other two Chotts. Fungi generally prefer a slightly acidic pH, although they are able to grow in a wide range of pH [10, 23]. Acidic soil facilitates the rate of growth of soil fungi and biodegradation [14]. The results of soil pH in the present study were slightly alkaline in Chott Merouane and Melghir but it was alkaline in Chott Tighdidine, which is similar to the studies who reported that soils in arid and semi-arid regions are generally alkaline [15, 24, 25]. Insignificant correlation between electrical conductivity and fungal population was found in all the Chotts. Soil moisture and salts played an important role in the variation of electrical conductivity, it is higher than the critical value (> 4 ds/m) [7], indicating that the soils of this investigation represent an extreme environment for the growth of fungi. Insignificant correlation was noted also between the fungal population and the calcium in the three Chotts, this result is in agreement with other studies [20]. Significant positive correlation was observed between magnesium and fungal population in Chott Melghir and Tighdidine. Calcium and magnesium are trace elements necessary for fungal growth in very low concentration; in this study the concentration of these elements was much higher than the requirements of fungi [26]. Significantly positive correlation was found between potassium and fungal population in Chott Tighdidine, but insignificant correlation in Chott Merouane and Chott Melghir. The stimulatory effects of potassium on soil fungi have been confirmed by many mycologists [13]. The present study reveals a negative correlation between the chloride, sodium contents and fungal population, which was significantly in all the Chotts for chloride, but significantly only in Chott Merouane for sodium. This result can be justified by the high chloride content exceeding the needs of microfungi. Sodium is an element needed by fungi from the sea and salt lakes, which can conveniently be provided as the chloride [26].

In conclusion, edaphic analysis showed that the study area is an extreme environment in its salinity and its poverty in organic carbon and nitrogen. Generally, edaphic factors influence significantly the distribution of fungi.

REFERENCES

- [1] Suhail, M., Akhund, S., Jatt, T., Ishrat Rani Abro, H. (2007). Isolation and identification of soil mycoflora of river induskotri, Pak. J. Bot., 39, 2663-2666.
- [2] Satyanarayana, T., Chandralata R. Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. Curr. Sci., 89, 78-90.
- [3] Demnati, F., Allache, F. Ernoul, L. Samraoui, B. (2012). Socio-economic stakes and perceptions of wetland management in an arid region: A case study from Chott Merouane, Algeria. AMBIO., 41, 504-512.
- [4] Mahowald, N. M., Bryant, R.G., Corral, J. Steinberger, L. (2003). Ephemeral lakes and desert dust sources. Geophys. Res. Let., 30, 46-49.
- [5] Cantrell, S. A., Casillas-Martinez, L. Marirosa, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. Mycol. Res., 110, 962-970.
- [6] Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K. A. Maupin-Furiow, J.A. (2011). Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. J. Arid. Environ., 75, 909-916.
- [7] Aubert, G. (1978). Méthode d'analyse des sols. CRDP., Marseille.
- [8] Rodier, J. (2005). L'analyse de l'eau, Dunod, Paris.
- [9] Davet, P. Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. INRA., Paris.
- [10] Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., et al. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Masson, Paris.
- [11] Watanabe, T. (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Boca Raton. CRC Press.
- [12] Demirel, R., Ilhan, S., Asan, A., Kinaci, E., Oner, S. (2005). Microfungi in cultivated fields in Eskisehir provience. J. Basic. Microbiol., 45, 279-293.
- [13] Banakar, S. P., Thippeswamy, B., Thirumalesh, B. V., Naveenkumar, K. J. (2012). Diversity of soil fungi in dry deciduous forest of Bhadra Wildlife Sanctuary, western ghats of southern India. Journal of Forestry Research, 23, 631-640.
- [14] Abdel-Hafez, S. I. I. (1982). Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soil of Saudi Arabia. Mycopathologia, 80, 15-20.
- [15] Abdulllah, S. K., Al-khesraji, T.O. Al-edany, T.Y. (1986). Soil mycoflora of the southern desert of Iraq. Sydowia, 39, 8-16.
- [16] Kanaujia, R.S., Singh, C. S. (1977). Studies on certain ecological aspects of soil fungi, fungi in relation to locality type, cover vegetation and physico-chemical characters of the soil. Sydowia, 30, 112-121.
- [17] Saravanakumar, K., Kaviyaranan, V. (2010). Seasonal distribution of soil fungi and chemical properties of montane wet temperate forest types of Tamil Nadu. Afr. J. Plant Sci., 4, 190-196.
- [18] Joshi, I.J. (1983). Investigations into the soil mycoecology of chambal ravines of India. Plant Soil, 73, 177-186.
- [19] Wu, N., Wang, H., Liang, S., Nie, H., Zhang, Y. (2006). Temporal-spatial dynamics of distribution patterns of microorganism relating to biological soil crusts in the Gurbantunggut desert. Chinese Sci. Bull., 51, 124-131.
- [20] Joshi, I.J. and Chauhan, R. K. S. (1982). Distribution of soil microfungi in various soil types of chambal ravines. Proc. Indian natn. Sci. Acad., 48, 525-533.
- [21] Aguilera, L. E. Gutierrez J. R. Meserve, P. L. (1999). Variation in soil microorganisms and nutrients underneath and outside the canopy of Adesmia bed welli (papilionaceae) shrubs in arid coastal chile following drought and above average rainfall. J. Arid. Environ., 42, 61-70.
- [22] Okoth, S.A., Odhiambo, J. (2009). Influence of soil chemical and physical properties on Trichoderma spp. occurrence in Taita region. Trop. sub trop. agroecosyst., 11, 403-413.
- [23] Grantina, L., Seile, E., Kenigvalde, K., Kasparinskis, R., Tabors, G. et al., (2011). The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. Environmental and Experimental Biology, 9, 9-21.
- [24] Grishkan, I., Nevo, E., 2010. Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Roman area, central Negev desert, Israel. Fungal Ecol., 3, 326-337.
- [25] Mandeel Q. A. (2002). Microfungal community associated with rhizosphere soil of Zygophyllum qatarense in arid habitats of Bahrain. J. Arid. Environ., 50, 665-681.
- [26] Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001). The fungi, Academic press, London.

Biocontrol of Wheat *Fusarium* Crown and Root Rot by *Trichoderma* spp. and Evaluation of Their Cell Wall Degrading Enzymes Activities

W. DENDOUGA^{1*}, H. BOUREGHDA² and M. BELHAMRA¹

¹Laboratory of Biodiversity of Ecosystem and Dynamic Production of Agriculture System in Arid Regions,
University of Biskra, Biskra, Algeria

²Laboratory of Phytopathology and Molecular Biology, National High School of Agronomy (ENSA),
El-Harrach, Algiers, Algeria

(Received: 15 September 2015; accepted: 1 November 2015)

Fourteen strains of *Trichoderma* spp. were isolated from Algerian desert soils and assessed for their antagonistic activity against *Fusarium* crown and root rot of wheat. Biocontrol efficiency of *Trichoderma* spp. was studied by *in vitro* and *in vivo* based bioassay against three pathogenic species: *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. verticillioides*. *In vitro* based bioassay (dual culture) results obtained with all *Trichoderma* spp. isolates showed significant decrease in colony diameter of *Fusarium* species compared to the control. The highest percentages of reduction in colony diameter were obtained with *T. harzianum* Thr.4 causing a growth reduction of 70.68%, 67.05 and 70.57% against *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. verticillioides*, respectively. All *Trichoderma* spp. isolates were able to overgrow and sporulate above *F. culmorum* colonies but no overgrowth was observed with *F. graminearum* and *F. verticillioides*. The seed treatment by *Trichoderma* spp. isolates before sowing in a soil already infested by the pathogens led to a significant decrease of disease severity compared to the untreated control. The highest disease index decrease (> 70%) was obtained with two isolates of *T. harzianum* (Thr.4 and Thr.10) and *T. viride* Tv.6 against the three fungal pathogens. Lytic enzymes production by *Trichoderma* spp. isolates was tested in liquid cultures containing fungal cell walls of each pathogen as sole carbon source. Higher levels of protease and chitinase activities were induced by hyphal cell walls of *F. graminearum* than cell walls of *F. verticillioides* and *F. culmorum*. *T. harzianum* Thr.4 exhibited the highest enzyme activities with hyphal cell walls of *F. graminearum* and *F. culmorum*. However, in the medium amended with cell wall of *F. verticillioides*, maximal lytic activities were recorded for *T. viride* Tv.6.

