



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة زيان عاشور-الجلفة
Université Ziane Achour – Djelfa
كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie



Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie Appliquée
Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* sp et
Gliocladium roseum Vis à - vis de quelques champignons
phytopathogènes**

Présenté par : -MEZATI Fadila
- KIDAR Aicha

Devant le jury :

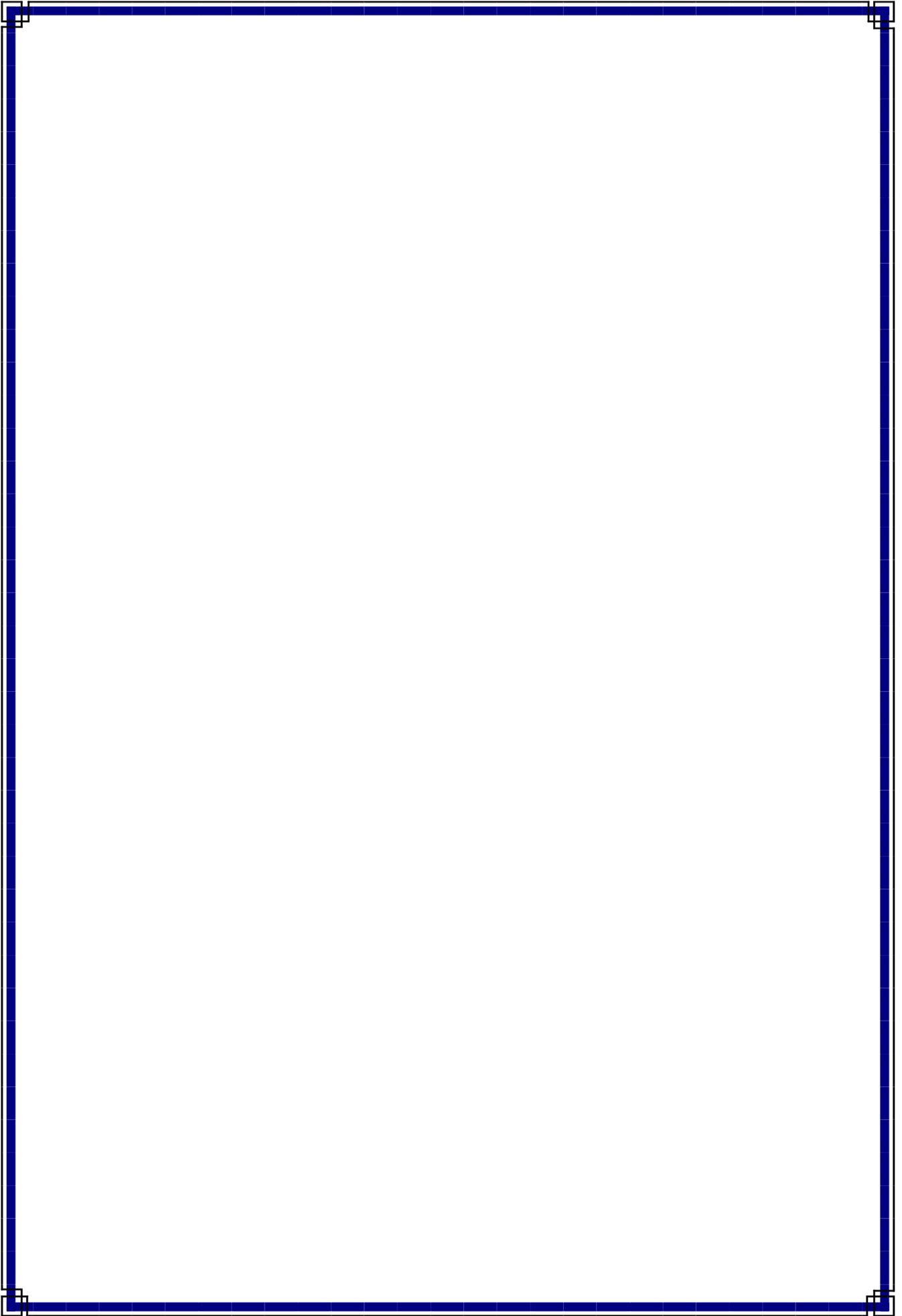
Président : Mr BERRABAH F MCB, Univ. Djelfa

Examinatrices : Mme KHREISAT N MAA, Univ. Djelfa

Mme CHENOUF A MAA, Univ. Djelfa

Promotrice : Mme SAHOULI S MAA, Univ. Djelfa

Année universitaires : 2018/2019



Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu «Allah» le tout puissant miséricordieux de nous avoir donné le courage et la confiance ainsi que la volonté pour préparer ce travail.

Nous remercions nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite.

*Nous souhaitons remercier l'équipe du laboratoire On tient aussi à remercier notre encadreur **Mme SAHOULI Safia** pour son professionnalisme et ses conseils précieux*

Enfin je remercie chacune des personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de notre memoires.

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

*À mes très chers parents dont le soutien est
inestimable AMEUR & HADDA*

A mes soeurs bien aimée : KARIMA et FATNA

A mon cher frère : MEKHALET

A mes cher oncle: ADEL ,MOHAMED

*A mes amis : SIHEM , WIDAD, SELMA, SAAD,
MORAD, NOURHAN, SALIMA ,HANAN,
ISMAHANE*

A mes familles: MEZATI et DJAAROUN

A tous mes ami(e)

Fadila



DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

*À mes très chers parents dont le soutien est
inestimable*

ABD ELKADER et FATNA

A mes soeur bien aimée : SAIDA et FATI

*A mes cher frère : lakhdar, Abd el hadi,
Mustafa, Ahmed, Omar, Khaled, Abd el Slem*

A mon cher mari : ABD ELKADER

A mes amis et sur tous chiboute khadidja

*A mes familles : KIDAR, MENZAH, SAADI ,
ZOGBI, MRIZAK, KHALDI.*

A tous mes ami(e)s

AICHA



Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

1.Généralité sur les agents pathogènes.....3

1.1-*Fusarium oxysporum*.....3

1.1.1-Taxonomie.....3

1.2- *Fusarium proliferatum*.....4

1.3-*Alternaria* sp.....5

2. La lutte biologique.....6

3. Les agents de bio contrôle.....6

4. Généralité sur *Trichoderma* sp et *Gliocladium* sp.....7

4.1-*Trichoderma* sp.....7

4.1.1- Définition.....7

4.1.2- Historique.....7

4.1.3- taxonomie9

4.1.4- Morphologie.....10

4.1.5- Ecologie et habitat11

4.2- *Gliocladium* sp.....12

4.2.1-Définition.....12

4.2.2- Morphologie et taxonomie.....12

4.2.3- Ecologie et habitat.....13

| | |
|--|----|
| 5. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique..... | 14 |
| 6. Mode d'action des agent de lutte biologique | 14 |
| 6. 1- Compétition..... | 14 |
| 6. 2- Mycoparasitisme..... | 15 |
| 6. 3- Antibiose..... | 15 |

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel fongique | 16 |
| 2. Echantillonnage du sol | 16 |
| 3. Isolement des agents antagoniste..... | 16 |
| 4. Repiquage et purification..... | 16 |
| 5. Identification des souches sélectionnées..... | 17 |
| 5.1- Etude macroscopique..... | 17 |
| 5.2- Etude microscopique..... | 17 |
| 6. Les tests d'antagonisme et mode d'action | 17 |
| 6.1- Confrontation par contact direct | 18 |
| 6.2- Confrontation à distance..... | 18 |
| 6.3- Evaluation du pourcentage d'inhibition..... | 19 |
| 7. Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes..... | 20 |
| 7.1- Production des ligninases..... | 20 |
| 7.2- Production des protéases..... | 20 |
| 7.3- Production des amylases..... | 20 |
| 7.4- Production des cellulases..... | 20 |
| 8. Production des phytohormones (AIA)..... | 21 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|--|-----------|
| 1.Résultats..... | 22 |
| 1.1-Isolement et Identification des agents antagonistes..... | 22 |
| 1.2-Identification des souches sélectionnées..... | 23 |
| 1.2.1- <i>Trichoderma sp.</i> | 23 |
| 1.2.1- <i>Alternaria sp.</i> | 24 |
| 1.3- Les tests d'antagonisme et mode d'action..... | 25 |
| 1.3.1- Confrontation par contact direct..... | 25 |
| 1.3.2- Confrontation à distance..... | 28 |
| 1.4- Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes..... | 29 |
| 1.4.1- Production des ligninase..... | 29 |
| 1.4.2- Production des protéases..... | 30 |
| 1.4.3- Production des amylases..... | 30 |
| 1.4.4- Production des cellulase..... | 31 |
| 1.5- Production des phytohormones (AIA)..... | 31 |
| 2.Discussion..... | 32 |
| Conclusion..... | 38 |

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Liste des abréviations

°C : degré celsius.

μL : microlitre.

AIA : Acide indole acétique.

F. o. f. sp. Albedinis : *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*.

FB1: fumonisine B1.

g/l : gramme/litre.

Glio : *Gliocladium roseum* .

h: heure.

INPV : l'Institut National de la Protection des Végétaux.

ml : millilitre.

mn: minute.

nm : nano mètre.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PDB : Potato Dextrose Broth.

PPO : polyphénol oxydase .

rpm: rotation par minute.

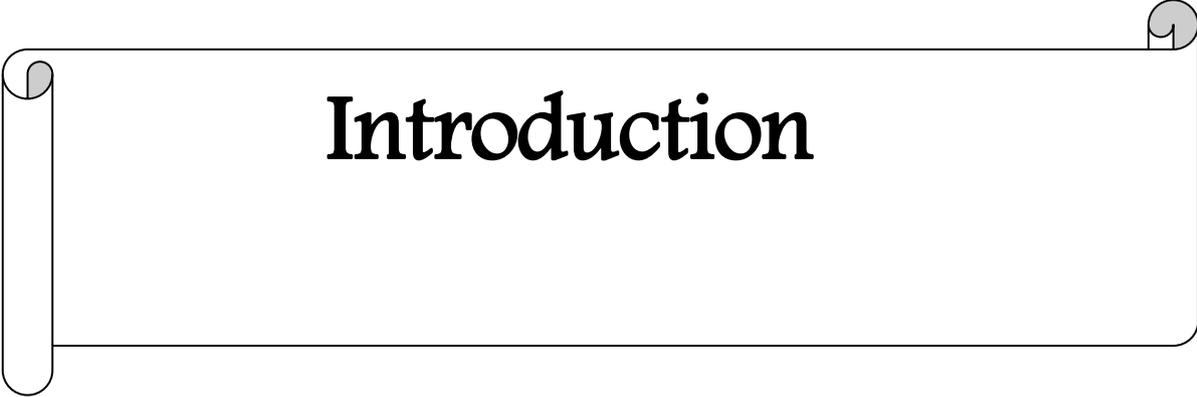
μg: microgramme.

Liste des figures

| | |
|---|-----------|
| Figure 1: Les cinq sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> Et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bissett (1991a et b).* Les espèces agrégées de Rifai (1969). | 9 |
| Figure 2: Méthode de Confrontation directe entre l'agent pathogène et l'agent antagoniste sur milieu PDA | 18 |
| Figure 3: Confrontation à distance entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste sur milieu PDA..... | 19 |
| Figure 4 : Aspect macroscopique verso (a) recto (b) et microscopique(G×40) (c) Conidiophores,(d) phialiospore de la <i>Trichoderma sp</i> Tri(ant) ,Aspect macroscopique verso (e) recto (f) et microscopique(G×40) (g) Conidiophores, (h) phialiospore de <i>Trichoderma sp</i> Tri (A) | 24 |
| Figure 5 : Aspect macroscopique verso (a) recto (b) et microscopique (c) G×100 de la <i>Alternaria sp.</i> | 25 |
| Figure 6 : Aspect macroscopique , témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et Aspect microscopique (G×40) , témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h) de l'antagoniste d' <i>Alternaria sp.</i> | 26 |
| Figure 7 : Aspect macroscopique , témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et microscopique (G×40) témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h) de l'antagoniste de <i>Fusarium proliferatum</i> | 27 |
| Figure 8 : Aspect macroscopique ,témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et microscopique (G×40) , témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h.i) de l'antagoniste de <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i> | 28 |
| Figure 9: Teste de l'activité ligninase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c)..... | 30 |
| Figure 10: Teste de l'activité protéase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c)..... | 30 |
| Figure 11: Teste de l'activité amylase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio(c)..... | 31 |
| Figure 12: Teste de l'activité cellulase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c)..... | 32 |
| Figure 13: Production d'AIA par Tri(ant) (a) ,Tri (b) et Glio (c) sur le milieu PDB..... | 33 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1: les caractères macroscopiques et microscopiques des souches fongiques isolées du sol AkBOU | 22 |
| Tableau 2: confrontation a distance entre Tri(ant), Tri(A) et Glio contre les agent phytopathogène..... | 28 |



Introduction

Introduction

Depuis l'existence de l'espèce humaine sur terre il y a des millions d'années, l'homme a su en profiter du couvert végétal. Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines des plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants. Il s'agit notamment de *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Alternaria* et *Fusarium*; à ce groupe on peut ajouter des Oomycètes tels que *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces*. L'ensemble de ces microorganismes cause des maladies soit de pourriture racinaire soit de flétrissement dû à l'obstruction des vaisseaux conducteurs (**Agrios, 2005**).

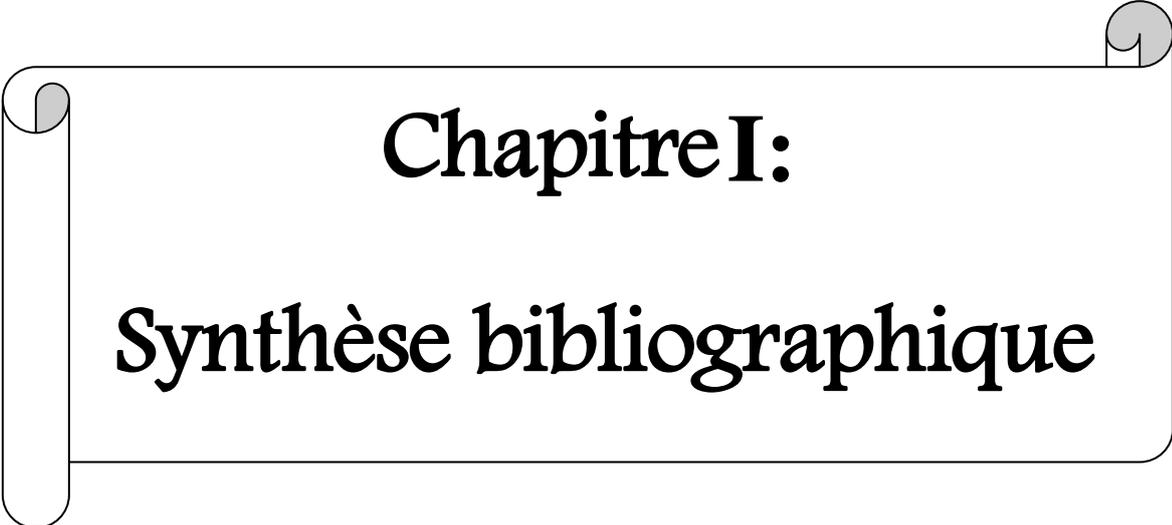
Le développement de la biotechnologie au cours des deux dernières décennies abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers à partir des microorganismes et susceptibles d'être utilisés dans des applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développée, dû à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (**Leveau et Bouix , 1993; Botton et al., 1999**).

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à une étude taxonomique des espèces de *Trichoderma* sp et *Gliocladium* sp . Utilisées dans cette étude. L'appartenance des isolats au genre *Trichoderma* et la détermination des espèces est basée sur les caractéristiques morphologiques décrites par **Rifai(1969) ; Bisset (1984 ; 1991a,b,c)**. Cependant, la détermination des espèces chez ce genre est délicate à cause de la grande similitude qui peut exister entre elles. Ainsi nous avons étudié ou déterminé le pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* et *Gliocladium*.

La lutte biologique offre des potentialités de contrôle des maladies où certains agents antagonistes sont capables de contrôler des maladies contre lesquelles aucun moyen de lutte chimique ou résistance de l'hôte n'existe, et avec moins de contraintes environnementales que les pesticides (**Hanson et Howell, 2002**). Ces dernières années la lutte biologique par l'utilisation d'agents antagonistes fongiques et bactériens a été envisagée contre la fusariose et l'alternariose. Notre travail est donc scindé en plusieurs étapes :

Introduction

- Isolement des souches fongiques (antagoniste) à partir du sol et la vérification des propriétés antagonistes, de *Trichoderma* et *Gliocladium* par deux méthodes de confrontation: directe et indirecte;
- Purification et identification macro et microscopique des isolats obtenues;
- Mise en évidence des testes d'antagonismes in vitro en utilisant des souches de *Trichoderma* et *Gliocladium* .



Chapitre I:

Synthèse bibliographique

1. Généralité sur les agents pathogènes

1.1-*Fusarium oxysporum*

Les *Fusarium* sont des champignons imparfaits « *Fungi imperfecti* » ou Deutéromycètes ou encore Adélomycètes (Link , 1809) .

L'espèce *Fusarium oxysporum* existe sous de nombreuses formes spéciales (f.sp.). Selon Bouth (1971), cette espèce posséderait 77 formes parasites attaquant aussi bien des plantes annuelles (cotonnier, lin, tomate, pois, melon), que des plantes pérennes comme le bananier, le palmier à huile et le palmier dattier.

Le nombre des f.sp. Ne cesse d'augmenter. Ramirez –Suero (2009) dénote 120 formes spéciales. C'est ainsi que la forme spéciale f.sp. *albedinis* (Gordon, 1965) dont la nomenclature définitive est *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (Killian et Maire) (Gordon).

