

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI
DE MASCARA**



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DÉPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : Phytopathologie

Présentée par :

Mr BEKKAR Ahmed Amine

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

Composition du jury de soutenance

Présidente	Pr. TIR TOUIL Aïcha	Université de Mascara
Directeur de thèse	Pr. BELABID Lakhdar	Université de Mascara
Examineur	Pr. MEDDAH Boumediène	Université de Mascara
Examineur	Pr. BEKKI Abdelkader	Université d'Oran-1
Examineur	Pr. ABBOUNI Bouziane	Université de Sidi Bel-Abbès
Examineur	Pr. BOUKRAA Laïd	Université de Tiaret

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Recherche sur les systèmes Biologiques et Géomatiques (LRSBG) de l'Université de Mascara, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude au Dr HAMIMED A. de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir assuré mon encadrement. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères et celle de mon profond respect.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude, ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Mrs. le Professeur BELABID Lakhdar, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de m'avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Il a toujours su me faire confiance et m'apporter l'aide nécessaire, tant sur le plan scientifique que moral. Il m'est agréable de pouvoir lui adresser mes vifs remerciements et immenses reconnaissances.

Je remercie très vivement Madame la Professeur TIR TOUIL Aicha de l'Université de Mascara, pour l'honneur qu'elle m'a fait en présidant le jury de cette thèse ; qu'elle veuille bien trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury Mrs. les Professeurs MEDDAH Boumediène, BEKKI Abdelkader, ABBOUNI Bouziane et BOUKRAA Laid qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Mrs MONTE Enrique et DEBBI Ali d'avoir réalisé l'identification moléculaire de *Trichoderma* au niveau du laboratoire de département de microbiologie et de génétique de l'université de Salamanca, Espagne. Qu'ils veuillent bien agréer l'expression de mon profond dévouement.

Un grand merci à Mme la Professeur ESSALMANI Hayet de l'Université de Tanger, Maroc, pour ses fructueux conseils ainsi que les discussions scientifiques que j'ai eu la chance d'avoir avec elle.

Merci à mon père pour avoir lu, relu et corrigé ce manuscrit.

Enfin, que tous ceux, de près ou de loin, dont l'assistance ou les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes salutations les plus respectueuses : Mr Belahcene M., Mr Boucif M., Mr Benarba B., Mr Eloussi M., Mr Bendaha M., Mr Megharbi A., Mr Mokrani S., Mr Benhada D., Mr Saidi M., Mme Malik S., Mme Lazreg F., Mme Moumou M., ...

Je dédie cette thèse, le fruit de plusieurs années d'études et de sacrifices,

A mes parents

A tous ceux que j'aime et spécialement :

- A **ma femme** et **mes adorables enfants** Mohamed Akram, Ahmed Baraa et Sarah Ilhem. Que Allah vous garde et vous protège.
- A **mon frère** Mohamed, sa femme Abir et la petite adorable Iness et ...
- A **mes sœurs**
- A **mes amis** : Yerou Med, Sellam Med et Moussaoui Gherissi.

Résumé

Compte tenu des méthodes de gestion des maladies les plus respectueuses de l'environnement et durables, un total de 23 isolats de *Trichoderma* spp., appartenant à trois espèces : *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum* sont isolés à partir des sols rhizosphériques, prélevés de quatre régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Mostaganem, Tlemcen et Oran. Les isolats obtenus sont évalués pour leurs activités et leurs mécanismes employés contre quatre champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* : *F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Les résultats montrent que tous les isolats de *Trichoderma* ont une activité antagoniste importante par confrontation directe où ils ont inhibé significativement la croissance mycélienne de tous les agents pathogènes testés avec un pourcentage d'inhibition variable (45 à 90% par rapport aux témoins). T5, T10 et T14 sont les isolats les plus performants vis-à-vis de tous les isolats de *Fusarium*. Des observations microscopiques au niveau de la zone de contact ont montré un enroulement du mycélium de *Trichoderma* autour de celui des agents pathogènes. Une vacuolisation et une désintégration des hyphes du pathogène ont été aussi observées. Cette étude a révélé l'aptitude des *Trichoderma* à agir par antibiose contre le *Fusarium* en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne et la germination des conidies. L'identité de l'isolat le plus performant *T. harzianum* T5 a été confirmée par une identification moléculaire basée sur les séquençages de la région ITS et du gène *tef1* de l'ADNr et qui ont été déposées auprès de NCBI Genbank sous les deux numéros d'accès KX523899 et KX674063. Tous les isolats ont démontré leur capacité à synthétiser des enzymes chitinolytiques, cellulolytiques, protéolytiques, amylolytiques, ligninolytiques et lipolytiques. Dans les essais en pot, le traitement des graines avec un des trois isolats les plus performants de *Trichoderma* : T5, T10 et T14 a empêché l'expression du flétrissement vasculaire de pois chiche causé par *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* et significativement réduit l'incidence de cette maladie. Un maximum de réduction de 92% a été enregistré avec l'isolat *T. harzianum* (T5). Cette étude a permis de révéler que les espèces appartenant au genre *Trichoderma* notamment *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum* peuvent être utilisées comme des agents de lutte en phytoprotection.

Mots-clés : *Trichoderma* spp., activité antagoniste, *Fusarium* sp., mycoparasitisme, enzymes hydrolytiques, contrôle biologique.

في ضوء أساليب أكثر لمكافحة الأمراض بطريقة آمنة ومستدامة بيئياً، 23 عزلة من *Trichoderma* spp. متكونة من ثلاثة أنواع كالأتي : *T. harzianum* ، *T. koningii* و *T. longibrachiatum* . تم تقييم نشاطها المضاد والآليات المستخدمة ضد أربع فطريات ممرضة للنبات تنتمي إلى جنس الفيوزاريوم. (*F. oxysporum* f. sp. *albedinis*، *F. solani*) وقد تم إثبات قدرة هذه العزلات أيضاً على إنتاج الإنزيمات المحللة. وأظهرت النتائج أن عزلات *Trichoderma* لها نشاط العدائي في المواجهة المباشرة والتي خفضت بشكل كبير من نمو الفطريات الممرضة مع اختلاف النسبة المئوية لتثبيط نمو المسيليوم (45 إلى 90% بالمقارنة مع الشاهد). T5 ، و T10 ، T14 عزلات قوية مع جميع الفيوزاريوم نظراً لإمكاناتها التطفلية. وقد لوحظ التفاف مسيليوم *Trichoderma* حول تلك الفطريات الممرضة وتشكل الفجوات وتفكك مسيليوم الممرض. وأظهرت مركبات طيارة من عزلات فطر أيضاً نشاط مضاد ضد كل الفطريات الممرضة للنبات. أظهرت جميع العزلات أنشطة إنزيمية (كيتيناز، البروتيني والسيلولوز، الاميلاز و الليياز). واعتبرت إنتاج المواد المتطايرة ومركبات غير المتطايرة، في متوسطة النمو وتساهم في أنشطة معادية *Trichoderma*. كما انه تم إثبات هوية T5 *T. harzianum* عن طريق البيولوجيا الجزيئية باستعمال الجينات *tef1* لل ADNr حيث سجلت في بنك الجينات *NCBI* تحت رقمين مسجلين كالأتي KX674063 و KX523899. في التجارب على النبات، تبين أن معالجة بذور الحمص ب *Trichoderma* : T5 ، T14 ، T10 يحمي من مرض الذبول الوعائي للحمص الناجم عن فطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* وبشكل ملحوظ خفض الإصابة الذبول. لوحظ أن الحد الأقصى للحد من الذبول (92%) تم تسجيله في البذور المعالجة مع *T. harzianum* (T5). من خلال هذه الدراسة يمكن استخدام الأنواع الثلاثة *T. harzianum*، *T. koningii* و *T. longibrachiatum* في مكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma* spp.، النشاط العدائي ، *Fusarium* sp.، التطفل الفطري، الإنزيمات المحللة، مكافحة البيولوجية.

Abstract

In view of more environmentally safe and sustainable disease management methods, twenty three isolates of *Trichoderma* spp including three species: *T. harzianum*, *T. koningii* and *T. Longibrachiatum*, were evaluated for its antagonistic activities and mechanisms employed against four phytopathogenic fungi belong to the genus *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*). Results showed that all *Trichoderma* isolates displayed antagonistic activity in dual culture and where significantly reduced the mycelial growth of all pathogens tested with varying percentage of inhibition (45 to 90% in comparison with to controls). T5, T10 and T14 isolates suffered strong opposition from all *Fusarium* isolates and invaded colonies of those pathogens revealing its mycoparasitic potential. Coiling of *Trichoderma* spp. hyphae around those pathogens and the vacuolization and disintegration of the host hyphae was observed. This study revealed the ability of *Trichoderma* to act by antibiosis against *Fusarium* releasing active volatile and non-volatile substances on mycelial growth and conidial germination. All the isolates have shown enzymatic activities (chitinolytic, proteolytic, cellulolytic, amylolytic, ligninolytic and lipolytic). The identity of the most efficient isolate T5 of *T. harzianum* was confirmed by molecular identification based on sequencing of the ITS region of the *tef1* rDNA gene and have been submitted to NCBI GenBank under both numbers accession KX523899 and KX674063. In pot trials, seeds treatments with alone of the three highest antagonistic *Trichoderma*: T5, T10 and T14 controlled *Fusarium* wilt of chickpea plants caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* and significantly reduced wilt incidence. The maximum wilt reduction (92%) was observed in seeds treated with *T. harzianum* (T5). This study revealed that species belonging to the genus *Trichoderma* including *T. harzianum*, *T. koningii* and *T. Longibrachiatum* can be used as biocontrol agents in crop protection.

Keywords: *Trichoderma* spp – Antagonistic activity – *Fusarium* spp. – mycoparasitism – hydrolytic enzymes – biological control

Résumé	i
.....	ii
Abstract.....	iii
Sommaire	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xiii

TABLE DES MATIERES

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

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les <i>Trichoderma</i>	3
1.1- Historique et taxonomie de <i>Trichoderma</i>	3
1.2- Morphologie de <i>Trichoderma/Hypocrea</i>	7
1.3- Ecologie et habitat	8
1.4- Rhizosphère : source potentielle des <i>Trichoderma</i>	11
1.5. <i>Trichoderma</i> : agents de lutte biologique et promoteur de la croissance des plantes	12
2. Généralités sur les <i>Fusarium</i>	18
2.1. Taxonomie et morphologie de <i>Fusarium</i>	18
2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Fusarium solani</i>	20
2.3. Cycle biologique de <i>Fusarium</i>	22
2.4. Méthodes et Moyens de lutte.....	23

PARTIE 2 : Matériel et méthodes

1. Obtention des isolats appartenant au genre <i>Trichoderma</i> à partir de sols rhizosphériques du nord ouest Algérien	26
1.1- Milieux de culture	26
1.2 - Prélèvement des échantillons du sol rhizosphérique	26
1.3 - Isolement des champignons du genre <i>Trichoderma</i>	27
1.4- Purification et obtention des cultures monospores	28

1.5 -Identification des isolats de <i>Trichoderma</i>	28
2.5.1- Morphologique des isolats obtenus	28
2.5.2- Identification moléculaire de <i>Trichoderma</i>	29
1.6 – Conservation des isolats de <i>Trichoderma</i>	31
2. Pouvoir antagoniste et mode d'action de <i>Trichoderma</i> vis-à-vis des <i>Fusarium</i> phytopathogènes « <i>in vitro</i> »	31
2.1- Milieux de culture	31
2.2- Matériel fongique	31
2.2.1- Agents phytopathogènes	31
2.2.2- Agents antagonistes	32
2.3-Confrontation par contact direct sur milieu de culture	32
2.4- Production des substances volatiles	33
2.5- Analyse <i>in vitro</i> de l'effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i>	33
2.6 – Analyses statistiques	34
3. Etude de quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de <i>Trichoderma</i>	34
3.1. Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes	35
3.1.1. Production des chitinases	35
3.1.2. Production des cellulases	35
3.1.3. Production des protéases	36
3.1.4- Production des amylases	36
3.1.5. Production des ligninases	36
3.1.6. Production des lipases	37
3.2. Solubilisation des phosphates	37
3.3. Production des phytohormones (AIA)	37
3.4. Analyses statistiques	38
4. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur FOC en pots	38
4.1. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur FOC en pots	38
4.2. Préparation de l'inoculum	38
4.3. Inoculation et traitement des graines	39
4.4. Semi des graines en pot	39

4.5. Évaluation de l'efficacité de <i>Trichoderma</i> spp. sur FOC <i>in vivo</i>	40
4.6. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur les paramètres de développement végétatif de pois chiche	41
4.7. Analyse statistique	41

PARTIE 3 : Résultats et discussion

1. Obtention des isolats appartenant au genre *Trichoderma* à partir de sols rhizosphériques du nord ouest Algérien

1.1 - Isolement et obtention d'isolats de <i>Trichoderma</i>	42
1.2 - Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de <i>Trichoderma</i>	44
1.2.1- Caractérisation culturale	44
1.2.2- Caractéristiques biométriques des spores	44
1.3- Identification moléculaire	50
1.4. Discussion	51
1.5. Conclusion	54

2. Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis des *Fusarium* phytopathogènes «*in vitro*»

2.1 - Confrontation directe sur milieu de culture entre les pathogènes et les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	55
2.2- Confrontation à distance sur milieu de culture entre les quatre isolats de <i>Fusarium</i> et les isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i>	66
2.3- Analyse <i>in vitro</i> de l'effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la germination des conidies de FOC	70
2.4- Relations entre le mycoparasitisme, la sécrétion des métabolites volatils et celles des substances diffusibles	73
2.5- Discussion	77

3. Etude de quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de *Trichoderma*

3.1. Production des enzymes par les isolats antagonistes	80
3.1.1- Production de chitinase	80

3.1.2- Production des cellulases	82
3.1.3- Production des protéases	82
3.1.4- Production des amylases	87
3.1.5- Production de ligninase	89
3.1.6- Production de lipase	89
3.1.7- Relations entre les différentes activités enzymatiques étudiées liées au mode d'action de <i>Trichoderma</i>	93
3.2. Étude de quelques paramètres liés à la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de <i>Trichoderma</i>	95
3.2.1- Solubilisation des phosphates (Biofertilisation)	95
3.2.2 - Production des phytohormones AIA (Phytostimulation)	95
3.3- Discussion	99
3.4- Conclusion	102
4. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur FOC en pots	
4.1. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'incidence de la maladie	103
4.2. Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur les paramètres de développement végétatif de pois chiche	107
4.3. Discussion	115
4.4. Conclusion	118
Conclusion générale et perspectives	119
Références bibliographiques	121
Annexes	143
Publications	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les sites et dates de prélèvements des sols rhizosphériques.....	27
Tableau 2 : Amorces et programme d'amplification par PCR	30
Tableau 3 : Isolats de <i>Trichoderma</i> obtenus à partir de différents échantillons de sols rhizosphériques.	46
Tableau 4 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> par confrontation directe avec les 23 isolats de <i>Trichoderma</i>	56
Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> par confrontation à distance avec les 23 isolats de <i>Trichoderma</i>	67
Tableau 6 : Effet des substances non-volatiles de <i>Trichoderma</i> (%) sur la germination des conidies de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (FOC).	71
Tableau 7 : Matrice de corrélation calculée sur 3 paramètres étudiés.	76
Tableau 8 : Matrice de corrélation calculée sur 7 paramètres de la production des enzymes étudiées.	94
Tableau 9 : Indice de solubilisation de P par les isolats de <i>Trichoderma</i>	96
Tableau 10 : La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots selon les traitements.	105
Tableau 11 : Variation des paramètres de développement végétatif des plantes de pois chiche traitées par les trois isolats de <i>Trichoderma</i> en présence et en absence du FOC	111
Tableau 12 : Corrélation entre l'incidence de la maladie et les paramètres de développement végétatif de la variété ILC 482 du pois chiche	113
Tableau 13 : Les caractéristiques <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. testées <i>in vivo</i>	113

Listes des figures

Figure 1. Historique et développement chronologique du genre <i>Trichoderma</i> : de l'approche morphologique à l'approche moléculaire	4
Figure 2 : Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr	6
Figures 3: Aspect morphologique des conidies, des conidiophores et des phialides de <i>Trichoderma</i> spp.	9
Figure 4 : <i>Hypocrea</i> (Téléomorphe)	10
Figure 5 : Mécanisme de mycoparasitisme des <i>Trichoderma</i>	14
Figure 6 : Interaction <i>Trichoderma</i> –plante	17
Figure 7 : Morphologie du <i>Fusarium oxysporum</i>	19
Figure 8 : Morphologie du <i>Fusarium solani</i>	19
Figure 9 : Symptômes de la fusariose vasculaire du palmier dattier causée par <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	21
Figure 10 : Symptômes de la fusariose vasculaire de la tomate causée par <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
Figure 11 : Symptômes de la fusariose vasculaire du pois chiche causée par <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	21
Figure 12 : Développement des colonies de <i>Trichoderma</i> ssp. sur le milieu de culture sélectif TSM après 3 jours d'incubation à 25°C.	43
Figure 13: Répartition en pourcentage et par région de 23 isolats de <i>Trichoderma</i> spp. obtenus à partir de différents sols rhizosphériques	43
Figure 14: Morphologie, conidiophores, spores et chlamydo-spores de <i>T. harzianum</i>	47
Figure 15: Aspect macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma koningii</i>	48
Figure 16: Aspect macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	49
Figure 17 : Profil d'amplification par PCR d'ADNr de la région ITS et du gène Tef 1 de la souche de <i>Trichoderma harzianum</i> T5	50
Figure 18: Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr de la souche T5 (KX523899) et de certaines souches phylogénétiquement proches... ..	52
Fig. 19 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOA par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25 °C.	57
Fig. 20 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOL par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25 °C.	57
Fig. 21 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25 °C.	58

Fig. 22 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FS par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25 °C.	58
Fig. 23: Inhibition de la croissance mycélienne des <i>Fusarium</i> , en comparaison avec leur témoin, par confrontation directe avec <i>Trichoderma</i>	60
Fig. 24: Action mycoparasitaire de l'isolat <i>T. harzianum</i> (T5) montrant une surcroissance et une sporulation abondante sur la colonie <i>F. solani</i>	61
Fig. 25: Sporulation en masse, sous forme de pustules hémisphériques, de <i>T. harzianum</i> (T5) sur les hyphes de <i>F. oxysporum</i> dans la zone de contact	61
Fig. 26: Enroulement (E) des hyphes de <i>T. harzianum</i> (T5) sur celui du <i>Fusarium oxysporum</i> (F) (X40)	62
Fig. 27 : Pénétration et formation d'un appressorium (A) de <i>T. harzianum</i> (T1) dans le mycélium de <i>F. oxysporum</i> (40x)	62
Fig. 28: La lyse (L) et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène (voir flèches) (X40)	63
Fig. 29 : Apparition de grandes vacuoles dans le mycélium de FOA (voir flèches) collecté au niveau de l'interface de <i>Trichoderma</i> (X40)	63
Fig. 30: Présence de petites vésicules dans le mycélium de FOC (pv) et une fuite du contenu cytoplasmique (fc) (X40)	64
Fig. 31: Coagulation du cytoplasme dans le mycélium de FOL (X40)	64
Fig. 32 : Formation de chlamydospores) sur le mycélium du <i>Fusarium oxysporum</i> en présence de <i>Trichoderma</i> en comparaison avec le témoin	65
Fig. 33 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOA par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25°C.	68
Fig. 34 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOL par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25°C.	68
Fig. 35 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25°C.	69
Fig. 36: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FS par les 23 isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> après six jours d'incubation à 25°C.	69
Figure 37 : Action du filtrat de culture de <i>T. harzianum</i> (T5) sur la germination des conidies de FOC en comparaison avec le témoin	72
Figure 38 : Pourcentage d'inhibition de la germination des conidies de FOC par les filtrats de culture de 23 isolats de <i>Trichoderma</i> après 72h d'incubation.....	73
Figure 39 : Corrélation entre l'inhibition des 4 isolats de <i>Fusarium</i> par confrontation directe et de l'inhibition par les substances volatiles	74
Figure 40 : Corrélation entre l'inhibition des 4 isolats de <i>Fusarium</i> par les substances	

volatiles et l'inhibition par les filtrats de culture	74
Figure 41 : Corrélation entre l'inhibition des 4 isolats de <i>Fusarium</i> par confrontation directe et l'inhibition par les filtrats de culture	74
Figure 42 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 23 isolats de <i>Trichoderma</i> suivant les 3 paramètres étudiés	76
Fig. 43: Production des chitinases	80
Figure 44 : Production des chitinases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone après 3 jours incubation à 25 °C	81
Fig. 45 : Formation d'un halo transparent autour des colonies de <i>Trichoderma</i> caractéristique de la production des cellulases de l'espèce testée	83
Figure 46 : Production des cellulases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur deux milieux à base de la carboxyméthylcellulose (CMC) ou de la cellulose microcristalline (MCC) comme la seule source de carbone après incubation à 28°C pendant 7 jours en (CMC) et 3 jours en (MCC)	84
Fig. 47: Production des protéases après 3 jours d'incubation à 28°C : Halo transparent autour des colonies de <i>Trichoderma</i>	85
Figure 48 : Production des protéases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu au lait écrémé comme la seule source de carbone après 4 jours incubation à 28°C	86
Fig. 49: Production des amylases après 2 jours d'incubation à 28 °C: Formation d'un halo transparent autour des colonies de <i>Trichoderma</i>	87
Figure 50 : Production d'amylase par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de l'amidon comme seule source de carbone après 3 jours d'incubation à 28°C	88
Fig. 51 : Formation d'un halo brun-foncé autour des colonies de <i>Trichoderma</i> caractéristique de la production de ligninase après 2 jours d'incubation.	89
Figure 52 : Production de ligninase par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu contenant du l'acide tannique comme seule source de carbone après 4 jours incubation.	90
Fig. 53 : Production de lipase traduit par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies de <i>Trichoderma</i> sur le milieu de culture contenant du Tween 20 comme un substrat lipidique	91
Figure 54 : Production de lipase par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu contenant du Tween 20 comme seule source de carbone	92
Figure 55 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des isolats de <i>Trichoderma</i> suivant les 3 paramètres d'antagonisme étudiés.	94

Figure 56: Halo transparent autour des colonies de <i>Trichoderma</i> caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK additionné de bleu de bromophénol après 5 jours d'incubation.	97
Figure 57 : Production d'AIA sur le milieu liquide additionné de tryptophane.	98
Figure 58 : Production de l'AIA ($\mu\text{g/ml}$) sur le milieu liquide additionné de tryptophane.	98
Fig. 59 : a. Symptômes typiques du flétrissement vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement et un flétrissement sur les feuilles de plantes inoculées par FOC après 19 jours de semés.	104
Fig. 60 : Essai de lutte biologique en pots	106
Fig. 61: Incidence et réduction du flétrissement vasculaire (%) en pots en comparaison avec les plantes issues des graines inoculées seulement avec FOC et les plantes issues des graines inoculées et traitées par <i>Trichoderma</i> spp.	107
Fig. 62 : Effet de traitement des graines d'ILC 482 par <i>T. harzianum</i> (T5) sur la germination, en comparaison avec le témoin non traité et les graines inoculées par FOC et traitées par T5.	108
Fig. 63 : Etat des plantes inoculées par le pathogène et par l'antagoniste, comparativement à ceux du témoin sain et traité, les plants traités par <i>T. harzianum</i> (T5) présentent un développement végétatif plus important.	109
Fig. 64 : Effet bio-stimulateur de <i>Trichoderma</i> (T5) sur la croissance racinaire du pois chiche ILC482.	110
Fig. 65 : Effet bénéfique de traitement par <i>Trichoderma</i> (T5) sur les racines du pois chiche ILC482.	114

Liste des principales abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNr: ADN ribosomique

AIA: Aide indole acétique

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

ddNTP: didésoxy Nucléotide Tri-Phosphate

dNTP: désoxy Nucléotide Tri-Phosphate

DO: densité optique

F: Fischer test

F.O : *Fusarium oxysporum*

F. S : *Fusarium solani*

IS : indice de la solubilisation de phosphate

LRSBG: Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et Géomatiques

mM: milliMolaire

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGPF : plant growth promoting Fungi

PTC: phosphates tricalcique

rpm: rotation par minute

Introduction générale

La production végétale mondiale connaît chaque année des pertes de récolte très importantes dûes aux agents pathogènes en réduisant le rendement, la productivité et la croissance de plusieurs cultures (Strange et Scott, 2005). Toutefois, celles-ci sont contrôlées par l'utilisation massive de produits phytopharmaceutiques. Le marché mondial des seuls fongicides est estimé à plus de 10 milliards de dollars en 2008 par l'UIPP (Union des Industries de la Protection des Plantes) (Jaulneau, 2010). Cependant, les traitements phytosanitaires à base de produits chimiques de synthèse suscitent une méfiance de plus en plus grande et de nombreuses inquiétudes tant au niveau de la santé humaine et de l'environnement que de l'apparition de souches résistantes et de la présence des résidus dans les fruits à la récolte. L'accumulation des résidus dans l'environnement et les récoltes représente un danger qu'on ne peut plus négliger (Toussaint, 1996 ; Ozbay, 2004).

L'infection à *Fusarium*, champignon phytopathogène, tend à devenir un problème préoccupant au niveau global, en causant des pertes de récolte économiquement graves, les dommages en étant amplifiés par la capacité de ce genre de synthétiser des mycotoxines (Picot *et al.*, 2012).

Le genre *Fusarium* comprend de nombreuses espèces qui provoquent différents types de maladies comme la pourriture racinaire (*Fusarium solani*) et le flétrissement vasculaire (*Fusarium oxysporum*) affectant un grand nombre de végétaux tel que le flétrissement vasculaire du palmier dattier causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, de la tomate provoqué par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et du pois chiche provoqué par *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Pour contrôler ces organismes fongiques, difficiles à atteindre, une série de stratégies a été proposée, dont la rotation des cultures, l'utilisation de variétés résistantes ou le traitement antifongique, ce sont les principales approches pratiques utilisées à une efficacité limitée (Correa et Soria, 2011). L'efficacité des fongicides de synthèse est assez sélective vis-à-vis de la nature des plantes cultivées et dépend largement des conditions de culture et ou d'application (Rioux *et al.*, 2011). Dûes à leurs facilités de dissémination et à leurs persistance dans le sol, la lutte contre les *Fusarium* reste limitée à des mesures prophylactiques (Benhamou et Chet, 1997).