Keywords: *Trichoderma* spp., biological control, *Fusarium* spp., wheat, cell wall degrading enzymes.

Root and crown rot of wheat caused by *Fusarium* species is a very common and economically important disease in many wheat-producing area of the world, especially in low and medium rainfall areas (Cook, 1980; Wiese, 1987; Moya-Elizondo, 2013). Invasion of crown and root tissues by root and crown rotting fungi reduces the plant's capacity for efficient nutrient and water uptake, causing significant losses in wheat production (Tunali et al., 2008). In addition to the quantity losses, *Fusarium* species produce a wide range of mycotoxins, which are hazardous to humans and animals (Nelson

* Corresponding author; e-mail: w.dendouga@univ-biskra.dz

et al., 1993; Parry et al., 1995). As *Fusarium* species are soil-borne in nature, application of fungicides to control these pathogens is not practical. In addition, resistance to *Fusarium* crown rot in commercial cultivars is only partial (Cook, 2010). These reasons have increased the need to find alternative methods for pathogens control as biological control methods.

Trichoderma is one of the most exploited fungal biocontrol agents in agriculture to manage plant diseases caused by a wide number of fungal pathogens (Harman et al., 2008; Vinale et al., 2008). Several mechanisms have been associated with *Trichoderma* spp. ability to control plant pathogens including nutrient competition, antibiotics and antifungal metabolites production, and mycoparasitism by cell wall degrading enzymes (Howell, 2003; Vinale et al., 2008). Extracellular chitinase and protease production increases significantly when *Trichoderma* spp. is grown in medium supplemented with either autoclaved mycelium or fungal cell walls (Elad et al., 1982; Geremia et al., 1993) and a correlation between biocontrol ability of *Trichoderma* spp. and lytic enzymes activities has been reported (Flores et al., 1997; Herrera-Estrella and Chet, 1999).

Trichoderma isolated from agricultural crops rhizosphere have been the subject of several researches. However, those isolated from extreme environment remain poorly studied. Although fungal isolates from hot desert were revealed to play an important role in seeds germination by breaking dormancy and increasing water uptake (Delgado-Sánchez et al., 2011). The objective of this investigation was to evaluate the potential of fourteen strains of *Trichoderma* isolated from Algerian desert soils for their biocontrol ability against three causal agent of root and crown rot of wheat in Algeria, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo and *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (Bouregghda et al., 2010; Lounaci and Athmani-Guemouri, 2014), focusing on the relationship between their ability to reduce disease index of pathogens and their cell wall degrading enzymes activities.

Materials and Methods

Isolation and identification of pathogens and antagonists

The pathogen strains used in this study are originated from culture collection of the Laboratory of Phytopathology and Molecular Biology of the National High School of Agronomy (ENSA), El-Harrach, Algiers, Algeria. *Fusarium* strains were isolated from wheat diseased plant (root rot) and identified based on morphological characters using the literature Tousson and Nelson (1976), Booth (1977), Leslie and Summerell (2006). *F. culmorum* identification was confirmed by DNA analysis with Fco1 primers (Fco1 Forward: ATGGTGAAC TCGTCGTGGC, Fco1 Revers: CCCTTCTTACGCCAATCTCG). Strains of the three *Trichoderma* species *T. harzianum*, *T. viride* and *T. hamatum* were isolated from desert soil of six sites in the southern east of Algeria (Table 1) by the dilution plate method described by Davet and Rouxel (1997). *Trichoderma* isolates were identified at species level based on phenotypic and molecular approaches. Phenotypic identification was performed by observation of colony characteristics at different temperatures and by

Table 1List of *Trichoderma* spp. strains used in the present investigation

Isolate code	Species	Origin	Isolation year
Thr.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ain Ben Naoui	2012
Thr.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Doucen	2012
Thm.3	<i>Trichoderma hamatum</i>	Foughala	2012
Thr.4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Foughala	2012
Thr.5	<i>Trichoderma harzianum</i>	Foughala	2012
Thv.6	<i>Trichoderma viride</i>	Foughala	2012
Thm.7	<i>Trichoderma hamatum</i>	El-Hadjeb	2012
Thr.8	<i>Trichoderma harzianum</i>	Doucen	2013
Thr.9	<i>Trichoderma harzianum</i>	Loutaya	2013
Thr.10	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tighdidine	2013
Thr.11	<i>Trichoderma harzianum</i>	El-Hadjeb	2013
Thr.12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Loutaya	2013
Tv.13	<i>Trichoderma viride</i>	Doucen	2013
Thr.14	<i>Trichoderma harzianum</i>	Loutaya	2013

Thr: *T. harzianum*, Thm: *T. hamatum*, Tv: *T. viride*

microscopic studies of conidiophores, phialides and conidia. Phenotypic results were compared to a taxonomic key of the genus *Trichoderma* as described by Rifai (1969), Bissett (1984; 1991a, b, c), Gams and Bissett (1998), Chaverri et al. (2003). This investigation was completed by molecular identification performed by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 rRNA region using the primers ITS1 and ITS4 as described by White et al. (1990). The single cultures spores of isolates were maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants at 4 °C and subcultured at 2 month intervals.

Plant material

The wheat cultivar Vitron known for its sensitivity to the *Fusarium* root rot and head scab of wheat was used in the present study.

Antagonistic activity of *Trichoderma* strains in vitro

Interactions between antagonistic fungi and pathogenic fungi were carried out by direct confrontation method described by Benhamou and Chet (1996). One mycelial disc (5 mm) of each fungus was placed at opposite poles on PDA plates, keeping a distance of 4 cm between the two fungi and incubated at 25 °C for 7 days. Three replicates were made for each combination of *Trichoderma* isolate/pathogen. Plates containing only the pathogens were used for control. Growth of pathogenic strains was measured at two days intervals and the hyphal interactions were studied under optical microscope. Inhibition percentage of the pathogen mycelial growth was estimated using the following formula: $I (\%) = (1 - Cn/C0) \times 100$. Cn: diameter of pathogen colony in the presence of the antagonist (mm). C0: Colony diameter of the control (mm).