Le *Fusarium oxysporum* est un complexe d'espèces telluriques composé de formes spéciales pathogènes et saprophytes ;Ainsi les variations génétiques chez cette espèce peuvent résulter principalement de l'accumulation des mutations. En conséquence, chez ces champignons la totalité du génome est liée, transmise comme une seule unité d'une génération à une autre, et leurs populations naturelles sont clonales dans la nature.

1.1.1-Taxonomie

Depuis la création du genre *Fusarium* par Linken (1809), et de nombreux travaux ont été consacrés à sa taxonomie .Le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fusus* car ses spores sont en forme de fuseau. *Fusarium oxysporum* et se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production abondante de micro conidies, rassemblées en fausse tête à partir de monophialides courtes. Seule la reproduction asexuée est connue chez cette espèce, ce qui la place dans le groupe des Deutéromycètes ainsi qu'à la sous classe des Hyphomycètes et à la Famille des Tuberculariacées; il fait partie de la section *Elegans* (Nelson et al., 1983; Belabid, 2003). Le genre *Fusarium* est économiquement très important car il regroupe beaucoup d' espèces phytopathogènes Susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes. Ainsi, plus de 120 formes spécialisées et races ont été décrites chez *F.oxysporum* (Armstrong et al., 1981).De plus beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes

secondaires sur des tissus végétaux sénescents sa classifications la suivante (**Anaïssie et al., 2001**).

❖ Systématique

| | |
|--------------------|-------------------|
| Règne | Fungi |
| Division | Ascomycota |
| Classe | Sordariomycetes |
| Sous-classe | Hypocreomycetidae |
| Ordre | Hypocreales |
| Famille | Nectriaceae |
| Espèce | Fusarium |

1.2- *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum est un agent pathogène fongique bien connu d'au moins 15 plantes d'importance agricole et produit une vaste gamme de toxines, notamment la fumonisine B1 (FB1) (**Leslie et al., 1996**). Certaines des plantes hôtes sont le maïs (**Logrieco et al., 1995**), le riz (**Desjardins et al., 1997**), les asperges (**Elmer, 1990**), le palmier dattier (**Abdalla et al., 2000**) et les palmiers d'ornement (**Armengol et al., 2005**). Ces dernières années, le champignon a été identifié comme l'agent pathogène de la pourriture bulbeuse dans les cultures *Allium*, notamment l'oignon et l'ail (**Dugan et al., 2003; Du Toit et al., 2003**).

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg se trouve dans la section *Liseola* de *Fusarium*. Est un agent pathogène commun infectant de nombreuses plantes cultivées et présent dans diverses zones climatiques (**Abdalla et al., 2000**), l'agent pathogène peut également survivre en tant qu'organisme ressemblant à un endophyte, sans symptômes de maladie visibles chez l'hôte.

Morphologiquement, *F. proliferatum* se confond facilement avec *F. oxysporum* sur PDA mais se distingue par les chlamydospores dans les cultures de *F. oxysporum* et les chaînes de

Synthèse bibliographique

microconidies dans *F. proliferatum*. ce dernier ne peut être différencié de *F. fujikuroi* (section Gibberella) (Leslie et Summerell, 2006).

1.3- *Alternaria* sp

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (Logrieco et al., 2009). Autant que parasites de faiblesse, les *Alternaria* sont capable de mener une existence saprophytique pendant des périodes plus ou moins longues.

Le genre *Alternaria* a été initialement décrit en 1816 avec *A. tenuis*, comme le type et le seul membre du genre (Nees, 1817). Parmi les caractéristiques du genre, la production de chaînes de conidies multicellulaires de couleur foncée avec des cloisons longitudinales et transversales (phaeodictyospores), et d'un bec filamenteux avec des cellules apicales.

Les membres du genre *Alternaria* possèdent des conidies septées avec cloisons transversales et longitudinale, les cellules sont multi nucléées (pluricellulaires) de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espèces, Elles possèdent un pigment de types mélanine qui leur servent de protection contre des conditions environnementales défavorables, y compris la résistance aux microbes et enzymes hydrolytiques (Rotem, 1994). Les champignons du genre *Alternaria* sont des *Deutéromycètes* (syn. *Adélomycètes*, *fungi imperfecti*). Cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est généralement inconnue mais possèdent un mode de multiplication asexuée, par conidies. Certains espèces d'*Alternaria* ont une reproduction sexuée et leur forme parfaite appartient aux *Loculoascomycetes* (genre *Pleospora* ou *Lewia*) (Ellis, 1971 ; Erikson et Hawksworth, 1991).

❖ Systematique

classification taxonomique de l'*Alternaria* sp. Selon catalogue of life (25 mars 2016).

| | |
|----------------------|------------|
| Règne | Fungi |
| Embranchement | Ascomycota |

Synthèse bibliographique

| | |
|----------------|-----------------|
| Classe | Dothideomycetes |
| Ordre | Pleosporale |
| Famille | Pleosporaceae |
| Genre | Alternaria |

2. La lutte biologique

La lutte biologique des agents pathogènes est maintenant une sous-discipline dans la science de la phytopathologie. Bien qu'elle ait débuté il y a plus de 70 ans, c'est seulement autour de 1960 que la théorie et la pratique ont fait l'objet d'une première réunion (**Baker et Snyder, 1965**).

C'est une méthode qui consiste à utiliser les capacités biologique d'un organisme vivant en vue de limiter, arrêter ou bien inhiber le développement d'un autre organisme vivant sans avoir recours aux pesticides. Plusieurs être vivant, bactéries et champignons, ont fait l'objet d'étude ou ont été utilisées dans des applications de lutte biologiques.

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes (**Emmert et Handelsman, 1999**) que l'utilisation des fongicides chimiques.

Elle consiste à utiliser des organismes vivant, appelés auxiliaires, ou de leurs produits, pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les bio-agresseurs, ils 'agit d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles (**Fernandes, 2005**). La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de bio contrôle efficacité est notamment liée a l'utilisation de plusieurs modes d'action (**Cook, 1993 ; Ben brook et al., 1996**) et à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (**Singh et al., 2003**). Parmi les champignons, les *Trichoderma* formant groupe d'antagonistes .

3. Les agents de bio contrôle

Ces microorganismes antagonistes peuvent êtres des bacteries comme (*pseudomenas ; Bacillus ; Streptomyces*) ou des levures comme (*Pichia guilliermondii*), des virus (Virus de la

granulose) ou des champignons (*Trichoderma* ; *Penicillium* ; *Sporidesmium*). Parmi les champignons le plus connues il existe des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium* ; particulièrement *T. harzianum* et *G. virens* ; qui sont efficaces contre plusieurs pathogènes comme des espèces de *Pyhium* ; *Phytophthora* ; *Sclerotinia* ; *Fusarium* ...(**Nasraoui, 2006** ; **Lefort, 2010**).

4. Généralité sur *Trichoderma* sp et *Gliocladium* sp

4.1 *Trichoderma* sp

4.1.1- Définition

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plants. On le reconnaît facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides (en forme de quilles) (**Dubos, 1986**). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive.

4.1.2- Historique

Le terme «*Trichoderma*» a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud africain **Christiaan Hendrik Persoon (1794)** .C'est le premier qui a décrit le genre *Trichoderma* à partir des échantillons collectés en Allemagne.

En 1825, **Elias Fries** a décrit pour la première fois la forme parfaite «*Hypocrea* » comme étant une espèce avec des ascospores hyalines (**Chaverri et Samuels, 2004**).

En 1865 les frères **Tulasne** ont suggéré que *Hypocrea rufa* est le téléomorphe de *Trichoderma viride* Pers. **Brefeld (1891)** a pu obtenir une culture de *T. viride* à partir d'une seule ascospore de *H. rufa* (**Samuels, 2006**) .

De 1939 à 1969, toute espèce fongique à spores vertes appartenant au genre *Trichoderma* était considérée comme étant l'unique espèce *Trichoderma viride* (**Bisby, 1939**) . Ce système de l'espèce unique était très apprécié d'où aucune compétence particulière n'a été nécessaire pour parvenir à une nouvelle identification. Ce type de systématique «

Synthèse bibliographique

espèce unique » de Bisby a incité John Webster et son étudiant Mein Rifai à revoir la taxonomie de *Trichoderma* et *Hypocrea* (**Rifai et Webster, 1966 ; Webster et Rifai, 1968**).

En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification «utilisable avec le concept « d'espèces agrégées», basé sur les caractères microscopiques. «Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer». Neuf espèces agrégées sont créées (*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 (**Rifai, 1969**).

En 1991, Bissett. propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp. sans rapport avec les espèces agrégées. Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Figure 1) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (**Leuchtmann, 1996**).

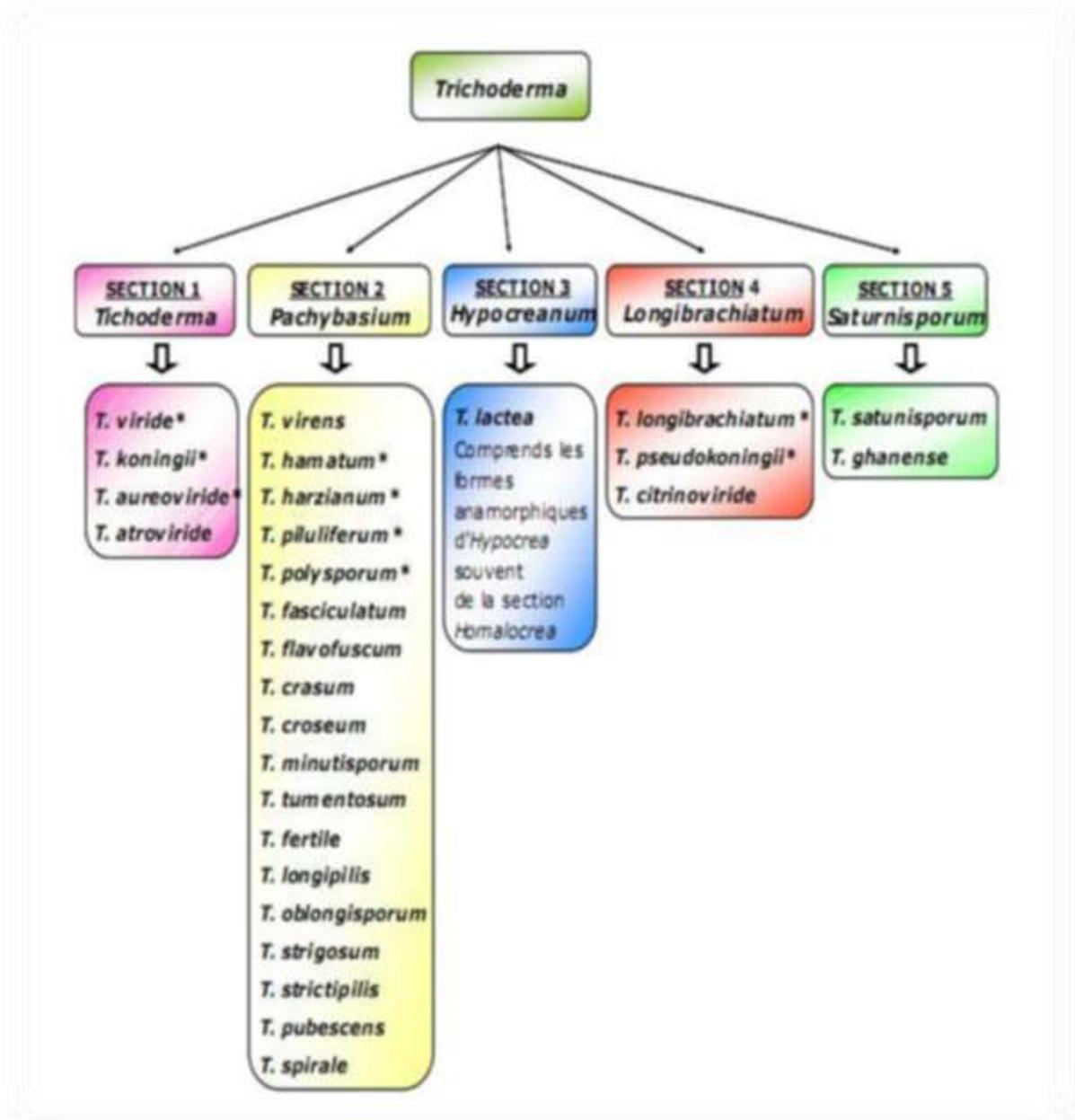


Figure 1: Les cinq sections systématiques de *Trichoderma* sp. Et quelques-unes des espèces y appartenant, selon **Bissett (1991a et b)**. *Les espèces agrégées de **Rifai (1969)**.

4.1.3- taxonomie

Le genre : *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*)

sous embranchement : des Ascomycètes,

classe : des Sordariomycètes,

Synthèse bibliographique

Ordre : des Hypocréales

la famille : des Hypocraceae

Genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*)
Chaverri et al., 2015

4.1.4- Morphologie

Depuis la révision du genre *Trichoderma* par **Rifai en 1969**, morphologiques sont utilisées pour caractériser et distinguer les espèces de *Trichoderma* (**Gams et Bissett, 2002**). En outre, **Samuels et al. (2015)** ont également fourni des observations détaillées sur les caractères morphologiques des espèces définies de *Trichoderma*.

Le genre *Trichoderma* Pers. est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et extensive avec une sporulation abondante sur le milieu de culture (**Gams et Bissett, 1998**).

Trichoderma est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte de ses spores (**Dubos, 1986**). Les conidies de *Trichoderma* donnent naissance à un mycélium d'abord blanc. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse (**Chabasse et al., 2002**).

Les conidies se forment typiquement dans un délai d'une semaine en touffes compactes ou bien légèrement floconneuses de couleurs verdâtres, blanchâtres et parfois jaunâtres. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Les caractéristiques du développement du mycélium et la pigmentation peuvent être mieux observées dans un milieu riche comme le PDA (Potato Dextrose Agar) (**Samuels et al., 2015**).

Au microscope optique, les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces, les conidies globuleuses sont rares. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes ». Le mycélium est composé d'hyphes septés et ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont fortement ramifiés suivant une structure pyramidale et se terminent par une ou plusieurs phialides qui sont en forme de flasques ou quilles. Les phialides sont fixées à angle droit sur les conidiophores qui à leur tour portent des conidies. Certaines espèces peuvent produire des chlamydospores globuleuses, qui sont

Synthèse bibliographique

intercalaires ou terminales. Ces chlamydospores sont en général unicellulaires mais peuvent être pluricellulaires chez certaines espèces tel que *Trichoderma stromaticum* (**Kubicek et al., 2003 ; Samuels et al., 2006 ; Sharma et Singh, 2014**).

4.1.5- Ecologie et habitat

Trichoderma est le genre le plus répandu dans le sol, retrouvé dans des habitats très variés, ceci peut être attribuable à la nature concurrentielle des espèces de *Trichoderma* et à la possibilité de production de divers métabolites (**Gams et Bissett, 1998**). L'abondance des *Trichoderma* sp. dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (**Benkada, 2006**).

Trichoderma se retrouve couramment dans le sol, sur le bois et sur les débris des végétaux (**Dubos, 1986**).

Les *Trichoderma* jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, d'origine naturelle et xénobiotique, en attribuant une bio fertilisation aux sols. Ils sont bien connus pour leur production d'enzymes de dégradation comme les chitinases et cellulases impliquées dans la lyse du mycélium de nombreux champignons. Avec de telles qualités, les *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique et stimulateurs de la croissance des plantes (**Klein et Eveleigh, 1998**).

Le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3^{ème} position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma* sp. en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (**Landreau, 2001**).

Ces microorganismes associés aux racines des plantes sont appelés des microorganismes rhizosphérique (**Chaparro et al., 2013**). La rhizosphère représente le lieu de multiples interactions entre microorganismes et racines, ces interactions étant bénéfiques, nuisibles, ou neutres pour la plante (**Bais et al., 2006**). Certains microorganismes rhizosphérique, à savoir les champignons, sont bénéfiques pour la plante, ce qui améliore souvent la croissance végétale (**Morgan et al., 2005**).

4.2- *Gliocladium* sp

4.2.1- Définition

Gliocladium sp. est un genre appartenant au phylum Ascomycota, qui ont été décrits au moins 32 espèces (**Roskov et al., 2015**). Son potentiel en tant que biocontrôleur a été démontré contre *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* et *Sclerotinia*. La principale méthode d'action observée à *Gliocladium* est l'enroulement de ses hyphes autour de ceux de l'agent pathogène (**Helyer et al., 2014**)

Gliocladium roseum est un champignon commun du sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition sur les racines des plantes en décomposition. On le rencontre régulièrement sur une extraordinaire gamme d'habitats, variant de la région subarctique, région tempérée, région tropicale et région désertique. *G. roseum* a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et insectes morts, sur les nématodes et sur de nombreux champignons, (**Schroers et al., 1999**).

Grâce à sa haute aptitude saprophytique, ce champignon est actuellement utilisé comme un agent de la lutte biologique. **Sutton et al. (1997)** ont signalé que *G. roseum* est fréquemment associé aux kystes des nématodes et aux sclérotés des champignons de l'espèce *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., et d'autres champignons du sol et matériel végétal tel que racines, fruits, semences et autres.

4.2.2- Morphologie et taxonomie

G. roseum La colonie de a une croissance rapide et est veloutée à duveteuse, blanche au départ puis devenant rose à saumon puis vert foncé lorsque les conidies se forment. Les conidiophores sont ramifiés en forme de pinces. Les conidies sont unicellulaires, blanches à vert foncé et à paroi lisse. Elles restent agglutinées en fausses têtes. Ce champignon produit des substances volatiles toxiques telles la gliovirine et la gliotoxine (**Schroers et al., 1999**). Les colonies du champignon sur la gélose sont généralement blanchâtre, orange ou saumon . *G.roseum* est l'anamorphe de *Nectria ochroleuca* (Schwein.) Berk, un ascomycète des Hypocréales (**Samuels, 1976**) . Le champignon est considéré génériquement distinct de l'agent de lutte biologique *Gliocladium virens* J.H. Miller, J.E. Giddens, & A.A. Foster, maintenant appelé

Synthèse bibliographique

Trichoderma virens, et de l'espèce type *Gliocladium penicillioides*. **Domsch et al. (1980)** a proposé que *G. roseum* appartient au genre *Clonostachys* et a suggéré qu'il être considérée comme une espèce collective.