Dans les dernières années, on accorde une attention spéciale aux méthodes de contrôle biologique des infestations fongiques, dans les différents agroécosystèmes, par

L'utilisation ou l'exploitation de la microflore tellurique non pathogène, ce qui pourrait réduire de façon significative l'impact négatif des pesticides chimiques sur l'environnement. L'utilisation des microorganismes s'avère primordiale et une alternative prometteuse à l'emploi des pesticides, de part l'ubiquité de ces microorganismes, leur grande diversité et leur dissémination dans les sols rhizosphériques ; et d'autre part salvatrice de la santé des producteurs et des consommateurs (Berg *et al.*, 2005). De ce fait, pour entreprendre une lutte biologique contre les maladies des plantes, le choix des microorganismes antagonistes des agents pathogènes est un critère très important.

Les *Trichoderma* spp. sont parmi les champignons du sol qui ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes (Tondje *et al.*, 2007). Les *Trichoderma* sont déjà commercialisés pour le contrôle biologique de nombreux agents pathogènes des plantes. Ils sont caractérisés par une croissance rapide, une aptitude importante à la compétition et à la stimulation des systèmes de défense. Ils sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (Verma *et al.*, 2007 ; Vinale *et al.*, 2008).

L'objectif principal de cette thèse est d'isoler des agents de lutte biologique appartenant au genre *Trichoderma*, ayant pour cible le genre *Fusarium*. Ce modèle de lutte biologique, sera fondé sur une analyse *in vitro* et *in vivo* sur ces microorganismes, qui s'articule sur :

- l'obtention d'une collection des *Trichoderma* isolés à partir de sols rhizosphériques, de cultures différentes, cultivées dans des régions du nord ouest Algérien,
- l'identification morphologique et moléculaire des isolats de *Trichoderma* obtenus,
- la sélection des *Trichoderma* antagonistes vis-à-vis de quatre isolats phytopathogènes de *Fusarium*, à savoir *F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*,
- l'étude du mode d'action de *Trichoderma* employé contre les *Fusarium* pathogènes testés,
- l'évaluation de leur effet bénéfique sur l'incidence de flétrissement vasculaire du pois chiche et sur la croissance des plantes.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les *Trichoderma***1.1-Historique et taxonomie de *Trichoderma***

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) appartient au sous embranchement des Ascomycètes, classe des Sordariomycètes, Ordre des Hypocréales et la famille des Hypocraceae (Chaverri *et al.*, 2015).

Le terme «*Trichoderma*» a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud-africain Christiaan Hendrik Persoon en 1794 (Figure 1). 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 « 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).

Les travaux de Rifai (1969) ont abouti à la publication de sa thèse, une monographie révolutionnaire sur les *Trichoderma* utilisables avec le concept d'« espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques anamorphes. Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Rifai a créé neuf espèces agrégées de *Trichoderma* : *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link : Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, et *T. viride* (Rifai, 1969). Ce système semble le plus facilement utilisable par la communauté scientifique.

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

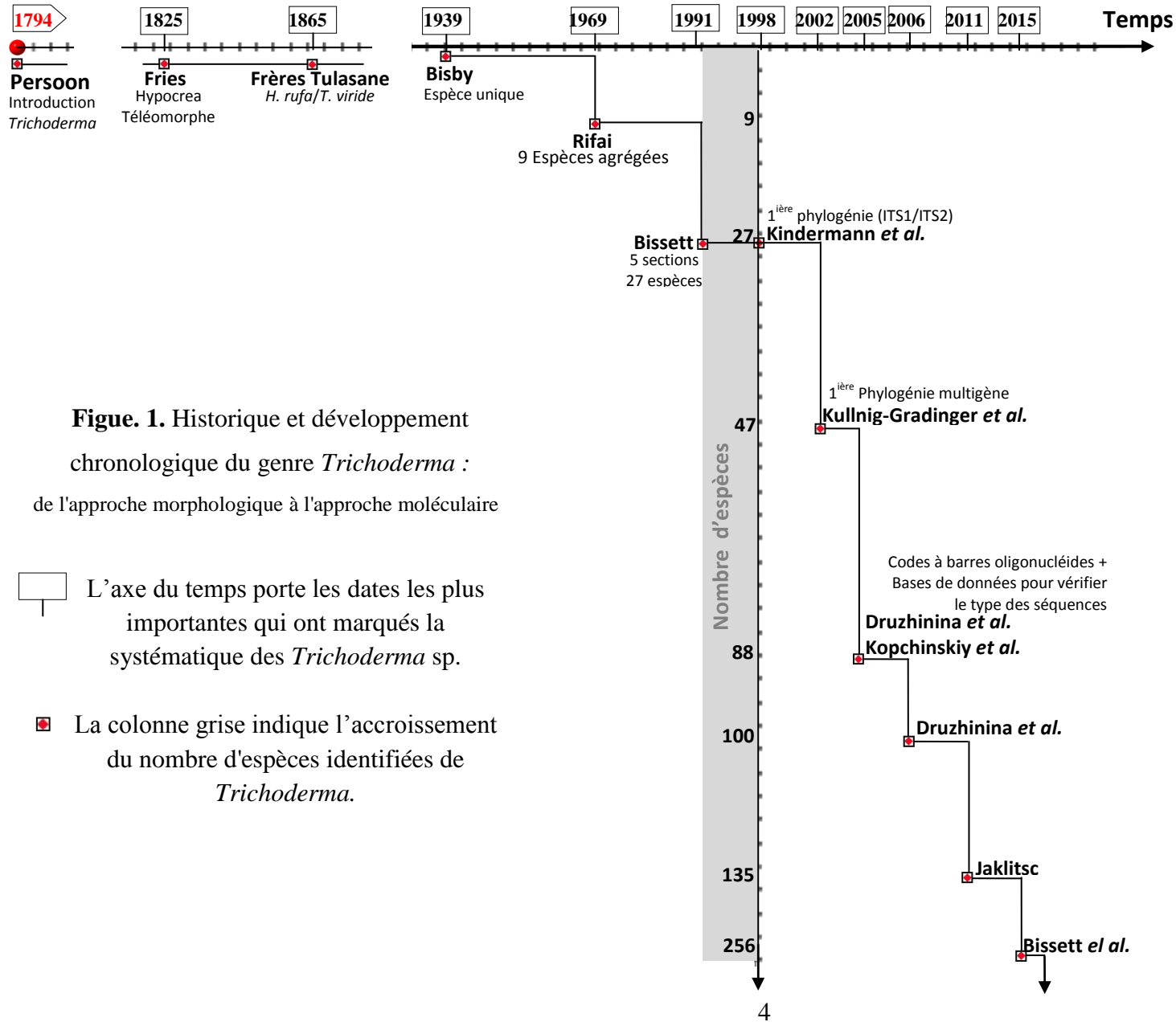


Fig. 1. Historique et développement chronologique du genre *Trichoderma* : de l'approche morphologique à l'approche moléculaire

- L'axe du temps porte les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* sp.
- La colonne grise indique l'accroissement du nombre d'espèces identifiées de *Trichoderma*.

Une série de révisions des espèces agrégées de Rifai a été effectuée par Bisset (1984; 1991 a, b, c) et Doi *et al.*, (1987). En 1991, Bissett a discuté la difficulté à distinguer les espèces agrégées de Rifai, puisque seulement cinq de ces espèces ont été étroitement définies (*T. harzianum*, *T. reesei*, *T. pseudokoningii*, *T. piluliferum* et *T. polysporum*). Comme solution et pour faire face au nombre croissant de nouvelles espèces de *Trichoderma*, Bissett a adopté la notion de « section » qui n'a aucun rapport avec les espèces agrégées (Chaverri et Samuels, 2004).

Bissett a amélioré le système de classification des espèces de *Trichoderma* en se basant sur des études morphologiques plus détaillées des anamorphes. Il a remplacé les 9 espèces agrégées de *Trichoderma* par cinq sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) comprenant 27 espèces (Druzhinina *et al.*, 2006).

D'autres méthodes taxonomiques supplémentaires à la morphologie ont été utilisées, notamment des études de métabolites secondaires, qui ont montrées une grande diversité dans ce genre (Okuda *et al.*, 1982). Les caractéristiques physiologiques peuvent éventuellement fournir un système utile pour l'identification. Les profils isoenzymiques ont été utilisés comme un outil taxonomique efficace (Leuchtman *et al.*, 1996 ; Samuels *et al.*, 1994).

Les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN, ont permis la résolution de la plus fine des entités taxonomiques et surtout la découverte de nombreuses nouvelles espèces de *Trichoderma/Hypocrea*. Les travaux d'identification moléculaire effectués jusqu'à 2000, incluant l'identification de *T. reesei* comme l'anamorphe de *H. jecorina* (l'espèce la plus importante industriellement), et la révision de la section *Longibrachiatum*, ont été basés principalement sur le séquençage de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomal (Kuhls *et al.*, 1996, 1997). La figure 2 représente l'unité de transcription de l'ADNr qui est composée à gauche des gènes 18S et à droite des gènes 28S avec au milieu l'ITS1 et l'ITS2 séparés par le gène 5.8S (absent chez les procaryotes).

Kindermann *et al.* (1998) ont tenté la première phylogénie du genre *Trichoderma* sur la base des séquences de la région ITS. Il a divisé la section *Pachybasium* en deux groupes phylogénétiques distincts appelés "A" et "B"; cette division a été adoptée et confirmée dans d'autres études (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002 ; Chaverri *et al.*, 2003). Lieckfeldt *et al.* (1999) ont pu identifier la nouvelle espèce *T. asperellum* en se basant sur les méthodes d'identification morphologique et phylogénique (région ITS).

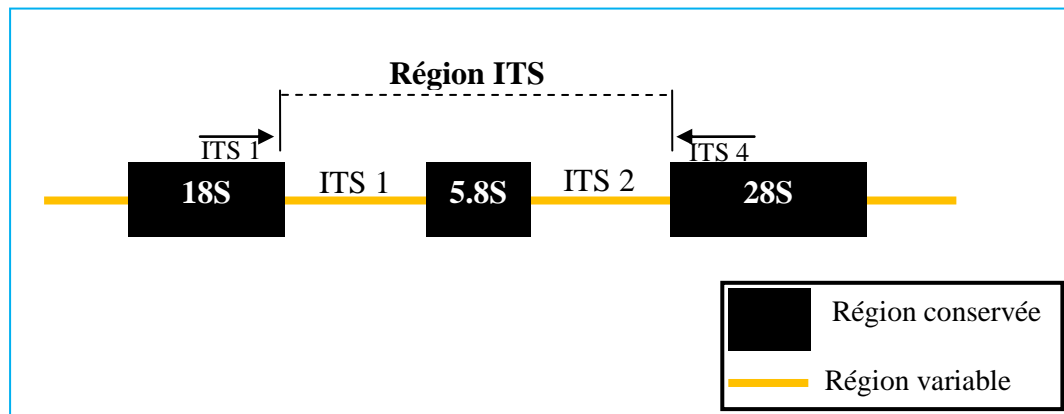


Figure 2 : Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr (Singh *et al.*, 2014)

Le développement de nouvelles méthodes et des techniques d'analyse phylogénétique des séquences a permis d'identifier des nombreuses espèces de *Trichoderma* sur la base de gènes multiples. Kullnig-Gradinger *et al.* (2002) ont élaboré la première classification phylogénétique « multigène » de *Trichoderma*, basée sur la région ITS1/ITS2, le gène endochitinase 42 (ECH42) et le gène du facteur d'élongation de la traduction (*tef1*). Elle a été portée sur 47 espèces distinctes de *Trichoderma*. Samuels *et al.* (2002) ont utilisé la région ITS de l'ADNr et le gène *tef1* pour étudier la systématique de deux espèces très proches, *T. harzianum* et *T. aggressivum* Samuels & W. Gams.

En 2005, le nombre des espèces d'*Hypocrea* / *Trichoderma* s'affiche à 88 espèces distinctes, dont 14 sont reconnues comme des holomorphes, 49 téléomorphes et 25 anamorphes (Druzhinina et Kubicek, 2005). En 2006, le genre est déjà composé de plus de 100 espèces définies phylogénétiquement (Druzhinina *et al.*, 2006). Dans la même année, la sous-commission internationale de Taxonomie *Trichoderma/Hypocrea* a répertoriée sur son site <http://www.isth.info/> une liste de 104 espèces *Trichoderma/Hypocrea* (Druzhinina et Kopchinskiy, 2006).

Le nombre d'espèces nouvellement décrites a doublé suite au développement des programmes d'identification moléculaire des *Trichoderma/Hypocrea* sur le site <http://www.isth.info/> : TrichOKEY, TrichoBLAST et TrichoCHIT, basés sur des codes à barres de l'ADN oligonucléotide (Druzhinina *et al.*, 2005 ; Kopchinskiy *et al.*, 2005 ; Nagy *et al.*, 2006). TrichOKEY est un programme utilisé pour identifier *Trichoderma/Hypocrea* sur la base de plusieurs caractéristiques spécifiques du genre situées dans les séquences ITS1 et ITS2 (Druzhinina *et al.*, 2005). TrichoBLAST est une base de données supportée par un diagnostic de séquences et des outils de recherche de similarité basés sur ces marqueurs

phylogénétiques fréquemment utilisés, y compris ITS1 et 2, et les introns *tef1_int4* et *tef1_int5* (Kopchinskiy *et al.*, 2005).

Jaklitsch (2011) a inclus 135 noms d'espèces différentes dans son arbre phylogénétique basé sur l'analyse combinée des gènes *tef1* et *rpb2*.

Bisset *et al.* (2015) ont publiés une liste de 256 noms acceptés d'espèces de *Trichoderma* contre lesquels ils doivent être protégés.

1.2- Morphologie de *Trichoderma/Hypocrea*

Depuis la révision du genre *Trichoderma* par Rifai en 1969, les caractéristiques 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). D'après Samuels *et al.* (2015), la majorité des cultures de *Trichoderma* croît rapidement à des températures comprises entre 25 °C et 30 °C et généralement pas de croissance à 35 °C. Cependant, certaines espèces poussent bien à 35 °C. Cela a servi comme un critère distinctif important entre les espèces morphologiquement similaires. Par exemple, *T. harzianum* peut être distingué des espèces morphologiquement similaires, tels que *T. aggressivum* et *T. atroviride* en les cultivant à 35 °C. Après 96 heures d'incubation à 35 °C, le diamètre des colonies de *T. aggressivum* et *T. atroviride* ne dépasse les 5 mm, tandis que celui de *T. harzianum* présente une bonne croissance et sporulation (Samuels, 2004).

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).

Certaines espèces de *Trichoderma* diffusent une pigmentation de couleur jaune sur milieu PDA et d'autres, telle que *T. viride*, produit une odeur caractéristique ressemblant à des odeurs « de la noix de coco » (Gams et Bissett, 2002 ; Sharma et Singh, 2014).

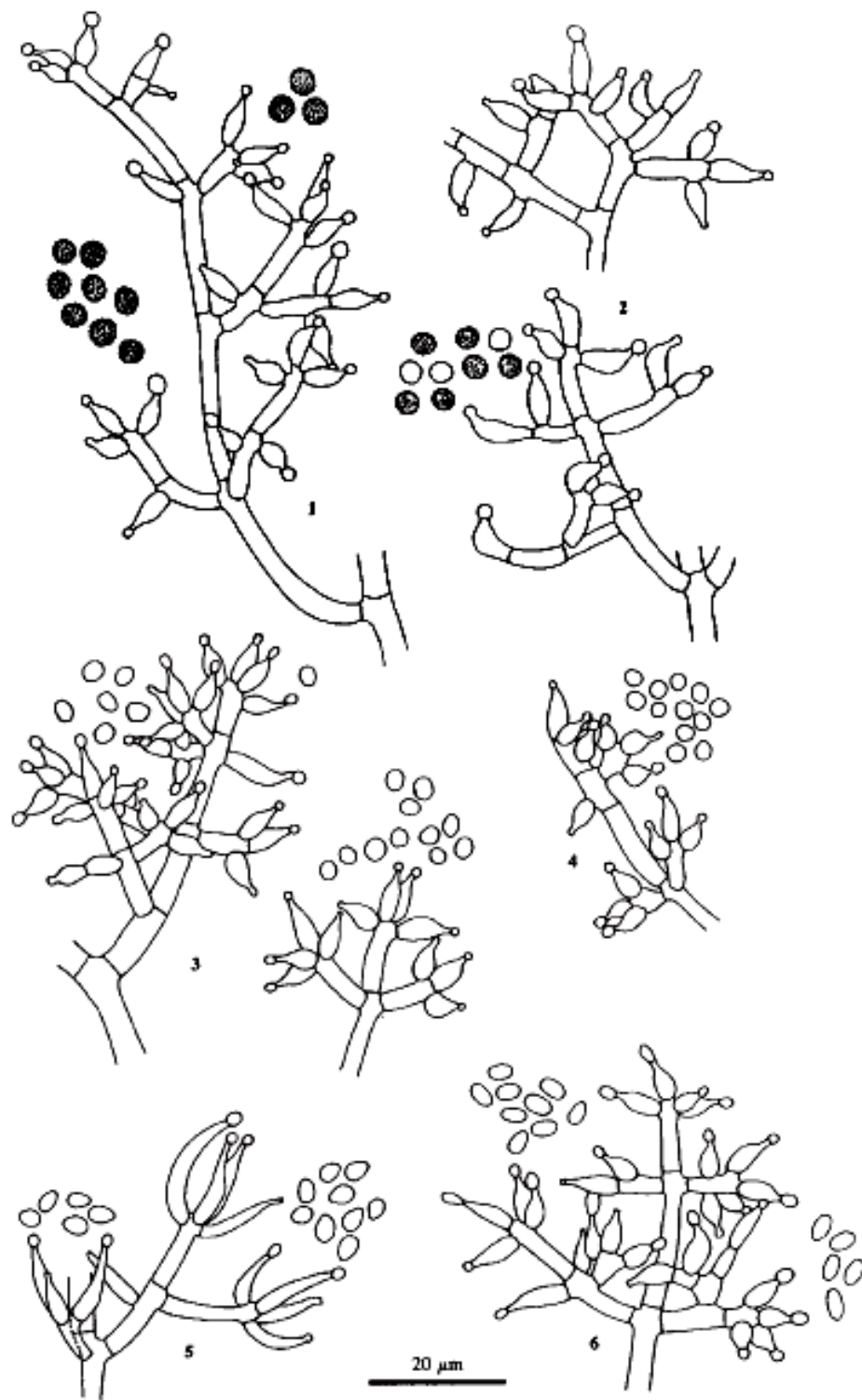
Au microscope optique, les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces, les conidies globuleuses sont rares. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes ». Le mycélium est composé d'hyphes septés et ramifiés à parois lisses. 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 (Figure 3). 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 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).

La forme parfaite *Hypocrea* se caractérise par un stroma charnu, arrondi, de couleur variable (pâle à très coloré), pourvu de périthèces à l'intérieur duquel se trouvent des asques cylindriques avec un apex plus ou moins fin (Figure 4). Chaque asque contient 8 ascospores sphériques, désarticulées et bicellulaires donnant l'apparence d'être 16 spores (Jaklitsch, 2009).

1.3- 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). D'après Kubicek *et al.*, (2003), l'abondance des *Trichoderma* spp. 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.

Trichoderma se retrouve couramment dans le sol, sur le bois et sur les débris des végétaux (Dubos, 1986). Les espèces de *Trichoderma* sont favorisées par la présence d'un grand nombre de racines, qu'elles colonisent aisément. Presque tous les sols tempérés et tropicaux contiennent 101-103 propagules de *Trichoderma*/g du sol (Harman *et al.*, 2004). Il peut représenter jusqu'à 3% du total des propagules fongiques de sols forestiers et 1,5% des champignons dans les sols des pâturages (Gams et Bissett, 1998).



Figures 3: Aspect morphologique des conidies, des conidiophores et des phialides de *Trichoderma* spp. :

1. *T. viride*. 2. *T. atroviride*. 3. *T. harzianum*. 4. *T. inhamatum*. 5. *T. aureoviride*. 6. *T. koningii* (Gams et Bissett, 1998)

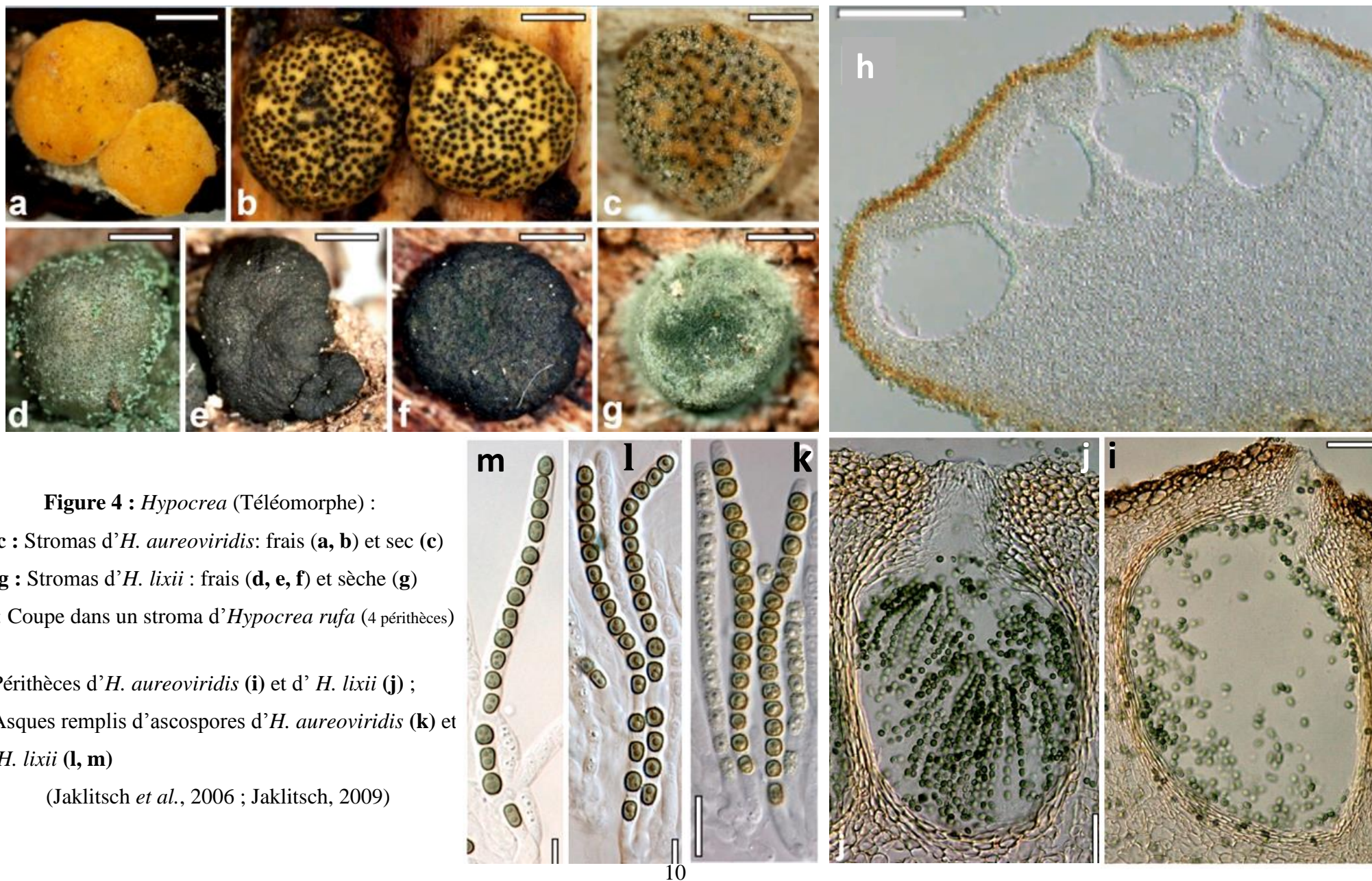


Figure 4 : *Hypocrea* (Téléomorphe) :

a-c : Stromas d'*H. aureoviridis*: frais (**a, b**) et sec (**c**)

d-g : Stromas d'*H. lixii* : frais (**d, e, f**) et sèche (**g**)

h : Coupe dans un stroma d'*Hypocrea rufa* (4 périthèces)

- Périthèces d'*H. aureoviridis* (**i**) et d' *H. lixii* (**j**) ;

- Asques remplis d'ascospores d'*H. aureoviridis* (**k**) et d'*H. lixii* (**l, m**)

(Jaklitsch *et al.*, 2006 ; Jaklitsch, 2009)

La dynamique des populations de *Trichoderma* est liée aux conditions du milieu, une forte dessiccation du sol pendant une longue période conduit à une baisse des populations (Papavizas, 1985). Davet (1983) a trouvé que le taux de propagules le plus faible est observé dans le cas des teneurs en eau les plus basses. Mais ce phénomène est réversible, si le sol est déshydraté, le taux de propagules revient à sa valeur d'origine. Cependant, la température n'a aucun effet sur les populations du *Trichoderma* dans le sol, si la teneur en eau est maintenue constante.

Omniprésents dans le sol, les *Trichoderma* sont très remarquable par des besoins nutritionnels minimaux, une croissance rapide, une sporulation abondante et une capacité d'utiliser divers substrats. Les *Trichoderma* jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, d'origine naturelle et xénobiotique, en attribuant une biofertilisation 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).

1.4- Rhizosphère : source potentielle des *Trichoderma*

La rhizosphère constitue une zone de sol, un espace autour des racines des plantes, définissant des microrégions du sol en contact direct avec les racines des plantes supérieures (Sabbagh, 2008 ; Berg et Smalla, 2009). Au niveau de cette zone, les racines libèrent des composés organiques nutritifs (des sucres, acides aminés, acides organiques, des régulateurs de croissance et des mucilages) qui stimuleraient le chimiotactisme des microorganismes et les attirent vers elles, en particulier ceux qui sont capables de métaboliser ces exsudats racinaires et de proliférer dans cet habitat microbien (Bais *et al.*, 2006 ; Badri *et al.*, 2009 ; Shukla *et al.*, 2011). Ces microorganismes associés aux racines des plantes sont appelés des microorganismes rhizosphériques (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 rhizosphériques, à savoir les champignons, sont bénéfiques pour la plante, ce qui améliore souvent la croissance végétale (Morgan *et al.*, 2005).