Enzyme production

For hydrolytic enzyme production, discs (5 mm diameter) from 5-day-old cultures of *Trichoderma* isolates previously grown on potato dextrose agar (PDA) were inoculated into synthetic medium (SM) containing the following components (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; K_2HPO_4 , 0.9; KCl, 0.2; NH_4NO_3 , 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002; MnSO_4 , 0.002 and ZnSO_4 , 0.002. The medium was supplemented with cellular wall (2 g/l) of each fungal pathogen as carbon source prepared according to Sivan and Chet (1989). The cultures were grown in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml SM medium with constant shaking (120 rpm) at 30 °C. After 72 h, the cultures were filtered through Whatman 1 filter paper at 4 °C. All experiments were performed in triplicate.

Estimation of protein and enzyme activity in the culture filtrates

The protein content in the culture filtrates was estimated by Bradford (1976) method using bovine serum albumin (BSA) as standard. The chitinase assay mixture consisting of 1 ml culture filtrate and 1 ml suspension of colloidal chitin (0.5% in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) was incubated at 37 °C under constant shaking. After 30 min, the released N-acetyl glucosamine in reaction mixture was estimated by the dinitrosalicylic (DNS) method described by Miller (1959). One unit (U) enzyme activity was defined as the amount of enzyme, which produced 1 μ mole of N-acetylglucosamine per minute. Protease activity was measured by the method of Kembhavi et al. (1993) using casein as a substrate. A 0.5 ml of the culture filtrate was mixed with 0.5 ml solution of casein (1% in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) and incubated for 15 min at 50 °C. The reaction was stopped by addition of 0.5 ml of trichloroacetic acid (20%; w/v). One unit enzyme activity was defined as the amount of enzyme, which produced 1 μ g of tyrosine per minute during the hydrolysis reaction under standard assay conditions. Specific activity is given in units per mg protein.

Antagonistic activity of Trichoderma strains in vivo

Soil infestation with pathogens

Soil infestation with fungal pathogens was carried out according to the method described by Khalifa (2006). A mixture of 54 g wheat seed and 22 ml of distilled water was distributed in flasks of 250 ml and then autoclaved at 120 °C for 20 minutes. The mixture was inoculated with five discs (5 mm) from 7-day-old culture of the pathogen. The mixture was incubated at 25 °C under continuous light for 15 days. Wheat seeds sown at a rate of 5 grains per pot were covered with 2.5 g of the mixture then covered by autoclaved soil.

Wheat seed treatment by Trichoderma strains

This test was conducted following the technique described by Harman et al. (1989). Wheat seeds were treated by *Trichoderma* spp. spore suspensions at a concentration of 10^6 – 10^7 spores/ml and at rate of 1 ml/4 g of seed. The treated seeds were incubated for

24 h at 25 °C in the dark. Four pots were used for each treatment as well as controls. Two controls were used, a positive control with untreated wheat seeds sown in pathogen-infested soil and a negative control with untreated seeds sown in non-infested soil. Severity disease estimated by a disease scale ranging from 0 to 3 based on the presence of black or brown lesions extending on the crown surface: 0: no symptom; 1: 1 to 25%; 2: 25 to 50%; 3: More than 50%.

Results

In dual culture, all *Trichoderma* isolates exhibited significant inhibition on growth of pathogens compared to the control (Table 2). Among *Trichoderma* isolates tested, *T. harzianum* Thr.4 showed the strongest growth inhibition activity against *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. verticillioides* by 70.68%, 67.05% and 70.57%, respectively. In fact, isolates Thr.4, Thr.10 and Thr.8 of *T. harzianum* showed high potential antagonistic activity against the three pathogens, and inhibited their growth with a percentage higher than 60%. Low growth rate of the three pathogens tested compared to controls was observed in the presence of *T. viride* Tv.6. In addition, these isolates were able to overgrow and sporulate above *F. culmorum* colonies after 5 to 6 days of incubation but no overgrowth was observed with *F. graminearum* and *F. verticillioides*. Microscopic examination of the interaction zone between antagonistic and pathogenic fungi revealed the coiling of

Table 2

Effect of *Trichoderma* spp. on colony diameter of *Fusarium* strains in dual culture after 7 days of incubation

Isolates	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	Colony diameter (mm)	% of reduction	Colony diameter (mm)	% of reduction	Colony diameter (mm)	% of reduction
Thr.1	37.00 de	55.42	40.00 de	54.02	41.33 h	46.32
Thr.2	38.33 e	53.81	36.00 c	58.62	32.66 d	57.58
Thm.3	42.00 fg	49.39	44.33 f	49.04	39.33 fg	48.92
Thr.4	24.33 a	70.68	28.66 a	67.05	22.66 a	70.57
Thr.5	33.33 c	59.84	37.66 cd	56.71	31.66 cd	58.88
Tv.6	30.00 b	63.85	35.66 c	59.01	30.66 c	60.18
Thm.7	41.33 f	50.20	51.66 h	40.62	40.33 gh	47.62
Thr.8	32.33 c	61.04	32.33 b	62.83	27.33 b	64.50
Thr.9	35.66 d	57.03	44.00 f	49.42	32.33 cd	58.01
Thr.10	28.66 b	65.46	31.33 ab	63.98	24.33 a	68.40
Thr.11	43.66 h	47.39	48.00 g	44.82	46.66 i	39.40
Thr.12	43.00 gh	48.19	43.66 f	49.81	31.33 cd	59.31
Tv.13	33.66 c	59.44	48.66 gh	44.06	37.66 f	51.09
Thr.14	41.00 f	50.60	41.33 ef	52.49	35.33 e	54.11
Control	83.00 i	–	87.00 i	–	77.00 j	–

Thr: *T. harzianum*, Thm: *T. hamatum*, Tv: *T. viride*

Values in the column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey test at $P < 0.05$

Table 3

Effect of *Trichoderma* spp. on disease severity

Isolates	<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	Disease index	Severity reduction	Disease index	Severity reduction	Disease index	Severity reduction
Thr.1	1.25 de	52.83	1.93 ef	35.66	1.69 de	41.52
Thr.2	1.60 g	39.62	2.40 g	20.00	1.45 d	49.82
Thm.3	0.99 c	62.64	1.17 c	61.00	1.10 c	61.93
Thr.4	0.27 a	89.81	0.48 a	84.00	0.30 a	89.61
Thr.5	1.05 cd	60.37	1.24 c	58.66	1.12 c	61.24
Tv.6	0.33 a	87.54	0.60 a	80.00	0.64 b	77.85
Thm.7	1.03 cd	61.13	1.15 c	61.66	1.14 c	60.55
Thr.8	0.98 c	63.01	1.24 c	58.66	1.15 c	60.20
Thr.9	1.56 fg	41.13	1.68 d	44.00	1.48 d	48.78
Thr.10	0.64 b	75.84	0.85 b	71.66	0.75 b	74.04
Thr.11	1.96 h	26.03	2.11 f	29.66	1.86 e	35.64
Thr.12	1.78 gh	32.83	2.01 ef	33.00	1.51 d	47.75
Tv.13	1.05 cd	60.37	1.24 c	58.66	1.13 c	60.89
Thr.14	1.35 ef	49.05	1.90 e	36.66	1.86 e	35.64
Control	2.65 i	–	3.00 h	–	2.89 f	–

Thr: *T. harzianum*, Thm: *T. hamatum*, Tv: *T. viride*

Values in column followed by same letter are not significantly different according to Tukey test at P < 0.05

the *Trichoderma* spp. around hyphae of the pathogenic fungus and finally segmentation of their mycelia, showing the process of mycoparasitism.