4.2.3- Ecologie et habitat

G. roseum est commun dans une gamme extraordinaire d'habitats dans les régions tropicales, tempérées, régions subarctiques et désertiques du monde. Il a été signalé dans des terres cultivées, des prairies, forêts, forêts, landes, eaux douces et sols côtiers, en particulier ceux pH neutre à alcalin (**Domsch et al., 1980 ; Foley et Deacon, 1985**).

Les diverses associations de *G. roseum* avec des racines, des tiges, feuilles, fruits et graines de plantes. Le champignon est présent à la surface des plantes, comme le phylloplan de fraise (**Mcelan et Sutton, 1992**) et le mycorhizoplan du sapin blanc (**Mosca et al., 1985**).

Les rapports font état d'une abondance de *G. roseum* dans la zone sénescence et les racines et le feuillage morts d'une grande variété de plantes et de plantes affaiblies par des facteurs de stress tels que les herbicides et les maladies (**Gourley et 1964; Dix, 1967; Brandsberg, 1969; ; Domsch et al., 1980; Dashwood et al., 1993**).

Curieusement, on sait que *G. roseum* colonise, sans symptômes, des racines, des tiges, des gousses et des graines de soja apparemment saines (**Mueller et Sinclair, 1986**), des racines de trèfle rouge (**Skipp et Christensen, 1990**) et des feuilles de fraise (**Sutton, 1995**). et de framboise (**Yu, 1996**). Dans ces cas, le champignon a apparemment colonisé l'hôte en tant que parasite non pathogène et, chez le soja au moins, l'association est systémique. La preuve rapportée que *G. roseum* est pathogène pour les pommes, les tubercules de pomme de terre, les plantules de conifères, les fèves *Exacum* affine et les féveroles est considérée comme non concluante (**Huber et Finley, 1959; Hanso et Karoles, 1980 ; Al-Hamdany et Salih, 1986 ; Arie et al., 1987 ; Theron et Holz, 1991**). Le téléomorphe de *G. roseum*, *N. ochroleuca*, se rencontre le plus souvent sur les branches d'arbres récemment morts, mais également sur les tissus herbacés et charnus de plantes et de champignons (**Houston et al., 1987 ; Rehner et Samuels, 1994**).

5. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* comme agents de lutte biologique avait été observé pour la première fois par **Weinding (1932) in Howell (2003)**. Ce dernier auteur a rapporté l'action mycoparasitaire de *T. lignorum* (Tode) Harz contre *Rhizoctonia solani* Kühn. Il avait décrit avec détail l'enroulement des hyphes de l'agent antagoniste contre celles de l'agent pathogène, la pénétration, ainsi que la dissolution du cytoplasme de l'hôte.

Deux années plus tard **Weinding (1934) in Howell (2003)** avait rapporté que la souche de *T. lignorum* produisait une substance toxique contre *R. solani* et *Sclerotinia americana* Norton et Ezekiel, et la nomma gliotoxine. Plus tard il avait été démontré que l'espèce qui produisait la gliotoxine n'était pas *T. lignorum* mais plutôt *Gliocladium virens* Miller, Gidden et Foster (**Webster et Lomas, 1964**). Cette dernière espèce est récemment renommée comme *Trichoderma virens* (**Miller, Gidden et Foster**) Arx (**Rehner et Samuels, 1994**).

6. Mode d'action des agents de lutte biologique

Trois modes d'action sont principalement utilisés par *Trichoderma* dans la lutte aux agents pathogènes (**Baker et Cook, 1982; Whipps, 1992**). Il y a :

- la compétition,
- le mycoparasitisme
- l'antibiose.

Ces modes d'action peuvent par contre être utilisés en synergie. Les modes 1 et 3 étant les plus communs. Ces modes d'action permettent à *Trichoderma* de s'installer prioritairement avant l'agent pathogène ce qui facilite sa survie et conservation dans le milieu.

6.1- Compétition

Izallalen (1997) a défini la compétition comme étant deux populations ou plusieurs sont limitées, en termes de vitesse de croissance ou de taille de population, par une dépendance commune envers un facteur externe nécessaire pour la croissance. Par exemple, une concurrence entre *Trichoderma Lignorum* et *Rhizoctonia* afin de tirer profit des exsudats racinaires du haricot a réduit l'effet de la fonte de semi établie par *Rhizoctonia* (**Aziz et al., 1997**). La compétition pour

Synthèse bibliographique

le carbone, l'azote et autres facteurs de croissance en même temps que la compétition pour l'espace et les sites spécifiques d'infection peuvent être utilisées par les agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes (**Vinale et al., 2008**).

6. 2- Mycoparasitisme

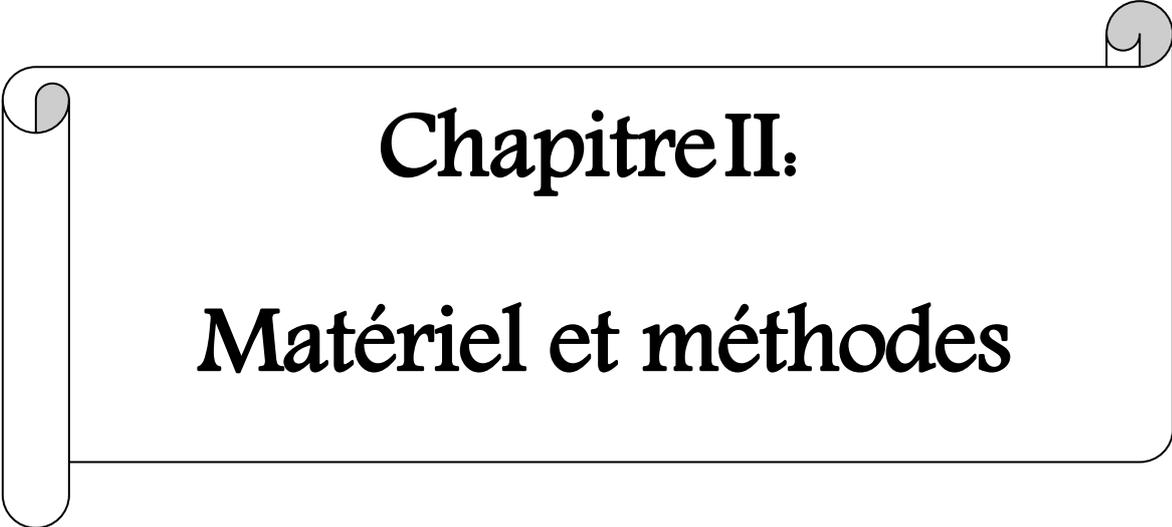
Le processus de mycoparasitisme est complexe, il se compose de plusieurs étapes notamment la reconnaissance de l'hôte par l'agent antagoniste, la pénétration, l'attaque et la mort de l'hôte (**Vinale et al., 2008**).

Le mycoparasitisme est une association étroite entre deux espèces fongique, elle se représente dans l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. Le parasite tire de l'hôte un profit de ressources normalement destinée à sa croissance, sa survie et sa reproduction (**Soufiane, 1998**). En effet, **Schubert et al. (2008)** ont conclu que *Trichoderma* spp. ont pu se proliférer et parasité le mycélium du champignon de la pourriture du bois.

6. 3- Antibiose

Plus de 100 métabolites secondaires avec des activités antibiotiques, sont produits par les différentes souches du genre *Trichoderma* (**Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998**). La production des antibiotiques dépend des paramètres environnementales tels le substrat colonisé, le pH et la température (**Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998 ; Vizcaino et al., 2005**). Ces antibiotiques, peuvent être classés en trois groupes : des composés volatiles, des composés solubles dans l'eau et les peptaiboles qui agit avec la membrane plasmique (**Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991**). Néanmoins, les mécanismes par le quel ces antibiotiques agissent ne sont pas suffisamment connus (**Song et al., 2006**).

En fait, le genre *Trichoderma* a fait l'objet de nombreuses études qui ont montré que ce groupe a évolué de nombreux mécanismes, à la fois pour attaquer d'autres champignons et pour améliorer la croissance des plantes (**Mouria et al., 2007; Caron et al., 2002 ; Naher et al., 2014**).



Chapitre II.

Matériel et méthodes

La présente étude évalue lutte biologique contre des champignons phytopathogènes (*Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Alternaria* sp).

1. Matériel fongique

Les isolats de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Fusarium proliferatum* et *Gliocladium roseum*, utilisés pour cette étude ont été obtenus à partir de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) de GHARDAIA.

2. Echantillonnage du sol

L'isolement des souches antagonistes a été réalisé à partir de la rhizosphère des arbres d'olivier situés dans la région AKBOU wilaya de BEJAIA.

Le prélèvement de 5 échantillons de sol a été effectué durant le mois de mai (2018), selon le protocole décrit par **Pochon et Tardieux (1962)**. A l'aide d'une spatule stérile, qui a servi à prendre une quantité du sol prélevé et remplir un flacon stérile dans des conditions d'asepsies rigoureuses.

3. Isolement des agents antagonistes

A partir de la rhizosphère des arbres d'olivier situés dans la région AKBOU wilaya de BEJAIA, nous avons effectué des isollements basés sur la technique de suspensions-dilutions. Cette technique consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol, Un gramme de sol est suspendu dans 9ml d'eau distillée stérile, puis homogénéisé pendant 10 minutes à l'aide d'un vortex. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparés jusqu'à 10^{-5} (dilution décimale) (**Botton et al., 1990**). Un volume de 100 μ L de chaque suspension est déposé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, puis, étalé sur toute la surface. Sur le milieu de culture PDA en boîte de Pétri. L'incubation des boîtes se fait à 25°C pendant 24 à 48 heures.

4. Repiquage et purification

Après un bon développement des colonies, des repiquages ont été effectués de chaque colonie jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné (**Guiraud, 1998**).

La purification est réalisée par transfert des colonies développées sur des boîtes contenant le milieu de culture PDA (Annexe 1) (chaque colonie récupérée dans une boîte). Ce dernier se considère comme un milieu favorable de développement (rapide) des champignons, ainsi à la production des spores (**Botton et al., 1990**). L'incubation est réalisée à une température 28°C, pendant à 4 -6 jours. Cette méthode est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

5. Identification des souches sélectionnées

L'identification des souches fongiques est effectuée par deux techniques classiques: par l'observation macroscopique et microscopique des souches. Ces deux techniques sont largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

5.1- Etude macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées, permet de déterminer les caractères culturels suivants : la croissance et le développement du champignon, le diamètre de la colonie, la couleur du revers ainsi que son odeur (**Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Rinaldi et al., 1998**).

5.2- Etude microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à différents grossissements est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (**Chabasse, 2002**). ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycélium, la présence ou l'absence des spores etc. (**Samson et al., 1988 ; Hawksworth et al., 1994 ; Gams et al., 1998**).

6. Les tests d'antagonisme et mode d'action

La lutte biologique est limitée à l'utilisation des organismes antagonistes (généralement des microorganismes). Les effets d'antagonistes sont directs ou indirectes et peuvent être dus aux organismes introduits ou à la manipulation des organismes existants (**Nasraoui, 2006**). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou une antibiose (**Soufiane, 1998**).

6.1- Confrontation par contact direct

Les confrontations *in vitro* sont effectuées selon la méthode de **Patel et Brown (1969)**. Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant le pathogène pure et l'autre l'agent antagoniste pure sont placées suivant un axe diamétral à 5 cm et à équidistance du centre de la boîte . Les repiquages sont effectués, en même temps (**Benhamou et Chet, 1996**). L'incubation est réalisée à 28°C pendant sept jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies de l'agent pathogène et leur envahissement par le mycélium de l'agent antagoniste sont effectuées chaque jour jusqu'au septième jour. Le témoin est effectué par un repiquage de l'agent pathogène dans la boîte de pétri qui contient le PDA.

Après 2 à 6 jours d'incubation la région d'interface a été observée sous microscope optique en vue d'étudier le mode d'action de l'agent antagoniste.

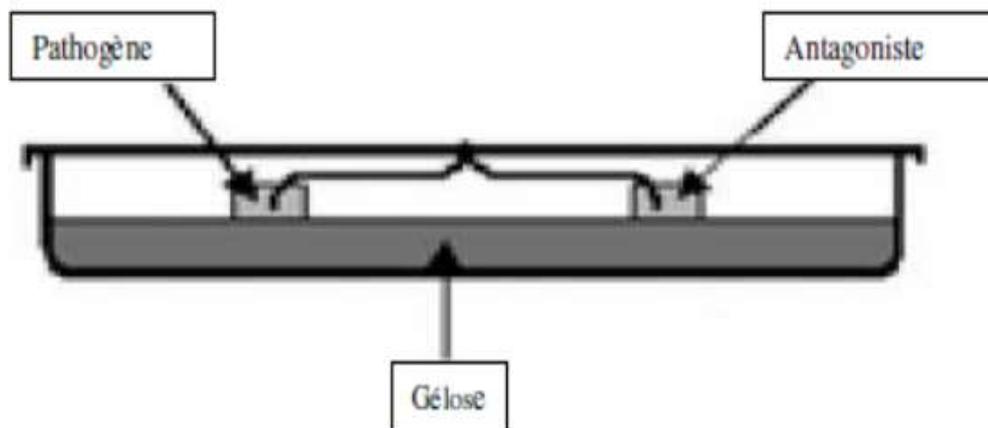


Figure 2 : Méthode de Confrontation directe entre le pathogène et l'agent antagoniste sur milieu PDA (**Hibar et al., 2005**)

6.2- Confrontation à distance

Le principe de cette méthode repose sur la technique déjà utilisée par **Campora (1985)**. Il consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées. Ensuite, un assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes, l'agent antagoniste en bas et le pathogène en haut (Figure 3).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de para film afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. On expose ainsi l'isolat de l'agent antagoniste à l'influence des substances volatiles émises par la souche de l'agent pathogène. Le témoin est formé par superposition des deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de l'agent pathogène alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA (Annexe 3). Les boîtes sont soumises pendant 7 jours à une température de $(26\pm 2^{\circ}\text{C})$.

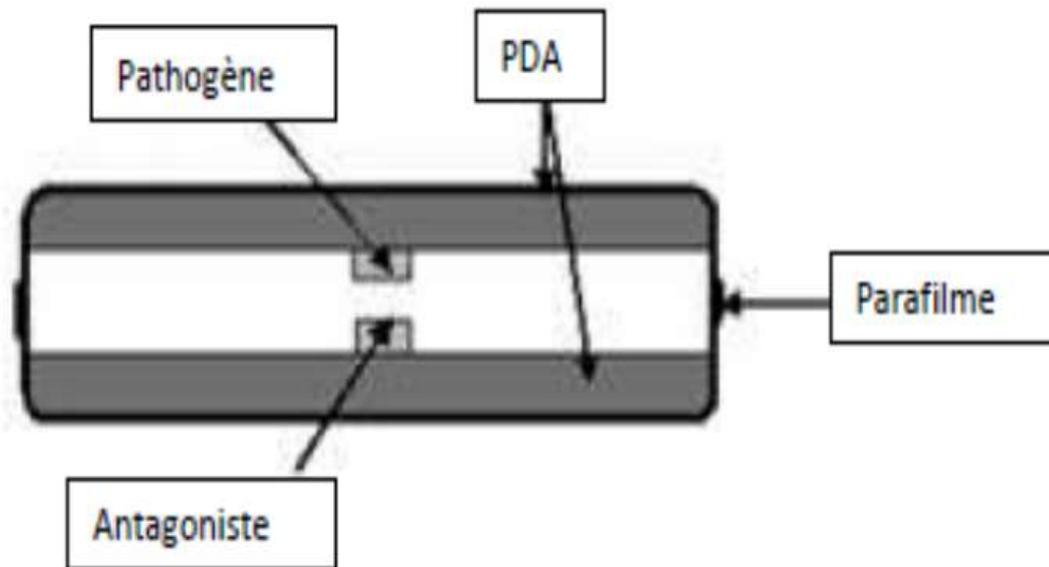


Figure 3: Confrontation à distance entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste sur milieu PDA

6.3- Evaluation du pourcentage d'inhibition

La croissance mycélienne est évaluée par la mesure des diamètres moyens de la colonie mycélienne. Le pourcentage d'inhibition de la croissance est calculé selon la formule suivante (**Rapily, 1968**).

$$IC\% = \frac{DT - DPA}{DT} * 100$$

DT : croissance diamètre du témoin ;

DPA : croissance diamètre de mycélium du pathogène en présence de l'antagoniste ;

IC : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

7. Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes

Pour chaque test enzymatique, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre provenant de cultures âgées de 7 jours de l'agent antagoniste est déposée au centre d'une boîte de Petri. L'activité enzymatique a été évaluée en mesurant le halo transparent ou la zone hydrolysée autour des colonies après une période d'incubation de 2 à 5 jours, ce qui indique la production de l'enzyme testée (Ceska, 1971; Federici, 1982).

7.1- Production des ligninases

La dégradation enzymatique de la lignine par la polyphénol oxydase (EC 1.10.3.1) a été testée en utilisant le milieu d'acide tannique (Annexe 1) (Thormann et al., 2002). La formation d'un pigment brun foncé qui entoure le point de repiquage a été utilisé comme indicateur du polyphénol oxydase (PPO) sur le milieu d'acide tannique après 4 jours d'incubation à 28°C (Mukhlis et al., 2013).

7.2- Production des protéases

Les isolats d'antagoniste ont été testés pour la production de la protéase en utilisant le milieu au lait écrémé (Annexe 1). Après incubation à 28 °C pendant 3 à 4 jours, les isolats antagonistes ayant une activité protéase démontrent une zone claire autour de la colonie (Berg et al., 2002).