Les champignons, qui sont capables de coloniser la surface du système racinaire (racines et parfois des tissus internes), de stimuler la croissance et de protéger les plantes, sont considérés comme des PGPF « Plant Growth-Promoting Fungi ». Les champignons PGPF peuvent stimuler la défense de la plante et présenter une activité antagoniste envers différents

agents phytopathogènes, tout en stimulant directement la croissance de la plante (Whipps, 2001 ; Bent, 2006). Ils peuvent être des champignons filamenteux comme le *Trichoderma* voire même des levures également appelées PGPY « Plant Growth-Promoting Yeasts » (Harman *et al.*, 2004 ; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Chez diverses plantes et au niveau de leurs racines, les PGPF peuvent être épiphytiques et/ou endophytiques (Faeth, 2002 ; Schardl *et al.*, 2004 ; Xia *et al.*, 2011).

Les espèces de *Trichoderma* sont considérées comme un élément majeur de la biodiversité des sols et qui sont principalement associées aux racines des plantes. Cependant, des études récentes ont révélée que les espèces *Trichoderma*, non seulement sont associées aux racines des plantes, mais elles persistent également à l'intérieur des tissus racinaires (Xia *et al.*, 2011 ; Mulaw *et al.*, 2013 ; Cummings *et al.*, 2016).

Lors d'une association bénéfique entre une plante et les *Trichoderma*, divers mécanismes sont impliqués dans la bioprotection et la stimulation de la croissance de la plante. Ces microorganismes peuvent agir directement sur l'agent pathogène pour protéger indirectement la plante, ceci par le biais d'un mycoparasitisme et une sécrétion des substances inhibiteurs et/ou par un phénomène de compétition pour l'espace et les nutriments, tout en fournissant des composés bénéfiques pour le développement de la plante (Whipps, 2001 ; Howell, 2003 ; Harman *et al.*, 2004 ; Supothina *et al.*, 2007, Xiao-Yan *et al.*, 2006).

1.5. *Trichoderma* : agents de lutte biologique et promoteur de la croissance des plantes

D'après la définition de Cook et Baker (1983), la lutte biologique consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou l'activité de celui-ci (le potentiel infectieux) en mettant en œuvre un ou plusieurs organismes autres que l'homme.

L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à prévenir une éradication totale de l'espèce envahissante mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour les amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et/ou économiquement acceptable. L'objectif principal est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte biologique et l'agent pathogène (Suty, 2010).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook *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).

L'utilisation de *Trichoderma* en lutte biologique pour protéger les plantes cultivées date des années 1930 mais leurs propriétés antagonistes sont connues depuis longtemps où la

première publication qui en fait mention en 1887. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales. Les modèles étudiés s'intéressaient essentiellement aux parasites du sol mais déjà, en 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue (Caron, 2002).

La capacité de *Trichoderma* spp. à contrôler des agents phytopathogènes du sol est connue depuis le début du XX^{ième} siècle, mais ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de biopesticide, ce qui indique la somme considérable de connaissances qu'il faut acquérir avant de permettre l'utilisation pratique d'une telle méthode de lutte (Lepoivre, 2003). En plus, *Trichoderma* spp. est utilisé commercialement pour la production des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes. Il est fréquemment employé dans les industries alimentaires et textiles (Harman, 2006).

Le *Trichoderma* spp. a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la protection des plantes vis-à-vis des maladies parasitaires. Il est capable d'attaquer différents agents pathogènes par des mécanismes variés dont les principaux sont le parasitisme, l'antibiose et la compétition (Howell, 2003 ; Vinale *et al.*, 2007). Ces mécanismes sont utilisés de manière complexe, indépendamment ou en synergie, suivant l'adversaire à neutraliser et les conditions du milieu (Suty, 2010). Un autre mécanisme est proposé pour expliquer l'activité antagoniste du *Trichoderma* spp. est l'induction de la résistance chez la plante hôte (Howell, 2003 ; Shores *et al.*, 2005).

Le parasitisme des champignons phytopathogènes par les *Trichoderma* est un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes. La figure 5 illustre le mécanisme du mycoparasitisme exercé par *Trichoderma*.

Le mycoparasitisme implique comme une première étape une reconnaissance de l'agent pathogène par l'agent de lutte. Le *Trichoderma* perçoit la présence de son hôte et commence à développer des hyphes en direction de ceux du pathogène par chimiotropisme. La reconnaissance se manifeste par une adhésion de *Trichoderma* spp aux parois de son hôte suivie par l'enroulement des hyphes du mycoparasite sur ceux de l'agent phytopathogène. Par la suite, une pénétration à l'intérieur des hyphes du pathogène se fait suite à des sécrétions d'enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte comme les chitinases et les glucanases. Ce phénomène est suivi par une dissolution du cytoplasme. Le contenu cellulaire de l'hôte est rapidement lysé par la mise en jeu d'enzymes extracellulaires telles que la protéase et la lipase (Howell, 2003 ; Harman *et al.*, 2004 ; Dubey *et al.*, 2007).

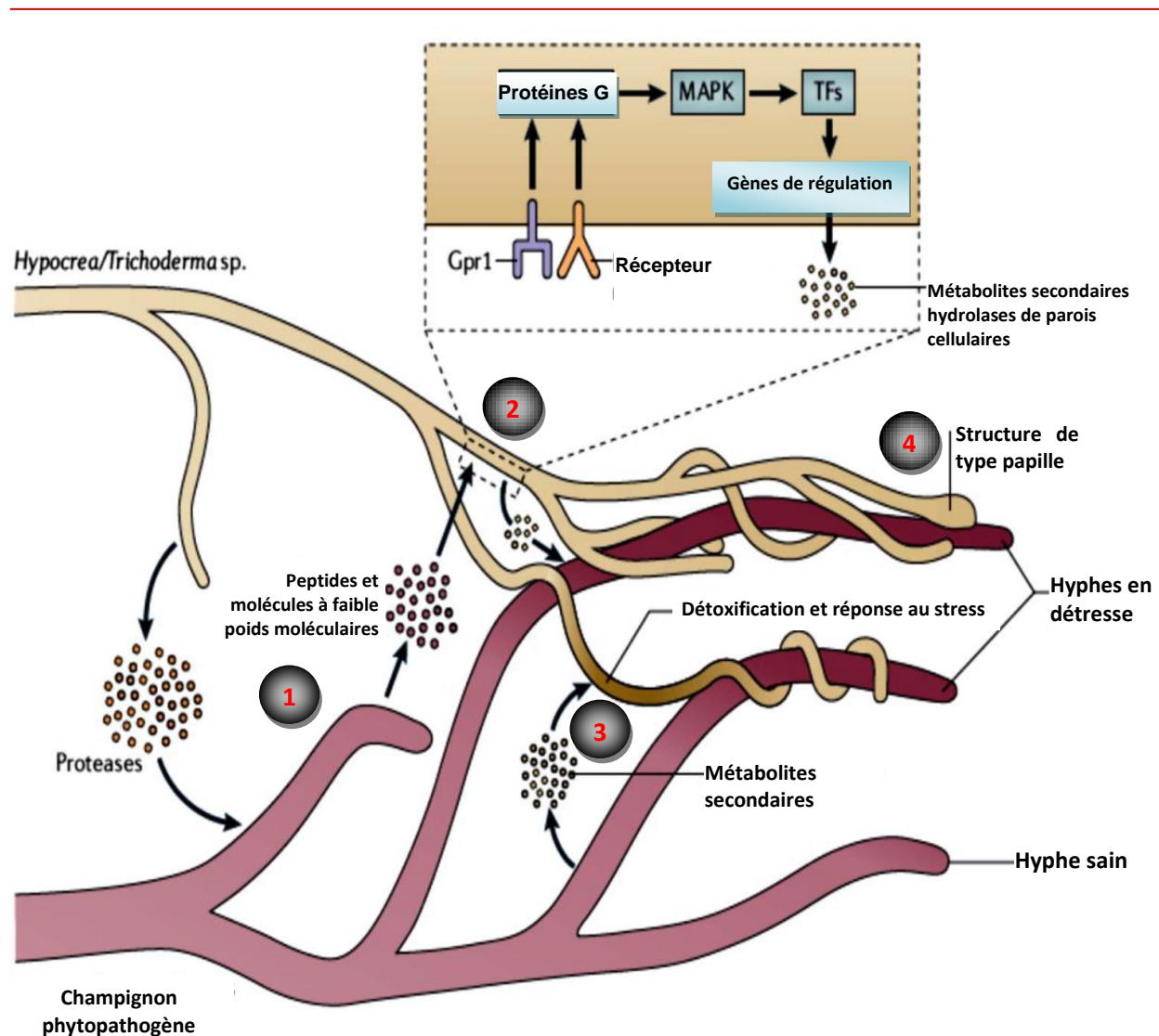


Figure 5 : Mécanisme de mycoparasitisme des *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2011)

1. **Reconnaissance** entre *Trichoderma* et un champignon phytopathogène par l'intermédiaire de molécules (peptides) qui sont libérées par l'agent pathogène suite à l'action des protéases sécrétées par *Trichoderma*.

2. Ces molécules peuvent se lier à des récepteurs sur la surface des hyphes de *Trichoderma* ou des (récepteurs de détection ou couplés à la protéine G (Gpr1)), provoquant ainsi une cascade de signalisation comprenant les protéines G et les protéines-kinases activées par les mitogènes (MAPK), qui peuvent moduler les activités des facteurs de transcription (TFs). Ces facteurs qui accroissent l'expression constitutive des gènes qui codent pour les enzymes pour la biosynthèse de métabolites secondaires hydrolases de parois cellulaires

3. Le pathogène réagit en synthétisant des métabolites secondaires qui déclenchent une réponse au stress et une désintoxification de *Trichoderma*.

4. Enroulement des hyphes de *Trichoderma* sur ceux du pathogène et pénétration via des structures de type papille (Appressorium)

L'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu chez les espèces de *Trichoderma* qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse, exerçant un effet inhibiteur voir létal sur l'agent pathogène (Vinale *et al.*, 2007).

Les espèces de *Trichoderma* sont capables de produire plus de 180 métabolites secondaires appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset 1998; Reino *et al.* 2008). Ces composés ont été caractérisés et qui peuvent être classés en trois catégories : des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam 1991). Il est très difficile de connaître quels sont les métabolites secondaires réellement produits et actifs *in situ*. Certaines souches de *Trichoderma* peuvent produire plusieurs métabolites différents selon les conditions environnementales, le sol, la plante et l'agent pathogène auquel elles sont confrontées.

Certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, sont capables de produire l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń *et al.* 2013 ; Błaszczuk *et al.*, 2014).

Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par *Trichoderma* (Howell ,2003 ; Harman *et al.*, 2004; Eziashi *et al.*, 2006 ; De Castro *et al.*, 2010).

Les *Trichoderma* peuvent aussi secrétés des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antivirales. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique, trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Vinale *et al.* 2006 ; Reino *et al.*, 2008 ; Andrabi *et al.* 2011).

La compétition pour les éléments nutritifs et l'espace est un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Tronsmo et Hjeljord, 1998). Au niveau de la rhizosphère, la compétition pour l'espèce est intense et s'exprime par la colonisation de la surface racinaire (Sivan et Chet, 1989). Le *Trichoderma* est parmi les microorganismes rhizosphériques les plus compétitifs qui pourront tirer profit de l'apport nutritif libéré par le système racinaire et tenter de coloniser la racine des plantes. La

pénétration de *Trichoderma* au niveau du tissu racinaire est généralement limitée au niveau de la première couche ou bien la couche secondaire des cellules racinaires (Yedidia *et al.* 1999, 2000; Metcalf *et al.* 2001). La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia *et al.* 2001).

L'induction de la résistance chez la plante hôte fait partie du mécanisme de biocontrôle de *Trichoderma* contre les agents phytopathogènes. Cette résistance est soit localisée ou systémique. La reconnaissance entre la plante et le *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phytoalexines (molécules fongitoxiques) (Howell, 2003 ; Shores *et al.*, 2005). Yedidia *et al.* (2000) ont prouvé que l'association de *Trichoderma* avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes.

Les *Trichoderma* sont capables d'éliciter les mécanismes de défense de la plante par la synthèse de l'enzyme ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) et la phytohormone AIA (acide indole-3-acétique) (Figure 6). La biosynthèse de l'éthylène (hormone végétale) augmente en réponse à l'ACC désaminase. En fait, le développement et le système de défense de la plante sont liés entre eux par un réseau de voies de signalisations hormonales dont les acteurs centraux dans la défense sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Viterbo *et al.*, 2010 ; Hermosa *et al.*, 2012).

Des oligosaccharides, des protéines à fonction enzymatique et d'autres composés de faible poids moléculaire, sécrétés par *Trichoderma* induisant la résistance chez les plantes sont identifiés. La xylanase, protéine à fonction enzymatique, sécrétée par plusieurs espèces de *Trichoderma* est capable de déclencher la production d'éthylène et la défense des plantes (Fuchs *et al.*, 1989; Anderson, 1993 ; Yedidia *et al.*, 1999).

Les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes. Certaines souches établissent une colonisation au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité et la résistance au stress biotique et abiotique ainsi que l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.*, 2004).

Il a été prouvé que les *Trichoderma* peuvent stimuler la croissance des plantes et leur développement en présence et en absence des pathogènes (Harman *et al.*, 2004 ; Avis *et al.* 2008). L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante, soit au niveau du sol (Chang *et al.* 1986; Harman, 2000 ; Yedidia *et al.*

2001). Des recherches ont montré que *T. viride* est un améliorateur de croissance chez le soja et que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines du maïs et chez d'autres plantes (Harman, 2000 et 2001 ; Harman *et al.*, 2004).

Les *Trichoderma* influencent sur la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones comme l'AIA et en améliorant le contenu du sol en nutriments par la solubilisation du phosphate et d'autres éléments nutritifs comme le Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ et Zn qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous forme non assimilable pour les plantes (Altomare *et al.*, 1999 ; Rudresh *et al.*, 2005 ; Gravel *et al.*, 2007).

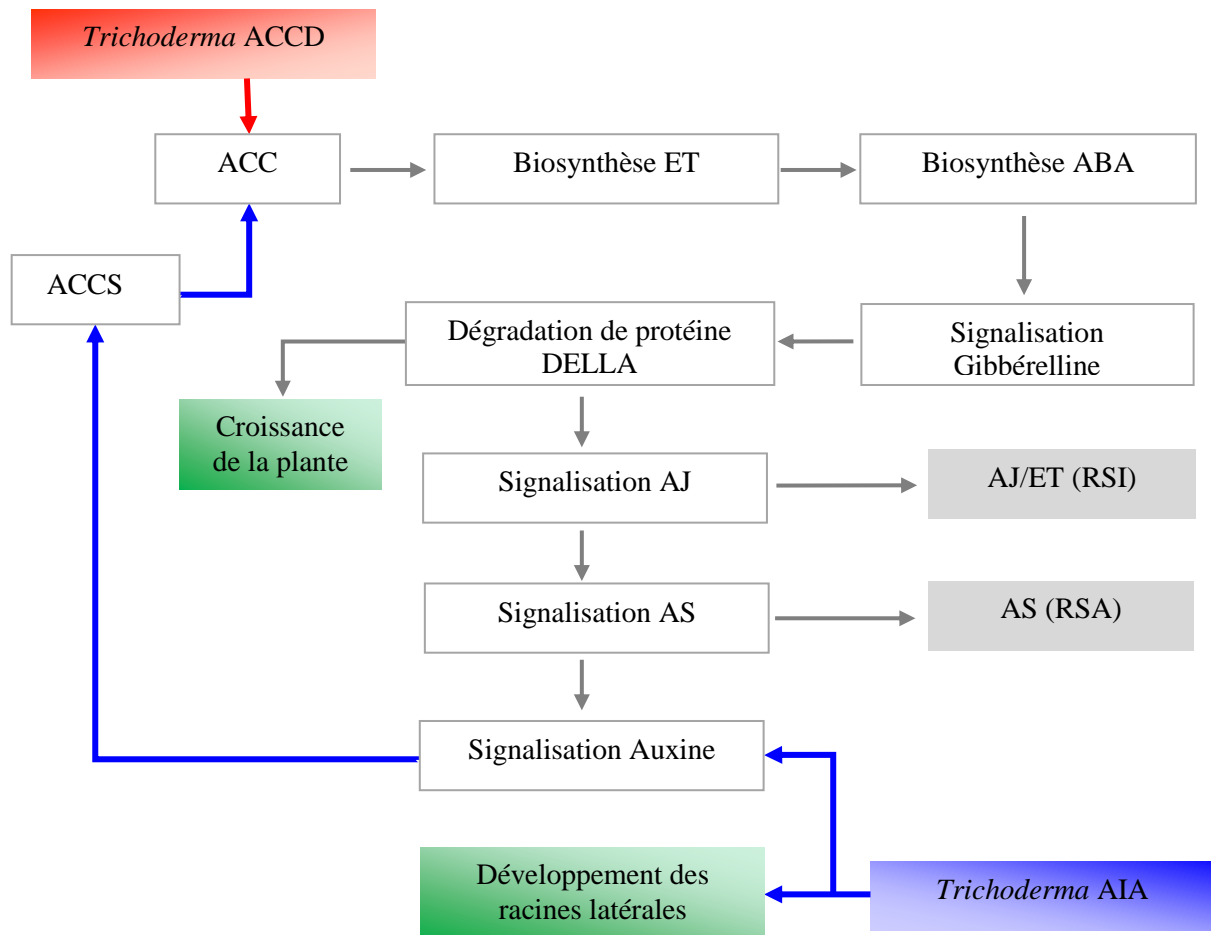


Figure 6 : Interaction *Trichoderma*–plante (Hermosa *et al.*, 2012)

Effets de la production par *Trichoderma* de l'ACC désaminase (ACCD) et acide indole-3-acétique (AIA) sur la plante

ABA, acide abscisique; **ACC**, acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique; **ACCS**, ACC synthéase; **ET**, éthylène; **RSI**, résistance systémique induite ; **AJ**, acide jasmonique; **AS**, acide salicylique; **SAR**, résistance systémique acquise.

2. Généralités sur les *Fusarium*

2.1. Taxonomie et morphologie de *Fusarium*

Le genre *Fusarium* a été découvert par Link en 1809. Il est délimité dans son sens actuel par Appell et Wollenweber (1910) et correspond à la forme de reproduction asexuée. Il appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la reproduction sexuée chez la plupart des espèces n'a pas été observée. Il appartient à la sous-classe des Hyphomycètes à conidiophores réunis en sporodochie et à la famille des tuberculariacées, il fait partie de la section Elegans (Nelson *et al.*, 1983).

Le *Fusarium* se multiplie par voie végétative ou par l'intermédiaire de spores asexuées. Cette forme imparfaite (anamorphe) est caractérisée par un mycélium septé et ramifié (Belabid, 2003). Le *Fusarium* produit trois types de spores asexuées (Figure 7 et 8): des **microconidies** unicellulaires ou bicellulaires arrondies ou ellipsoïdales, des **macroconidies** pluricellulaires en forme de croissant et des **chlamydospores** arrondies d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée, en position terminale ou intercalaire des hyphes mycéliens, représentant ainsi les spores de résistance du champignon (Nelson *et al.*, 1983 ; Booth, 1971 ; Llorens *et al.*, 2006). La présence ou l'absence de macro et microconidies, de chlamydospores ainsi que la couleur et la forme de *Fusarium* sont les caractères de classification utilisés couramment pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (Nasraoui, 2000).

Sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), les espèces appartenant au genre *Fusarium* peuvent varier d'apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une grande variété de couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon l'isolat. En revanche, si les sporodochiums (amas de conidiophores provenant d'un stroma ou masse d'hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra avec une couleur crème ou orange (Smith *et al.*, 1988).

La forme parfaite (téléomorphe) observée pour certaines espèces de *Fusarium* se rattache au Phylum d'Ascomycète, de l'ordre Sphaérialia et de la famille des Hypocreacées et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* (Seifert, 2001). Elle est proposée d'être plutôt proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* (Di Pietro *et al.*, 2003, Michielse et Rep, 2009).

La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante chez les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (Thrane, 2001).

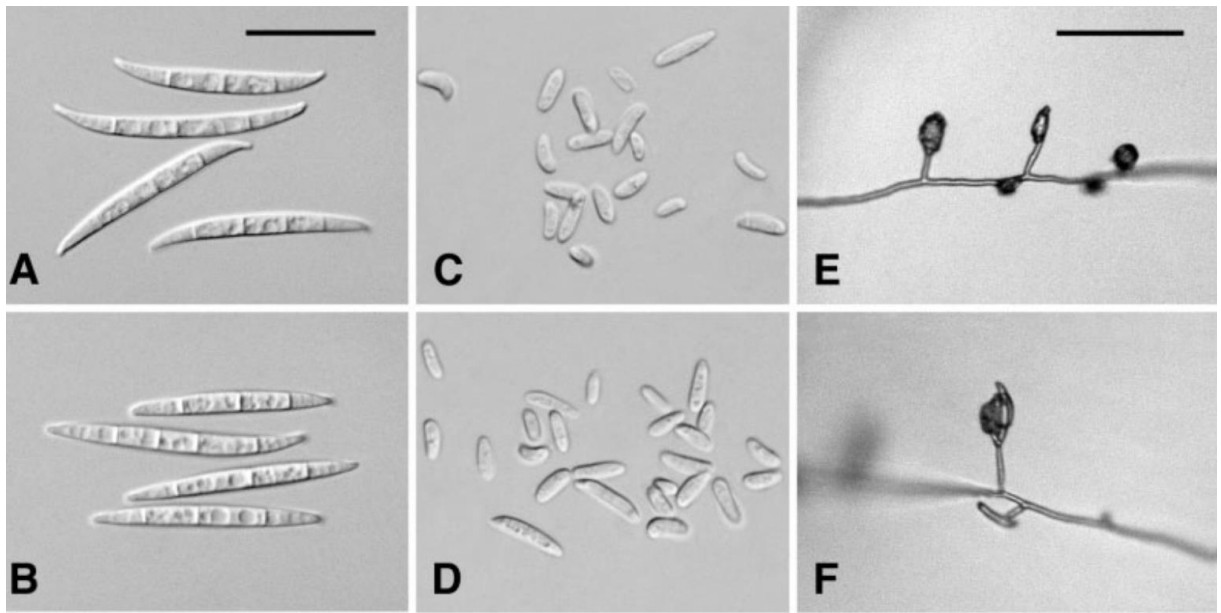


Figure 7 : Morphologie du *Fusarium oxysporum* (Leslie et Summerell, 2006)

A – B: Macroconidies ; **C – D**: Microconidies ; **E – F**: Conidiophores et microconidies
 - Barres d'échelle : **A – D** = 25 μm ; **E – F** = 50 μm .

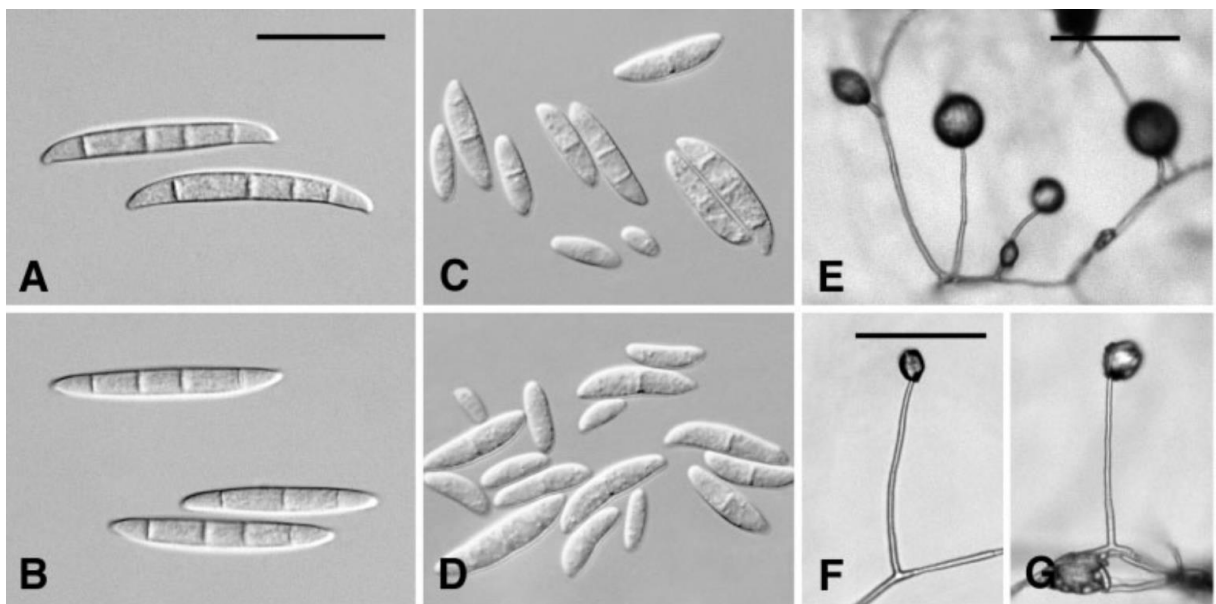


Figure 8 : Morphologie du *Fusarium solani* (Leslie et Summerell, 2006)

A – B: Macroconidies ; **C – D**: Microconidies ; **E – G**: Conidiophores et microconidies
 - Barres d'échelle : **A – D** = 25 μm ; **E** = 100 μm ; **F – G** = 50 μm .

Actuellement, le genre *Fusarium* comprend au moins 300 espèces phylogénétiquement distinctes, 20 espèces complexes et neuf lignées monotypiques. La plupart des espèces de *Fusarium* pathogènes identifiées appartiennent aux complexes *F. oxysporum* et les complexes *F. solani* (Balajee *et al.*, 2009, O'Donnell *et al.*, 2015).