The efficiency of all *Trichoderma* spp. isolates under greenhouse conditions (pot trial) was evaluated during the first week of germination and 30 days after sowing. Disease incidence and severity of the seedlings treated with *Trichoderma* spp. were significantly less than the control inoculated only with pathogen (Table 3). Seed treatment with *T. harzianum* Thr.4 resulted in the highest percentage of disease decrease for the three pathogens, followed by *T. viride* Tv.6 and *T. harzianum* Thr.10. *F. graminearum* isolate was the most aggressive pathogen with disease index of 3.00, followed by *F. verticillioides* and *F. culmorum* with 2.89 and 2.65, respectively. The isolates Thr.5, Thr.8 (*T. harzianum*), Thm.3, Thm.7 (*T. hamatum*) and *T. viride* Tv.13 also strongly decreased disease index (by ~60%) for the three fungal pathogens. In addition, this study has shown variability in the antagonistic ability of the isolates belonging to *T. harzianum* and *T. viride* species compared to *T. hamatum* towards the same pathogenic agent.

The hydrolytic enzymes production by *Trichoderma* isolates was tested using cell walls of the three *Fusarium* pathogens as sole carbon source. Cellular walls of fungal pathogens were degraded by all *Trichoderma* isolates and the specific proteolytic and chitinolytic activities were calculated (Fig. 1). Highest enzyme activities were exhibited by Thr.4 and Thr.8 of *T. harzianum* followed by *T. hamatum* Thm.3 with *F. graminearum* cell wall. When Thr.4, Thr.8 and *T. hamatum* Thm.3 were grown in media amended with hyphal cell walls of *F. graminearum*, the levels of chitinase were 4.10, 3.75 and 3.22 U/mg,

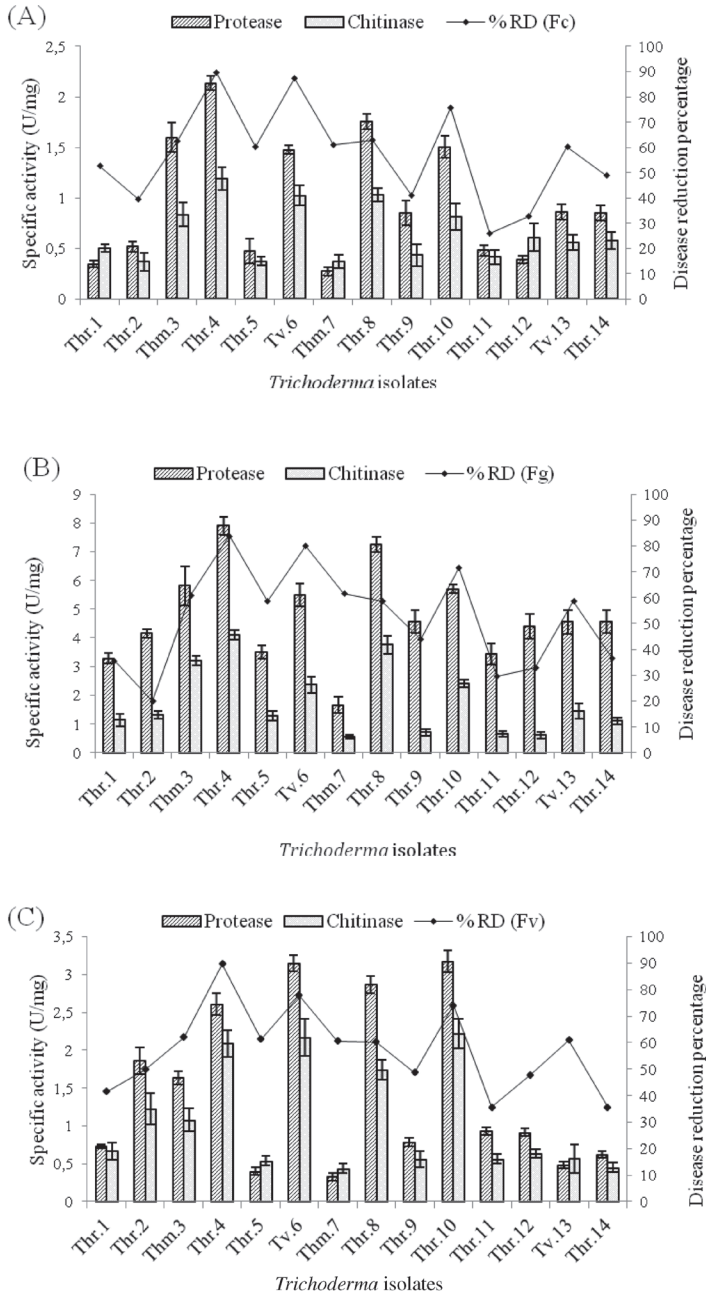


Fig. 1. Specific proteolytic and chitinolytic activities of *Trichoderma* isolates grown on SM supplemented with cellular wall of each fungal pathogen, (A): *F. culmorum*. (B): *F. graminearum*. (C): *F. verticillioides*. Thr. *T. harzianum*, Thm. *T. hamatum*, Tv. *T. viride*. % RD: Disease reduction percentage. Each result is the mean of three replicates $\pm$ SD

respectively. On the other hand, high level of proteolytic activity was shown by these isolates in the same medium, specific proteolytic activity of *T. harzianum* Thr.4 (7.90 U/mg) was also higher than *T. harzianum* Thr.8 (7.25 U/mg) and *T. hamatum* Thm.3 (5.81 U/mg). High lytic activities were also recorded for *T. viride* Tv.6 and *T. harzianum* Thr.10 in the medium amended with cell wall of *F. graminearum*. Both isolates produced maximal lytic activities when hyphal walls of *F. verticillioides* were used as sole carbon source. However, minimum enzyme activities were observed by the most of *Trichoderma* isolates with *F. culmorum* cell wall. The specific activities of protease and chitinase of *T. hamatum* Thm.7 were the lowest with the three fungal cell walls.

Discussion

In the present investigation *in vitro* and *in vivo* antagonistic activity of fourteen isolates of *Trichoderma* spp. against three causal agents of wheat *Fusarium* crown and root rot were studied. Dual culture experiments have shown highly significant growth reduction of pathogens compared to the controls. Nevertheless, isolates Thr.4, Thr.8 and Thr.10 of *T. harzianum* and *T. viride* Tv.6 were more effective than other isolates used for reducing growth of the three fungal pathogens. Furthermore, these isolates were able to overgrow and sporulate on *F. culmorum* colonies after 5 to 6 days of incubation, showing their highest mycoparasitic capacity towards this fungal pathogen. Similar phenomenon was described by Benhamou and Chet (1996) during confrontation between *T. harzianum* and soil born fungus, *Pythium ultimum*. However, *Trichoderma* spp. used in this study were not able to invade *F. graminearum* and *F. verticillioides* colonies with formation of lytic zones between the pathogen and *Trichoderma* spp. colonies. Formation of clear zones in dual cultures could be explained by the production of extracellular hydrolytic enzymes rather than production of growth inhibiting substances by *Trichoderma* spp. (Benhamou and Chet 1993; Haran et al., 1996). These isolates have a rapid growth compared to the other antagonists, especially the two isolates of *T. hamatum*. Competitiveness of *Trichoderma* spp. based on rapid growth and germination is a decisive feature for antagonism (Camporota, 1985; Chet et al., 1998).