7.3- Production des amylases

La production de l'amylase par les isolats antagonistes a été mise en évidence en utilisant un milieu gélosé à base d'amidon (Abe et al., 2015) (Annexe 1). Après incubation à 28°C pendant 72 heures, les boîtes ont été traitées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0,5% I₂(v/v)) pendant 15 minutes.

La production des amylases a été évaluée par la formation d'un halo jaune clair autour de la colonie pour chaque isolat.

7.4- Production des cellulases

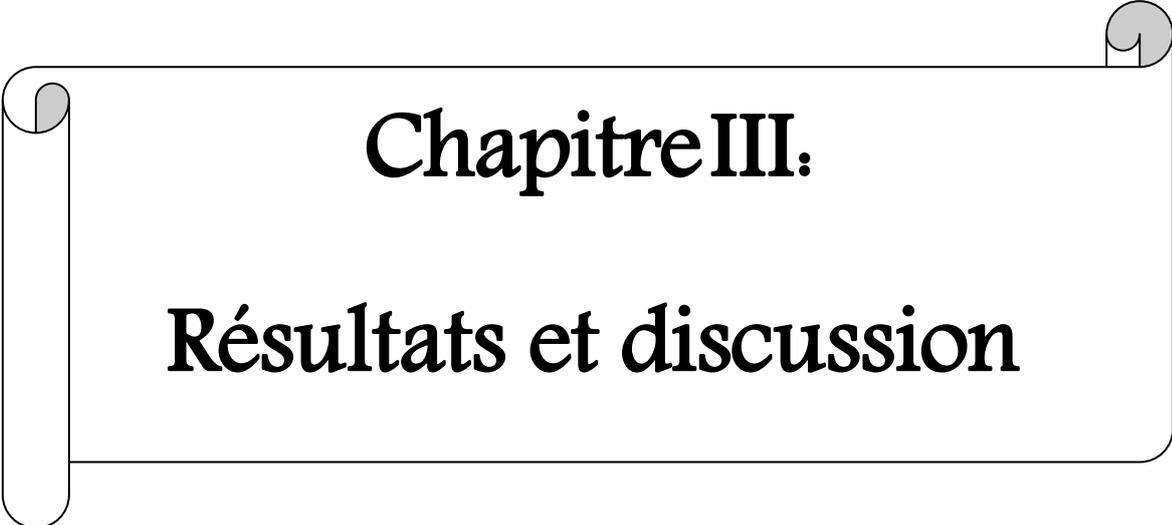
Pour la détermination de l'activité de cellulase nous avons utilisé la cellulose microcristalline comme substrat. Un disque de 6 mm de l'antagoniste est ensemencé sur chaque milieu de culture (Annexe 1). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 2 à 3 jours.

La production de cellulase a été évaluée après une incubation supplémentaire à 50°C pendant 16 heures afin d'accélérer l'action des cellulases extracellulaires (**Abe et al., 2015**). Après cette période d'incubation, les cultures ont été inondées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0,5% I₂(v/v)) qui a formé après 3 à 5 minutes un complexe de couleur noire bleuâtre avec de la cellulose, donnant une forte et distincte zone autour des colonies produites de la cellulase (**Kasna et al., 2008**).

8. Production des phytohormones (AIA)

La production de l'AIA est testée sur milieu liquide PDB additionné de tryptophane (5g/l) (Annexe 2) (**Bric et al., 1991**). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures de l'agent antagoniste incubées à 30°C/96 h. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de **Loper et Scroth (1986)**.

Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/20min. 1ml du surnageant est additionné de 2 ml ddensité optique est mesurée à 535 nm après 20 mn d'incubation à l'obscurité. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue de l'AIA (Annexe2).



Chapitre III.

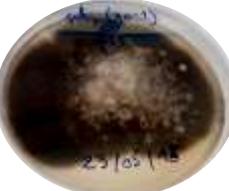
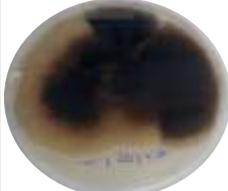
Résultats et discussion

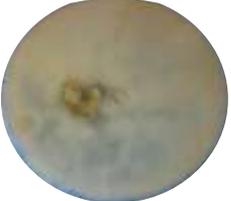
1. Résultats

1.1- Isolement et Identification des agents antagonistes

L'isolement et la purification des champignons sont réalisés à partir du sol sur le milieu PDA. Les résultats obtenus au cours des identifications macroscopiques et microscopiques sont représentés dans le tableau 1 et révèlent la présence de 9 isolats fongiques répartis en 4 genres: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Pythium*, *Alternaria*.

Tableau 1 : les caractères macroscopiques et microscopiques des souches fongiques isolées du sol AkBOU.

| Sol | Aspect macroscopique | | Aspect microscopique | Identification présumée |
|-------|---|---|--|-------------------------|
| | Verso | Recto | | |
| Sol 1 |  |  |  | <i>Aspergillus</i> sp |
| Sol 2 |  |  |  | <i>Aspergillus</i> sp |
| |  |  |  | <i>Pythium</i> sp |
| Sol 3 |  |  |  | <i>Alternaria</i> sp |
| |  |  |  | <i>Alternaria</i> sp |

| | | | | |
|--------------|---|---|--|-----------------------------------|
| |  |  |  | <i>Alternaria</i> sp |
| Sol 4 |  |  |  | <i>Trichoderma</i> sp Tri(A) |
| Sol 5 |  |  |  | <i>Trichoderma</i> sp Tri(ant) |

1.2- Identification des souches sélectionnées

Pour la réalisation de notre travail nous avons sélectionné les souches appartenant au genre *Trichoderma* sp et un isolat appartient au genre *Alternaria* sp.

1.2.1- *Trichoderma* sp

les observations macroscopiques (aspect, couleur et vitesse de croissance des colonies) et microscopiques (nature du filament, présence de conidiophores et forme des conidies) montrent que les souches sélectionnée appartiennent au genre *Trichoderma* sp (Figure 4).

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés sur milieu PDA sont :

- Les deux souches antagonistes du genre *Trichoderma* sp, ont montré une coloration verte plus ou moins intense.
- Croissance rapide et extensive.
- Floconneuse et bien compactées en touffe.

L'observation microscopique a révélé :

- Filament septé .
- Présence des conidiophores très ramifiées.
- Les phialides son en forme des quilles .

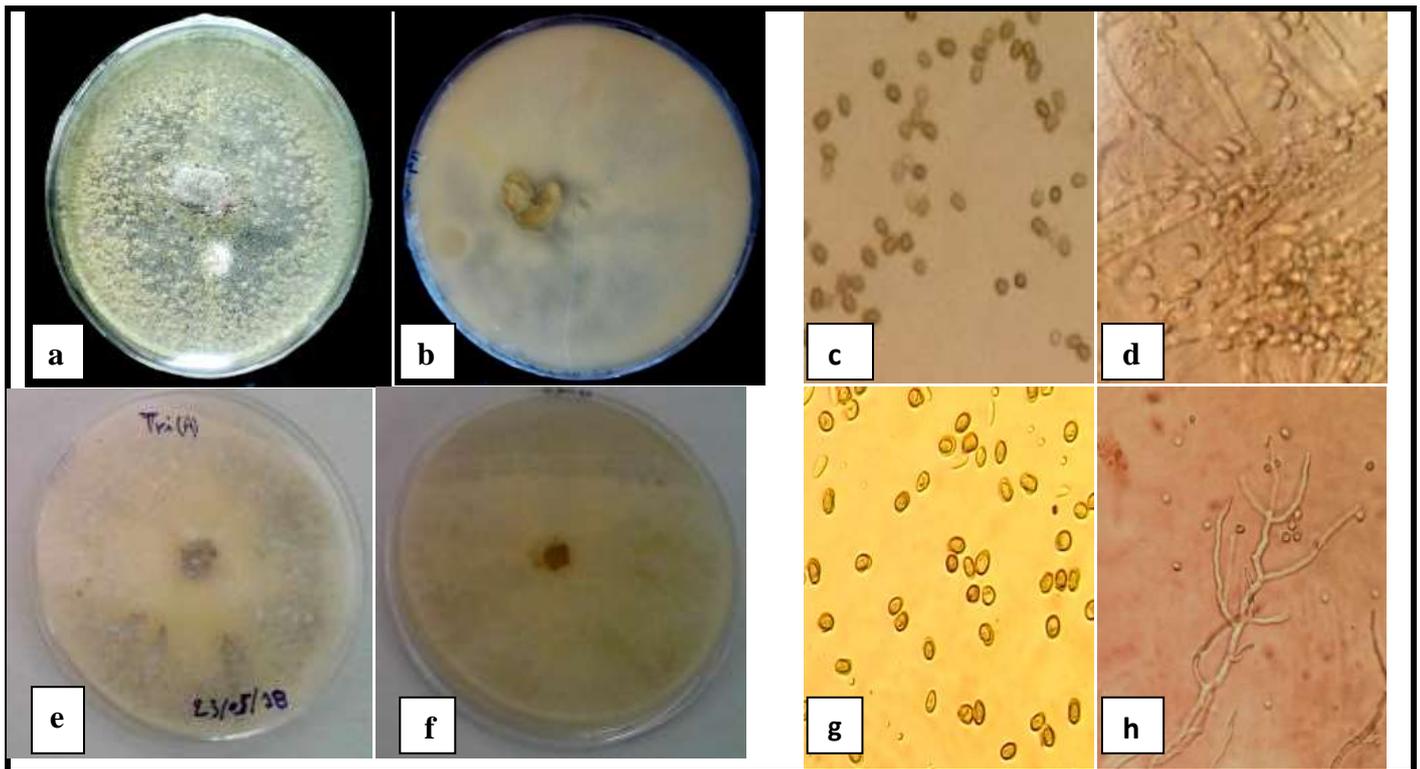


Figure 4 : Aspect macroscopique verso (a) recto (b) et microscopique(G×40) (c) Conidiophores,(d) phialiospore de *Trichoderma* sp Tri(ant) ,Aspect macroscopique verso (e) recto (f) et microscopique(G×40) (g) Conidiophores, (h) phialiospore de *Trichoderma* sp Tri (A).

1.2.2- *Alternaria* sp

L'observation macroscopique des colonies d'*Alternaria* (Figure 5) a montré comme suivant:

- Croissance rapide sur milieu PDA.
- Couleur verdâtre au départ qui devient rapidement foncée.
- Reverse de colonie vert olive à noire.

L'examen microscopique a révélé :

- Des hyphes septés.
- Conidiophores qui sont marron, d'aspect ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important.
- Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre *Alternaria* (Figure 5).

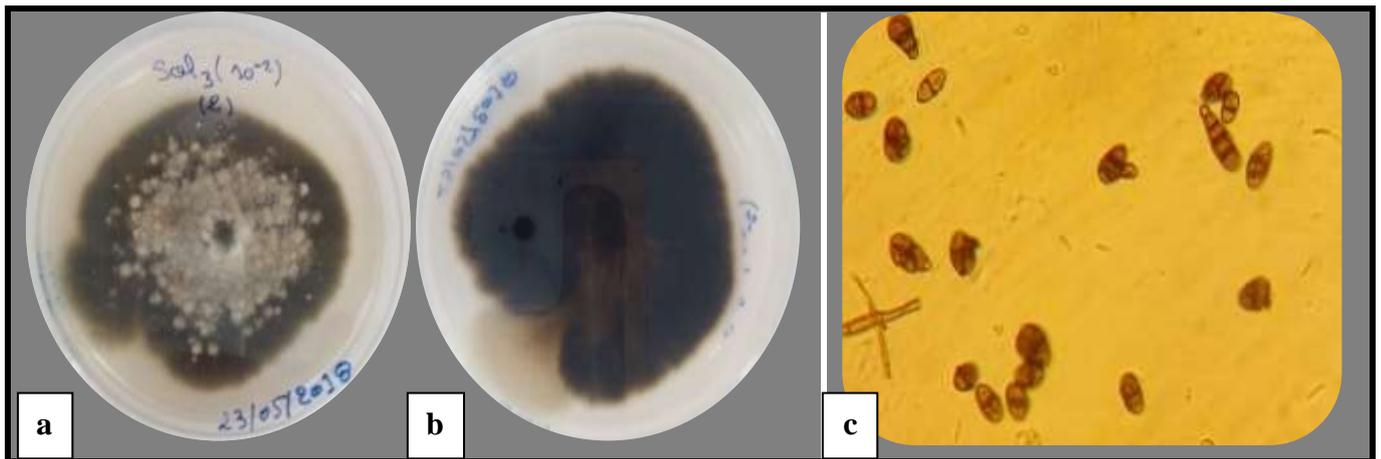


Figure 5: Aspect macroscopique verso (a) recto (b) et microscopique (c) (G×100)
d'*Alternaria* sp.

1.3- Les tests d'antagonisme et mode d'action

l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* sp Tri(A) , Tri (ant) et *Gliocladium roseum* vis-à-vis des souches phytopathogènes (*Alternaria* sp, *Fusarium proliferatum* et *Fusarium oxysporum*f.sp.*albedinis*) a été étudiée selon deux méthodes:

- la confrontation par contact directe.
- la confrontation à distance .

1.3.1- Confrontation par contact direct

1.3.1.1- Effet sur *Alternaria* sp

Après 7 jours d'incubation, Le taux d'inhibition enregistré par Tri(ant) ,Tri(A) et Glio contre *Alternaria* sp suivi par 50.29% , 44.44 % et 15.20 % respectivement.

Dans le but d'étudier les modifications structurales qui affectes les pathogène et mode d'action des souches antagonistes nous avons effectué des observations microscopiques de la zone du contacte des deux colonies (antagonistes et pathogène).

l'observation microscopique a montrée diminution du nombre de conidie par rapport au témoin(Figure 6.e). a été observée la lyse mycélienne par Tri(ant) (Figure 6.f) et par Tri(A) (Figure 6.g)et un enroulement du mycélium d'antagoniste Glio sur celui du *Alternaria* sp (Figure 6.h).

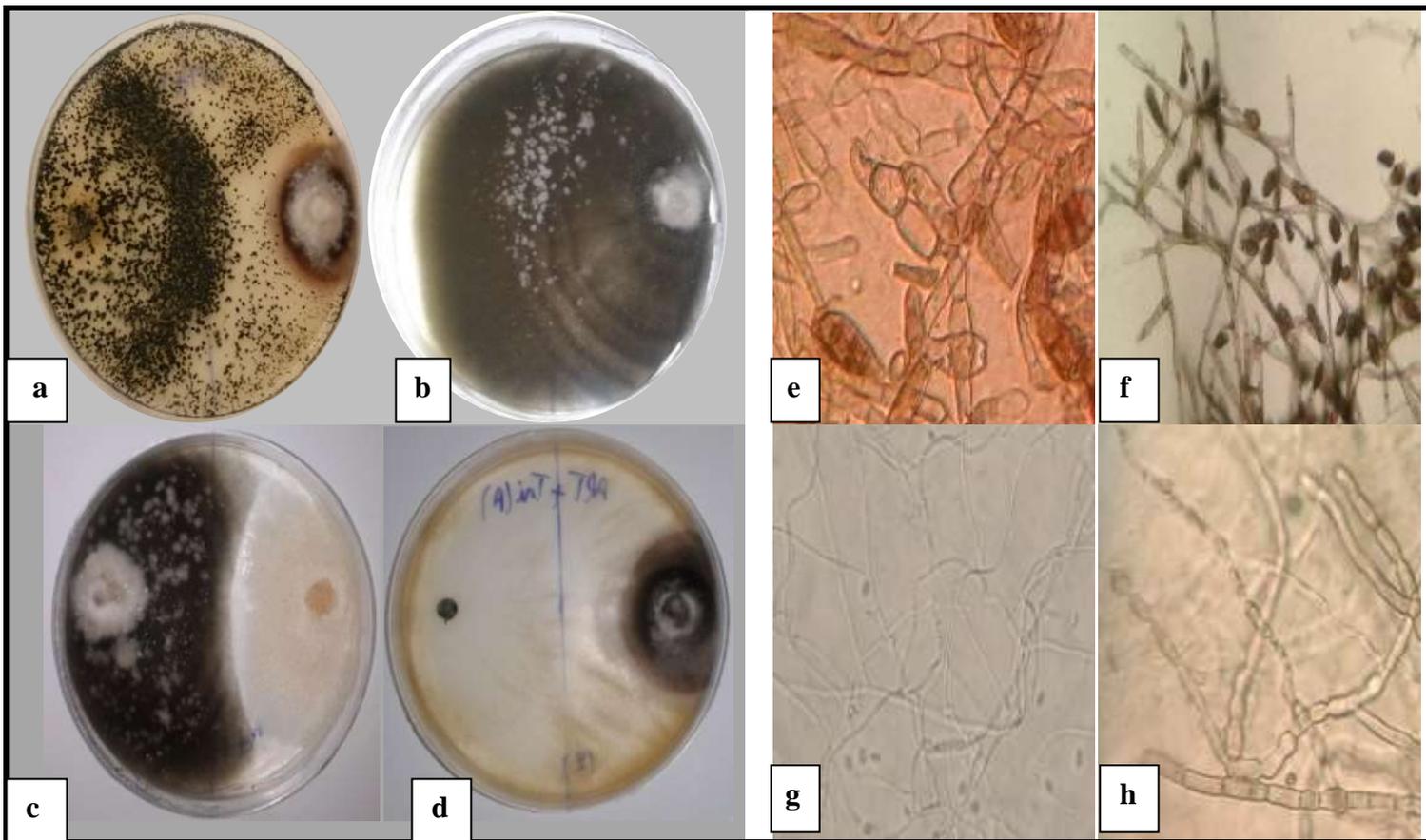


Figure 6 : Aspect macroscopique , témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et Aspect microscopique (G×40) , témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h) de l'antagoniste d'*Alternaria* sp.