2.2. *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*

Les espèces de *Fusarium* provoquent des maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées aux champs et en serres (Fravel *et al.*, 2003). Le genre *Fusarium* doit être considéré comme un faisceau d'espèces très diversifiées du point de vue morphologique, chacune de ces espèces est représentée dans la nature par une majorité de souches saprophytes ou de parasites regroupant des formes plus ou moins spécialisées et douées d'une véritable virulence. Il regroupe de nombreuses espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes.

Fusarium oxysporum (Schlecht). Snyder et Hansen (Snyder et Hansen, 1940) est l'espèce la plus répandue. Elle comporte des formes phytopathogènes les plus fréquentes et les plus importantes de la microflore fongique des sols cultivés (Baayen *et al.*, 2000). *F. oxysporum* est un complexe d'espèces ubiquistes comprenant de nombreuses *formae speciales* (f. sp.) responsables de diverses maladies, la principale étant le flétrissement vasculaire caractérisé par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène (Dean *et al.*, 2012). Les noms attribués aux différentes formes spéciales sont directement dérivés de l'hôte sur lequel le champignon a été isolé. L'espèce *F. oxysporum* peut infecter un grand nombre de plantes, souvent de façon très spécifique. Plus de 120 formes spéciales et races ont été ainsi identifiées, basées sur leur spécificité d'hôtes (O'Donnell *et al.*, 2015), parmi lesquelles les formes spéciales *albedinis*, *lycopersici* et *ciceris* qui sont responsables, respectivement, de la fusariose vasculaire du palmier dattier, de la tomate et du pois chiche (Benzohra *et al.*, 2015; El Komy *et al.*, 2015; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015) (Figure 9, 10 et 11).

Fusarium solani est un agent pathogène qui cause des maladies sur une gamme vaste et diversifiée de plantes hôtes. Il est connu comme responsable de maladies sur une centaine de genres de plantes où il est souvent associé à des pourritures racinaires (Farr *et al.*, 1989). Les hôtes prédominants sont les cultures maraichères, les légumineuses et les des cucurbitacées (O'Donnell, 2000).



Fig. 9 : Symptômes de la fusariose vasculaire du palmier dattier causée par *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* :
(a) sur l'arbre ; (b) sur folioles. Photos prises à Béchar, Algérie. (Benzohra *et al.*, 2015)



(a) flétrissement ; (b) tissus corticaux nécrosés ;
(c, d) coloration brun sombre des vaisseaux.

Fig. 10 : Symptômes de la fusariose vasculaire de la tomate causée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* :

(a) : Roskopf *et al.*, 2005

(b, c, d) Blancard, 2009



Fig. 11 : Symptômes de la fusariose vasculaire du pois chiche causée par *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.
Photos prises à Mascara, Algérie.
(Zaim *et al.*, 2016)

F. solani est membre d'un clade monophylétique qui comprend environ 60 espèces phylogénétiques connues sous le nom de « complexe d'espèces *Fusarium solani* » FSSC (O'Donnell, 2000; Zhang *et al.*, 2006 ; Geiser *et al.*, 2013). Les noms des espèces biologiques individuelles (formae speciales, f. sp.) du FSSC sont principalement associés au nom de la plante hôte spécifique colonisée (ex. *F. solani* f. sp. *pisi* sur le pois et *F. solani* f. sp. *glycines* sur le soya) (Matuo et Snyder, 1973 ; Li et Hartman, 2003 ; Geiser *et al.*, 2013).

Les membres de ce complexe peuvent vivre dans des conditions environnementales extrêmes. En effet, *F. solani* a été retrouvé à l'intérieur d'une section hautement radioactive du réacteur nucléaire endommagé de Tchernobyl (Zhdanova *et al.*, 2000). Ces champignons sont capables de croître dans les conditions anaérobiques du sol et tolèrent de nombreux composés révélés comme toxiques pour d'autres champignons (Wainwright *et al.*, 1994 ; Espinel-ingroff, 1998). Leur capacité à s'adapter à différents environnements, reflète leur diversité génétique et métabolique (O'Donnell, 2000; Suga *et al.*, 2000).

2.3. Cycle biologique de *Fusarium*

Le *Fusarium* responsable d'importants dégâts durant tout le cycle vital de la plante hôte est transmis essentiellement par les semences récoltées de plantes infectées, mais peut aussi provenir du sol. Le *Fusarium* est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique où il croît sur des débris de plantes ou survit en forme de chlamydozoospores, il est capable de survivre pendant plusieurs années dans les conditions les plus défavorables (Haware *et al.*, 1978 ; Beckman, 1987). Les *F. oxysporum* peuvent même coloniser des zones profondes du sol ; c'est le cas de la forme spéciale *ciceris* (Haware *et al.*, 1986). Selon Blancard (1988), le *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* persiste dans le sol jusqu'à une profondeur de 80 centimètres et peut recoloniser le sol à partir des couches inférieures.

L'infection des plantes se fait au moyen des chlamydozoospores qui restent dormantes jusqu'à la stimulation de leur germination par des substrats organiques ou des exsudats racinaires. Suite à la germination, il y a formation d'un mycélium. Si les conditions sont favorables, le thalle produit des conidies (Beckman et Roberts, 1995; Agrios, 2005).

En présence d'une plante hôte, le mycélium envahit tout d'abord les racines suite à la pénétration de l'épiderme dans la zone d'élongation ou par des blessures (Agrios, 1988 ; Beckman et Roberts, 1995). Le tube germinatif qui s'introduit à travers l'épiderme du système racinaire envahit les vaisseaux conducteurs, dans les quels les microconidies sont

transportées de façon passive par le flux du xylème et peuvent ainsi infecter des parties aériennes.

La plante présente un stress hydrique qui provient soit des vaisseaux qui se bouchent (un blocage du transport d'eau et d'éléments nutritifs) sous l'action combinée du mycélium, des microconidies et de substances mucilagineuses produites par la plante en réponse à l'attaque du champignon, soit de toxines produites par le champignon, comme l'acide fusarique, soit de ces causes combinées (Toyoda *et al.*, 1988 ; Klein et Correll, 2001). Par conséquent, des symptômes de flétrissement apparaissent sur les plantes affectées par *F. oxysporum* et les feuilles montrent une flaccidité suivie d'une coloration vert-terne et d'un dessèchement. Les symptômes peuvent se manifester aussi sous forme d'un jaunissement progressif de bas en haut avec une nécrose des folioles. Les racines des plantes affectées gardent une apparence saine et leurs tiges montrent une coloration brune des tissus internes quand elles sont sectionnées verticalement.

Les mécanismes de pathogénicité de *F. solani* ont été largement liés à la sécrétion d'enzyme de cutinase. Au niveau des racines, il produit des enzymes pectolityques induisant par conséquent une pourriture racinaire (Gupta *et al.*, 1986 ; Epstein *et al.*, 1994).

2.4. Méthodes et Moyens de lutte

Le contrôle de la fusariose est difficile en raison de la nature du pathogène transmis par le sol et la semence ainsi sa capacité de persister de longues périodes, même en l'absence de la plante hôte sous forme de chlamydospores (Frederix et Den Brader, 1989). Il est évident que le traitement des semences est indispensable pour éviter l'introduction du *Fusarium* dans des aires de cultures saines et son installation dans le sol.

Les pratiques culturales à savoir la destruction des débris de récolte des plantes fusariées, la jachère de longue durée, la rotation culturale avec des cultures non- hôtes, peuvent agir sur la densité de l'inoculum présent dans le sol (Edel *et al.*, 1995 ; Scott *et al.*, 2012). Néanmoins, la rotation des cultures est impraticable sur le plan économique où l'agriculture intensive est hautement spécialisée (Miguel *et al.*, 2004). De plus, il est connu que des formes spéciales comme *melonis*, *ciceris* et *lentis* peuvent coloniser d'autres plantes sans provoquer de symptômes apparents, ce qui rend impossible l'éradication de la maladie par la pratique des cultures en rotation (Belabid, 2003).

Comme pour de nombreuses maladies, la méthode la plus efficace pour le contrôle des maladies provoquées par *Fusarium* est l'utilisation des cultivars résistants s'ils sont disponibles (Fravel *et al.*, 2003). Des gènes de résistance vis – à – vis des *Fusarium* existent

chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées. Ainsi, chez la tomate, le melon, le haricot et le pois chiche des gènes dominants de résistance ont été identifiés (Huang et Lindhout, 1997; Hawkins *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2001; Halila *et al.*, 2008; Diener et Ausubel, 2005). Cependant, l'efficacité de variétés résistantes dans le contrôle d'une maladie peut être sérieusement limitée par la variabilité de la pathogénicité, y compris l'apparition de nouvelles races pathogènes et pathotypes par des mutations ou des parasexualités aléatoires et spontanées (Sidhu et Webster, 1979 ; Beckman, 1987; Cai *et al.*, 2003).

La fumigation du sol est efficace dans l'élimination de l'inoculum déjà présent dans le sol ; mais comme c'est toujours à recommencer, il ne s'agit pas d'une solution à long terme (Miguel *et al.*, 2004 ; Fravel *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2012).

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons pathogènes. Certains fongicides systémiques peuvent contrôler partiellement les maladies dûe aux *Fusarium* (Bolton, 1984; Song *et al.*, 2004 ; Amini et Sidovich, 2010). L'augmentation de l'utilisation des fongicides provoque plusieurs effets négatifs comme le développement de la résistance des agents pathogènes. Ces fongicides ont aussi un effet néfaste sur l'environnement (Gerhardson, 2002).

Toutes ces méthodes et moyens ne sont pas suffisantes pour protéger totalement les cultures contre les infections et en outre, la plupart d'entre elles sont défavorables à une bonne productivité (Bulit *et al.*, 1967). Pour ces raisons ci-dessus, d'autres alternatives pour la gestion des *Fusarium* phytopathogènes sont nécessaires.

En conséquence, les stratégies du contrôle biologique des fusarioses ont acquis un intérêt particulier. On sait depuis longtemps que l'incidence de la fusariose peut varier sur des sols différents infestés de *Fusarium*. Ce phénomène de « sols suppressifs » a été trouvé corrélé parfois aux caractéristiques pédologiques mais surtout à sa population microbienne (Alabouvette *et al.*, 2006). Des études qui portent sur ce phénomène et les microorganismes impliqués sont nombreuses (Alabouvette *et al.*, 1984 ; Alabouvette, 1986, Kaur *et al.*, 2010). La présence de la souche non pathogène de *F. oxysporum* 47 (*Fo47*) dans le sol était capable de protéger plusieurs espèces végétales comme le lin, melon et tomate contre ses respectives formes spéciales de *F.oxysporum* : *lini*, *melonis* et *lycopersici* (Aimé *et al.*, 2008).

La lutte biologique avec des *Trichoderma* spp. antagonistes contre les agents phytopathogènes telluriques est une alternative potentielle à la lutte chimique (Harman *et al.*, 2004). Des espèces de *Trichoderma* ont démontrés leurs efficacités dans le contrôle des maladies de la pourriture racinaires de nombreuses plantes cultivées (Verma *et al.*, 2007). Aussi, *T. harzianum* a été décrit comme capable de contrôler les pathologies induites par *F. oxysporum* sur le bananier (Thangavelu *et al.*, 2004). El-Mohamedy et Abd El-Baky (2008) ont évalué l'efficacité de l'enrobage des graines par des agents de contrôle biologique (*T. harzianum*, *Bacillus subtilis* et *P. fluorescens*) et qui par conséquent a réduit l'incidence de la maladie.

Des espèces du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour limiter le développement de la pourriture racinaire de la tomate causée par *Fusarium solani* (Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 2000; Bolwerk *et al.*, 2003).

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* isolée de la rhizosphère du pois chiche est capable de protéger les plants de pois chiches contre le flétrissement vasculaire causé par FOC ; l'inoculation avec *Pseudomonas aeruginosa* a diminué significativement l'incidence de la maladie chez des génotypes du pois chiche sensibles ou modérément résistants (Landa *et al.*, 1997).

1. Obtention des isolats appartenant au du genre *Trichoderma* à partir de sols rhizosphériques du nord ouest Algérien

L'objectif de cette partie de notre travail est :

- l'isolement des *Trichoderma* spp. à partir de la rhizosphère des plantes saines prélevée de quatre régions différentes du nord ouest Algérien.
- la purification et l'obtention d'une collection d'isolats appartenant au genre *Trichoderma* ;
- d'identifier les isolats selon des critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) et phylogénétique.

1.1- Milieux de culture

Suivant les besoins expérimentaux, divers types de milieux de culture sont mis en œuvre. La composition des milieux de culture utilisés est indiquée dans l'annexe 1.

- Milieux d'isolement

Le milieu TSM (*Trichoderma* Selective Medium) a été utilisé pour l'isolement de *Trichoderma* spp.

- Milieux de purification et conservation

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour la purification et la conservation des isolats de *Trichoderma* spp.

Le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) liquide a été utilisé pour la production d'inoculum de *Trichoderma* spp. afin de le conserver sur papier filtre.

- Milieu de caractérisation morphologique

Le milieu PDA a été utilisé pour la détermination des morphotypes et la pigmentation des isolats.

1.2 -Prélèvement des échantillons du sol rhizosphérique

Dans le but d'obtenir d'isolats de *Trichoderma* de la zone rhizosphérique de plantes, vigoureuses et saines, à une profondeur de 10-25 cm, des échantillons ont été prélevés dans différents lieux de quatre régions : Mascara, Mostaganem, Tlemcen et Oran, au cours des années 2011, 2012 et 2013. Lors des sorties effectuées, les cultures présentes

étaient de la pomme de terre, blé, pois chiche, pois, carotte et l'oignon. Les sites de prélèvements des échantillons sont indiqués dans le tableau 1.

Les échantillons des sols prélevés ont été placés dans des sacs en papiers, bien fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C en vu de leurs analyses.

Tableau 1: Les sites et dates de prélèvements des sols rhizosphériques

Régions	Sites de prélèvements	Cultures présentes	Dates de prélèvements	Nombre d'isolat
Mascara	- Maoussa	- Pomme de terre - Blé	28 Mars 2011	2
	- Tighennif	- Blé - Pois chiche	22 Avril 2011	2
	- El Bordj - Ain Farés	- Pois - Pois - Blé	08 Mai 2011	5
	- Matemore	- Carotte	11 Juin 2012	2
Mostaganem	- Aïn Nouissy - Hassi Mameche	- Pomme de terre - Blé	03 juin 2011	2
	- Mazaghran - Sayada	- Oignon - Pomme de terre	05 Mai 2012	2
Tlemcen	- Ouled Mimoun - Chetouane	- Blé - Pois chiche - Pomme de terre	14 juin 2012	3
Oran	- Gdyl	- Blé - Pomme de terre	12 juin 2011 23 Mai 2013	3
	- Misserghin	- Pomme de terre - Blé	23 Mai 2013	2

1.3 -Isolement des champignons du genre *Trichoderma*

L'isolement de *Trichoderma* a été conduit selon la technique des suspensions-dilutions telle qu'elle est décrite par Rappilly (1968). Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile, est ajouté aseptiquement 1 g de sol rhizosphérique. Ce mélange est agité afin de mettre en suspension les particules du sol ainsi que les spores et mycélium qui y sont attachés. La suspension obtenue correspond à la dilution 10^{-1} . Pour obtenir une concentration variable de propagules et faciliter le dénombrement des colonies une série de dilution est réalisée à partir de la solution mère dont la concentration est de 10^{-1} . Un ml (1 ml) de la dilution 10^{-1} est prélevé aseptiquement et mis dans 9 ml d'eau distillée stérile donnant ainsi la dilution 10^{-2} qui est agitée avant de prélever 1ml que l'on ajoute à 9

ml d'eau distillée stérile et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-7} et par la suite quatre dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7}) ont été choisies afin de les ensemercer sur le milieu de culture TSM (Annexe 1). Un dixième (0,1ml) de chaque dilution a été prélevé et étalé sur boîte de Petri contenant le milieu TSM. Trois boîtes ont été préparées pour chaque dilution. Elles ont été incubées à 25° C, et les observations se sont poursuivies 2 à 3 jours dès leur ensemencement.

1.4- Purification et obtention des cultures monospores

Après incubation, nous avons procédé à la purification des champignons d'apparences différentes qui ont poussé sur le milieu TSM.

Les champignons ont été repiqués, cultivés dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA (Annexe 1) puis incubés à 25°C.

Afin d'éviter une dérive génétique des populations au cours des essais successifs, nous employons des isolaments monoconidiens, assimilables à des clones puisque les conidies de *Trichoderma* sont uninuclées (Hammill, 1974).

Une suspension de conidies est diluée dans de l'eau stérile, de façon à obtenir une concentration voisine de 20 conidies/ml. Une goutte de la suspension est déposée puis étalée en stries à la surface du milieu PDA en boîte Petri (Annexe 1). Les conidies germées ont été repiquées individuellement sur milieu PDA et incubées à 25°C pendant 7 jours. Un fragment mycélien de chaque culture, issu d'un clone monospore, a été repiqué sur le même milieu en boîte de Petri.

1.5 -Identification des isolats de *Trichoderma*

1.5.1- Morphologique des isolats obtenus

L'identification est réalisée par observation des caractères macroscopiques sur les différents milieux de culture (croissance, couleur aspect de la colonie ...) et des caractères microscopiques (mycélium, conidiophores, conidies...) sous microscope optique par un examen direct d'un petit fragment de culture de champignon âgé de 4 à 7 jours en utilisant le bleu coton comme liquide de montage et en se référant à différentes clés de détermination du genre *Trichoderma* : Rifai (1969) ; Samuels *et al.* (1994) ; Samuels (2006) et la clé interactive d'identification de *Trichoderma* en ligne de Samuels *et al.* (2016) sur le site <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.

L'aspect microscopique des arrangements spatiaux des conidies sur les conidiophores a été observé en réalisant une micro-culture du champignon sur une mince couche de milieu PDA préparé aseptiquement sur une lame microscopique recouverte

d'une lamelle. Le champignon est ensemencé sur les bords des 4 côtés de la lamelle. La lame portant la culture est ensuite déposée dans une boîte de Petri contenant un disque de papier filtre imbibé d'eau distillée stérile. La culture est incubée à 25°C, pendant 2 à 3 jours.

Des photos macroscopiques montrant l'aspect morphologique des thalles et des photos microscopiques du mycélium, conidies et conidiogénèse ont été également prises.

1.5.2- Identification moléculaire de *Trichoderma*

A partir de la collection de *Trichoderma* obtenue, l'isolat T5 a fait l'objet d'une identification génotypique et qui a été choisi sur la base de critères de sélection comme étant l'isolat le plus antagoniste *in vitro* vis-à-vis des *Fusarium* pathogène. La technique de PCR a été utilisée pour l'amplification de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomale (ADNr) à une bande de 600 bp et d'une partie du gène codant pour le facteur d'élongation de la traduction (tef 1) (un fragment d'environ 0,56 Kb).

La PCR de la région ITS des extraits d'ADN a été effectuée en utilisant la paire d'amorces universelles ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') comme décrites par White *et al.*, (1990).

La paire d'amorces EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (Chaverri *et al.*, 2003) et tef1-rev (5'-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3') (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002), a été utilisée pour l'amplification du gène tef 1.

La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 5-20 ng/µl d'ADN génomique, 5 µl du tampon de réaction 10 X (avec MgCl₂), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1,5 µl de chaque amorce (10 µM), 2,5 unités de Taq ADN polymérase et de H₂O pure et stérile pour compléter jusqu'à 50 µl.

Les conditions d'amplification et les paramètres du cycle de la PCR sont présentés dans le tableau 2.

Suite à l'amplification, la qualité de la réaction de PCR est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,75 %.

Les produits de la PCR, sous forme de bande, sont coupés du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel et sont ensuite purifiés avec le kit Gene-clean II system (Q-Biogene, Calsbad, California) selon les instructions du fabricant.

Les produits ainsi purifiés, sont quantifiés dans un gel d'agarose de 1% en utilisant un marqueur de poids. Les échantillons sont ensuite préparés dans des volumes de 8 µl par

PARTIE 2 : Matériel et méthodes

amorce, dans des tubes séparés contenant chacun 3 µl d'amorce à 1 µM et de 70 à 100 ng du produit PCR purifié (Druzhinina *et al.*, 2005). Les séquences de l'ADN sont obtenues, par un séquençage automatique avec un terminateur fluorescent en utilisant l'ABI 377 Prism Sequencer (Applied Biosystems, Foster city California) au niveau du département de microbiologie et de génétique de l'université de Salamanca, Espagne.

Les séquences d'ADN ont été alignées en utilisant Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) basé sur l'algorithme de Waterman (1986). Ensuite, les séquences obtenues ont été comparées à des séquences analogues sur la base de données du logiciel Blast (basic local alignment search tool), du site NCBI (National Centre Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>), et *TrichOKEY*, programme pour l'identification moléculaire de *Trichoderma* et *Hypocrea* (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>).

L'analyse phylogénétique a été réalisée avec l'utilisation en ligne du programme «phylogeny» disponible sur la plate-forme <http://www.phylogeny.fr> (Guindon et Gascuel, 2003 ; Chevenet *et al.*, 2006 ; Dereeper, 2008 ; Dereeper, 2010).

Toutes les séquences ainsi obtenues, ont été déposées sur la base de données nucléotidiques internationales NCBI GenBank où un numéro d'accèsion a été attribué à chaque séquence.

Tableau 2 : Amorces et programme d'amplification par PCR.

Amorces d'amplification utilisées (5'-3')		Conditions PCR (programme d'amplification)
ITS	ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	-Dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min. -39 cycles comportent 3 phases : Dénaturation à 94°C pendant 1 min suivie de 2 min d'hybridation à 55°C et 3 min d'élongation à 72°C. -Le cycle final consiste en 7 min à 72°C pour finir l'élongation des séquences en voie de synthèse.
tef	EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) tef1-rev (GCCATCCTTGGAGACCAGC)	-Dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min. -35 cycles comportent 3 phases : Dénaturation à 95°C pendant 1 min suivie de 1 min d'hybridation à 59°C et 1 min d'élongation à 72°C. -Le cycle final consiste en 7 min à 72°C pour finir l'élongation des séquences en voie de synthèse.

1.6 –Conservation des isolats de *Trichoderma*

- Conservation sur gélose inclinée

La méthode consiste à repiquer le champignon purifié en tubes à essai sur du milieu PDA incliné, les cultures sont maintenues pendant 3 jours à la température de 22°C puis stockées à 5°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

- Conservation sur papier filtre

La méthode consiste à ensemercer le champignon dans des boites de Petri contenant un disque de papier filtre imbibé d'une solution nutritive pauvre en source carbonée (Annexe 1) puis incubé à 25°C pendant 10 jours.

2. Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis des *Fusarium* phytopathogènes «*in vitro*»

Cette partie fait l'objet de :

- L'étude de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* obtenus vis-à-vis de quatre *Fusarium* pathogènes. Cette étude a pour but de sélectionner les isolats de *Trichoderma* les plus performants ;
- La mise en évidence de l'action inhibitrice de la germination des conidies de *Fusarium* par les substances diffusibles produites par nos isolats de *Trichoderma* ;
- l'étude des modes d'action employés par les isolats de *Trichoderma* à l'égard des espèces phytopathogènes du genre *Fusarium*.
- Rechercher des associations possibles entre les différents mécanismes d'antagonisme.

2.1- Milieux de culture

- Milieu de sélection des *Trichoderma*

L'activité antifongique des isolats de *Trichoderma* a été testée sur milieu PDA (Annexe 1) dans le but de sélectionner les isolats les plus performants.

- Milieu d'analyse de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma*

Le milieu liquide PDB (Annexe 1) a été utilisé pour analyser *in vitro* l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma* sur la germination des conidies de *Fusarium*.

2.2- Matériel fongique

2.2.1- Agents phytopathogènes

Dans le but de sélectionner les isolats les plus performants de *Trichoderma*, quatre isolats phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* ont été utilisés dans cette étude et

qui ont été délivrés par le laboratoire L.R.S.B.G, Université de Mascara. Il s'agit d'un isolat de *Fusarium solani* (FS) (agent causal de la pourriture racinaire du pois chiche) et 3 isolats de *Fusarium oxysporum* (FO) représentant 3 formes spéciales différentes: *albedinis* (FOA), *lycopersici* (FOL) et *ciceris* (FOC), respectivement agents causaux du flétrissement vasculaire du palmier dattier, de la tomate et du pois chiche.

2.2.2- Agents antagonistes

La collection des isolats de *Trichoderma*, obtenue et décrite dans le chapitre 2, a été utilisée dans cette étude. Elle est constituée de 23 isolats issus de sols rhizosphériques prélevés de quatre régions du nord ouest Algérien : Mascara, Mostaganem, Tlemcen et Oran.

2.3-Confrontation par contact direct sur milieu de culture

L'activité antagoniste des isolats obtenus de *Trichoderma* vis-à-vis de quatre champignons phytopathogènes a été étudiée en utilisant la technique de la confrontation directe décrite par Sivan et Chet (1989).

Cette technique consiste à co-ensemencer, dans la même boîte de Petri contenant un milieu PDA (Annexe 1), deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre) prélevées à partir de cultures de *Trichoderma* et du pathogène (âgées de 7 jours). Les deux pastilles ont été ensemencées à 3 cm de distance l'une de l'autre et à équidistance du centre de la boîte.

Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Petri contenant le milieu PDA.

Les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité (25°C) pendant six jours.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 2, 4 et 6 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement.

L'inhibition des *Trichoderma* testés est évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon (Datta *et al.*, 2004) :

$$(\%) \text{ inhibition} = \frac{(\text{R témoin} - \text{R test})}{\text{R témoin}} \times 100$$

R témoin : distance radiale max de la croissance du champignon pathogène.

R test : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

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 du *Trichoderma*.

2.4- Production des substances volatiles

L'inhibition fongique grâce à la production des substances volatiles par les isolats de *Trichoderma* a été mesurée selon la méthode décrite par Dennis et Webster (1971a). A partir des cultures âgées de 7 jours des protagonistes, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu PDA. Après l'enlèvement des couvercles aseptiquement, la boîte de Petriensemencée avec le pathogène est placée au dessus de celle qui contient le *Trichoderma*.

Les deux fonds adhésés sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Pour le témoin, le même assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes. Le fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Trois répétitions sont été maintenues pour chaque traitement.

Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

2.5- Analyse *in vitro* de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma*

La germination des conidies constitue une phase importante dans le cycle infectieux des champignons phytopathogènes. L'action *in vitro* des filtrats de culture de 23 isolats de *Trichoderma* a été évaluée sur la germination des spores de FOC.

Les filtrats de culture de *Trichoderma* ont été préparés selon la méthode décrite par Dennis et de Webster (1971b). Deux pastilles gélosées de *Trichoderma* (6 mm de diamètre) prélevées d'une culture âgée de 7 jours sontensemencées dans 100 ml de milieu liquide PDB (Annexe 1) et incubées à 25°C pendant 15 jours sous agitation. Les différents isolats de *Trichoderma* sont cultivés séparément sur le milieu liquide PDB. Les cultures sont ensuite centrifugées à 8000 rpm pendant 10 mn. Le surnagent recueilli est filtré à travers un filtre millipore de 0,22 µm de diamètre. Le filtrat de chaque antagoniste est ajouté aseptiquement, à l'aide d'une seringue stérile, au milieu PDB pour obtenir une concentration de 50% (v/v).

A partir des cultures jeunes de FOC, des spores sont récoltées dans de l'eau distillée stérile. La suspension sporale est agitée afin de libérer les conidies des conidiophores. La suspension résultante a été filtrée à travers un papier filtre stérile afin d'éliminer les fragments mycéliens puis ajustée à 10³ spores/ml. Une quantité de 0,2 ml de cette

suspension a été ensemencée dans le milieu liquide PDB à laquelle le filtrat a été ajouté. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais sans addition du filtrat. Les cultures sont incubées à 25°C. Pour chaque filtrat, trois répétitions sont réalisées.

Après chaque 24 h, le comptage des spores, germées ou non, a été effectué sur un total de 150 spores et le pourcentage d'inhibition de la germination des conidies (**IG**) du pathogène est déterminé en utilisant la formule suivante (Chandrakala *et al.*, 2012) :

$$\text{IG (\%)} = (\text{NPA/NT}) \times 100$$

NPA : nombre de conidies germées en présence de l'antagoniste

NT : nombre de conidies germées chez le témoin ;

La spore est considérée comme germée si la longueur du tube germinatif est supérieure au plus petit diamètre de la spore (Besri et Diatta, 1985).

2.6 – Analyses statistiques

Pour chaque paramètre étudié en triplicata, les résultats ont été analysés avec de traitement statistique Statistica 8. Une analyse de variance (ANOVA) a été d'abord effectuée et les moyennes ont été classées par la méthode de Newman-Keuls au seuil de 5% quand les effets analysés étaient significatifs. Une régression linéaire (réalisé dans le but de rechercher des corrélations entre les différents paramètres) et une classification hiérarchique ascendante des 23 isolats testés ont été effectuées par le même logiciel de traitement.

3. Etude de quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de *Trichoderma*

Le but principal de cette partie est de déterminer la réponse des isolats de *Trichoderma* aux différents tests *in vitro* mettant en évidence leurs capacités :

- de produire des enzymes lytiques qui auraient un impact néfaste sur la croissance et le développement du pathogène,
- à solubiliser le phosphate ayant un rôle dans la biofertilisation des plantes et
- à synthétiser l'hormone de croissance AIA qui est considérée comme un biostimulant de la croissance des plantes.

Cette étude permettra, par la suite, la sélection des isolats les plus performants et qui sont à la fois des agents antagonistes contre *Fusarium*, biostimulateurs et biofertilisateurs, ainsi que de rechercher des associations possibles entre les paramètres étudiés.

3.1. Etude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes

Les 23 isolats de *Trichoderma* antagonistes contre les 4 champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* ont été testés pour leur capacité et leur potentiel de produire des enzymes comme la chitinase, la cellulase, la protéase, l'amylase, la *ligninase* et la lipase. La production de chaque enzyme a été détectée sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme unique ou principale source de carbone.

Pour chaque test enzymatique, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre provenant de cultures âgées de 7 jours de *Trichoderma* 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).

L'évaluation a été effectuée sur 3 boîtes pour chaque isolat de *Trichoderma*, et les résultats sont exprimés par la moyenne des 3 répétitions.

3.1.1. Production des chitinasés

La production de chitinase par les isolats de *Trichoderma* a été mesurée selon la méthode de Kamala et Indira Devi (2011). Cette activité a été déterminée sur le milieu de détection de la chitinase (Annexe 1) avec l'utilisation de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone additionnée du pourpre de bromocrésol (colorant indicateur de pH); Le pH a été ajusté à 4,7. La zone de virage du colorant s'étend de pH 5,2 à pH 6,8, passant du jaune au pourpre.

Après une période d'incubation de 2-3 jours à 25 °C, un changement de couleur du jaune au violet pourpre peut être vu dans la région d'utilisation de la chitine autour des colonies de *Trichoderma* suite à l'augmentation du pH. L'intensité de la couleur et le diamètre de la zone de couleur pourpre sont pris comme des critères pour déterminer la production de chitinase.

3.1.2. Production des cellulases

Afin de démontrer la capacité des isolats de *Trichoderma* à produire des cellulases, deux sources de celluloses sont utilisées : la *carboxy-méthyl-cellulose* (CMC) et la cellulose microcristalline (MCC), pour la détermination de l'activité des enzymes endoglucanases et cellobiohydrolases respectivement (Kausar *et al.*, 2010 ; Kamala et Indira Devi, 2011). Un disque de 6 mm de *Trichoderma* est ensemencé sur chaque milieu

de culture (Annexe 1). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 7 jours pour celles contenant le milieu CMC et 2 à 3 jours pour le milieu MCC.

La production de l'endoglucanase (CMCase) a été observée après une inondation des boîtes avec 0,1% de rouge Congo (1 mg/ml) pendant 15 min. La solution de rouge Congo a été ensuite déversée et les boîtes ont été ensuite traitées par une inondation avec 1M de NaCl pendant 15 min. La dégradation de la cellulose a été visualisée sous forme d'une zone claire autour de la colonie fongique.

La production de cellobiohydrolase (MCCase) 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).

Le diamètre de la zone autour des colonies a été mesuré pour évaluer la production de l'endoglucanase et cellobiohydrolase (Kausar *et al.*, 2010).

3.1.3. Production des protéases

Les isolats de *Trichoderma* 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 de *Trichoderma* ayant une activité protéase démontrent une zone claire autour de la colonie (Berg *et al.*, 2002).

3.1.4- Production des amylases

La production de l'amylase par les isolats de *Trichoderma* 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.

3.1.5. 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) (Thomann *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).

3.1.6. Production des lipases

La production des lipases a été déterminée sur un milieu de culture contenant du Tween 20 (polyoxy-éthylène-sorbitan-monolaurate) comme un substrat lipidique (Annexe 1) (Abe *et al.*, 2015). Le Tween 20 a été autoclavé séparément et ajouté au milieu stérile avant de le couler dans les boîtes. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28 °C, les boîtes ont été incubées à 4°C pendant 12 h, avant la lecture des résultats (Hankin et Anagnostakis, 1975).

La production des lipases a été évaluée par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies.

3.2. Solubilisation des phosphates

La capacité des isolats de *Trichoderma* à solubiliser le phosphate a été testée sur un milieu Pikovskaya solide (PVK) (Annexe 1) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme seule source de phosphate insoluble (Pikovskaya, 1948).

Un disque de 6 mm issu de précultures de *Trichoderma*, a été déposé au centre de la boîte de Petri contenant le milieu PVK solide additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948).

Après 7 jours d'incubation à 28 °C, la solubilisation de P est traduite par l'apparition d'un halo autour des colonies. Les diamètres des colonies et de l'halo qui les entourent ont été mesurés. L'indice de solubilisation est ensuite calculé par le rapport du diamètre total (halo+colonie) et le diamètre de la colonie (Edi-Premono *et al.*, 1996).

3.3. Production des phytohormones (AIA)

La production de l'AIA est testée sur milieu liquide PDB additionné de tryptophane (5g/l) (Annexe 1) (Bric *et al.*, 1991). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures *Trichoderma* 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. un ml (1ml) du surnageant est additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl_3 à 0.5 M). La densité 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 dans un intervalle 0 à 10^{-3} M d'AIA (Annexe 4).

3.4. Analyses statistiques

Chaque expérience a fait l'objet de trois répétitions. Les analyses statistiques des résultats obtenus sont effectuées à l'aide d'un programme informatique Statistica 8 pour l'analyse de la variance (ANOVA) et les tests de corrélations entre les différents paramètres étudiés. Les résultats sont comparés en utilisant le test de Newman-Keuls à 5%.

4. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur FOC en pots

L'efficacité des *Trichoderma* induisant le pourcentage d'inhibition le plus élevé *in vitro*, a servi de critère de choix principal des antagonistes à tester *in vivo*. Pour être efficace, un isolat de *Trichoderma* doit en effet posséder non seulement une activité mycoparasitaire spécifique, mais aussi une bonne aptitude à la compétition saprophytique. Pour choisir judicieusement l'isolat, il faut pouvoir apprécier ce caractère d'une manière rapide et sûre (Davet et Camporota, 1986). C'est pourquoi nous avons choisi sur la base des critères de sélection (confrontation directe et à distance), effectuée *in vitro* sur milieu de culture, les trois (03) isolats *T. harzianum* (T5), *T. harzianum* (T14) et *T. koningii* (T10) comme les isolats les plus performants.

L'objectif de cette partie est :

- d'évaluer l'efficacité des isolats de *Trichoderma* les plus performants à protéger les plantes du pois chiche contre l'agent pathogène FOC en culture sur pots;
- d'étudier certains paramètres de développement végétatif du pois chiche.

4.1. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur FOC en pots

Sur la base de leur activité antagoniste démontrée *in vitro*, les trois isolats de *Trichoderma* les plus performants (T5, T10 et T14) ont été sélectionnés pour tester leur efficacité *in vivo*, en pots sur le flétrissement vasculaire du pois chiche causé par *F. oxysporum* f.sp *ciceris* (FOC). Le cultivar du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) ILC 482 est choisi sur la base de sa sensibilité vis-à-vis le FOC afin d'effectuer des inoculations artificielles. Les graines de ce cultivar ont été fournies par l'ITGC (Institut technique des grandes cultures) de Saïda.

4.2. Préparation de l'inoculum

Après une culture monospore, FOC a été ensemencé sur un milieu PDA et incubé à 25°C pendant 15 jours. Le contenu de chaque boîte a été broyé pendant 30 secondes dans

50 ml d'eau distillée stérile, ensuite, il a été filtré à travers une couche de papier filtre (Zaim *et al.*, 2013).

La concentration de la suspension en conidies (macro-et microconidies) du FOC a été ajustée par dilution avec de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de 10^6 conidies/ml, concentration qui s'était révélée suffisante pour provoquer la manifestation des symptômes de la maladie (Westerlund *et al.*, 1974).

Par la même technique la concentration de la suspension en conidies des isolats de *Trichoderma* sélectionnés (T5, T10 et T14) a été ajustée par dilution avec de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de 10^8 conidies/ml, concentration qui s'était révélée suffisante pour la protection (Bailey *et al.*, 2008).

4.3. Inoculation et traitement des graines

Des graines, du cultivar ILC 482, ont été désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes puis rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles (Belabid *et al.*, 2004).

Les graines ont subi des inoculations et/ou traitements comme suit :

1. inoculées par immersion dans une suspension conidienne de FOC pendant 30 min.
2. traitées par trempage dans une suspension conidienne pour chaque isolat de *Trichoderma* sélectionné pendant 30 min.
3. plongées dans un mélange (v/v) constitué d'une suspension de spores de FOC et de *Trichoderma* pour chaque isolat antagoniste sélectionné.
4. immergées dans l'eau distillée stérile (graines du témoin).

4.4. Semis des graines en pot

Des pots en plastique (20 cm de diamètre et 30 cm de hauteur), préalablement désinfectés par l'hypochlorite de sodium (2 %), ont été remplis par le substrat composé du mélange terre végétale – tourbe (2v : 1v) stérilisé à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C ; l'autoclavage a été répété 3 fois à 24 d'heures d'intervalle. En suite, un semis a été réalisé à raison de quatre graines par pot et 3 pots pour chaque traitement. Les pots ainsi préparés sont ensuite placés dans le laboratoire L.R.S.B.G de l'université de Mascara durant une période de 40 jours et arrosés une fois par semaine. Les plantules du pois chiche sont élevées dans les conditions suivantes :

- La photopériode est de 12 heures sous un flux énergétique fourni par des tubes fluorescents émettant une lumière blanche, disposés à une hauteur d'environ 75 cm au dessus des plantules ;
- La température: 25°C±2 le jour.
- L'humidité relative : 70 %.

Les 4 types de traitements étaient :

- (1) des graines saines (témoin) non infectées par FOC et non traitées par *Trichoderma* ;
- (2) des graines inoculées uniquement par FOC ;
- (3) des graines inoculées par FOC et traitées par *Trichoderma* spp. ;
- (4) des graines traitées uniquement par *Trichoderma* spp.

4.5. Évaluation de l'efficacité de *Trichoderma* spp. sur FOC *in vivo*

Des estimations de l'incidence (IM) et le pourcentage de réduction (RM) de la maladie des plantes inoculées par FOC et traitées avec *Trichoderma* spp. par rapport aux plantes inoculées uniquement par FOC ont été réalisés.

L'incidence de la maladie (IM) a été calculée par la formule suivante (Landa *et al.*, 1997):

$$IM (\%) = (\text{nombre de plantes infectées} / \text{nombre total de plantes}) \times 100$$

Le pourcentage de réduction de la maladie (RM) a été calculé en fonction de l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996) :

$$RM (\%) = [(A - B) / A \times 100]$$

Où : A est l'indice de gravité de la maladie dûe uniquement par FOC

B est l'indice de gravité de la maladie après une inoculation par FOC et un traitement par *Trichoderma*.

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par Landa *et al.* (1997) allant de 0 à 4 ; ce classement est basé sur le pourcentage de feuillage avec jaunissement ou nécrose. Cette échelle comprend :

- 0** = 0% (plantule saine) ;
- 1** = 1-33% (léger jaunissement) ;
- 2** = 34-66% (jaunissement important des feuilles) ;
- 3** = 67-100% (jaunissement avec nécrose) ;
- 4** = mort de la plantule.

4.6. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur les paramètres de développement végétatif de pois chiche

Après 40 jours de culture, les paramètres agronomiques liés au développement végétatif furent mesurés: la longueur de la tige et du système racinaire (LT et LR), le poids frais de la partie aérienne et des racines (PFP et PFR), le poids sec de la partie aérienne et des racines (PSP et PSR) ainsi que la finesse racinaire (FR). Les mesures ont été réalisées de la manière suivante :

- a- la longueur de la tige (LT ; en cm / plant):** Elle est mesurée à partir du collet jusqu'à l'extrémité supérieure des plants ;
- b- la longueur du système racinaire (LR ; en cm / plant):** le système racinaire des plantes de pois chiche a été soigneusement rincé à l'eau claire et séché avec du papier filtre. LR a été mesurée à partir du collet jusqu'à l'extrémité inférieure de la racine principale ;
- c- le poids frais de la partie aérienne et des racines (PFP et PFR ; en g / plant) :** la biomasse aérienne et souterraine des plants a été pesée à l'état frais.
- d - le poids sec de la partie aérienne et des racines (PSP et PSR ; en g / plant):** la biomasse aérienne et la masse racinaire des plantes, soigneusement rincées à l'eau et séchées avec du papier filtre, ont été pesées à l'état sec après séchage dans une étuve à 80 °C pendant 48 heures.
- e - la finesse racinaire (FR ; en cm/g):** le rapport de la longueur du système racinaire par le poids de la matière sèche des racines des plantes (Wilhelm *et al.*, 1982 cité par Ben Mebarek, 2011).

4.7. Analyse statistique

Toutes les données ont été statistiquement analysées à l'aide du logiciel Statistica, version 8.0. Une analyse de la variance a été d'abord effectuée (ANOVA) et, à chaque fois qu'il existe des différences significatives, les moyennes ont été classées par le test de Newman-Keuls (au seuil de 5%).

1. Obtention des isolats appartenant au du genre *Trichoderma* à partir de sols rhizosphériques du nord ouest Algérien

1.1 - Isolement et obtention d'isolats de *Trichoderma*

Les prélèvements effectués dans les quatre régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Mostaganem, Tlemcen et Oran nous ont permis de constituer une collection de 23 isolats appartenant au genre *Trichoderma*.

Le pourcentage d'isolements calculé pour chaque région, représente le nombre d'isolements positifs de *Trichoderma* rapporté au nombre d'isolements effectués. Les résultats obtenus montrent que *Trichoderma* est présent dans tous les sols rhizosphériques des régions prospectées. Le pourcentage d'isolement de ce champignon est variable et élevé, compris entre 83 et 100%. Cette différence de pourcentage est probablement dûe aux conditions édaphiques qui déterminent la spécificité de la région et le type de culture.

Au cours des isolements, le *Trichoderma* est le genre le plus fréquemment isolé sur le milieu sélectif TSM (Figure 12), avec des pourcentages d'abondance atteignant les 89,4 %. Cependant, d'autres champignons ont été aussi isolés et identifiés en particulier le *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* spp. avec des pourcentages respectifs de 5,3 %, 3,1 % et 2,2 %.

Onze (11) isolats de *Trichoderma* ont été isolés à partir des sols rhizosphériques issus de la région de Mascara, soit 47,82 % de la collection obtenue, 21,74 % à Oran et 17,39 % à Mostaganem. Par contre, la région de Tlemcen ne représente que 13,04 % de la collection (Figure 13).

PARTIE 3 : Résultats et discussion



Figure 12 : Développement des colonies de *Trichoderma* spp. sur le milieu de culture sélectif TSM après 3 jours d'incubation à 25°C.

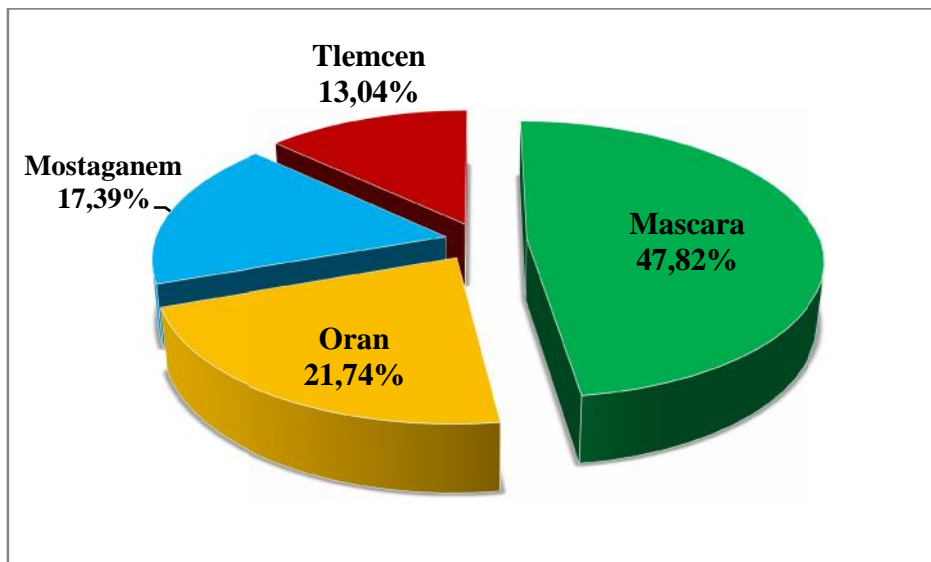


Figure 13: Répartition en pourcentage et par région de 23 isolats de *Trichoderma* spp. obtenus à partir de différents sols rhizosphériques

1.2 - Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de *Trichoderma*

Une étude morphologique de *Trichoderma* a porté sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du mycélium sur milieu PDA) ainsi que les caractéristiques biométriques des spores (conidies et chlamydo-spores).

Contrairement à beaucoup d'autres champignons pour lesquels l'aspect culturel de la colonie n'est pas pris en considération, l'expérience a montré qu'il n'en est pas de même pour les *Trichoderma* spp. C'est ce qui nous a amené au cours de nos isolements à retenir ce critère dans une première approche à l'identification des isolats.

Notons que l'aspect général d'une colonie, est déterminé par la couleur de la colonie, sa texture et enfin la présence de chlamydo-spores.

1.2.1- Caractérisation culturelle

Dans l'ensemble des essais réalisés, un seul morphotype mycéliens a été rencontré et qui se caractérise par un mycélium aérien, très abondant et vigoureux, épais et dense.

Les *Trichoderma* spp. se développent facilement *in vitro* avec un rythme de croissance élevé, la taille des colonies de *Trichoderma* spp. est relativement plus importante que celle du reste des espèces fongiques présentes dans les échantillons.

Macroscopiquement, le *Trichoderma* spp. est reconnu par sa façon cyclique de pousser sous forme de cercles concentriques réguliers. L'observation des caractères morphologiques des isolats n'a pas vraiment révélé une grande hétérogénéité au sein de ce genre. Les colonies sont légèrement floconneuses ou en touffes, à surface lisse, translucide ou blanc aqueux. Néanmoins, de nombreux types intermédiaires existent entre ces deux extrêmes, sachant que les deux aspects peuvent exister chez la même colonie. La couleur des colonies varie du vert foncé à jaunâtre ou jaune.

A travers cette étude, nous avons noté également la présence des zonations chez tous les isolats sauf l'isolat T11 de la région de Mascara.

1.2.2- Caractéristiques biométriques des spores

Les isolats de *Trichoderma* spp. présélectionnés selon les critères macroscopiques sont observés sous microscope optique pour confirmation. Nous avons recherché un mycélium constitué d'hyphes ramifiés à parois lisses et hyalines, portant des conidiophores de forme

PARTIE 3 : Résultats et discussion

conique ou pyramidale ainsi que des phialides en forme de quilles ou de flasques, spécifique du genre *Trichoderma*. Les phialides portent à leur extrémité des phialospores de forme ovoïde ou ellipsoïdale en général. Ces caractères nous ont permis d'identifier les isolats de *Trichoderma* spp. au niveau du genre uniquement.

Par ailleurs, nous avons pu identifier trois espèces de *Trichoderma*, à savoir le *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum*. L'espèce la plus dominante de la collection appartient à *T. harzianum* (65,21 %), isolée de sols rhizosphériques prélevés des quatre régions.

Les mensurations des conidies, phialides et chlamydospores produites par les isolats de *Trichoderma* figurent dans le tableau 3.

- ***Trichoderma harzianum*** Rifai (Figure 14) :

Le thalle est tout d'abord blanc puis vert-olive dans les régions sporogènes. Le revers est incolore. Les conidiophores sont très ramifiés. Les conidies sont globuleuses, lisses et vertes d'une taille de 2,8 - 3 x 2,4 - 2,8 μm . Les phialides sont puliformes, d'une dimension de 5 - 5,6 x 3 - 3,4 μm et en groupes de 2 à 3. Les chlamydospores sont globuleuses et hyalines, leurs diamètres sont de 7 à 10 μm (Tableau 3).

- ***Trichoderma koningii*** Oud (Figure 15):

Le thalle est d'une couleur d'abord blanche puis verdâtre et enfin vert foncé, zonée. Les conidiophores sont très ramifiées, formant un ensemble pyramidal, les phialides sont en forme de quille, de dimension de 7,8-9,6 x 2,8-3,5 μm et souvent en groupes de 3. Les conidies sont elliptiques ou oblongues, 3,5 - 4 x 2,2 - 2,8 μm , lisses et vertes. Les chlamydospores sont globuleuses à elliptiques, atteignant jusqu'à 12 μm (Tableau 3).

- ***Trichoderma longibrachiatum*** Rifai (Figure 16) :

Le thalle est d'une couleur verte jaunâtre avec un revers jaune. Les phialides qui sont dans la plupart du temps solitaires, cylindriques et coniques au cou, mesurent 6 - 11,5 x 2,5 - 3 μm . Les conidies sont lisses et ellipsoïdes d'une taille de 4 - 6,2 x 2,4 - 3 μm . Les chlamydospores sont communes, terminales apparaissant ovales à globuleuses ou intercalaires et cylindriques à gonflées, leur diamètre est de 8 à 10 μm .

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 3 : Isolats de *Trichoderma* obtenus à partir de différents échantillons de sols rhizosphériques.