Dual culture tests have also shown that all *Trichoderma* isolates were able to inhibit the mycelial growth of the three fungal pathogens prior to mycelial contact, indicating a possible production of diffusible components by the antagonists, such as lytic enzymes or water-soluble metabolites (Grondona et al., 1997; Anees et al., 2010). Previous studies have demonstrated that before mycelia of fungi interact, *Trichoderma* spp. produces low level of extracellular exochitinases (Kullnig et al., 2000; Brunner et al., 2003). The diffusion of these lytic enzymes dissolves cell fragments of pathogen cells. The degraded cell wall components from pathogens induced the production of further enzymes and the expression of gene related to mycoparasitism increasing the antagonism of *Trichoderma* spp. allowing them to be more antagonistic (Vinale et al., 2008).

The hydrolytic enzymes production by fourteen isolates of *Trichoderma* spp. in the presence of fungal pathogen cell walls as sole carbon source, indicates that these substrates can be used as inducers of lytic enzymes production. This result was also supported by Elad

et al. (1982), Sivan and Chet (1989) and Geraldine et al. (2013). Most of *Trichoderma* spp. isolates tested in this study were able to produce a high level of chitinase and protease when grown in the presence of *F. graminearum* cell wall, whereas cell walls of *F. verticillioides* and particularly *F. culmorum* were less effective as inducers of these two enzymes. Sivan and Chet (1989) have explained difference in cell wall degrading enzymes activities of *T. harzianum* against *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium* species by protein content in their cell walls, they have argued that cell walls of *Fusarium* species contain more protein (7–28%) than walls of other fungi. Chemical composition analysis indicates that the hyphal wall of *F. culmorum* contains more protein than the cell walls of *F. graminearum* with only 4.5% (Laborda et al., 1974; Barbosa and Kemmelmeier, 1993). Several studies have reported that chitinase and protease involved in mycoparasitism of *Trichoderma* strains play an important role in the destruction of the plant pathogens. These enzymes are responsible of breakdown of the host cell wall, since fungal cell walls contain chitin embedded in a protein matrix (Elad et al., 1982; Sivan and Chet, 1989; Peberdy, 1990).

The results obtained *in planta* tests by seed treatment with *Trichoderma* spp. have shown the effectiveness of all *Trichoderma* ssp. isolates used in this study on biocontrol of wheat crown and root rot. The highest disease index reduction was obtained with Thr.4 and Thr.10 of *T. harzianum* and Tv.6 of *T. viride* against the three fungal pathogens. Sivan and Chet (1986) reported that application of *T. harzianum* under greenhouse conditions resulted in a significant control of *F. culmorum* on wheat. Other investigations have also shown the effectiveness of these two species as biocontrol agents in reduction of *Fusarium* diseases on wheat (Dal Bello et al., 2002; Salehpour et al., 2005; Foroutan, 2013). In general, data obtained *in planta* bioassay were consistent with the clear inhibitory effects exhibited by the antagonists on pathogen growth in dual culture tests, and with their cell walls degrading enzymes activities. However, we cannot correlate high biocontrol capacity of disease with chitinase and protease specific activities because isolates, such as *T. harzianum* Thr.5, *T. hamatum* Thm.7, and *T. viride* Tv.13, showed important ($\approx 60\%$) disease reduction percentage but low levels of protease and chitinase activities. Despite this finding, Elad and Kapat (1999) have shown a correlation between protease activity and biocontrol capacity of *T. harzianum* against *Botrytis cinerea* under greenhouse conditions. In addition, authors studies suggest that increased secretion of extracellular enzymes such as chitinase, β -1,3-glucanases and proteases should be key components of *Trichoderma* spp. action in biocontrol of phytopathogens in the field and may be used as markers to hasten the selection of new promising isolates (Benítez et al., 2004; Woo et al., 2006; Geraldine et al., 2013).

Seed treatment by the antagonist agents enables them to invade the roots and the rhizosphere colonization which is an important characteristic of antagonists of soil borne pathogens. Studies showed a variability in root colonization ability of *Trichoderma* spp., some strains can colonize only some sites located on the roots level (Metcalf and Wilson, 2001), but other can colonize the whole surface of the roots for several weeks (Thrane et al., 1997) or month (Harman, 2000). *Trichoderma* species showed a widespread capacity to act against pathogens through various mechanisms including antibiosis, mycoparasitism and rhizosphere competence. These species showed also their capacity to induce systemic resistance against various classes of plant pathogens including fungi, bacteria and viruses in a variety of plants (Harman, 2000; Howell, 2003; Harman et al., 2004).

Literature

- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C. and Steinberg, C. (2010): Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.* 114, 691–701.
- Barbosa, I. P. and Kimmmeier, C. (1993): Chemical composition of the hyphal wall from *Fusarium graminearum*. *Exp. Mycol.* 17, 274–283.
- Benhamou, N. and Chet, I. (1993): Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83, 1062–1071.
- Benhamou, N. and Chet, I. (1996): Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, 405–416.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón, A. C. (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.
- Bissett, J. (1984): A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec. nov. *Can. J. Bot.* 62, 924–931.
- Bissett, J. (1991a): A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69, 2357–2372.
- Bissett, J. (1991b): A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69, 2373–2417.
- Bissett, J. (1991c): A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69, 2418–2420.
- Booth, C. (1977): Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, England, 220 p.
- Bouareghda, H., Djeghmoum, C. and Bouroubi, N. (2010): Study of *in vitro* growth and pathogenicity of some isolates of *Fusarium* spp. causal agent of *Fusarium* head scab and root rot of wheat. Abstract Book of 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. 20–25 June 2010, Rome, Italy.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. and Kubicek, R. L. (2003): The Nag I *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase by chitin and major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43, 289–295.
- Camporota, P. (1985): Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agro-nomie* 5, 613–620.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E. and Samuels, G. J. (2003): *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* 95, 1100–1140.
- Chet, I., Benhamou, N. and Haran, S. (1998): Mycoparasitism and lytic enzymes. In: G. E. Harman and C. P. Kubicek (eds): *Trichoderma and Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, London, pp. 153–172.
- Cook, R. J. (1980): *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 64, 1061–1066.
- Cook, R. J. (2010): *Fusarium* root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. In: W. W. Bockus, R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray and R. Smiley (eds): *Compendium of Wheat Diseases and Pests*. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA, pp. 37–39.
- Dal Bello, G. M., Monaco, C. I. and Simón, M. R. (2002): Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microb. Biot.* 18, 627–636.
- Davet, P. and Rouxel, F. (1997): Détection et isolement des champignons du sol. INRA, Paris.
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Jiménez-Bremont, J. F. and Flores, J. (2011): Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biol.* 13, 154–159.
- Elad, Y. and Kapat, A. (1999): The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 177–189.
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. (1982): Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28, 719–725.
- Flores, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1997): Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* 31, 30–37.