1.3.1.2- Effet sur *Fusarium proliferatum*

Le taux d'inhibition de *Fusarium proliferatum* sous l'action de Tri(ant) et Tri(A) est de 51.85 %, 45.92% et pour Glio (37.05%).

L'observation microscopique de la zone contacte a montrée la lyse mycélienne du *Fusarium Proliferatum* par Tri(ant) (Figure 7.f). et par Tri(A) (Figure 7.g).a été observée l'enroulement du mycélium Glio sur mycélium de pathogène (Figure 7.h).

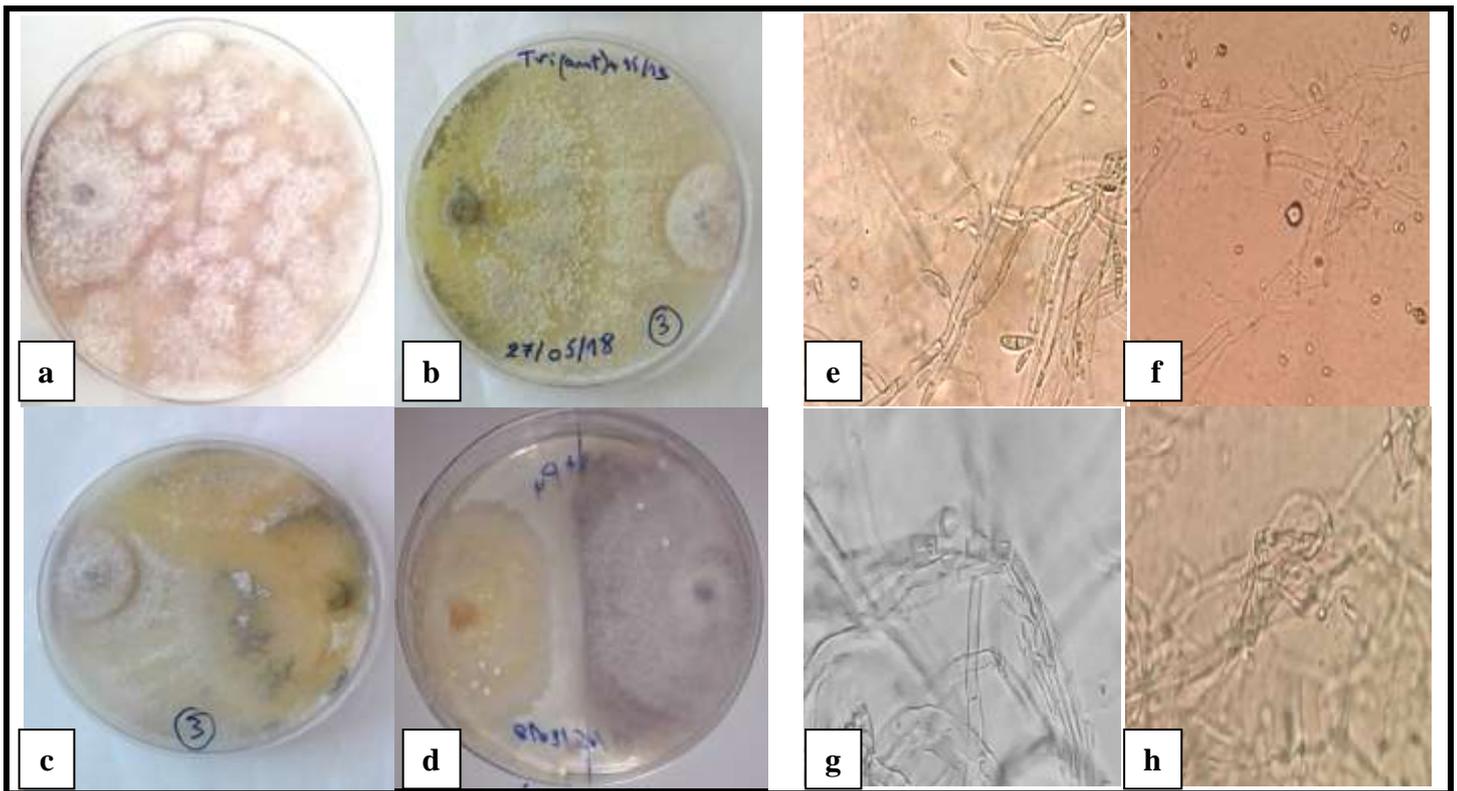


Figure 7 : Aspect macroscopique , témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et microscopique (G×40) témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h) de l'antagoniste de *Fusarium proliferatum* sp.

1.3.1.3- Effet sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*

Au bout de sept jours d'incubation, Le taux d'inhibition enregistré par Tri(ant) ,Tri(A) contre *F. o. f. sp. albedinis* très proche suivi par 53.74 % , 55.78 % respectivement. et le taux le plus faible enregistrée par Glio 10.37% .

L'observation microscopique de la zone contacte a montrée la lyse mycélienne par Tri(ant) (Figure 8.f) Formation de chlamydospores sur le mycélium du *F. o. f. sp. albedinis* en présence de Tri(A) (Figure 8.g) et Glio(Figure 8.i) , et a observée enroulement des hyphes de *Glio* sur mycélium du *F. o. f. sp. albedinis* (Figure 8.h).

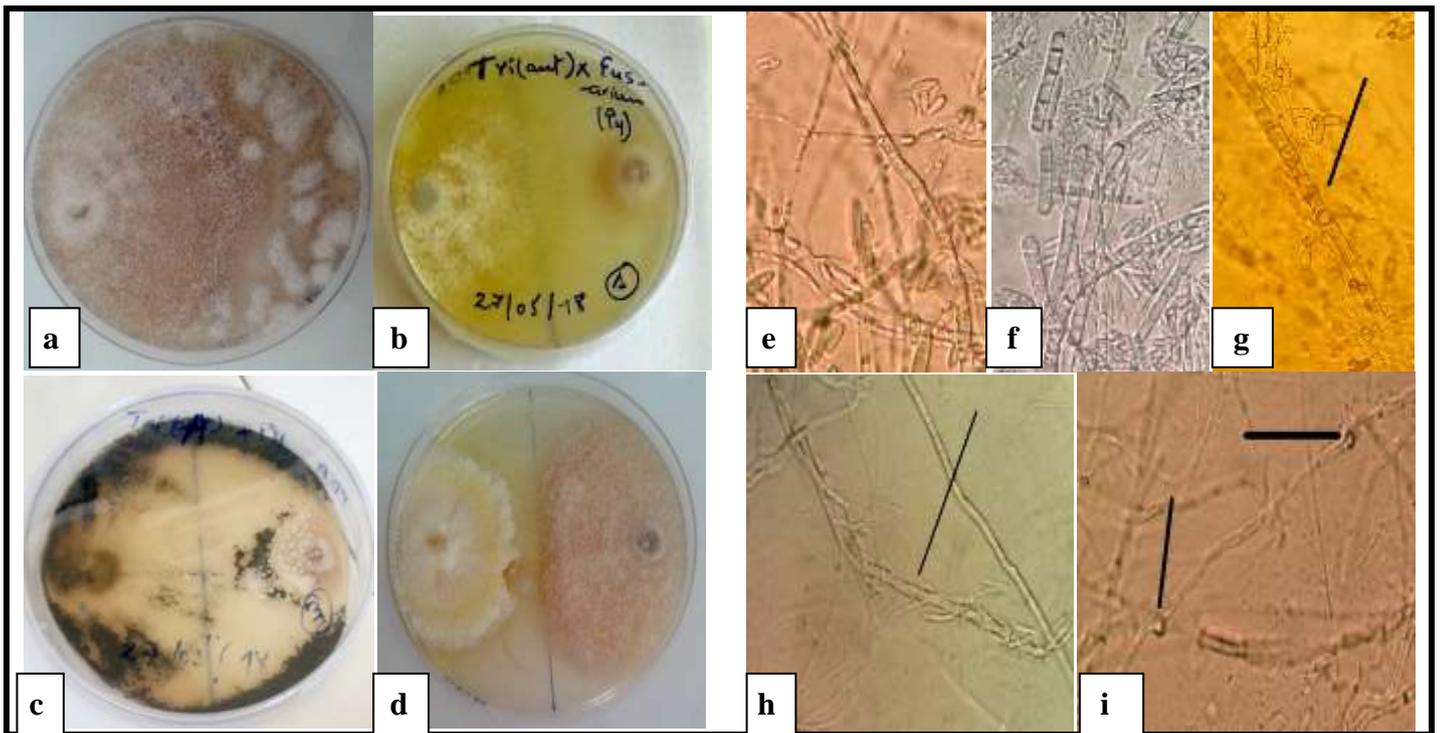


Figure 8 : Aspect macroscopique ,témoin (a) , avec Tri(ant) (b) ,avec Tri(A) (c) et avec Glio (d) et microscopique (G×40) , témoin (e) , avec Tri(ant) (f) ,avec Tri(A) (g) et avec Glio (h.i) de l'antagoniste de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*.

1.3.2- Confrontation à distance

Cette confrontation a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur (à distance) du *Trichoderma sp* (Tri(ant),Tri(A)) et *Gliocladium roseum* exercé sur les isolats pathogènes. Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies et l'estimation des pourcentages d'inhibition des pathogènes cultivés en présence de l'antagoniste (Tableau 2).

Après sept jours d'incubation, les boîte de *Fusarium proliferatum* est totalement envahie par les antagonistes Tri(ant) ,Tri(A) ,Glio et changement de couleur de la colonie par rapport au témoin , avec des taux d'inhibition 38.23% ,51.47% et 4.41% respectivement, ce qui correspond à la sécrétion des substances volatiles par les agents antagonistes en présence du pathogène. En ce qui concerne le genre *Alternaria sp* l'inhibition par tri(ant) a été 10.63%. Par contre aucune inhibition d'*Alternaria* par Tri(A) et Glio n'a été observé ;(tableau 2) Par ailleurs le taux d'inhibition de *Fusarium oxysporum* par Tri(ant) 8.82,et Tri(A) 23.52 % , avec des changement de couleur et a été aucun effet par Glio.

Tableau 2: confrontation a distance entre Tri(ant), Tri(A) et Glio contre les agent phytopathogène.

Résultats

| pathogène | Témoin | Tri(ant) | Tri(A) | Glio |
|---|--|--|---|--|
| <i>Alternaria</i> sp |  |  |  |  |
| <i>Fusarium</i> <i>proliferatum</i> |  |  |  |  |
| <i>Fusarium</i> <i>Oxysporum</i> <i>f.sp.</i> <i>albedinis</i> |  |  |  |  |

1.4- Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes

1.4.1- Production des ligninase

La production de cet enzyme par des isolats antagonistes a été testée sur un milieu à base d'acide tannique où ils ont formé une zone foncée entourant les colonies après 4 jours d'incubation .

L'isolat Tri(ant) a été capable de former une zone foncée avec un diamètre 1.4 cm, suivie par Tri (A) (1.6 cm), l'isolat Glio a produit significativement la plus grande zone avec un diamètre de 3 cm (Figure 9).

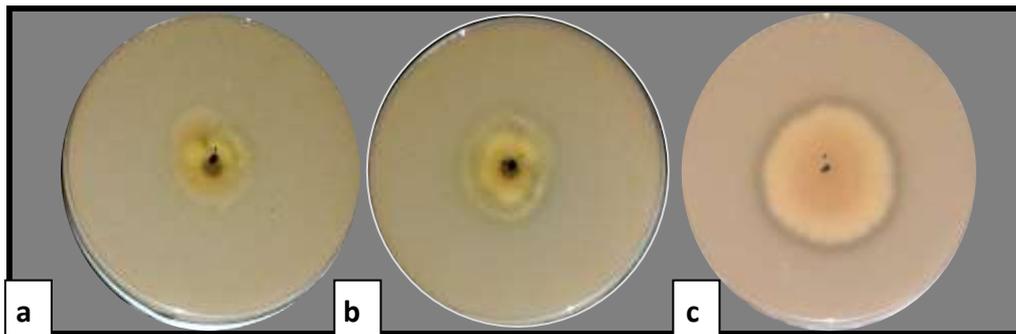


Figure 9 : Teste de l'activité ligninase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c).

1.4.2- Production des protéases

L'activité protéolytique des isolats antagonistes a été testée sur un milieu à base de lait écrémé. Traduit par l'apparition d'une zone transparente sur le milieu de culture. L'isolat Tri(ant) a formé une grande zone claire de 5.3 cm sur gélose au lait écrémé (Figure 10). La zone claire a indiqué la présence des protéases. Par contre, Le plus faible diamètre de la zone hydrolysée la caséine est enregistré par l'isolat Tri (A) (2.4 cm) et Glio (2.2) (Figure 10).

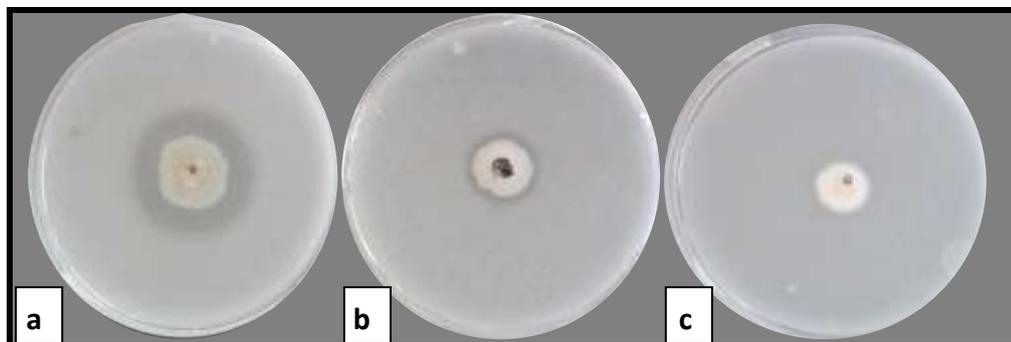


Figure 10: Test de l'activité protéase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c).

1.4.3- Production des amylases

La production d'enzyme amylase des isolats antagonistes a été testée sur un milieu à base d'amidon. Les trois isolats testés ont présentés un résultat positif avec formation d'un halo jaune clair autour de la colonie pour chaque isolat (Figure 11).

Parmi les 3 isolats, Tri(ant) et Tri (A) ont formé un grand halo démontré une bonne activité enzymatique par rapport au Glio (Figure11).

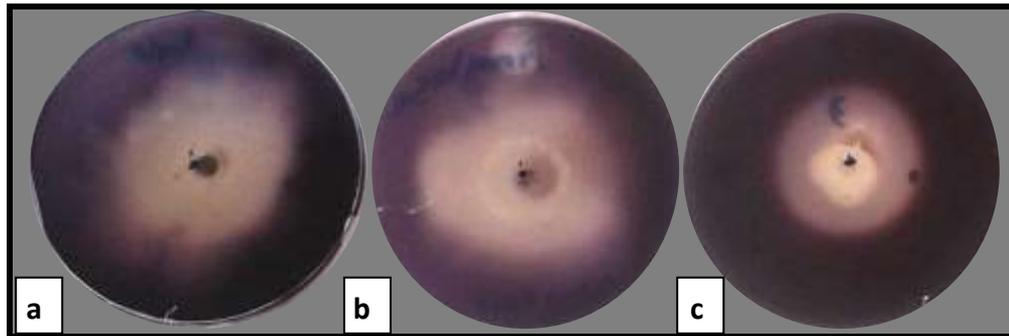


Figure 11 : Teste de l'activité amylase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c).

1.4.4- Production des cellulase

L'activité cellulolytique des isolats antagonistes ont été testée sur un milieu à base de la cellulose. L'isolat Tri(ant) a montré une possibilité de produire la cellulase (8.5cm),et (5.7cm) par Tri(A). Par contre, Le plus faible diamètre enregistré par l'isolat Glio(Figure 12).

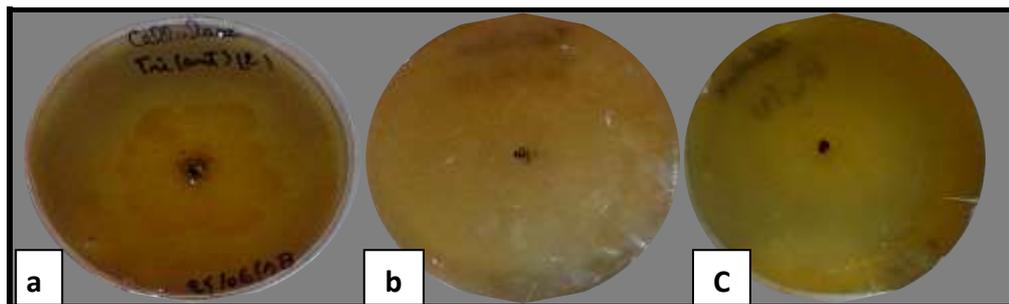


Figure 12 : Test de l'activité cellulase de Tri(ant) (a),Tri(A) (b) et Glio (c).

1.5- Production des phytohormones (AIA)

Les résultats obtenus sur l'AIA (Acide indole acétique) ont montré La production de ce composé est variable d'un isolat a l'autre, nous avons enregistré des concentrations de 18.89 $\mu\text{g/ml}$, 5.89 $\mu\text{g/ml}$, et 5.26 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches Tri(ant), Tri(A) et Glio respectivement (Figure 13) .