Origine (région)	Isolats de <i>Trichoderma</i>	Espèce	Mensurations (µm)		
			Conidies	Phialides	Chlamydo-spores
Mascara (11 isolats)	T 1	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,4 - 2,6	5,1 - 5,5 x 3 - 3,4	9,6
	T 2	<i>T. harzianum</i>	3 x 2,4 - 2,8	5 - 5,3 x 3 - 3,4	8 - 10
	T 3	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 2,9 x 2,4 - 2,8	5 - 5,6 x 3 - 3,4	8,2 - 9,8
	T 4	<i>T. harzianum</i>	2,9 - 3 x 2,5 - 2,7	5,2-5,5 x 3-3,4	8 - 10
	T 5	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,6 - 2,8	5,1 - 5,5 x 3 - 3,4	8,5 - 10
	T 6	<i>T. koningii</i>	3,5 x 2,2 - 2,8	7,8-9,5 x 3-3,4	12
	T 7	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,5	5 - 5,3 x 3 - 3,4	7,8 - 10
	T 8	<i>T. longibrachiatum</i>	4,2 - 6,2 x 2,5 - 3	7 - 10,4 x 2,5 - 3	10
	T 9	<i>T. longibrachiatum</i>	4 - 6 x 2,4 - 2,9	6 - 11,3 x 2,5 - 3	8 - 9,5
	T 10	<i>T. koningii</i>	3,8 x 4 - 2,8	8 - 9,6 x 3 - 3,5	11,8
	T 11	<i>T. longibrachiatum</i>	4 - 6,2 x 2,4 - 3	6 - 11,5 x 2,5 - 3	8,5 - 9,8
Mostaganem (4 isolats)	T 12	<i>T. harzianum</i>	3 x 2,4 - 2,8	5,2-5,6 x 3,2- 3,4	9,3 - 9,8
	T 13	<i>T. harzianum</i>	2,9 - 3 x 2,4 - 2,8	5 - 5,4 x 3,2 - 3,4	10
	T14	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,4 - 2,6	5 - 5,6 x 3 -3,4	9,6
	T15	<i>T. koningii</i>	3,5 - 4 x 2,2 - 2,8	7,8 - 9,4 x 3 - 3,5	12
Tlemcen (3 isolats)	T 16	<i>T. harzianum</i>	2,9 x 2,4 - 2,8	5,2 - 5,6 x 3 - 3,4	7,2 - 9
	T 17	<i>T. T. koningii</i>	3,8 - 4 x 2,2 - 2,8	7,8-9,6 x 2,8-3,5	11,6
	T 18	<i>T. harzianum</i>	3 x 2,4 - 2,6	5 - 5,6 x 3 - 3,4	8 - 10
Oran (5 isolats)	T 19	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,4 - 2,8	5,1 - 5,5 x 3 - 3,4	7,8 - 9
	T 20	<i>T. T. koningii</i>	3,1 - 3,2 x 2,4 - 2,8	5,1 - 5,5 x 3 - 3,5	7,3 - 8,1
	T 21	<i>T. harzianum</i>	3 x 2,5 - 2,8	5 - 5,5 x 3 - 3,4	7,8 - 10
	T 22	<i>T. harzianum</i>	2,8 - 3 x 2,5 - 2,8	5,2 - 5,6 x 3 - 3,4	8 - 9,2
	T 23	<i>T. harzianum</i>	2,9 - 3 x 2,4 - 2,8	5 - 5,4 x 3,2 - 3,4	7 - 8,3

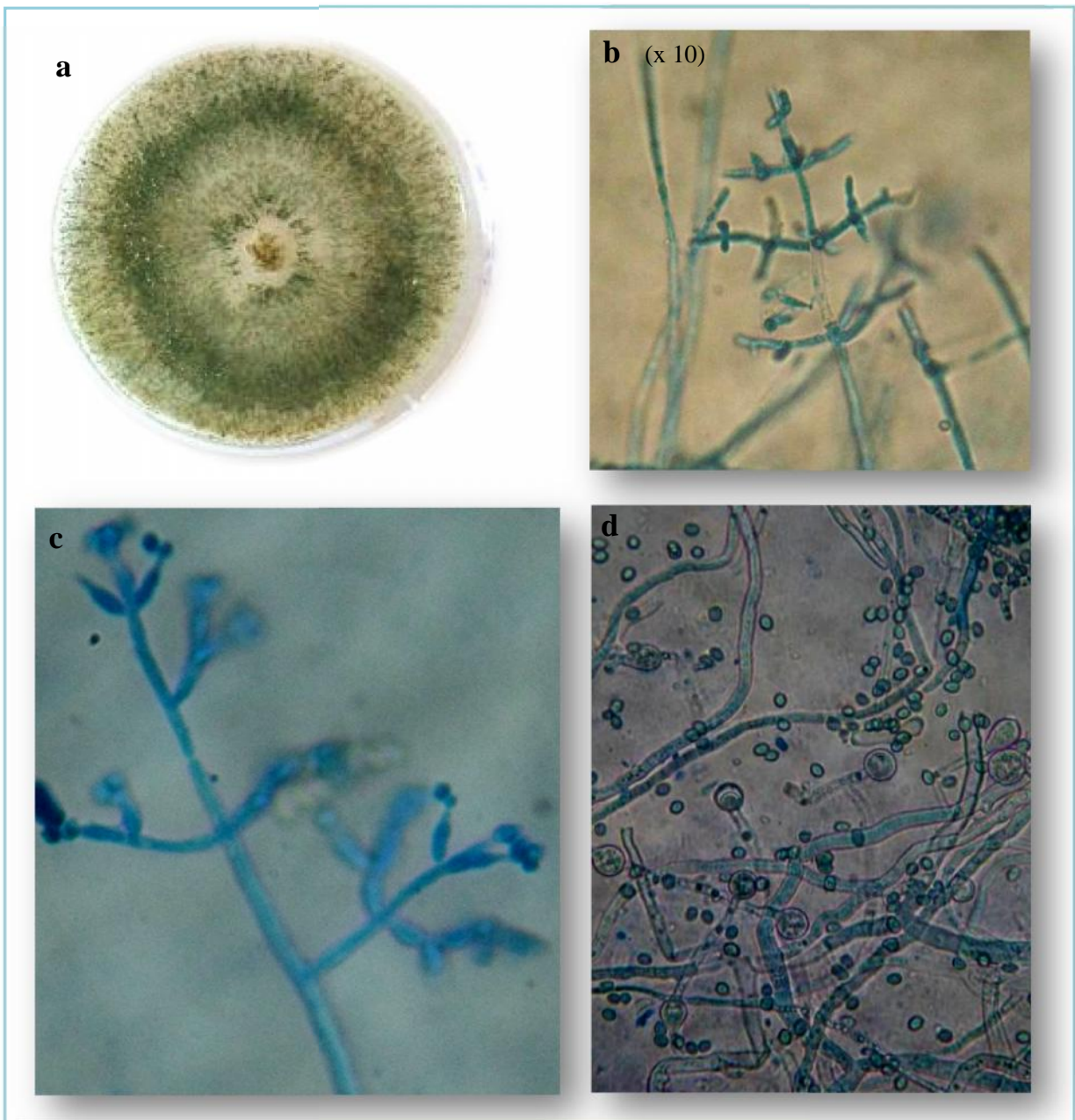


Fig. 14: Morphologie (a), conidiophores (b et c), spores et chlamydospores (d) de *Trichoderma harzianum*

(a) Aspect macroscopique sur milieu PDA après 6 jours d'incubation à 25°C

(c) détaille de phialides contenant des phialospores (x 100)

(d) chlamydospores terminales et intercalaires (x 40)

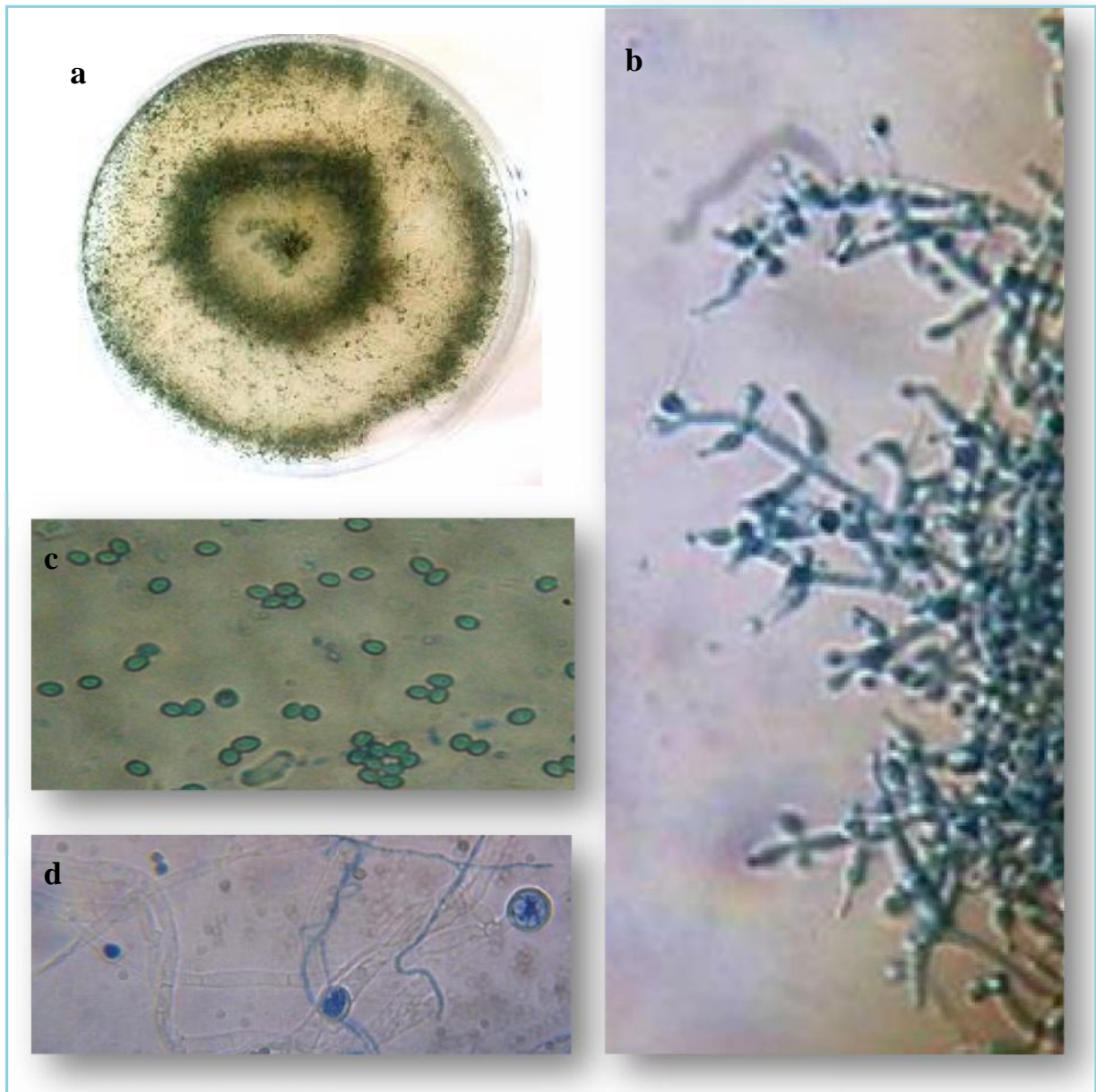


Fig. 15: Aspect macroscopique (a) et microscopique (b, c, d) de *Trichoderma koningii*.

b- Conidiophores (x 40), **c-** Phialospores (x 100),
d- Chlamydospores terminales et intercalaires (x 40).

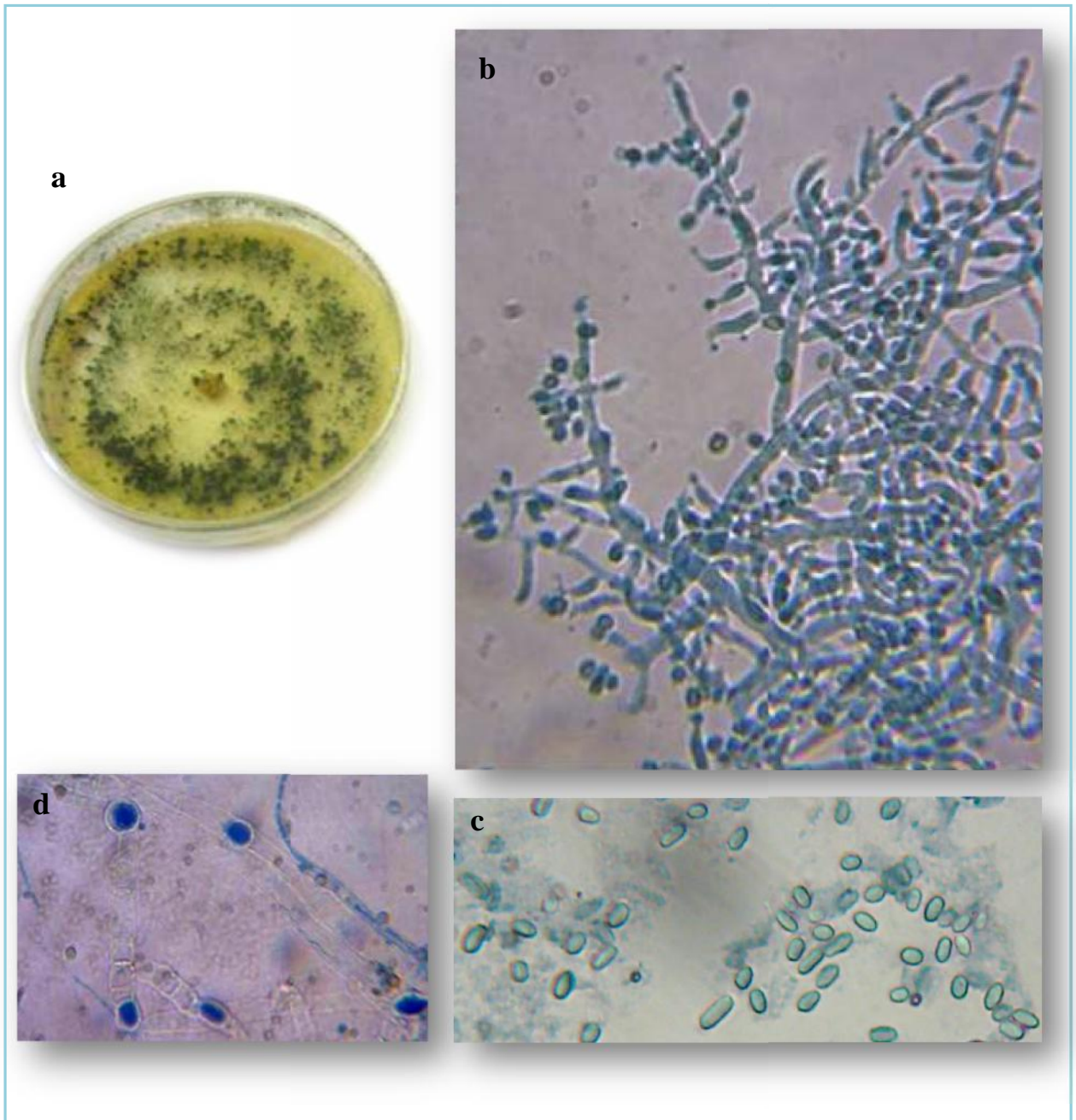


Fig. 16: Aspect macroscopique (a) et microscopique (b, c, d)

de *Trichoderma longibrachiatum*

b- Conidiophores (x 40), **c-** Phialospores (x 100), **d-** Chlamydospores terminales et intercalaires (x 40).

1.3- Identification moléculaire

L'identification morphologique de l'isolat T5 a été confirmée par une identification moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS et du gène *tef 1* de l'ADN ribosomale. Il a été identifié comme étant une espèce de *Trichoderma harzianum*.

Après une amplification par PCR de la région ITS1/ITS4 et du gène *tef 1*, le résultat est révélé par électrophorèse sur gel d'agarose de 1 % (Figure 17). L'amplification a montré une seule bande d'environ 600 pb.

Les séquences d'ADN (Annexe 2) de la région ITS et du gène *tef 1* élaboré par le laboratoire du département de microbiologie et de génétique de l'université de Salamanca, Espagne, ont été comparées avec celles d'autres organismes de 3 bases de données : NCBI, l'ENA et le programme *TrichoKEY* pour l'identification moléculaire de *Trichoderma* et *Hypocrea*.

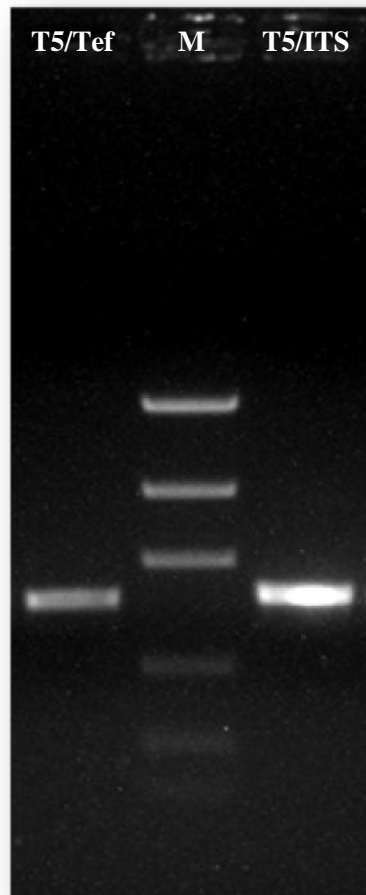


Figure 17 : Profil d'amplification par PCR d'ADNr de la région ITS et du gène *Tef 1* de la souche de *Trichoderma harzianum* T5 utilisant des amorces différentes ITS1/ITS4 et EF1-728F/*tef1*-rev (M : marqueur de poids)

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Les séquences obtenues, ont été déposées sur la base de données nucléotidiques internationales NCBI GenBank. Les deux numéros d'accèsion KX523899 et KX674063 ont été attribués aux séquences de l'ADNr obtenues de la région ITS1/ITS4 et du gène *tef 1* respectivement (Annexe 2).

L'analyse des séquences des souches fongiques de ces banques a permis de confirmer et d'affilier notre souche (T5) à l'espèce *Trichoderma harzianum* qui a montré une similarité de 100% avec les souches publiées sous les numéros d'accèsion KR995120, KT715705, KP985636 et AY605716 (Figure 18).

1. 4. Discussion

L'ensemble de nos échantillons de sols rhizosphériques, prélevés de quatre régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Mostaganem, Tlemcen et Oran, nous a fourni 23 isolats présumés de *Trichoderma* spp., où nous avons sélectionné par leurs aspects microscopiques, macroscopiques et culturels.

Les *Trichoderma* se trouvent communément dans diverses niches écologiques. La majorité des espèces de ce genre sont ubiquistes (Harman *et al.*, 2004).

Les 23 isolats de *Trichoderma* ont été isolés à partir des rhizosphères de cultures différentes : la pomme de terre, le blé, le pois chiche, le pois, la carotte et l'oignon. La plupart des recherches qui impliquent l'isolement et l'identification des souches de *Trichoderma* à partir de divers champs cultivés, agricoles et/ou horticoles, dans différentes zones agro-climatiques ont été effectués afin de les évaluer pour leurs potentiels de lutte biologique contre divers agents phytopathogènes (Kredics *et al.*, 2014). Par conséquent, un nombre limité d'études traitent l'abondance et la diversité de la population du genre *Trichoderma* dans les champs de cultures spécifiques ou les agroécosystèmes. *Trichoderma* spp. est avéré être parmi les champignons qui dominent différentes rhizosphères telles que celles des céréales incluant le blé (Liang *et al.*, 2004 ; Gherbawy *et al.*, 2004 ; Kredics *et al.*, 2012) ainsi que celles de la pomme de terre (Meincke *et al.*, 2010), l'oignon (Bourguignon, 2008), le pois chiche (Singh *et al.*, 2014).

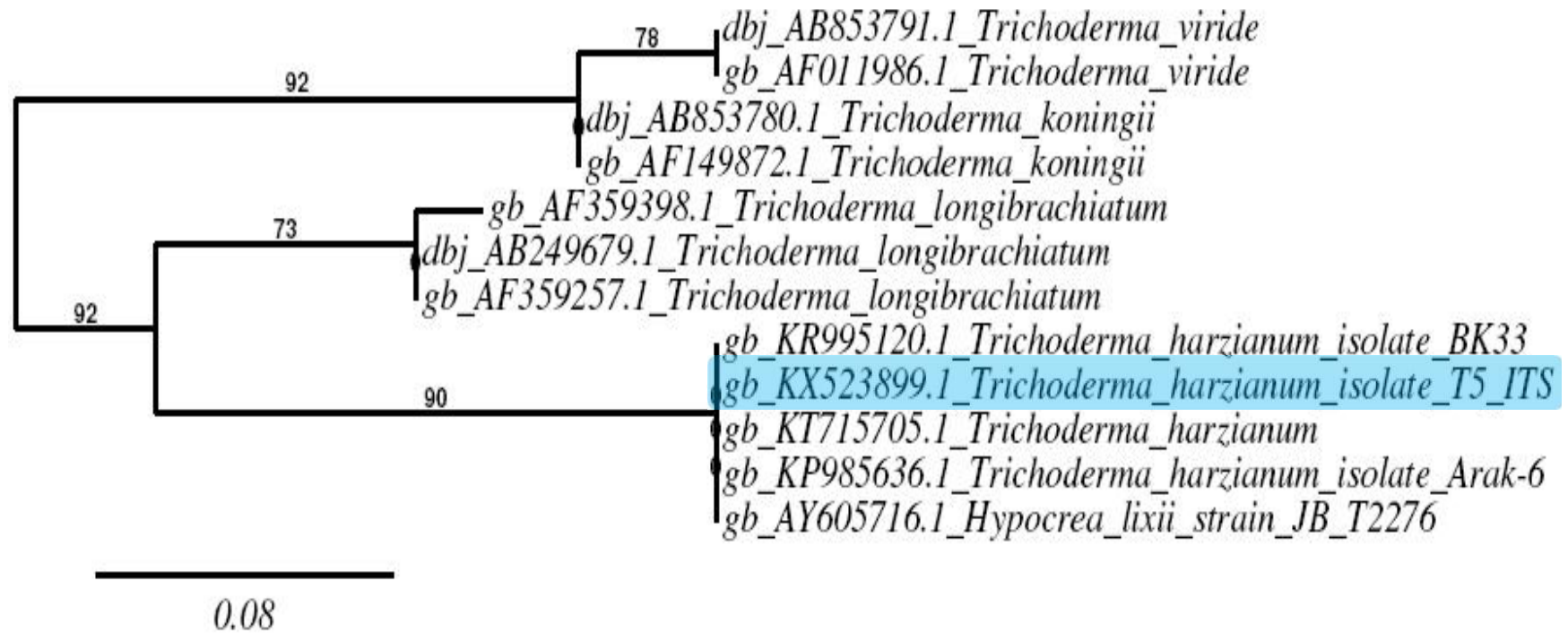


Fig. 18: Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr de la souche T5 (KX523899) et de certaines souches phylogénétiquement proches (souches validement publiées). Les nombres sur l'arbre indiquent les pourcentages des dérivés de répliqués

Les *Trichoderma* spp. se caractérisent par une croissance rapide *in vitro* en comparaison avec le reste des espèces fongiques présentes dans les échantillons (Kubicek *et al.*, 2003).

Papavizas et Lumsden (1980), ont signalé la présence de *Rhizopus sp* et *Mucor sp* lors de l'isolement de l'agent de lutte biologique *Trichoderma*. D'après Elad et Chet (1983), *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. peuvent exister ensemble dans le même écosystème.

Cependant, il nous a été possible et davantage d'isoler de nombreux isolats de *Trichoderma* sur le milieu de culture TSM. L'adjonction de rose Bengale au milieu inhibe le développement des bactéries et ralentit la croissance des espèces fongiques à croissance rapide comme les mucorales (Mueller *et al.*, 2004). Il est recommandé d'incuber les milieux contenant du rose Bengale à l'obscurité car ce dernier se décompose à la lumière et peut devenir toxique pour certaines espèces fongiques.

L'étude morphologique des isolats obtenus a porté sur la mensuration des conidies, phialides et chlamydospores ainsi que l'aspect cultural de la croissance des colonies en milieu PDA (couleur, texture et présence ou absence de chlamydospores). Quant au critère aspect cultural défini par la texture et la couleur, nous n'avons pas pu relever des différences entre les isolats, en revanche, la couleur des colonies semble virer de vert - olive à vert foncé. S'agissant de la texture des colonies de *Trichoderma*, celle ci peut varier d'une espèce à une autre, avec présence ou absence de zonations.

Nous avons pu identifier phénotypiquement trois espèces appartenant au genre *Trichoderma* : *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum*. Les trois espèces peuvent coexister dans le même habitat (Naeimi *et al.*, 2011). Cependant, l'identification précise, des espèces basées sur la morphologie, est difficile en raison de la similitude des caractères morphologiques (Druzhinina *et al.*, 2005 ; De Respinis *et al.*, 2010). Par conséquent, avec l'approche des méthodes moléculaires et les outils d'identification basés sur l'analyse des séquences de multiples gènes, il est maintenant possible d'identifier les *Trichoderma* et même d'identifier des nouvelles espèces (Samuels, 2006 ; Kubicek *et al.*, 2008). L'identification phénotypique de l'isolat *T. harzianum* T5 a été confirmée par une identification phylogénique.

Trichoderma a été classé par Rifai (1969), dans neuf espèces agrégées, basé sur la description morphologique et la croissance des colonies, dans la recherche pour qu'un système plus utile pour différencier les espèces phénotypiquement semblables, le genre a été révisé par Domsch *et al.* (1980), Bissett (1984) et Samuels (2006).

En effet, en étudiant le genre *Trichoderma*, Rifai (1969) a trouvé que les mensurations des conidies varient considérablement d'une espèce à une autre. Ainsi, il a remarqué que chez le *T. harzianum*, les mensurations des conidies sont de $2,8 - 3,2 \times 2,5 - 2,8 \mu\text{m}$, alors qu'elles sont de $3,5 \times 2 - 2,8 \mu\text{m}$ chez *T. koningii* et $3,6 - 6,5 \times 2,2 - 3 \mu\text{m}$ chez *T. longibrachiatum*. Le même auteur a noté que les mensurations des phialides sont $5 - 7 \times 3 - 3,5 \mu\text{m}$ pour le *T. harzianum*, alors qu'elles sont de $7,5 - 12 \times 2,5 - 3,5 \mu\text{m}$ chez *T. koningii* et $6 - 14 \times 2,5 - 3 \mu\text{m}$ chez *T. longibrachiatum*. Quant au diamètre des chlamydospores, il semble varié très peu d'une espèce à une autre. Rifai (1969) a trouvé que pour le *T. harzianum*, le diamètre des chlamydospores est de $6 - 12 \mu\text{m}$, alors qu'il est de $12 \mu\text{m}$ chez *T. koningii* et $10 \mu\text{m}$ chez *T. longibrachiatum*.

Les chlamydospores sont des spores accessoires viables, produites de façon asexuée résultant d'une modification structurelle du secteur des hyphes végétatifs ou de la cellule conidienne possédant une paroi épaisse, principalement produite pour la survie dans le sol et consistant principalement dans la paroi cellulaire nouvellement synthétisée (Schippers et Van Eck, 1981).

1. 5. Conclusion

Dans notre étude, *Trichoderma* a été isolé à partir de la rhizosphère de cultures différentes prélevées de 4 régions du nord-ouest Algérien. Trois espèces ont été identifiées phénotypiquement : *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum*. La souche T5 a fait l'objet d'une identification moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS et du gène *tef 1* de l'ADNr et elle a été confirmée comme étant *Trichoderma harzianum* enregistrée sur la banque des données NCBI GenBank sous les deux numéros d'accès KX523899 (région ITS) et KX674063 (gène *tef 1*).

Le pouvoir antagoniste des 23 isolats de *Trichoderma* obtenus vis-à-vis quatre champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* est étudié dans le chapitre suivant dans le but de sélectionner les isolats les plus performants.

2. Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis des *Fusarium* phytopathogènes «*in vitro*»

2.1 - Confrontation directe sur milieu de culture entre les pathogènes et les isolats de *Trichoderma* spp.

Le repiquage simultané des isolats de *Trichoderma* spp. et des isolats de *Fusarium* a montré une croissance plus rapide de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats phytopathogènes. La confrontation a eu lieu en tenant compte de la vitesse de croissance des champignons pathogènes testés.

Les isolats de *Fusarium* n'occupent qu'une croissance diamétrale allant de 9 à 45 mm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 52,85 % à 86,48 %, selon l'isolat testé (Tableau 4). Cette étude a mis en évidence l'effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* testés sur les quatre espèces de *Fusarium* et qui ont montré un pouvoir antagoniste important supérieur à 52%.

L'évaluation du potentiel antagoniste de 23 isolats de *Trichoderma* a montré que trois isolats (*T. harzianum* T5, *T. harzianum* T14 and *T. koningii* T10) sont les isolats les plus performants en raison de leur capacité d'inhibition de la croissance mycélienne des quatre isolats de *Fusarium* à plus de 78% (Tableau 4, Figure 19, 20, 21 et 22). Un taux d'inhibition de 86,48% a été enregistré par la souche *T. harzianum* (T5) et qui est nettement supérieur à celui exhibé par les autres isolats.

Le pourcentage minimum d'inhibition a été enregistré par l'isolat *T. harzianum* (T4) (52,85%) vis-à-vis de *F. solani*.

Les figures 19, 20, 21 et 22 représentent l'effet inhibiteur exercé par les 23 isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des 4 isolats de *Fusarium* après six jours d'incubation à 25°C.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 4 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* par confrontation directe avec les 23 isolats de *Trichoderma*.

Isolats de <i>Trichoderma</i>		Inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> (%)				Moyenne ^a
		FOA	FOL	FOC	FS	
T1	<i>T. harzianum</i>	84,23	65,06	77,91	72,85	75,01 ^{bcdef}
T2	<i>T. harzianum</i>	70,27	55,42	56,61	54,28	59,14 ^{ghi}
T3	<i>T. harzianum</i>	82,97	78,31	80	78,10	79,84 ^{ab}
T4	<i>T. harzianum</i>	66,66	53,01	64,03	52,85	59,13 ^{ghi}
T5	<i>T. harzianum</i>	86,48	80,72	84,66	85,71	84,39 ^a
T6	<i>T. koningii</i>	75,67	69,87	79,16	78,10	75,70 ^{abcde}
T7	<i>T. harzianum</i>	77,02	65,06	59,26	65,71	66,76 ^{efghi}
T8	<i>T. longibrachiatum</i>	79,72	69,87	78,84	75,71	76,03 ^{abcde}
T9	<i>T. longibrachiatum</i>	78,78	67,46	78,84	73,81	74,72 ^{bcdef}
T10	<i>T. koningii</i>	82,97	78,31	84,12	80	81,35 ^{ab}
T11	<i>T. longibrachiatum</i>	74,32	61,44	75,66	60	67,85 ^{defgh}
T12	<i>T. harzianum</i>	81,08	72,28	78,31	76,10	76,94 ^{abcd}
T13	<i>T. harzianum</i>	81,21	75,90	78,31	75,71	77,78 ^{abc}
T14	<i>T. harzianum</i>	84,23	79,51	84,12	82,85	82,67 ^{ab}
T15	<i>T. koningii</i>	75,67	61,44	80,83	59,52	69,36 ^{cdefg}
T16	<i>T. harzianum</i>	74,32	59,03	71,42	55,71	65,12 ^{ghi}
T17	<i>T. koningii</i>	79,72	77,10	77,25	67,14	75,30 ^{bcdef}
T18	<i>T. harzianum</i>	74,32	59,03	75	57,14	66,37 ^{fghi}
T19	<i>T. harzianum</i>	77,02	65,06	75,66	65,71	70,86 ^{cdefg}
T20	<i>T. koningii</i>	75,67	63,85	73,55	63,81	69,22 ^{cdefg}
T21	<i>T. harzianum</i>	72,97	57,83	61,90	54,28	61,74 ^{ghi}
T22	<i>T. harzianum</i>	75,67	61,44	75,66	61,91	68,67 ^{cdefg}
T23	<i>T. harzianum</i>	71,62	55,42	66,66	55,71	62,35 ^{ghi}
Moyenne		77,50	66,62	74,68	67,50	71,58

FOA: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* – FOL : *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
– FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* – FS: *Fusarium solani*

les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

^b au niveau de chaque ligne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P < 0.05$) (Annexe 3).

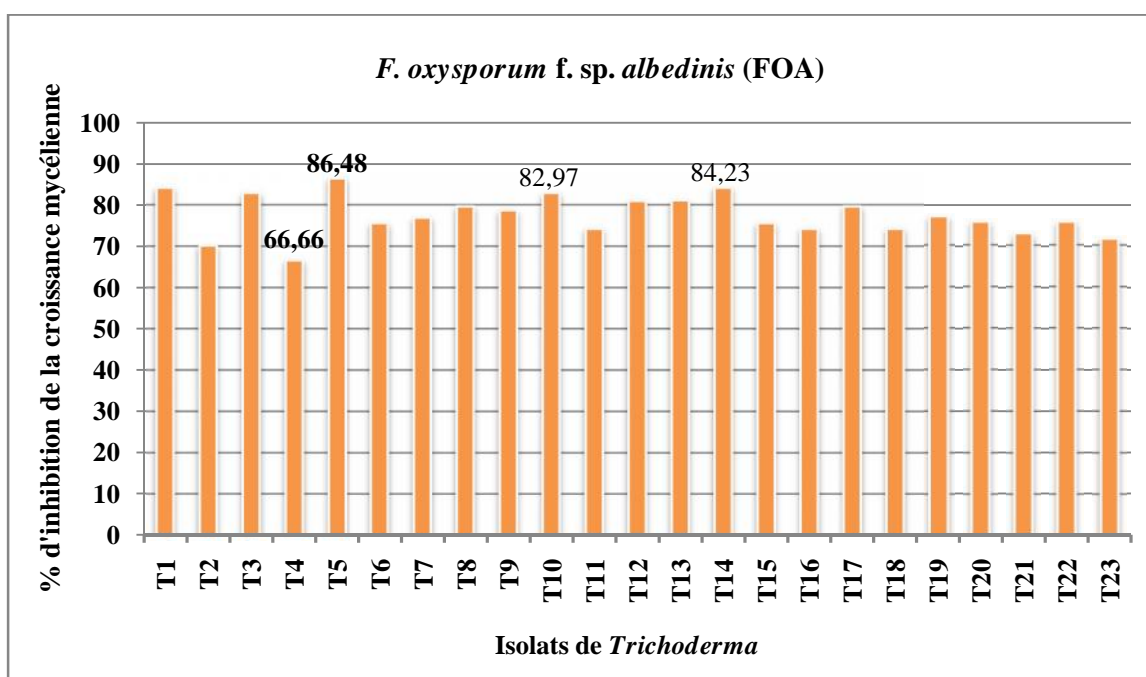


Fig. 19 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOA par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25 °C.

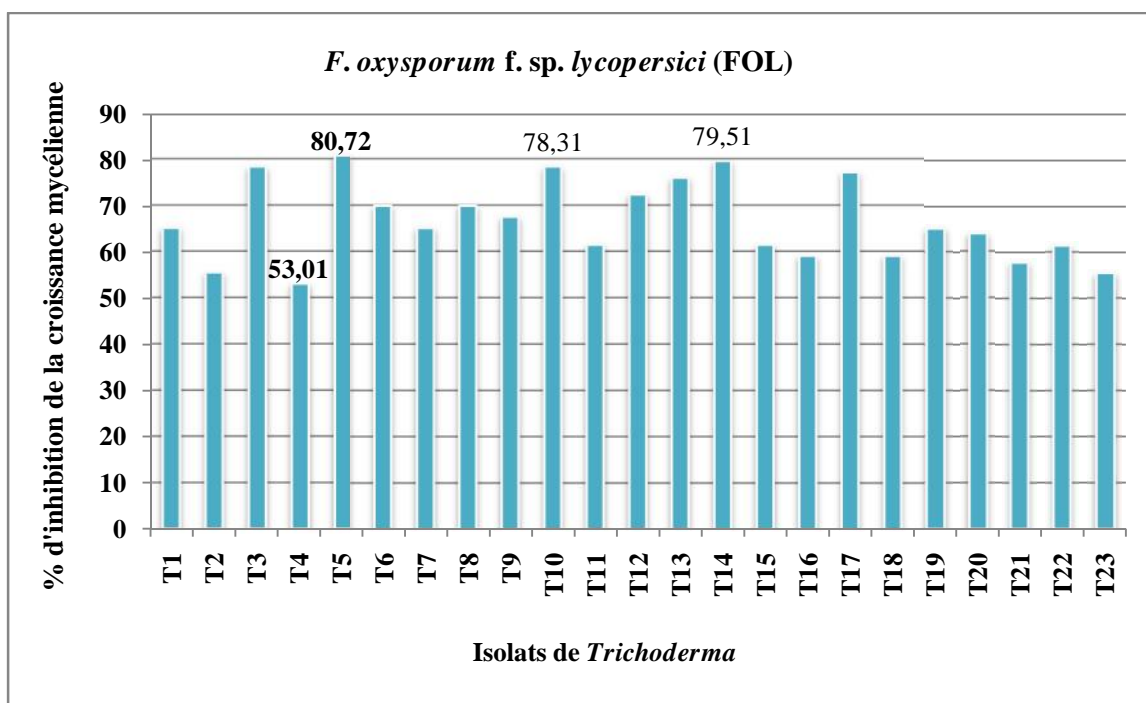


Fig. 20 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOL par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25 °C.

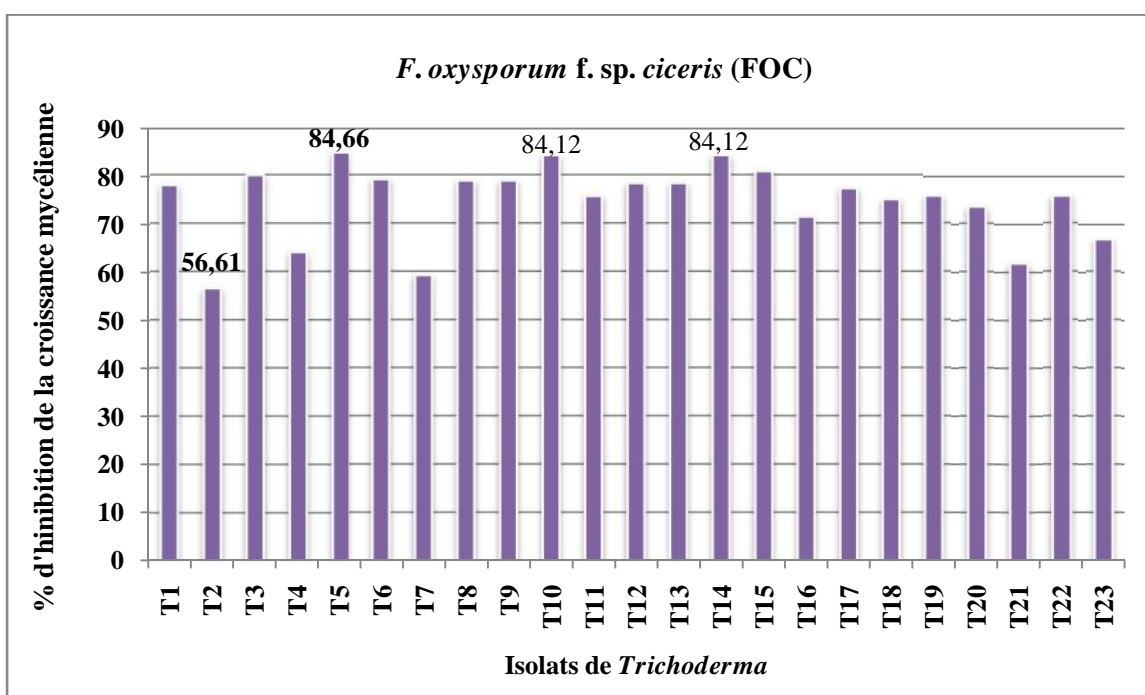


Fig. 21 : Pourcentage d’inhibition de la croissance mycélienne de FOC par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d’incubation à 25 °C.

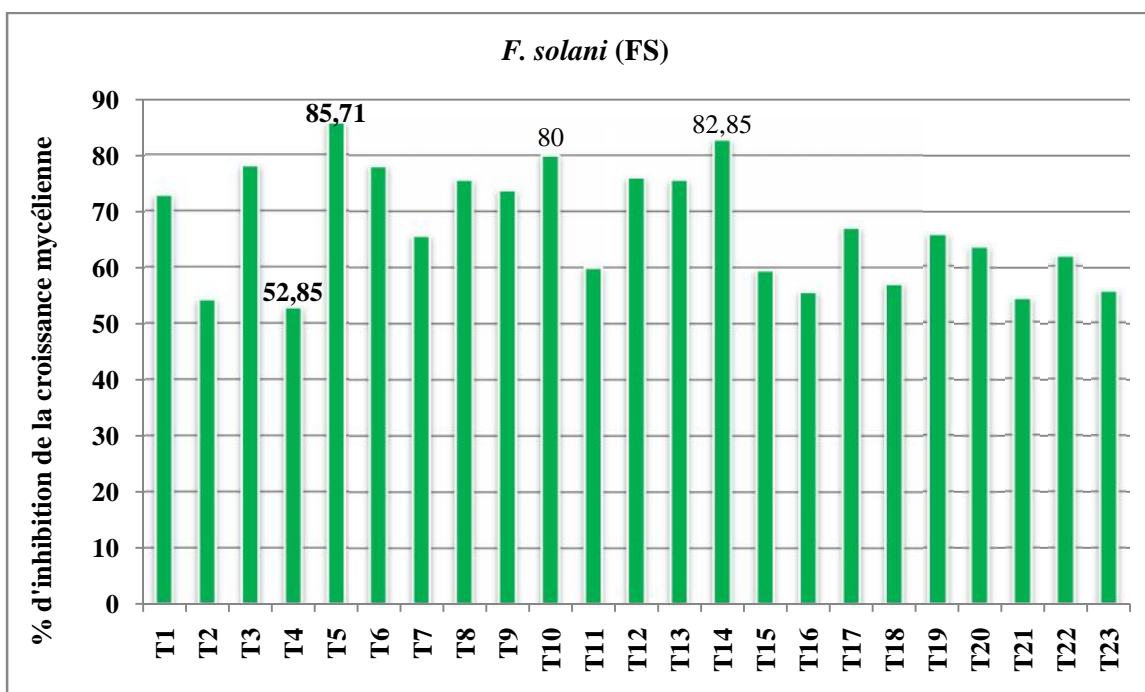


Fig. 22 : Pourcentage d’inhibition de la croissance mycélienne de FS par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d’incubation à 25 °C.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Au delà d'une période de six jours, les isolats de *Trichoderma* spp. envahissent les colonies de *Fusarium* et sporulent même sur celles-ci, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. L'envahissement de *Trichoderma* a été rapide et intense (Figure 23 et 24). Il semble qu'il existe un certain tropisme qui mène les hyphes de *Trichoderma* à l'encontre des spores du parasite.

Certains isolats de *Trichoderma* confrontés avec *Fusarium* ont montré une coloration jaunâtre diffusible dans le milieu de culture après 6 jours d'incubation (Figure 23).

Une surcroissance des hyphes de *Trichoderma* (Figure 24) accompagnée d'une sporulation en masse (Figure 25), sous forme de pustules hémisphériques, sur les hyphes de *Fusarium* dans la zone de contact ont été observées dès le 4^{ème} jour de confrontation.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre *Fusarium* et *Trichoderma*, montrent un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sur celui du *Fusarium* (Figure 26) et parfois nous notons chez certains isolats de *Trichoderma* que leur hyphe croît fréquemment en parallèle avec celui du pathogène et s'attache au mycélium de l'hôte par des appressoriums qui lui permette la pénétration (Figure 27).

Les observations montrent également une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une lyse importante (Figure 28), une vacuolisation (Figure 29), une présence de petites vésicules avec une fuite du contenu cytoplasmique (Figure 28 et 30) et une coagulation du cytoplasme (Figure 31).

La production des chlamydo-spores a été stimulée chez le pathogène dès le 3^{ème} jour de la confrontation par l'ensemble des isolats de *Trichoderma* (Figure 32).

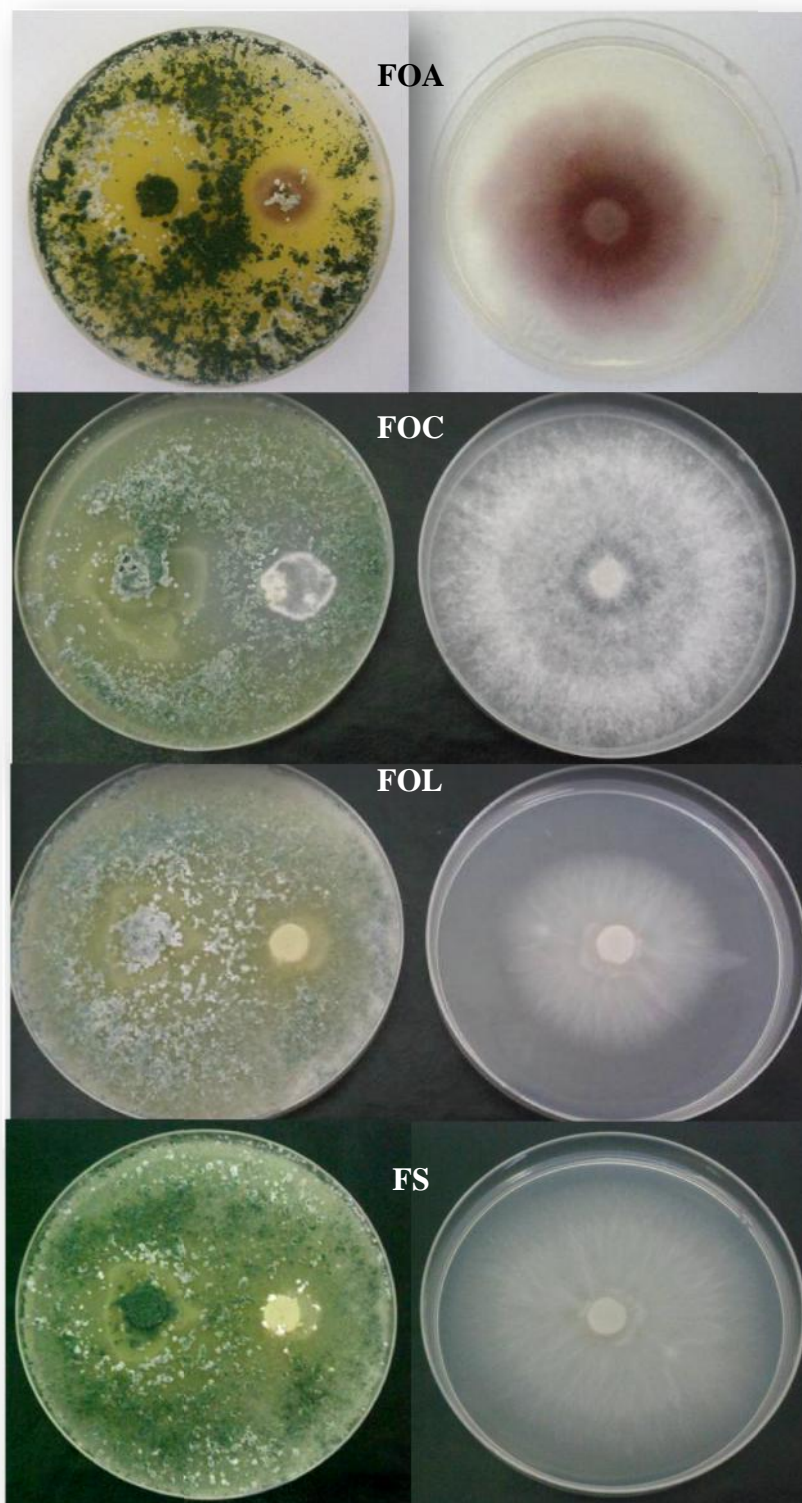


Fig. 23: Inhibition de la croissance mycélienne des *Fusarium*, en comparaison avec leur témoin, par confrontation directe avec *Trichoderma* après 6 jours d'incubation à 25°C

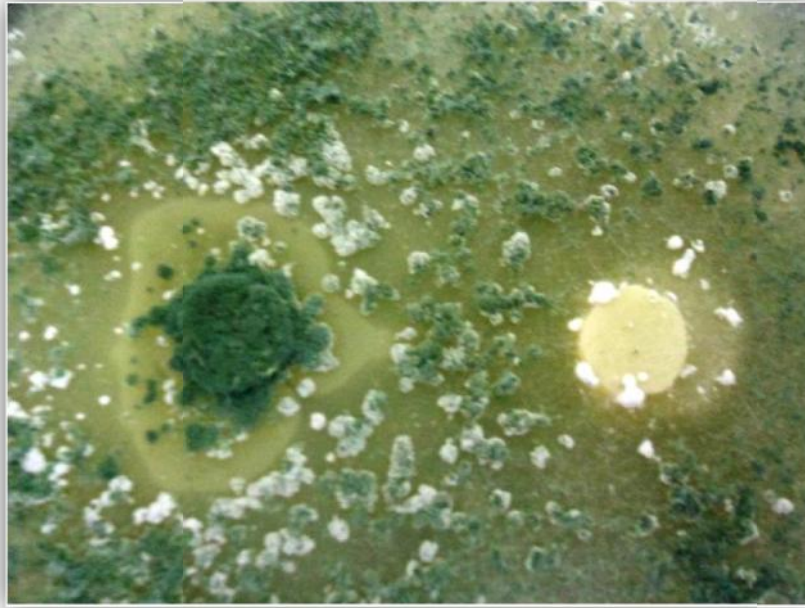


Fig. 24: Action mycoparasitaire de l'isolat *T. harzianum* (T5) montrant une surcroissance et une sporulation abondante sur la colonie *F. solani*.

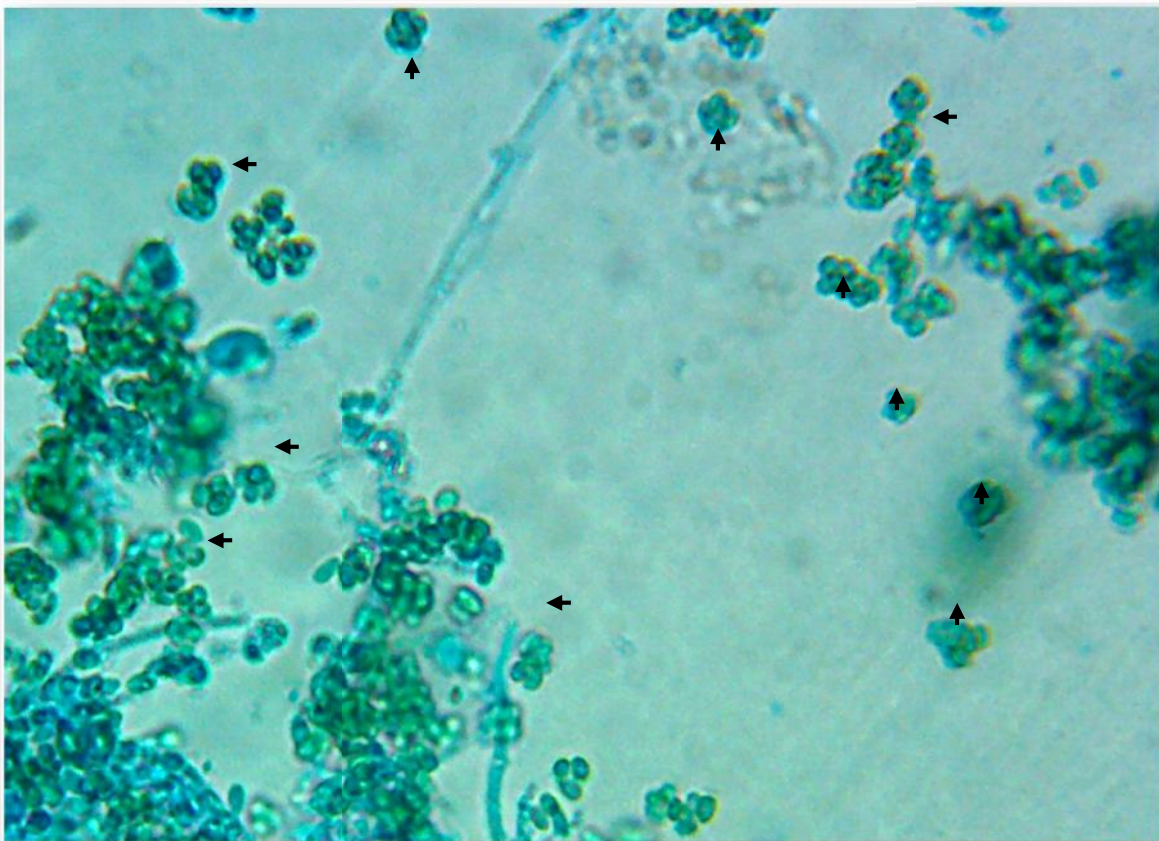


Fig. 25: Sporulation en masse, sous forme de pustules hémisphériques, de *T. harzianum* (T5) sur les hyphes de *F. oxysporum* dans la zone de contact (40X)