- Foroutan, A. (2013): Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of wheat *Fusarium* foot and root rot. Rom. Agric. Res. 30, 335–342.
- Gams, W. and Bissett, J. (1998): Morphology and identification of *Trichoderma*. In: C. P. Kubicek and G. E. Harman (eds): *Trichoderma and Gliocladium*, basic biology, taxonomy and genetic. Taylor and Francis, London, pp. 3–31.
- Geraldine, A. M., Lopes, F. A. C., Carvalho, D. D. C., Barbosa, E. T., Rodrigues, A. R., Brandão, R. S., Ulhoa, C. J. and Lobo Junior, M. (2013): Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biol. Control. 67, 308–316.
- Geremia, R., Goldman, G., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S., Van Montagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1993): Molecular characterization of the proteinase-encoding gene *prb1* related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8, 603–613.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. and Garcia-Acha, I. (1997): Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborn fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3189–3198.
- Haran, S., Schickler, H. and Chet, I. (1996): Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142, 2321–2331.
- Harman, G. E. (2000): Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Dis. 84, 377–393.
- Harman, G. E., Taylor, G. and Starz, T. E. (1989): Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. Plant Dis. 73, 631–637.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Vitebro, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004): *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews/Microbiology 2, 43–56.
- Harman, G. E., Björkman, T., Ondik, K. and Shores, M. (2008): Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Outlooks on Pest Management. DOI: 10.1564/19 feb00.
- Herrera-Estrella, A. and Chet, I. (1999): Chitinases in biological control. In: P. Jolles and R. A. A. Muzzarelli (eds): Chitin and Chitinases. Birkhäuser Publishing, Ltd. Basel, Switzerland, pp. 171–184.
- Howell, C. R. (2003): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87, 4–10.
- Kembhavi, A. A., Kulkarni, A. and Pant, A. A. (1993): Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No 64. Appl. Biochem. Biotechnol. 38, 83–92.
- Khalifa, M. (2006): Common root rot of wheat in Syria and DNA variability within *Fusarium* spp. as a major pathogen. PhD thesis University of Aleppo, Syria, 109 p.
- Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M. and Kubicek, C. P. (2000): Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2232–2234.
- Laborda, F., Garcia Acha, I., Uruburu, F. and Villanueva, J. R. (1974): Structure of conidial walls of *Fusarium culmorum*. J. Brit. Mycol. Soc. 62, 557–566.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006): The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, USA, 388 p.
- Lounaci, L. and Athmani-Guemouri, S. (2014): Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie. Algerian J. Natural Products 2, 35–42.
- Metcalf, D. A. and Wilson, C. R. (2001): The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* white rot affected onion roots by *Trichoderma Koningii*. Plant Pathol. 50, 249–257.
- Miller, G. L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428.
- Moya-Elizondo, A. E. (2013): *Fusarium* crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. Cien. Inv. Agr. 40, 235–252.
- Nelson, D. E., Desjardins, A. E. and Plattner, R. D. (1993): Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 233–252.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. and Mcleod, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. Plant Pathol. 44, 207–238.

- Peberdy, J. F. (1990): Fungal cell wall-a review. In: P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. M. Goosey and I. G. Cooping (eds): *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 5–24.
- Rifai, M. A. (1969): A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116, 1–56.
- Salehpour, M., Etebarian H. R., Roustaci, A., Khodakaramian, G. and Aminian, H. (2005): Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* isolates. *Plant Pathology* 4, 85–90.
- Sivan, A. and Chet, I. (1986): Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.* 116, 39–47.
- Sivan, A. and Chet, I. (1989): Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 675–682.
- Thrane, C., Tronsmo, A. and Jensen, D. F. (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. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 331–344.
- Tousson, T. A. and Nelson, P. E. (1976): A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomy system of Snyder and Hansen. The Pennsylvania State University Press, 43 p.
- Tunali, B., Nicol, J. M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M. A. and Bağcı, S. A. (2008): Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Dis.* 92, 1299–1306.
- Vinale, F., Sivasithamparamb, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M. (2008): *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1–10.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds): *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 315–322.
- Wiese, M. V. (1987): Common (dryland) root and foot rot and associated leaf and seedling diseases. In: M. V. Wiese (ed.): *Compendium of Wheat Diseases*. American Phytopathological Society, APS Press, pp. 53–55.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M. (2006): The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96, 181–185.

ANNEXES

Annexe 1 : milieux de culture et solutions

PDA

Dextrose	20 g
Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Eau distillée*	1000 ml

TME

Glucose	3 g	Solution d'oligo-éléments	
NH ₄ NO ₃	1 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.9 g	MnSO ₄ .4H ₂ O	0.65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.9 g
KCl	0.15 g	Eau distillée	1000 ml
Qunitozene	0.2 g		
Rose bengal	0.15 g		
Solution d'oligoéléments	1 ml		
Agar	20 g		
Eau distillée	1000 ml		
Chloramphénicol	0.25 g		

TSM

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.9 g
KCl	0.15 g
NH ₄ NO ₃	1 g
Glucose	3 g
Chloramphenicol	0.25 g
Rose Bengal	0.15 g
Fénaminosulf	0.3 g
Quintozone	0.2 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

CYA

Saccharose	30 g	Czapec concentré	
Extrait de levure	5 g	NaNO ₃	30 g
K ₂ HPO ₄	1 g	KCl	5 g
Czapec concentré	10 ml	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
Agar	15 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Eau distillée	1000 ml	Eau distillée	1000 ml

Czapec Dox

NaNO ₃	2 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Saccharose	30 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

CLM

Peptone tryptique	10 g
Glucose	10 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Eau distillée	1000 ml

BPD

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Eau distillée*	1000 ml

Kuster-Amidon

Amidon	5 g	Solution d'oligo-éléments	
Caséine	0.3 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
KNO ₃	2 g	CaCO ₃	2 g
NaCl	2 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g	Eau distillée	100 ml
Oligo-éléments	1 ml		
Agar	18 g		
Eau distillée	1000 ml		

King A

Peptone bactériologique	20 g
Glycérol	10 g
MgCl ₂	1.4 g
K ₂ SO ₄	10 g
Agar	13g
Eau distillée	1000 ml

King B

Peptone bactériologique	20 g
Glycérol	10 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5 g
Agar	13g
Eau distillée	1000 ml

TCA

Bactotryptone	20 g
Extrait de levure	2 g
Glucose	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ SO ₃	0.5 g
Agar	13g
Eau distillée	1000 ml

Les échantillons du sol sont chauffés à 80°C pendant 10 min

MSM

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.9 g
KCl	0.2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄	0.002 g
ZnSO ₄	0.002 g
NaNO ₃	1 g

Lactophénol bleu-coton

Acide lactique	20 g
Glycérol	20 g
Phénol	20 g
Eau distillée	20 ml

Annexe 02: Tests d'identification bactérienne

Test effectué	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Actinomycètes</i>
Coloration de Gram	-	+	+
Morphologie	Bacilles mobiles	Grands bacilles	filamenteuses
Test enzymatique			
Catalase	+	+	+/-
Oxydase	+	+/-	-
Test biochimique			
Mannitol	+/-	+/-	+/-
Lactose	/	/	+/-
glucose	+/-	+/-	+

+/- : caractère variable

Annexe 03: Clés d'identification des différentes classes de champignons

Dans les lignes ci-dessous on présente les caractères clés d'identification de chaque classe de champignons selon Alexopoulos et *al.* (1996 ; par rapport aux moisissures isolées au cours de notre étude):

1. Zygomycètes (champignons inférieurs) :

- Des hyphes **très larges** et **sans cloisons** (coenocytique), peu cloisonné dans le cas d'*Absidia*.
- Présence de **sporocystes** qui sont observables au microscope à l'objectif $\times 5$ (et même l'œil nu).
- Le sporocystophore (large et longue) se termine par sporocyste.

2. Ascomycètes (champignons supérieurs) : champignons à asque d'où leur nomination

- Des hyphes **moins larges** que les zygomycètes et **cloisonnés** (septés).
- Présence des structures caractéristiques de la reproduction sexuée ; asques qui peuvent être protégés à l'intérieur des organes de fructification ; ascocarpes (vue à l'objectif $\times 5$ et même à l'œil nu): cléistothèces (*Pseudallescheria*), périthèce (*Chaetomium*). Les asques peuvent être libres (octosporé) : asques globuleux.