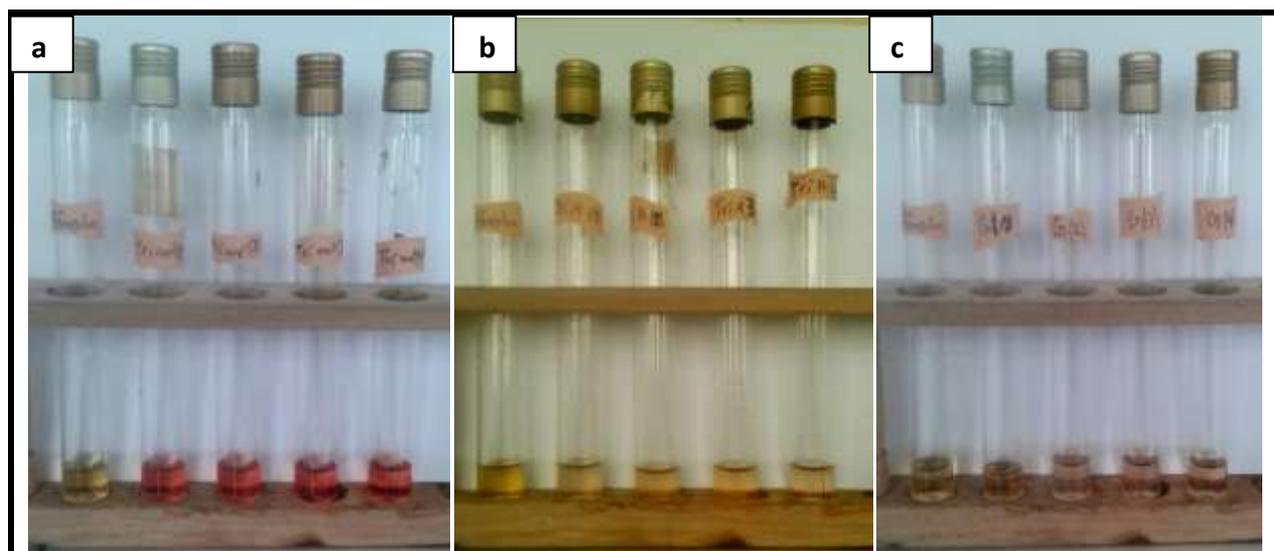


Figure 13 : Production d'AIA par Tri(ant) (a) ,Tri (b) et Glio (c) sur le milieu PDB

2. Discussion

L'isolement des agents antagonistes a été effectué à partir du sol de la région d'AKBOU. L'identification de ces souches étant basée essentiellement sur les clés de détermination des genres à savoir les caractères cultureux et la morphologie microscopique, établies par (**Botton et al., 1990 ; Messiaen et al., 1991 ; Rémi et al., 1997**).

Les isolats trouvés dans ce travail appartenant au genre suivant : *Alternaria* sp; *Pythium* sp ; *Aspergillus* sp ; *Trichoderma* sp.

Les critères proposés par **Botton et al. (1990) et Guiraud (1998)** ont été utilisé pour l'identification des deux souches sélectionnées de *Trichoderma* sp. Les deux isolats cultivés sur le milieu de culture PDA ont formé de grandes colonies circulaires occupant la totalité de la boîte de Pétri. **Cournut (1984); Landreau (2001)** ont montré que les colonies fongiques de *Trichoderma* sp peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. **Chaverri et Samuels (2003) et Kubicek et al. (2008)**. Les deux souches isolées ont été pré identifiées dans le genre *Trichoderma*, elles se caractérisent par des hyphes jaunes, septés, ramifiés et parfois lisses ; les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale ; les phialides sont très ramifiés, les conidies sont unicellulaires, le plus souvent vertes et lisses. Les résultats d'observations du genre *Trichoderma* obtenues par **Roquebert (1996) et Benkada (2006)** confirment que nos observations expriment bien le genre *Trichoderma*.

Grâce 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. Les *Trichoderma* sp. Terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) (**Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998**).

Les isolats obtenus d'*Alternaria* sp ont été identifiés selon les méthodes d'identifications classiques macroscopiques et microscopiques. En effet, Les résultats obtenus ont été en accord avec les études de **Chabasse et al. (2002)**, montrent les colonies d' *Alternaria* présentent une couleur grise blanche au départ, puis devient foncés (vert à noire) au recto comme au verso, les conidies d'*Alternaria* sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important. Ce sont des dictyospores. A maturité, elles présentent à la fois des cloisons

transversales, obliques ou longitudinales. Ces spores à parois lisse et de taille importante sont souvent disposées en chaînes.

Le genre *Alternaria* regroupe différentes espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire l'Alternariose. Les *Alternaria* sont des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sols, textiles, graines (**Linás et al., 1999**).

L'activité antagoniste de *Trichoderma* sp (Tri(ant), Tri(A)) et *Gliocladium* sp vis-à-vis des différents phytopathogène (*Alternaria* sp; *Fusarium oxysporum*; *f.sp.albedinis*; *Fusarium proliferatum*). Le test de confrontation directe été réalisé sur milieu PDA. Dans cette étude et après 7 jours d'incubation, le *Trichoderma* a montré une bonne activité inhibitrice vis-à-vis les souches pathogènes avec des taux d'inhibition entre 44.44% et 55.78 %. par contre, les taux d'inhibition ont été enregistrée par *Glio* ne dépasse pas 19.27%, sauf dans le cas du *Fusarium Proliferatum* où il a été enregistré un bon taux d'inhibition de 37.05% par rapport les autres pathogènes étudiés. Ces résultats ont montré que la croissance des souches pathogènes est très lente dans le cas de confrontation directe, ceci a été justifié par le fait que les antagonistes ont la capacité d'arrêter le développement du pathogène avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées avec une largeur variable selon l'isolat. Ces observations sont en accord avec les études précédemment réalisée par **Haran et al.(1996)** et **Zhihe et al.(1998)** qui ont prouvé que les antagonistes produisent des substances agissant comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance d'agents pathogènes.

Au-delà de cette période et au terme de 7 jours, les isolats antagonistes envahissent les colonies et sporulent même sur celles-ci. Cette action est expliquée par **Daami-Remadi et Mahjoub (2001)**. L'envahissement du mycélium du pathogène par l'antagoniste a été également observé par **Benhamou et Chet (1997)**, en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre cet antagoniste et un autre champignon tellurique le *Pythium ultimum* et ce, au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation. D'après **Davet (1983)** et **Maslouhi, (1989)**, cette action inhibitrice est due à des substances, de nature chimique, libérées par les souches antagonistes (phénomène d'antibiose). La capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèce différente. **Hibar et al. (2005)** et **Bouziane et al. (2011)** ont également observé l'envahissement du mycélium de *F. oxysporum f.sp. radices-lycopersici* Jarvis & Shoemaker par l'agent antagoniste *T. harzianum*.

Le mycoparasitisme est un phénomène couramment rencontré entre les différents groupes de champignons (**Elad, 1993**). Ce phénomène se passe lorsque les hyphes de l'antagonistes

s'enroulent autour du champignon phytopathogène (**Ezziyyani et al., 2004**) présentant une phase initiale d'interaction avec les mycéliums, une phase intermédiaire pour surmonter l'effet inhibiteur de celui-ci et une phase finale de parasitisme (**El-Gali, 2015**). Cette dernière est caractérisée par la libération d'enzymes pour dégrader les parois cellulaires (**Benitez et al., 2004**), une lyse des membranes mycéliennes, suivie par une digestion des contenus plasmiques traduits par la force de pression occasionnée par l'enroulement du mycélium *Trichoderma* sp au tour de mycélium du *Fusarium* sp. (**Howell et al., 2003**) Des résultats similaires ont été obtenus avec *Trichoderma lignorum*, capable de s'enrouler sur le mycélium du *Rhizoctonia solani*, causant ainsi une dissolution du cytoplasme du pathogène (**Howell, 2003**).

La compétition pour la nutrition et l'espace (**Hjeljord et al., 2000**) peuvent être également mises en jeu lorsque les fragments des champignons sont placés en contact avec l'antagonistes, ce dernier a l'avantage de l'espace et provoque des anomalies dans la morphologie des agents phytopathogènes (**Gveroska et Ziberoski, 2011**).

Dans ce travail, la confrontation indirecte réalisée entre *Trichoderma* sp (Tri(ant), Tri(A)) , *Gliocladium roseum* vis-à-vis des différents phytopathogène (*Alternaria* sp; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; *Fusarium Proliferatum* a montrée un ralentissement de la croissance mycélienne des cette souches pathogène exercé par *Trichoderma* sp (Tri(ant), Tri(A)) comparativement aux témoins.

Il a ressorti de ce résultat, que malgré l'absence d'un contact direct entre le *Trichoderma* sp et les pathogènes, selon **Dennis et Websters, (1971)** les *Trichoderma* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes. Les travaux de **Akrami et al. (2011)** ont rapporté que certaines espèces de *Trichoderma* sp ont réduit la croissance des espèces de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* par la production des substance volatiles . Ces mêmes résultats ont été remarqués par **Hibar et al.(2005)**. Ces auteurs ont expliquée la sécrétion des substances volatiles peut qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène.

Par ailleurs, une faible inhibition de la croissance mycélienne a été induite par la souche de *Gliocladium roseum* contre tous les pathogènes. il a montré un changement remarquable de la couleur et de l'aspect des souches pathogènes.

Un autre mécanisme est assuré par la sécrétion de métabolites volatiles et diffusibles (**Berber et al., 2009**) qui provoque la lyse du mycélium et des spores du phytopathogène. (**Moayedi et Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2010; Elad et al., 1979**).ont remarqué que la

structure des sclérotés est détruite par une sécrétion d'enzymes lytiques tels que la glucanase et la chitinase ainsi qu'une forte inhibition de leur germination.

L'activité enzymatique est observée par les souches de *Trichoderma sp*(Tri(A) ,Tri(ant)) et *Gliocladium sp* peut être due à la production d'enzymes extracellulaires de dégradation à des niveaux élevés des cellulases, protéases, amylases, et ligninases . Ces enzymes sont responsables de la dégradation des parois cellulaires des agents pathogènes (**Lorito et al., 1993**).Diverses études ont expliqué l'abondance des espèces de *Trichoderma sp* dans les écosystèmes par leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes, ils sont de ce fait, un maillon important dans les chaînes biologiques (**Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek et al., 2003**). De leurs côté, **Elsas et al.(1997)** considère *Trichoderma* comme un ascomycètes cellulolytiques.

Catalano et al. (2011) ont étudié l'interaction parasite, établie par *Trichoderma*, contre les champignons phytopathogènes par analyse histologique et biochimique. Plusieurs activités enzymatiques ont été liées au mycoparasitisme, tels que les enzymes dégradant les composants de la paroi cellulaire à savoir, la chitinase, la cellulase, la lipase et la protéase ou des composés phénoliques, la laccase dégradant la lignine et la mélanine.

Les résultats obtenus concernant les ligninases ont montré que tous les isolats ont la capacité de dégrader la lignine. La synthèse de la polyphénol-oxydase est nécessaire pour la dépolymérisation de la lignine (lignine est structurellement différente de l'acide tannique) est utilisé l'acide tannique comme un indicateur des polyphénol-oxydases et pour sélectionner les microorganismes ligninolytiques (**Thormann et al., 2002 ; Mukhlis et al., 2013**).

Le mycoparasitisme implique également la synthèse d'un mélange riche en enzymes hydrolytiques. Dans notre étude, la production de l'enzyme protéase par le *Trichoderma sp* et *Gliocladium sp* a été observée. Selon **Howell (2003) et Harman et al. (2004)**, les protéases, les chitinases et/ou des enzymes glucanases ont une fonction en décomposant les polysaccharides.

Dans cette étude, les isolats antagonistes ont démontré une bonne capacité de dégrader l'amidon. ces résultats obtenus ont confirmée par **Calistru et al.(1997)** qui ont été signalées des agents antagonistes comme des producteurs d'amylase.

L'activité cellulolytiques de ce test a montré une zone de la lyse sur le milieu de culture qui signifiée la production de la cellulase par les isolats. cet activité est associée au bio contrôle des agents phytopathogènes (**Elad et Kapat, 1999 ; Barbosa et al., 2001**).

La production de protéase et la cellulase par les isolats antagonistes. Joue un rôle important dans la décomposition de la matière organique, la minéralisation des éléments nutritifs et la promotion de la croissance des plantes (**Lima et al., 1998**).

Les antagonistes *Trichoderma* et *Gliocladium* peuvent utiliser un ou plusieurs modes d'action en même temps contre un agent pathogène comme suivant:

La compétition, qui se manifeste par l'aptitude de l'antagoniste à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes, cette action est observée par la technique de confrontation sur milieu gélosé, où le *Trichoderma* colonise le milieu de culture en épuisant le milieu de culture (**Dubos, 1985 ; Davet, 1996**). En analysant, microscopiquement, la zone de contact entre l'agent pathogène et les antagonistes pendant les tests d'antagonisme par confrontation directe, un enchevêtrement est observé entre l'action de **mycoparasitisme** qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque les antagonistes enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur, et l'action d'**antibiose** qui se manifeste par l'injection des substances (enzymes ou antibiotiques) qui détruisent le mycélium de pathogène (**Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001; Fang et al. 2005 ; St Leger et Wang 2010, Sandhu et al. 2012**).

Les résultats de la production de l'AIA (Acide indole acétique) ont montré une variation selon les isolats étudiés. L'AIA c'est un régulateur de croissance important chez la plante. La production de cet hormone est d'ailleurs souvent associée à la stimulation de la croissance chez la plante par les micro-organismes bénéfiques (**Patten et Glick, 1996 ; 2002 ; Vassilev et al., 2006**).

Au cours de ce travail, un intérêt particulier est porté aux genres *Trichoderma* et *Gliocladium* comme des agents de lutte biologique contre plusieurs champignons pathogènes.



Conclusion

Conclusion

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antagoniste de *Trichoderma* sp et *Gliocladium roseum* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum*.f. sp.*albedinis* ; *Alternaria* sp et *Fusarium proliferatum* " .

L'isolement de deux champignons antagonistes *Trichoderma* sp (Tri(ant) et Tri(A) et *Alternaria* sp a été réalisé à partir du sol de la région AKBOU de la wilaya de BEJAIA, les résultats de l'examen macroscopique et microscopique des souches du sol ont mis en évidence 9 souches fongiques représentant 4 genres différents, qui sont :*Trichoderma* sp.,*Aspergillus* sp., *Pythium* sp ,*Alternaria* sp .

l'activité antagoniste des isolas *Trichoderma* sp.Tri(ant) ,Tri(A) et *Gliocladium roseum* contre les espèces pathogènes *Alternaria* sp , *Fusarium oxysporum* f.sp .*albedinis* et *Fusarium proliferatum* a été étudié selon deux méthodes, Les résultats de la confrontation directe montrent un pourcentage d'inhibition Tri(ant) et Tri(A) varie de 44.44% à 55.78%, selon les espèces pathogènes testées et pour *Gliocladium roseum* cette inhibition varie de 10.37% à 37.05 % ,on peut dire que l'effet d'antagonisme de *Gliocladium roseum* est faible par rapport au *Trichoderma* vis –à vis des souches pathogènes.

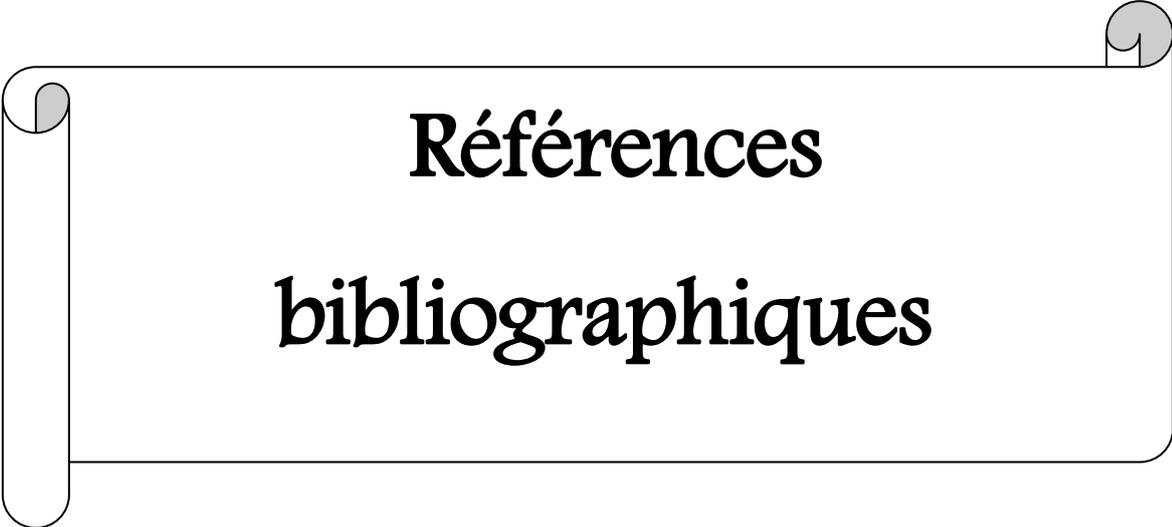
Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre *Trichoderma* et les pathogènes, une réduction du diamètre de la colonie de *Fusarium oxysporum*f.sp. *albedinis*, *Fusarium proliferatum* a été observée donc ces isolats pouvait produire des substances volatiles conte le pathogène.

Les tests d'activité enzymatique des antagonistes prouvent que les deux agents testés représentent une source très importante d'enzymes lytiques à savoir, la cellulase, protéase, ligninase. Ainsi que ces isolats testés ont la capacité de produire une hormone de croissance chez les plantes(AIA).

les résultats de ce travail nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel antagoniste de *Trichoderma* sp et *Gliocladium roseum* à l'égard des souches de *Fusarium oxysporum* .f. sp.*albedinis* , *Fusarium Proliferatum* et *Alternaria* sp testées.

Au terme de cette étude, il serait peut être intéressant de compléter ce travail par :

- Identification moléculaire des souches antagonistes (*Trichoderma*) ;
- Test in vivo afin de prouver l'activité antagoniste des souches;
- Production et l'identification des métabolites bioactifs de *Trichoderma* isolée.



Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- ABDALLA M. Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., MULE G., 2000.** Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84, 321-324.
- ABE C.A.L ., FARIA C.B., de CASTRO F.F., de SOUZA S.R., SANTOS F.C., de SILVA C.N., TESSMANN D.J. and BARBOOSA-TESSMANN I.P., 2015.** Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 15328–15346.
- AGRIOS G.N., 2005.** Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, 539, 524-525.
- AKRAMI M., HADI G., AHMADEH M., 2011.** Evaluation of different combinations of trichoderma species for controlling fusarium rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2653-2658.
- AI-HAMDANY M. A., SALIH M. M., 1986.** Wilt causing fungi on broad bean. *Indian Phytopathol*, 39, 620-622.
- ANAISSE E. J., KUCHAR R.T., REX A.J.H., FRANCESCONI M., KASAI F. M. C., MULLER M., LOZANO-CHIU R.C., SUMMERBELL M.C., DIGNANI S.J., CHANOCK T. J., WALSH., 2001.** « Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. », dans *Clin Infect Dis.*, vol. 33 pages =1871-1878.
- ARIE T., NAMB S., YAMASHTA S., DOI Y., KIJIMA T., 1987.** Stem blight, a new disease of *Exacum* caused by *Nectria gliocladioides* Smalley et Hansen. *Ann. Phytopathol.Soc. Jpn.*, 53, 570-575.
- ARMENGOL J., MORETTI A., PERRONE G., VICENT A., BENGOCHEA J. A., GARCIA-JIMENEZ J., 2005.** Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 123–131.
- ARMSTRONG G.M., ARMSTRONG J.K., 1981.** Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA, (1981), 391-399.
- AZIZ N.H., ELFOULY M.Z., ELESAWY A.A., KHALAFM.A., 1997.** Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. *Botanical bulletin of academic sinica*, 38, 33-38p.
- BAIS H.P., WEIR T.L., PERRY L.G., GILROY S., VIVANCO J.M., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol*, 57, 233–266.

Références bibliographiques

- BAKER K.F., SNYDER W.C., 1965.** Ecology of soil-borne plant pathogens: Prelude to biological control. Univ. of California Press, Berkeley, CA. 571p.
- BAKER K.F., COOK R.J., 1982.** Biological Control of Plant Pathogens. St Paul: APS Press 433p.
- BARBOSA M., REHM K., MENEZES M., MARIANO R.L., 2001.** Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characteriza. Brazilian Journal of Microbiology, 32, 98-104.
- BELABID L., 2003.** La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med) dans le Nord-Ouest Algérien: Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Emend. S. & H. f. sp. *lentis* (Vasud. Srin.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse DE Doctorat, Université d'Oran.
- BENHAMOU N., CHET L., 1996.** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology, 86, 405-416p.
- BENHAMOU N., CHET I., 1997.** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol, 63, 2095–2099.
- BENÍTEZ T., RINCÓN A.M., CARMEN-LIMÓN M. et CODÓN A.C., 2004** -Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology, 7: 249-260.
- BENKADA M.M., 2006.** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse doctorat. Univ. de Nantes, 139 p.
- BERBER F., OUAZZANI-TOUHAMI A., BADOUC A. et DOUIRA A., 2009.** Antagonisme *in vitro* et *in vivo* de deux *Trichoderma* à l'égard de quatre espèces de *bipolaris* pathogènes sur le sorgho. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 148, 93-114.
- BERG G., KRECHEL A., DITZ M., SIKORA R.A., ULRICH A., HALLMANN J., 2002.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol Ecol, 51(2), 215–229.
- BISBY G.R., 1939.** *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. Trans. Br. Mycol. Soc, 23, 149-168.
- BISSETT J., 1984.** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec.nov. Canadian Journal of Botany, 62, 924-931.

Références bibliographiques

- BISSETT J., 1991.** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) Can. J. Bot, 69, 2373-2417.
- 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., 1991c.** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany, 69, 2418-2420.
- BOOTH C., 1971.** The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, 273p.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIR S., GUY P.H., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1990.** Moisissures utiles et nuisible importance industrielle. 2^{ème} édition .maosson collection biotechnologies, 34-42p.
- BOTTON B., BRETON A., FEVER M., GAUTIE S., GUY PH., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J-J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1999.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industriels. Edn.
- BOURGEOIS C.M., LEVERAU J.Y., 1980.** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Tome 3. Contrôle microbiologique. Edition technique et documentation. Lavoisier Paris.
- BOUZIANE Z., DHIMAT L., KACEM CHAOUICHE N., ABDEL AZIZ W., 2011.** La compétition de *Trichoderma viride* vis-a-vis des souches fongiques pathogènes de maïs. Sciences & technologie C- N0 33, 31-37p.
- BRANDSBERG J.W., 1969.** Fungi isolated from decomposing conifer litter. Mycologia. 61, 373-38.
- BREFELD O., 1891.** Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 10: Ascomyceten II. Münster Cannon PF, Hawksworth DL (1983) (701) Proposal to conserve *Nectria* over *Ephedrosphaera* and *Hydropisphaera* (Fungi). Taxon, 32, 476-477.
- BRIC J.M., BOSTOCK R.M., SILVERSTONE S.E., 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Env. Microbiol, 533- 538.
- 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.

Références bibliographiques

- CAMPORTA P., 1985.** Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomie*, 5(7), 613-620.
- CARON J., LAVERDIERE L., PIERRE O., THIBODEAU et RICHARD R.B., 2002.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 (2), 73-87.
- CATALAN V., VERGARA M., HAUZENBERGER J.R., SEIBOTH B., SARROCCO S., VANNACCI G., KUBICEK C. P., SEIDL-SEIBOTH V., 2011.** Use of a non-homologous end-joining-deficient strain (delta-ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Curr Genet* 57, 13–2.
- CESKA M., 1971.** Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.*, 22, 186–192.
- CHABASSE D., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, 25-27p.
- CHABASSE D., BOUCHARA J.P., DE GENTILE L., BRUN S., CIMON B., PENN P., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bioforma, Edition Bioforma Paris, 25, 26 - 45.
- CHAPARRO J.M., BADRI D.V., BAKKER M.G., SUGIYAMA A., MANTER D.K., VIVANCO J.M., 2013.** Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* 8:e55731 10.1371/journal.pone.0055731.
- Chaverri P., Samuels G.J.(2003)** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud Mycol* 48:1–116.
- CHAVERRI P., BRANCO-ROCHA F., JAKLITSCH W., GAZIS R., DEGENKOLBE T., SAMUELS G.J., 2015.** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590.
- COOK R.J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 31: 53-80.
- COURNUT B., 1984.** Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th.: Pharmacie: Marseille, 77p.
- DAAMI- REMADI M., EI MAHJOUR M., 2001 .** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRAT* 74, 167–186p.

Références bibliographiques

- DASHWOOD E.P., FOX R.A., DUNCAN J.M., 1993.** Effect of substrate and plant maturity on the incidence of infection of potato roots by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Mycol. Res.*, 97, 733-745.
- DAVET P., 1983.** Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. Dans : Les antagonismes microbiens. Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. 24e Colloque de la Société Française de Phytopathologie (Bordeaux, 26- 28 mai 1983). De vannas, M.A., D.Rafaeli -Eshbol et G. Stotzky (éds). Versailles, INRA, 159-168.
- DAVET P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) INRA. Paris.
- DENIS C., WEBSTER I., 1971.** « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 5741-48.
- DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., NELSON P.E., 1997.** Production of fumonisin B1 and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1838-1842.
- DOMSCH K. H., GAMS W., ANDERSON T.H., 1980.** Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London.
- DU TOIT J. L., INGLIS D.A., PELTER G.Q., 2003.** *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87, 750-750.
- DUBOS B., 1985.** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, INRA, Paris (FR) 35-49p.
- DUBOS B., 1986.** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers.ex Fr) Pouzar (Plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. L'emploi d'ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l'INRA, N°34. 10 janvier 1985. Versailles (France), 37-49p.
- DUGAN F. M., HELLIER B.C., LUPIEN S.L., 2003.** First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*, 52, 426-426.
- ELAD Y., 1993** .Mycoparasitism. in : Pathogenesis and host specificity in Plant Diseases. Vol. 2, U. S. Singh, K. Komoto et R. P Singh ,e ds.Pergamon Publishers., 289-307p.
- ELAD Y., CHET I., KATAN J., 1979.** *Trichoderma harzianum*: A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. 70 (2), 119-121.

Références bibliographiques

- ELAD Y., KAPAT A., 1999.** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol, 105, 177-189.
- EL-GALI Z.I., 2015.** *Trichoderma harzianum* as a root treatment to control *Alternaria alternata* ceratoni leaf spot on *Ceratonia siliqua* L. Sky Journal of Agricultural Research, 4(8), 161-166.
- ELLIS M.B., 1971.** Dematiaceous hyphomycetes. Kew, 608p.
- ELMER W.H., 1990.** *Fusarium proliferatum*, as casual agent in Fusarium crown an root rot of asparagus. Plant Dis. 74, 938.
- EMMERT E.A.B., HANDELSMAN J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram⁻) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett*, 171, 1-9.
- ERIKSON O.E., HAWKSMORTH D.J., 1991.** Outline of the ascomycetes. *Syst. Ascomycet*, 9, 39-271.
- ESPOSITO E., SILVA M., 1998.** Systematics and environmental application of genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24(2), 89-98.
- EZZIYYANI M., SÁNCHEZ C.P., SID AHMED A., REQUENA M.E., CANDELA M.E., 2004** - *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- FANG W., LENG B., XIAO Y., JIN K., MA J., FAN Y., FENG J., YANG X., ZHANG Y., PEI Y., 2005.** Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 363–370.
- FEDERICI F., 1982.** Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 74, 738 -743.
- FERNANDES B., 2005.** Luttebiologique. *PHM% Revue horticole*, 465, 31p.
- FOLEY M.F., DEACON J.W., 1985.** Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 85, 631-639.
- FRIES E., 1825.** *Systema Orbis Vegetabilis*.
- GAMS W., BISSZTT J., 1998.** Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd, 3–34p.
- GAMS W., BISSETT J., 2002.** Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C. P. and Harman, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd, 3-31p.
- GHISALBERTI E.L., SIVASITHAMPARAM K., 1991.** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil. Biol. Bioche*, 23, 1011-1020.

Références bibliographiques

- GORDON W.L., 1965.** Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botanic, 43, 1309-1318.
- GOURLEY C.O., MACNAB A. A., 1964.** *Verticillium dahliae* and *Gliocladium roseum* isolation from strawberries in Nova Scotia. Can. J. Plant Sci., 44, 544-549.
- GUIRAUD J., 1998.** Microbiologie alimentaire. Edition. Donod, Paris, 8-101p, 330p.
- GVEROSKA B., ZIBEROSKI J., 2012.** *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. Applied Technologies and Innovations, 7 (2), 67-76.
- HANSO M., KAROLES K., 1980.** Some agents of damping-off in conifer seedlings in Estonian forest nurseries and associated microfungi. Metsan duslikud Uurim., 16, 120-134.
- HANSON L. E., HOWELL C.R., 2002.** Biocontrol efficacy and other characteristics of proplaste fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. Mycological Research, 1063, 321-328.
- HARANA S., SCINCKLER H., CHET I., 1996.** Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology., 142, 2312-2331.
- HARMAN G.E., 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature. Reviews. Microbiology, 2, 43-56.
- HARRIGAN W.F., MC CANCE M.E., 1976.** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London, P, 21-277p.
- HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON B.C., PEGLER D.N., 1994.** Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8th ed. International Mycological Institute, Egham. United Kingdom.
- HELYER N., CATTILIN N.D., BROWN K.C., 2014.** *Biological Control in Plant Protection: A Colour Handbook*. EE.UU.: CRC Press.
- HIBAR K., DAAMI-RAMADI M., KHIAREDDINE H., EL MAHDJOUR M., 2005.** Effet inhibiteur *in vivo* et *in vitro* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (3), 163-171.
- HJELJORD L.G., STENSVAND A., TRONSMO A., 2000.** Antagonism of Nutrient-Activated Conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 Against *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 91, 1172-1180.
- HOUSTON D. R., MAHONEY E. M., MCGAULEY B. H., 1987.** Beech bark disease: Association of *Nectria ochroleuca* in W. VA., PA., and Ontario. (Abstr.) Phytopathology, 77, 16-15.
- 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.

Références bibliographiques

- HUBER D. M., FINLEY A. M., 1959.** *Gliocladium roseum*, a causal agent in the bean root rot complex in Idaho. Plant Dis. Rep., 43,626-628.
- IBNU Z., SUPRIANA N., 1987.** Inventory of diseases at three *Pinus merkusii* nurseries in North Sumatra. Bul. Penelitian Kehutanan., 3, 37-44.
- IZALLALEN M., 1997.** Production des sidérophores chez le Rhizobium et leur rôle dans l'inhibition de certains champignons phytopathogènes. Thèse Doctorat, 84p.
- KASANA R.C., SALWAN R., DHAR H., DUTT S., GULATI A., 2008.** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. Curr. Microbiol, 57, 503–507.
- KAUSAR H, SARIA M, SAUD HM, ALAMI MZ, ISMAIL MR, 2010.**Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. evaluationto accelerate the action of extracellular cellulases. International Biodeterioration& Biodegradation, 64 (7): 594-600.
- KLEIN D., EVEJEIGH D.E., 1998.** Ecology of Trichoderma. Kubicek C.P., Harman G.E. (Eds.), Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics, Taylor and Francis Ltd, London, 57–74p.
- KUBICEK C.P., BISSETT J., DRUZHININA I., KULLINIG-GRADINGER C., SZAKACS G., 2003.** Genetic and métabolic diversity of *Trichoderma sp.*; a case study on south-east asian isolates. Fungal Genet. Biol, 38 (3), 310-319.
- KUBICEK C.P., KOMON-ZELZOWSKA M., DRUZHININA I.S., 2008.** Fungal genus Hypocrea/Trichoderma: from barcodes to biodiversity. J Zhejiang Univ Sci B, 9, 753–763.
- 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. Th. : Pharmacie : Nantes, 201 p.
- LEFORT F., 2010.** Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Istitut Terre Nature Paysage et Filière Agronomie, Hepia HES-SO//Genève, 57p.
- LESLIE J. F., MARASAS W.F.O., SHEPHARD G.S., SYDENHAM E.W., STOKENSTROM S., THIEL P.G., 1996.** Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1182–1187.
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A., 2006.** *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.245 Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Campos, M. A., &

Références bibliographiques

- Leslie, F. (2009). A new *Fusarium* lineage within *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. *Plant Pathology*, 58, 33-42.
- LEUCHTMANN A., PETRINI O., SAMUELS G., 1996.** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section Longibrachiatum. *Mycologia*, 88 (3), 384-394.
- LEVEAU J.Y., BOULX M., 1993.** Les moisissures.p:112-163.In:Florent J.(ed),Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel .Edition Tec et Doc-Lavoisier Apria.
- LIMA G., DE-CURTIS F., CASTORIA R., DE-CICCO V., 1998.** Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorulaglutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*, 8, 257-267.
- LINAS M.D., MORASSIN P., RECCO., 1999.** Actualités sur *Alternaria* : écologie, Revue Française, 349-355.
- LINK H.F., 1809.** Observations in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin, 3: 3–42.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., BOTTALICO A., CORDA P., 1995.** Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Dis.* 79, 727-731.
- LOGRIECO A., MORETTI A., SOLFRIZZO M., 2009.** *Alternaria* toxins and plant diseases : an overview of origine, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2 (2), 129-140.
- LOPER J. E., SCRTH M. N., 1986.** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76, 386-389.
- LORITO M., HAYES C.K., PIETERO A., HARMAN GE.,1993.** Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr Genet.* 24, 349–356.
- MASLOUHI A., 1989.** Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum F.sp Albedinis* ,agent causal du Bayoud. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc), 4-8p
- MCLEAN M. A., SUTTON J. C. 1992.** Mycoflora of strawberry in Ontario. *Can. J. Bot* 70, 846-852.
- MESSIAEN C.M., BLANCARD D., ROUXEL F., LAFON R., 1991.** Les maladies des plantes maraîchères. INRAA, Paris.
- MOAYEDI G., MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA R., 2010.** Antagonistic Activities of *Trichoderma* spp. on Phytophthora Root Rot of Sugar Beet . 29 (1-2).

Références bibliographiques

- MORGAN J.A.W., BENDING G.D., & WHITE P.J., 2005.** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729 -1739.
- MOSCA A.M.L., MARCHISIO V. F., 1985.** Mycorrhizoplane fungal populations of *Abies alba* seedlings. *Allionia (Turin)*, 27,30-39.
- MOURIA B., OUZZANI-TOUHAMI A., DOUIRA A., 2007.** Effet de diverses souches de *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprot*, 88(3), 103-110.
- MUELLER J.D., SINCLIR J.B., 1986.** Occurrence and role of *Gliocladium roseum* in field-grown soybeans in Illinois. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 86, 677-680.
- MUKHLIS SAUD H.M., SARIAH M., ISMAIL M.R., KAUSAR H., HABIB S.H., 2013.** Potential lignocellulolytic *Trichoderma* for bioconversion of oil palm empty fruit bunches. *Australian Journal of Crop Science*, 7(3), 425-431.
- NAHER L. SOON G.T. HO C.L., YUSUF U.K., SITI HAZAR A., ABDULLAH F., 2014.** RNAm Expression of EgCHI1, EgCHI2, and EgCHI3 in Oil Palm Leaves (*Elaeis guineensis* Jacq.) after Treatment with *Ganoderma boninense* Pat. and *Trichoderma harzianum* Rifai. *The Scientific World Journal*, Vol. 647504, 6p. doi:10.1100/2012/647504.
- NASRAOUI B., 2006.** Les champignons parasites des plantes cultivées. Chapitre 3 et 4, 320-447p.
- NEES., VON ESENBECK G.G., 1817.** System des Pilze Urid Schwamme, Wurzburg, 234p.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASS W.F.O., 1983.** *Fusarium* Species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa, 193p.
- PAPAVIZAS G.C., 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and potential of biological control. *Annu. Rev. Phytopatho*, 23, 23-54.
- PATTEN C. L., GLICKI B.R., 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- PATTEN C.L., GLICK B.R., 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb*, 68, 3795-3801.
- PERSOON C.H., 1794.** *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag. Bot, 1, 81-128.
- POCHON J., TARDIEUX P., 1962.** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tourtourielle, Saint-Mandé. 110 – 111.