3. Deutéromycètes (champignons imparfaits) : la forme imparfaite d'Ascomycètes

- Des hyphes **cloisonnés** (septé)
- Pas de reproduction sexuée, se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidies) ou par simple fragmentation du mycélium, les conidies sont parfois absentes (mycélium stérile).

Annexe 04: Séquence de la région ITS1-5.8S-ITS2 amplifiée par ITS1 et ITS4**T1**

CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG
CCCGCCGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCC
TCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGG
CCCTGCCTCTTGGCGGGCGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA
CACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

T2

CTCCAACCCATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCC.CGGACCAA
GGCGCCCGCCGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGG
CGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA.ACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGA
TCGGCCCTGCCTCTTGGCGGGCGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTT
TGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG
GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

T3

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGG
ACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAG
CGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGG
GAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
TGAACCTTAAGCATATC

T4

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGG
ACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAG
CGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGG
GAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCT
GAACTTAAGCATATCATAAAAGGGGAGAAGGGAAGCGAGTTAAACCTCAAACCAATGTGAACGTTACAACT
GTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGAGCTCGCAGC

T5

TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGC
CGGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCG
TAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT

CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTG
CCTCTTGGCGGCGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACTC
GCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGGCAGGAGGAAA

T6

GAAATTGTGAGCGGCAGTCCCAACCCAATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGC
GTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTA
TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGG
GGGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTTGGCGGCGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCC
TCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTTCTGAA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGGGGAAGGAAACGAA

T7

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGG
ACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAG
CGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGG
GAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAACCTTAAGCATATCA

T8

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGG
ACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAG
CGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGG
GAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGGCG

T9

GCACCCAAGTGACGGCGCTCCAACCCATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCG
TCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTAT
AATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTT
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGG
GGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTC
TCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGAGGAGGAA

T10

AACCAATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGC
GCCCCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGC

CTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCG
GCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA
CACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGGGGAGGAA

T11

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGG
ACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTT
GGCGGGCGCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCG
GGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAACCTTAAGCATATC

T12

CGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGG
ACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCG
TTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAG
CGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGG
GAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG
AACTTAAGCATATC

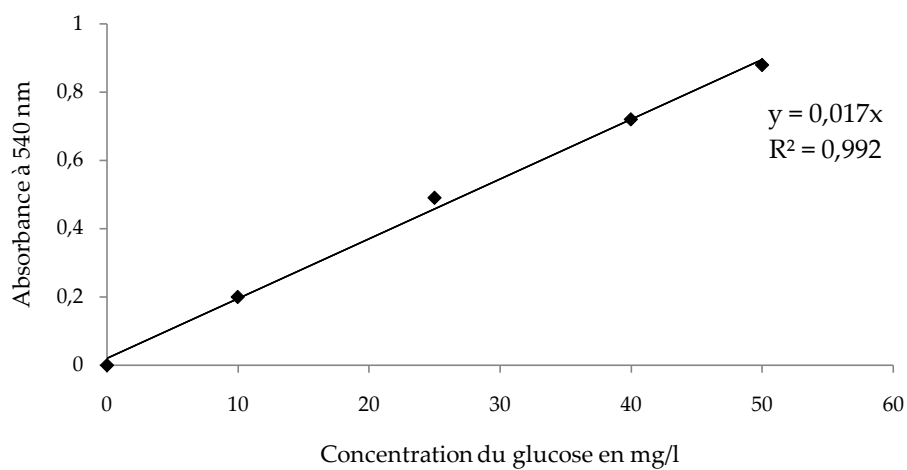
T13

GGATTTGGGGGAGGCGCTCCAACCCAATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCG
TCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTAT
AATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCT
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGG
GGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTC
TCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGG

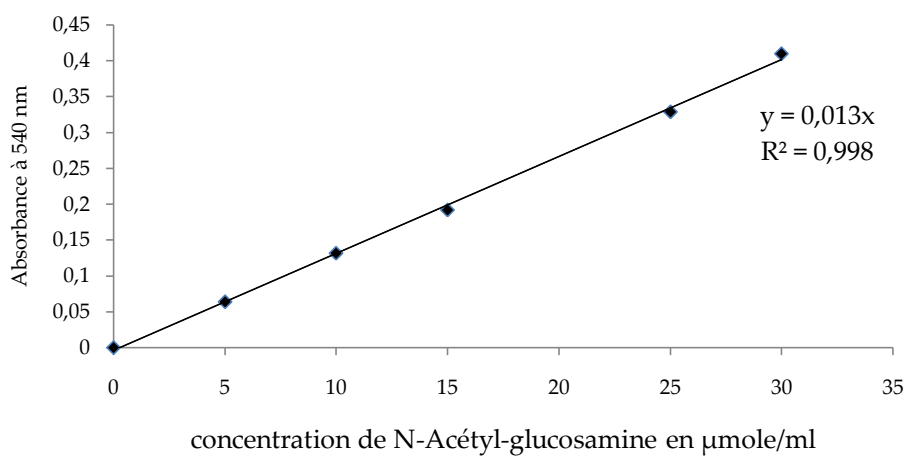
T14

AAACAGGACGGCGCTCCAACCCATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGC
AGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATC
TGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGT
CGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCT
GCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

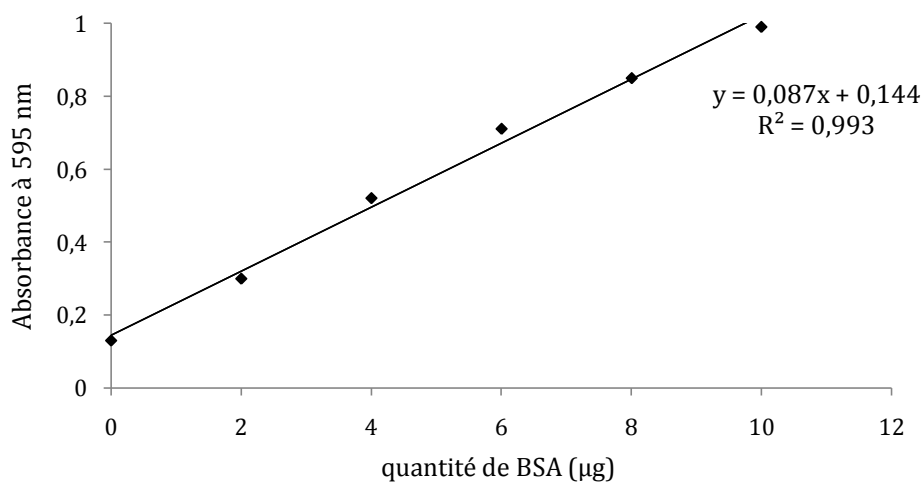
Annexe 05: Courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage du glucose



Courbe d'étalonnage N-acetylglucosamine



Courbe d'étalonnage des protéines

ملخص: في إطار البحث عن سلالات *Trichoderma* محلية من الصحراء الجزائرية و من أجل استغلال فعال لها في مكافحة البيولوجية ضد تعفن جذور وتاج القمح بالمناطق الجافة ، تم إجراء تحليلات ميكروبيولوجية وكيميائية لمتخلف عينات التربة. أظهرت معالجة البيانات بـ CCA تأثير كبير للمواد العضوية و الملوحة على توزيع *Trichoderma* ، إضافة إلى وجود *Pseudomonas* و *actinomycetes*. تحديد نوع عزلات *Trichoderma* تبين من خلال الجمع بين النتائج المورفولوجية، الفسيولوجية و تحليل تسلسل DNA لمنطقة ITS. دراسة فعالية تضاد عزلات *Trichoderma* اتجاه ثلاث أنواع ممرضة من *Fusarium* تمت باختبارات *in vitro* و *in vivo*. أظهرت النتائج المتحصل عليها بالمختبر قدرة جميع عزلات *Trichoderma* على التقليل المعتبر في إنتاج الأبواغ و النمو مقارنة بالشاهد. في اختبار المواجهة المباشرة، أعلى نسب التخفيض تم الحصول عليها بوجود *T.harzianum* Thr.4 التي قدرت بـ 70.68٪، 67.05٪ و 70.57 ضد *F. culmorum*، *F. graminearum* و *F. verticillioides* على التوالي. في حين أثناء المواجهة غير المباشرة أعلى نسب التخفيض تم الحصول عليها بوجود *T. viride* Tv.6، التي قدرت بحوالي 50٪. في اختبار *in vivo*، معالجة البذور بمستحضر *Trichoderma* قبل زرعها في تربة محقونة مسبقا بالفطريات مسببات المرض أدى إلى انخفاض كبير في شدة الإصابة بالمرض مقارنة بالشاهد. العزلات الأكثر فعالية (> 70٪) في حماية القمح ضد مسببات المرض الثلاثة هي *T. harzianum* (Thr.4 و Thr.10) و *T. viride* Tv.6. إنتاج الإنزيمات المحللة β -1,3-chitinase، glucanase و protease تم في رواشح بيئات زرع *Trichoderma*، حيث سجلت أعلى مستويات النشاط الانزيمي في وجود جدار الخلية *F.graminearum* كمصدر وحيد للكربون مقارنة بـ *F. culmorum* و *F. verticillioides*. العزلة *T.harzianum* Thr.4 أظهرت أعلى نشاط للإنزيمات المحللة في وجود الجدار الخلوي لـ *F.graminearum* و *F. culmorum*، بالمقابل في حالة *F. verticillioides* أعلى نشاط للإنزيمات المحللة سجلته *T. viride* Tv.6. أظهرت هذه الدراسة أن درجة الحرارة والملوحة تؤثر على إنتاج الإنزيمات المحللة التي تلعب دورا أساسيا في المكافحة البيولوجية لعزلات *Trichoderma*.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد، العوامل البيئية، الصحراء الجزائرية، *Trichoderma*، *Fusarium*، إنزيمات التحليلية.

Résumé : Dans le cadre de la recherche des souches de *Trichoderma* spp. autochtones du sahara Algérien et pour une application efficace de ces antagonistes contre la pourriture racinaire et de collet du blé dans les régions arides, des analyses microbiologiques et édaphiques ont été effectuées. Le traitement des données par ACC a montré l'impact majeur de la matière organique, la salinité, la présence de *Pseudomonas* et d'actinomycètes sur la répartition des *Trichoderma* spp. L'identité des *Trichoderma* spp. est confirmée par la combinaison des résultats des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que l'analyse génétique des séquences ITS. L'étude de l'efficacité des isolats appartenant aux espèces antagonistes de *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. viride* a été étudiée par des tests *in vitro* et *in vivo* à l'égard de trois isolats de *Fusarium* spp. Tous les isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une réduction significative de la sporulation et du diamètre de la colonie de *Fusarium* spp. par rapport au témoin. En confrontation directe, les pourcentages de réduction les plus élevés ont été obtenus en présence de *T. harzianum* Thr.4 avec une réduction de 70.68%, 67.05% et 70.57 contre *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. verticillioides*, respectivement. Cependant, en confrontation indirecte les pourcentages les plus élevés ont été obtenus par *T. viride* Tv.6 avec une réduction de l'ordre de 50%. Le traitement des semences par *Trichoderma* spp. avant de semer dans un sol déjà infesté par les agents pathogènes a abouti à une diminution significative de la gravité de la maladie par rapport au témoin non traité. Les isolats les plus efficaces (> 70%) dans la protection de blé contre les trois agents pathogènes sont les deux isolats de *T. harzianum* (Thr.4 et Thr.10) et *T. viride* Tv.6. La production de chitinase, de β -1,3 glucanase et de protéase est recherchée dans les filtrats des cultures des antagonistes. Les niveaux les plus élevés d'activité hydrolytique ont été enregistrés en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum* comme seule source de carbone par rapport à *F. verticillioides* et *F. culmorum*. L'isolat *T. harzianum* Thr.4 a montré les activités d'hydrolase les plus élevées en présence de la paroi cellulaire de *F. graminearum* et *F. culmorum*. Bien que dans le cas de *F. verticillioides*, les activités hydrolytiques maximales ont été enregistrées par *T. viride* Tv.6. La présente étude a montré que la température et la salinité influencent sur la sécrétion des hydrolases qui jouent un rôle essentiel dans la lutte biologique des isolats de *Trichoderma* spp.

Mots clés : antagonisme, facteurs écologiques, Sahara Algérien, *Trichoderma*, *Fusarium*, hydrolase

Abstract: As part of the search for autochthon strains of *Trichoderma* spp. from Algerian Sahara and for an effective application of these antagonistic strains against *Fusarium* crown and root rot of wheat in arid regions, microbiological and edaphic analyzes were performed. Data treatment with CCA showed the major impact of organic matter, salinity, presence of *Pseudomonas* and actinomycetes on *Trichoderma* spp distribution. Identity of *Trichoderma* spp. was confirmed by combining morphological results, physiological characteristics and genetic analysis of ITS sequences. Study of efficiency of the antagonist species *T. harzianum*, *T. hamatum* and *T. viride* was studied by *in vitro* and *in vivo* based bioassay against three pathogenic species of *Fusarium*. *In vitro* based bioassay results obtained with all *Trichoderma* spp. isolates showed significant decrease in colony diameter and sporulation of *Fusarium* species compared to the control. In direct confrontation, the highest percentages of reduction in colony diameter were obtained with *T. harzianum* Thr.4 causing a growth reduction of 70.68 %, 67.05 and 70.57 % against *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. verticillioides*, respectively. However, in indirect confrontation the highest percentages of reduction in colony diameter were around 50% obtained with *T. viride* Tv.6. The seed treatment by *Trichoderma* spp. isolates before sowing in a soil already infested by the pathogens led to a significant decrease of disease severity compared to the untreated control. The highest disease index decrease (>70 %) was obtained with two isolates of *T. harzianum* (Thr.4 and Thr.10) and *T. viride* Tv.6 against the three fungal pathogens. Production of chitinase, β -1,3-glucanase and protease was tested in the filtrates of cultures antagonists. Higher levels of hydrolytic activities were induced by hyphal cell walls of *F. graminearum* as sole carbon source than cell walls of *F. verticillioides* and *F. culmorum*. *T. harzianum* Thr.4 was exhibited the highest enzyme activities with hyphal cell walls of *F. graminearum* and *F. culmorum*. However, in the medium amended with cell wall of *F. verticillioides*, maximal lytic activities were recorded for *T. viride* Tv.6. The present study showed the influence of temperature and salinity on stability of hydrolases which play an essential role in the biological control of *Trichoderma* spp. isolates

Key words: antagonism, ecological factors, Algerian Sahara, *Trichoderma*, *Fusarium*, hydrolase.