Références bibliographiques

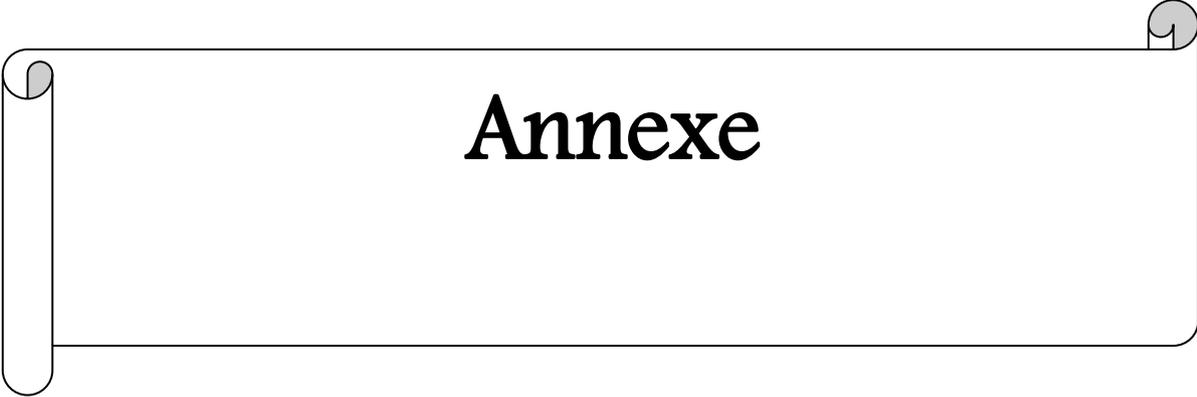
- RAMIREZ –SUERO M., 2009.** Etude de l'interaction de *Medicago trunculata* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Thèse de doctorat, INSAT Toulouse, 281p.
- RAPILLY F., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Annals des Epiphytes, vol.19.Institut National de la Recherché Agronomique, paris, 102.
- REHNER S.A., SAMULES G. J., 1994.** Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. Mycological Research, 98, 625-634.
- REMI C., 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.
- RIFAI M.A., 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*.Mycologia.Papers, 116, 1-56.
- RIFAI M.A., WEBSTER J., 1966.** Culture studies of *Hypocrea* and *Trichoderma* II. *H. aureoviridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. Trans. Br. Mycol. Soc, 49, 296.
- RINALDI C., SUTTON A., FOTHERGILL S.R., 1998.** The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 123-129.
- ROQUEBERT M.F., 1996.** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.
- ROSKOV Y., ABUCAY L., ORRELL T., NICOLSON D., KUNZE T., CULHAM A., BAILLY N., KIRK P., BOURGOIN T., DEWALT R.E., DECOC K.W., DE WEVER A., 2015.** *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 21st April 2015.* Obtenido de www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, Holanda.
- ROTEM J., 1994.**The genus *Alternaria*,biology and pathogenicity.APS Press,St.Paul, Minnesota, 326p.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., 1988.** Indroduction to food –born fungi , 3 edn . Centra AlbureauVoor .Schimelcultures. Baane. The Netherlands.
- SAMUELS G.J., 1976.** A revision of the fungi formerly classified as *Nectria*, subgenus *Hyphonectria*. Mem. N.Y. Bot. Gard., 26, 1-126.
- SAMUELS G.J., 2006.** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96, 195-206.
- SAMUELS G.J., CHAVERRI P., FARR D.F., MCCRAY E.B., 2015.** *Trichoderma* Online [Online]. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [consulter le :05 janvier 2015].
- SANDHU S.S., SHARMA A.K., BENIWEL V., BOWEL G., BATRA P., KUMAR A., JAGLAN S., SHARMA A.K., MALHOTRA S., 2012.** Myco-biocontrol of insect pests, factor involved, mechanism, and regulation. *Journal of Pathogen.* 2012,126819.

Références bibliographiques

- SCHROERS H.-J., SAMUELS G.J., SEIFERT A.K., GAMS W., 1999.** Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. Rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91, 365-385.
- SCHUBERT M., SIEGFRIED F., SCHWARZE F., W.M.R., 2008** - In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboricultural Journal*, 31, 227-248.
- SHARMA K.K., SINGH U.S., 2014.** Cultural and morphological characterization of rhizospheric isolates of fungal antagonist *Trichoderma*. *Journal of Applied and Natural Science*, 6 (2), 451-456.
- SIMMONS EG., 2007.** *Alternaria*. An Identification Manual : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands, 775p.
- SINGH H.B., KARLA A., PATRA N.K., KUMAR S., PANDEY R., KHANUJA S.P.S., SHASANY A.K., 2003.** Process for the preparation of novel growth media from distillation and other plant wastes for mass multiplication of bio-control fungi. (US Patent No: 6, 511-821) .
- SIVASITHMPARAM K., GHISALBERTI E.L., 1998.** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis. London. UK.
- SKIPP R. A., CHISTENSEN M. J. 1990.** Selection for persistence in red clover: Influence of root disease and stem nematode. *N.Z.J. Agric. Res.*, 33, 319-333.
- SONG X. Y., SHEN Q.T., XIE S.T., CHEN X.L., SUN C.Y., ZHANG Y.Z., 2006.** Broad spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichodermins from *Trichoderma Koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260, 119-125.
- SOUFIANE B., 1998.** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Maître ès science (M. Sc.). Univ. Laval, 69p.
- ST LEGER R.J., WANG C., 2010.** Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 901-907.
- SUTTON J. C., 1995.** Evaluation of microorganisms for biocontrol *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. Pages 173-190 in: *Advances in Plant Pathology*. Vol. II, Sustainability and Plant Pathology. J. H. Andrews and I. C. Tommerup, eds. Academic Press, London, 173-190.
- SUTTOU J. C., LI DE W., PENG G.Y., ZHAN P., 1997.** *Gliocladium roseum*-a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease.*, 81, 316-328.

Références bibliographiques

- THERON D.J., HOLZ G., 1991.** Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. Plant Pathol., 40, 302-305.
- THORMANN M.N., CURRAH R.S., BAYLEY S.E., 2002.** The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. Can J Microbiol, 48(3), 204-211.
- TULSANE L.R., TULSANE C., 1865.** Selecta fungorum carpologia. Jussu, Paris.
- VASSILEV N., VASSILVA M., NIKOLAEVA I., 2006.** Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Appl. Microbiol. Biot, 71, 137-144.
- VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALSERTI E.L., 2008.** *Trichoderma*-plantpathogen interactions. Soil biology and biochemistry, 40, 1-10.
- VIZCAAINO J.A., SANZ L., CARDOZA R.E., MONTE E., GUTIERREZ S., 2005.** Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. FEMS Microb. Lett, 244, 139-148.
- WEBSTER J., LOMAS N., 1964.** Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridine ? Transactions of the British Mycological Society, 47, 535-540.
- WEBSTER J., RIFAI M.A., 1968.** Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* IV. *Hypocrea pilulifera* sp. nov. Trans. Br. Mycol. Soc, 51, 511-514.
- WEINDLING R., 1932.** *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 22, 837-845.(2003).
- WEINDLING R ., 1934:** Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignolum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopath: 24 (1934) 1153-1179.
- WHIPPS J.M., 1992.** Status of biological disease control in horticulture. Biocontrol Science and Technology, 2, 3-24.
- WIDDEN P., ABITBOL J.J., 1980.** Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. Mycologia, 72, 775-784.
- YU H. 1996.** Relationships of epidemiologic factors, *Gliocladium roseum*, and bee vectors to gray mold of raspberry caused by *Botrytis cinerea*. Ph.D. thesis. University of Guelph, Guelph, Canada.
- ZHIHE C., QINGPING W., MLFFLOONG X., ET AL., 1998.** Advance of biocontrol of *Trichoderma* and *Gliocladhan*. J. Microbiol, 25(5), 284-286.



Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de culture:

❖ **Milieu PDA:** (Ronald et Atlas, 1997)

- pomme de terre 200g
- Glucose 20g
- Agar 20g
- Eau distillée 1000ml

❖ **Milieu utilisé pour la production de ligninase** (Thormann et *al.*, 2002)

- Acide tannique 5g
- extrait de Malt 15g
- Agar 20g
- Eau distillée 1L

❖ **Milieu utilisé pour la production de protéase** (Berg et *al.*, 2002)

- Lait allégé (non gras) 300ml
- Agar 20g
- Eau distillée 1L

❖ **Milieu utilisé pour la production d'amylase** (Abe et *al.*, 2015)

- Extrait de levure 3g
- peptone 5g
- Amidon 2g
- Agar 15g
- Eau distillée 1L

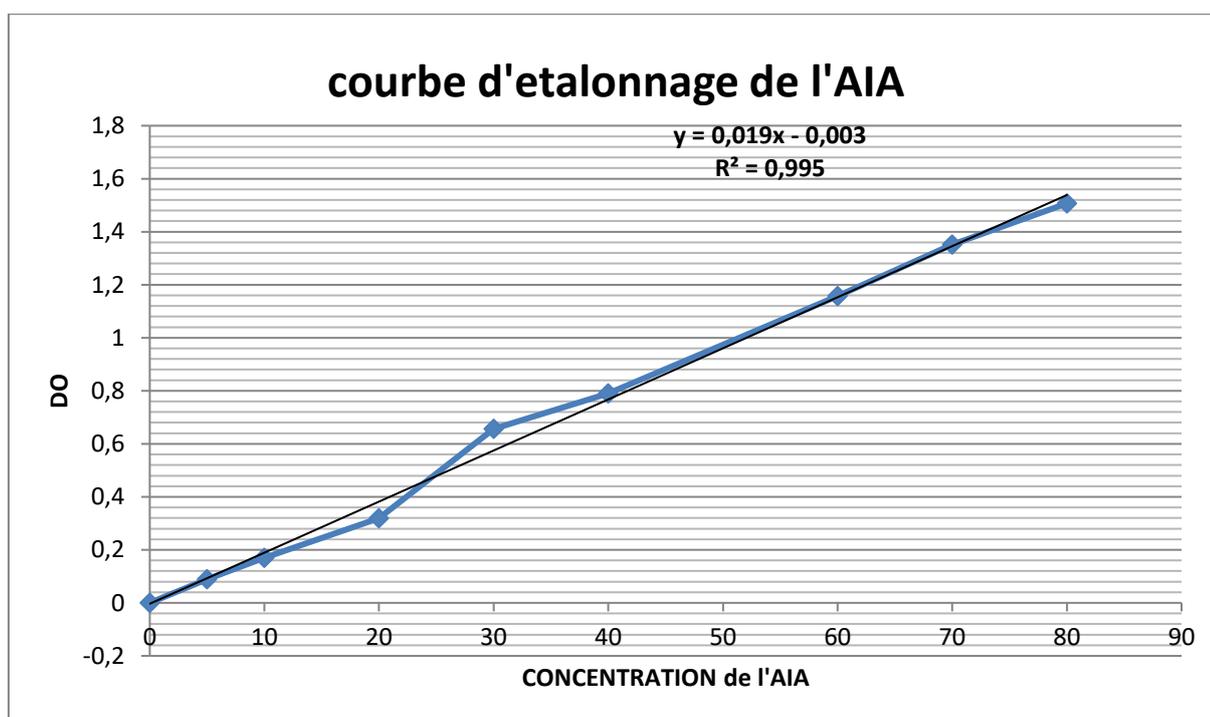
❖ **Milieu utilisée pour la production de cellulase** (kausar et *al.*, 2010)

- KH₂PO₄ 7g
- K₂HPO₄ 2g
- MgSO₄,7H₂O 0.1g
- (NH₄)₂ SO₄ 1g
- Extrait de levure 0.6g
- Cellulose 10g
- Agar 15g
- Eau distillée 1L

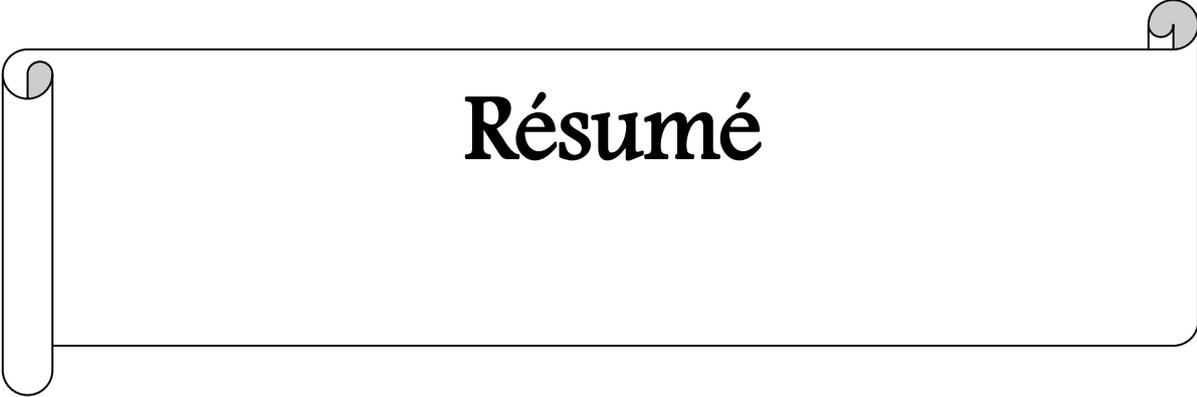
Annexe 2

❖ Milieu de PDB enrichi avec du tryptophane (Bric et *al.*, 1991)

| | |
|-----------------|------|
| -tryptophane | 5g |
| -pomme de terre | 200g |
| -Glucose | 20g |
| -Agar | 20g |
| -Eau distillée | 1L |



Courbe d'étalonnage de l'AIA



Résumé

Résumé:

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'antagonisme in vitro deux agents de biocontrôle à l'égard des champignons phytopathogènes. À cet effet ce travail a été conçu pour isoler des champignons antagonistes à partir de la rhizosphère de l'olivier cultivé dans la région d'AKBOU (Algérie). Ces souches sont caractérisées morphologiquement. La lutte biologique par *Trichoderma* et *Gliocladium roseum* contre les pathogènes. *Alternaria* sp, *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, *Fusarium proliferatum* a été testée par l'utilisation de deux méthodes de confrontation, la première méthode montre que ces antagonistes sont aptes à inhiber les pathogènes bien que cette inhibition soit modérée pour les souches de *Trichoderma* varie entre 44.44% et 55.78 % et faible pour *Gliocladium roseum* entre 10.37% et 37.05%.La confrontation à distance présente une action des substances volatiles contre ces pathogènes entraînant une vacuolisation et une granulation des hyphes, ces résultats suggèrent que les antagonistes inhibent les pathogènes par différents modes d'action (antibiose, mycoparasitisme, compétition). Tous les isolats antagonistes ont démontré leur capacité de produire d'enzymes impliquées dans la suppression de l'agent pathogène comme cellulases, ligninases, protéases et amylases, ainsi leurs potentiels de stimulation de croissance chez les plantes par une forte production de l'AIA.

Mots clés : La lutte biologique, *Trichoderma* sp, *Gliocladium roseum*, substances volatiles .

Abstract

The objective of this study is to evaluate the antagonism in vitro of two biocontrol agents for phytopathogenic fungi. For this purpose this work was designed to isolate antagonistic fungi from the rhizosphere of the olive tree grown in the region of AKBOU (Algeria). These strains are characterized morphologically. Biological control by *Trichoderma* and *Gliocladium roseum* against pathogens *Alternaria* sp, *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, *Fusarium proliferatum* was tested by the use of two methods of confrontation, the first method shows that these antagonists are able to inhibit pathogens although this inhibition is moderate for *Trichoderma* strains varies between 44.44% and 55.78% and low for *Gliocladium roseum* between 10.37% and 37.05%. Remote confrontation has an action of volatile substances against these pathogens causing vacuolation and granulation of hyphae, these results suggest that antagonists inhibit pathogens by different modes of action (antibiosis, mycoparasitism, competition). All antagonistic isolates have demonstrated their ability to produce enzymes involved in the deletion of the pathogen as cellulases, ligninases, proteases, and amylases, and their growth promotion potentials in plants by high production of AIA.

Keywords: biological control, *Trichoderma* sp, *Gliocladium roseum*, volatile substances.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم العداء داخل المختبر لعاملتي مكافحة البيولوجية بالنسبة للفطريات النباتية الممرضة. لأجل هذا ، صُمم هذا العمل لعزل الفطريات المعادية من جذور أشجار الزيتون المزروعة في منطقة AKBOU (الجزائر). تتميز هذه السلالات بالصفات الشكلية. مكافحة البيولوجية بواسطة *Trichoderma* و *Gliocladium roseum* ضد العوامل الممرضة *Alternaria* sp ، *Fusarium oxysporum fsp albedinis* ، *proliferatum* تم الاختبار من خلال استخدام طريقتين من المواجهة المباشرة وعن بعد ، تظهر الطريقة الأولى أن هذه المضادات قادرة على تثبيط الكائنات المسببة للأمراض مع أن هذا التثبيط معتدل بالنسبة لسلالات *Trichoderma* بين 44.44 % و 55.78 % ومنخفض بالنسبة *Gliocladium roseum* بين 10.37 % و 37.05 % . المواجهة عن بعد تتمثل في نشاط المواد المتطايرة ضد هذه العوامل الممرضة مما يؤدي إلى تحوصل وتحييب hyphe ، هذه النتائج تشير إلى أن المضادات تمنع العوامل الممرضة من خلال طرق مختلفة للعمل (تضاد ، التطفل ، والمنافسة) أثبتت جميع العزلات المعادية قدرتها على إنتاج الإنزيمات المشاركة في إبطال العوامل الممرضة مثل cellulases ، ligninases ، protéases ، و amylases ، وكذلك لهم إمكانيات تحفيز نمو النباتات من خلال إنتاج عالي من AIA.

الكلمات المفتاحية : مكافحة البيولوجية، *Trichoderma* sp ، *Gliocladium roseums* ، المواد المتطايرة.