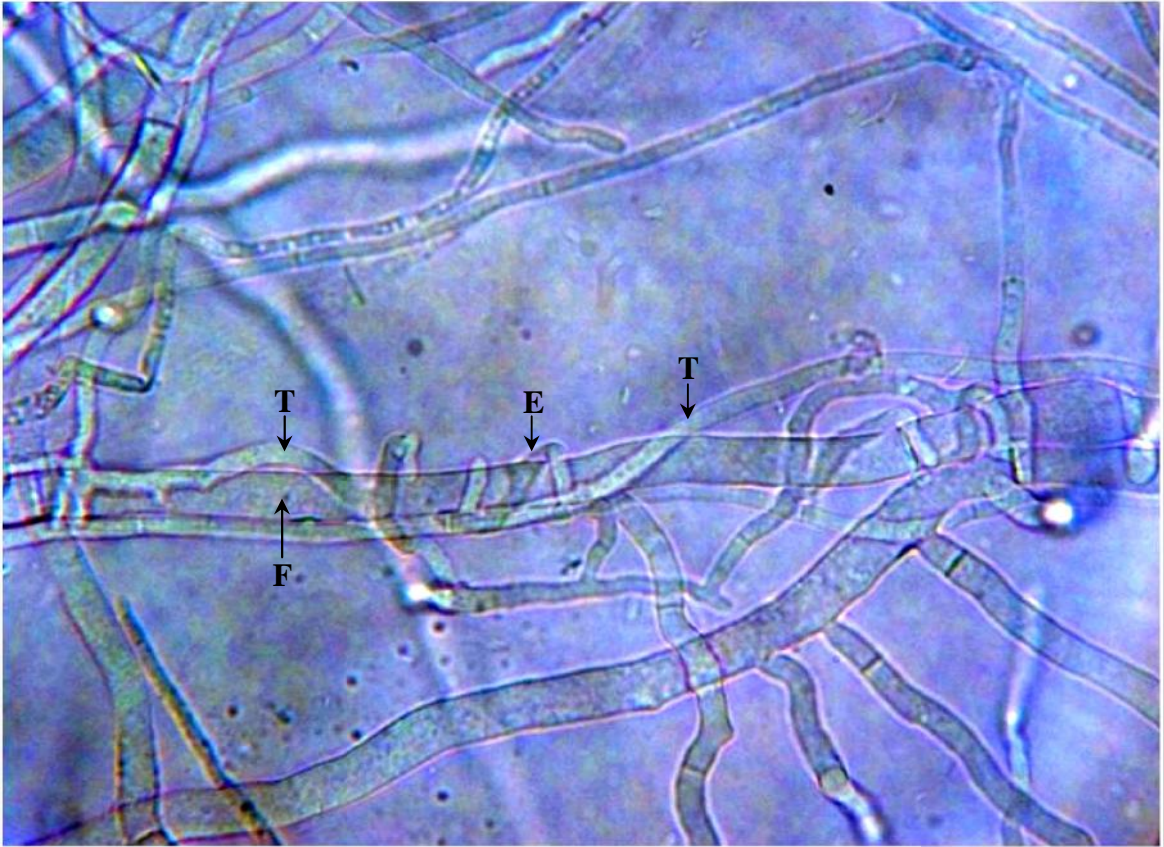


Fig. 26: Enroulement (E) des hyphes de *T. harzianum* (T5) sur celui du *Fusarium oxysporum* (F) (X40)



Fig. 27 : Pénétration et formation d'un appressorium (A) de *T. harzianum* (T1) dans le mycélium de *F. oxysporum* (40x)

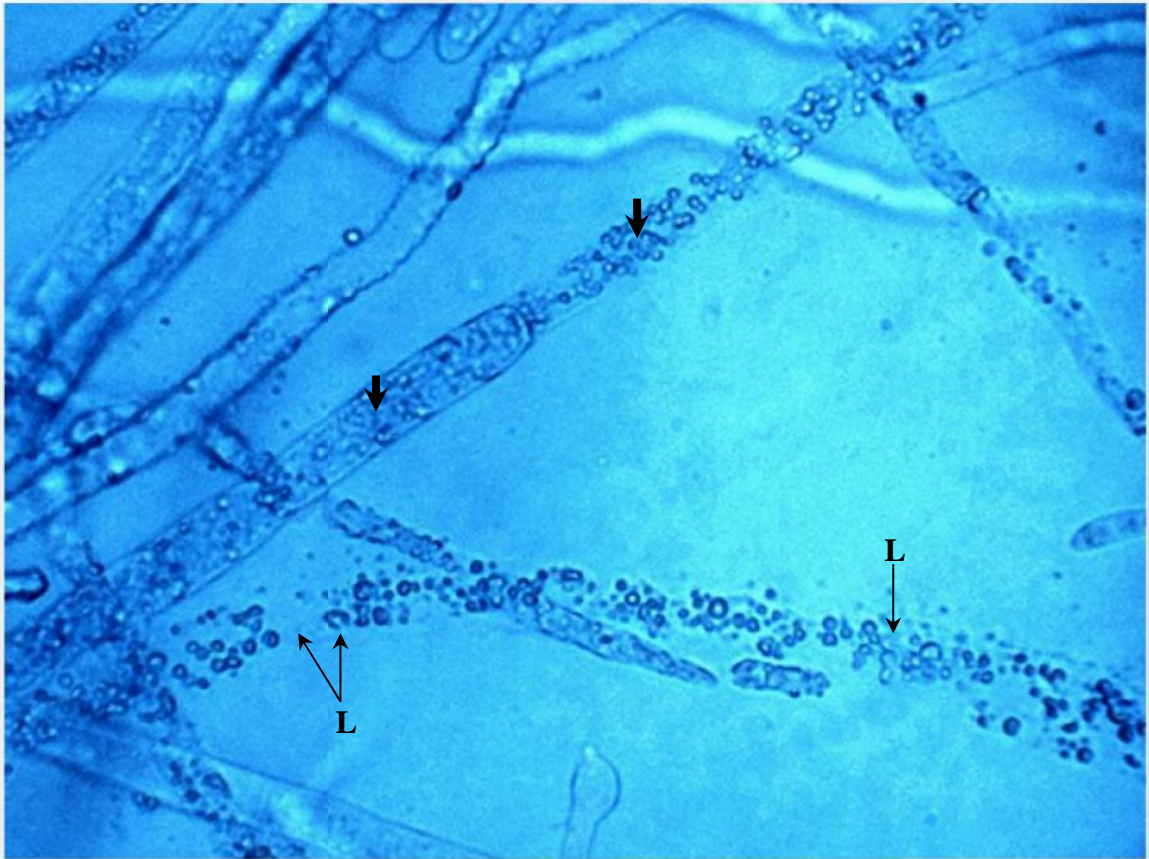


Fig. 28: La lyse (L) et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène (voir flèches) (X40)



Fig. 29 : Apparition de grandes vacuoles dans le mycélium de FOA (voir flèches) collecté au niveau de l'interface de *Trichoderma* (X40)

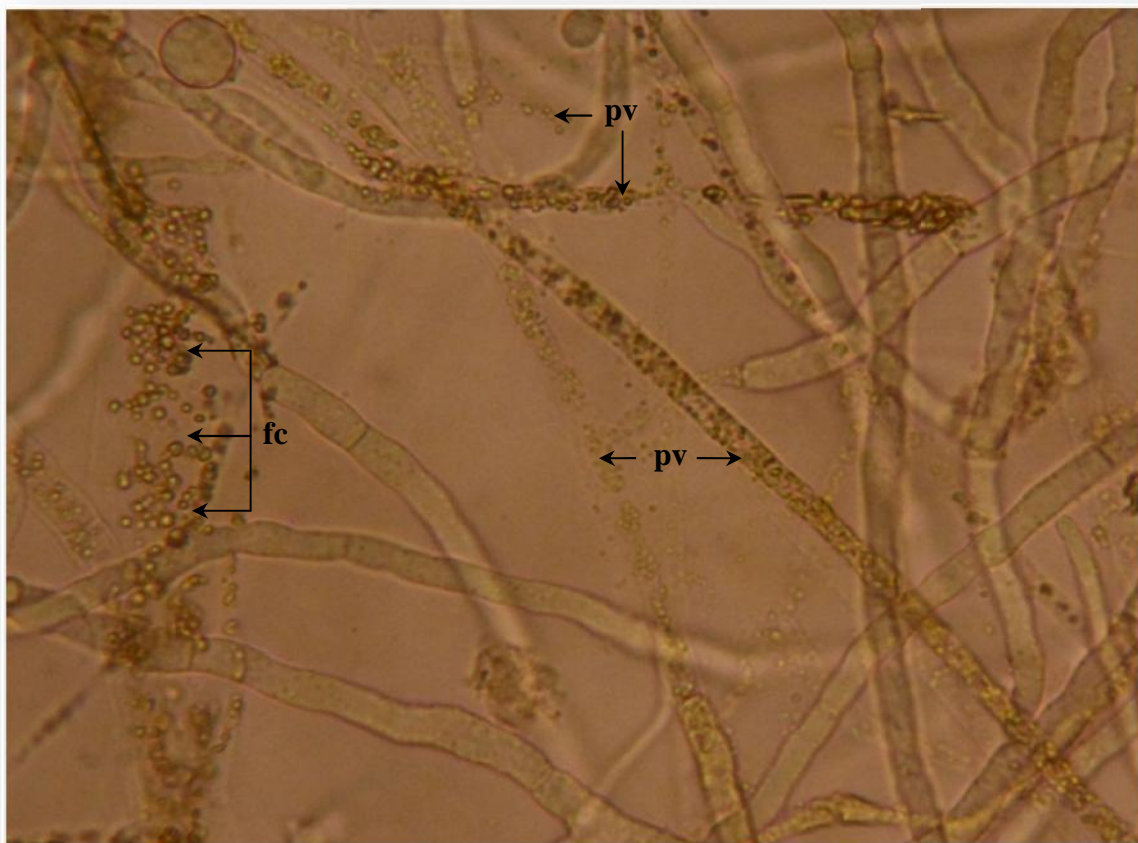


Fig. 30: Présence de petites vésicules dans le mycélium de FOC (pv) et une fuite du contenu cytoplasmique (fc) (X40)



Fig. 31: Coagulation du cytoplasme dans le mycélium de FOL (X40)

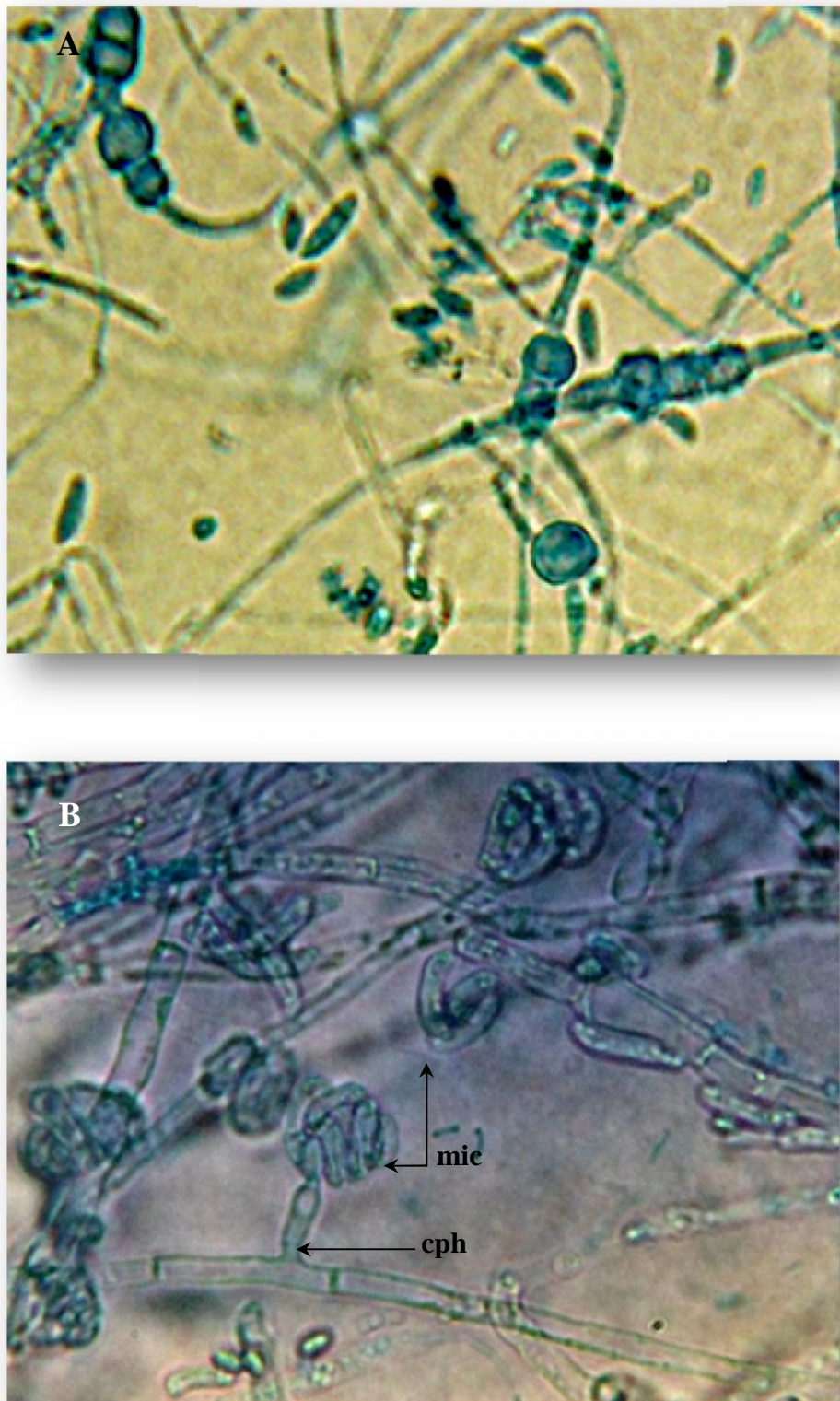


Fig. 32 : Formation de chlamydospores (A) sur le mycélium du *Fusarium oxysporum* en présence de *Trichoderma* après 3 jours de confrontation à 25°C en comparaison avec le témoin (B) (X40) : (mic) microconidies ; (cph) conidiophore

2.2- Confrontation à distance sur milieu de culture entre les quatre isolats de *Fusarium* et les isolats antagonistes de *Trichoderma*

La technique de la confrontation à distance nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance (substances antifongiques volatiles) de 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* exercés sur les isolats de FOA, FOL, FOC et FS; cet effet est évalué par la mesure des diamètres (mm) des colonies de ces deux derniers cultivés en présence ou en absence de l'antagoniste.

Après 6 jours de confrontation, les résultats obtenus montrent l'existence d'une nette réduction du diamètre des colonies par rapport au témoin.

Les trois isolats *T. harzianum* (T5), *T. harzianum* (T14), et *T. koningii* (T10) sont les plus efficaces contre les quatre espèces de *Fusarium* (FOA, FOL, FOC et FS) avec une moyenne de pourcentage d'inhibition varié de 60,52% à 67,10% selon le pathogène testé (Tableau 5, Figure 33, 34, 35 et 36).

Le très faible pourcentage d'inhibition a été enregistré pour l'isolat *T. harzianum* T4 (23,61%) contre FS. Ce dernier ainsi que FOA ont montré une forte sensibilité aux composés volatils produits par les isolats de *Trichoderma* suivie par FOC et FOL.

Un changement de couleur du mycélium de FOC confronté à distance avec les isolats de *Trichoderma* est aussi observé par rapport au témoin, ce qui correspond à la sécrétion des substances volatiles par ces derniers en présence du pathogène.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 5: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* par confrontation à distance avec les 23 isolats de *Trichoderma*

Isolats de <i>Trichoderma</i>		Inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> (%)				Moyenne
		FOA	FOL	FOC	FS	
T1	<i>T. harzianum</i>	35,13	38,27	40	37,50	37,72 ^{ghi}
T2	<i>T. harzianum</i>	25,52	25,92	30,76	29,16	27,84 ⁱ
T3	<i>T. harzianum</i>	61,44	64,19	56,92	58,33	60,22 ^{abc}
T4	<i>T. harzianum</i>	25,52	30,86	33,84	23,61	28,45 ⁱ
T5	<i>T. harzianum</i>	67,10	66,43	64,61	65,27	65,85 ^a
T6	<i>T. koningii</i>	60,52	62,96	54,87	55,55	58,47 ^{abcd}
T7	<i>T. harzianum</i>	56,18	58,02	44,61	50	52,20 ^{bcdef}
T8	<i>T. longibrachiatum</i>	48,28	59,25	50,76	52,77	52,76 ^{bcde}
T9	<i>T. longibrachiatum</i>	47,36	49,38	49,23	50	48,99 ^{cdefg}
T10	<i>T. koningii</i>	65,35	66,66	60,52	62,50	63,75 ^a
T11	<i>T. longibrachiatum</i>	35,13	51,85	38,46	37,50	40,73 ^{fgh}
T12	<i>T. harzianum</i>	56,18	56,79	53,84	29,16	48,99 ^{defg}
T13	<i>T. harzianum</i>	61,44	49,38	54,87	58,33	56,00 ^{abcd}
T14	<i>T. harzianum</i>	64,47	64,61	61,53	60,65	62,81 ^{ab}
T15	<i>T. koningii</i>	34,21	46,91	46,67	33,33	40,28 ^{gh}
T16	<i>T. harzianum</i>	29,82	44,44	33,84	26,38	33,62 ^{hi}
T17	<i>T. koningii</i>	43,02	40,74	46,67	41,66	43,02 ^{efgh}
T18	<i>T. harzianum</i>	29,82	30,86	36,92	37,50	33,77 ^{hi}
T19	<i>T. harzianum</i>	35,13	54,32	56,92	44,44	47,70 ^{defg}
T20	<i>T. koningii</i>	43,02	51,85	40	33,33	42,05 ^{efgh}
T21	<i>T. harzianum</i>	25,52	40,74	36,92	26,38	32,39 ^{hi}
T22	<i>T. harzianum</i>	43,02	44,44	38,46	46,76	43,17 ^{efgh}
T23	<i>T. harzianum</i>	34,21	38,27	30,76	29,16	33,10 ^{hi}
Moyenne		44,66	49,44	46,17	43,01	45,82

FOA: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* – FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* – FS: *Fusarium solani*

les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

^b au niveau de chaque ligne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P < 0.05$) (Annexe 3).

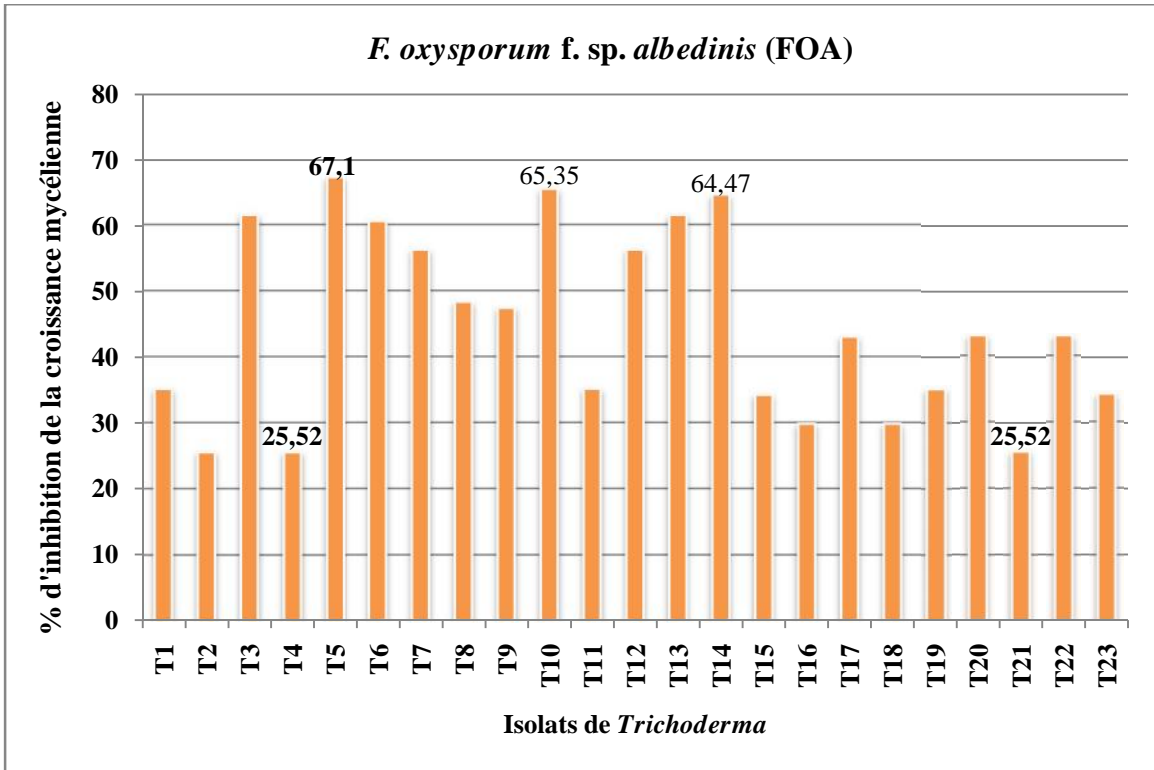


Fig. 33 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOA par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25°C.

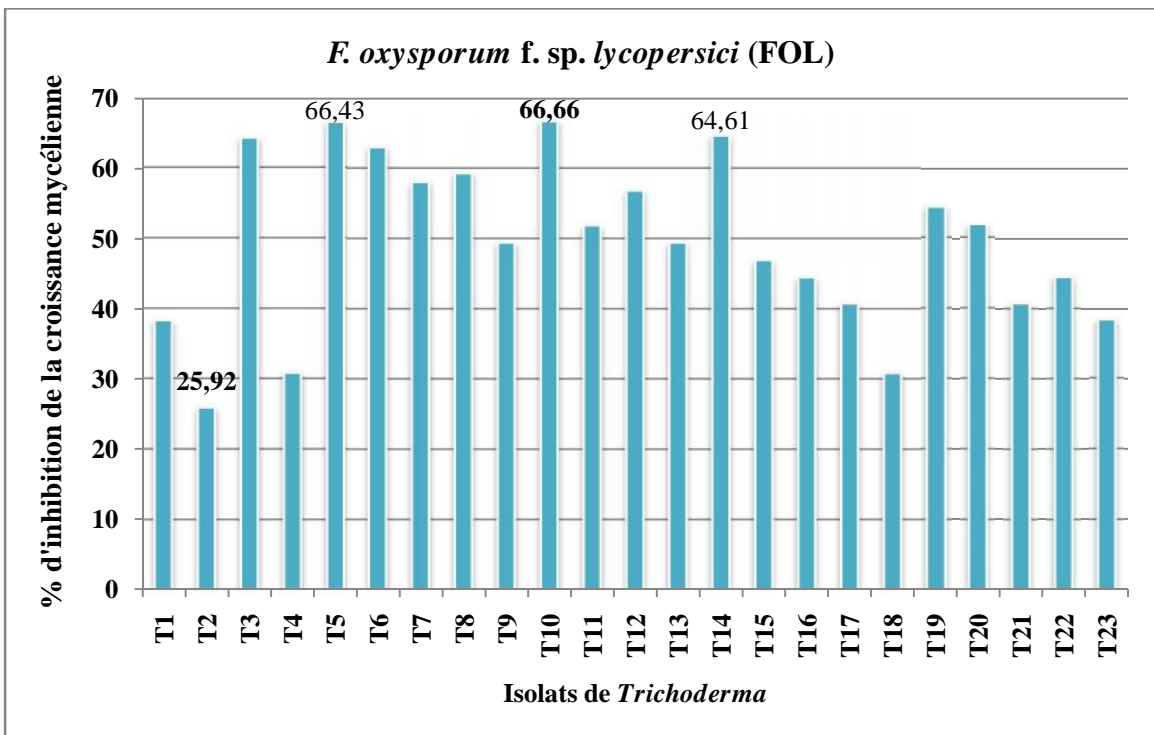


Fig. 34 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOL par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25°C.

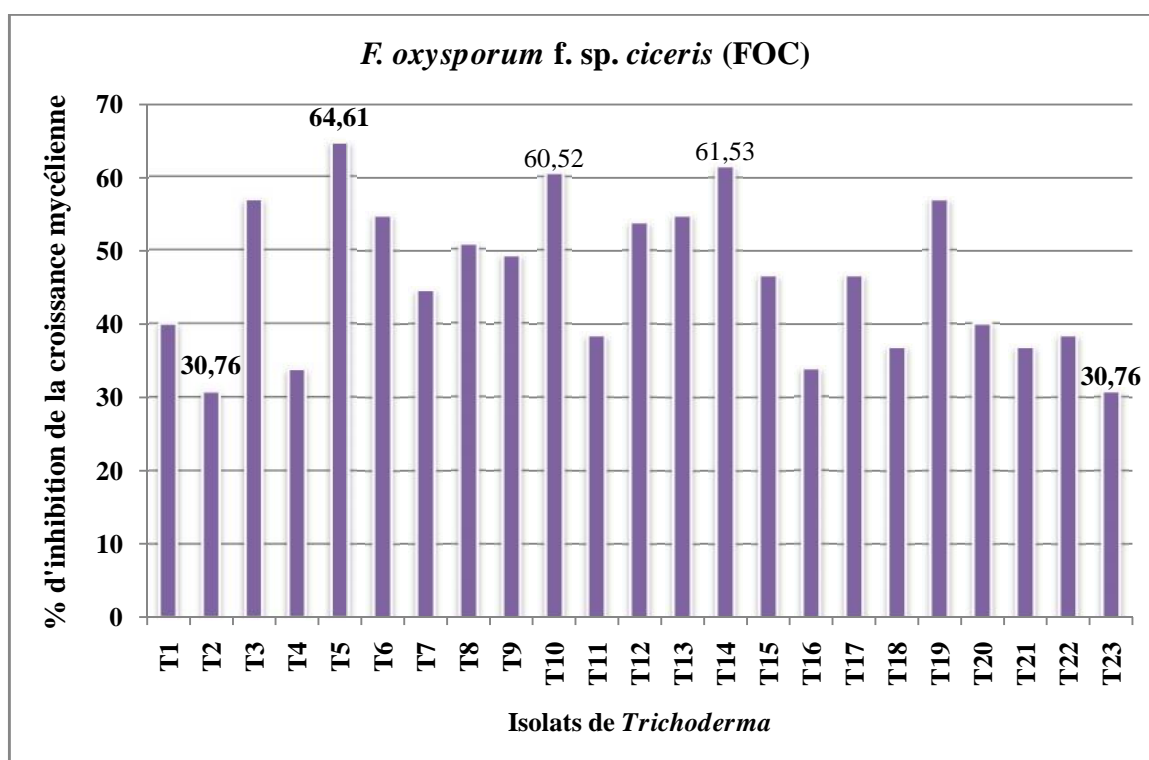


Fig. 35 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25°C.

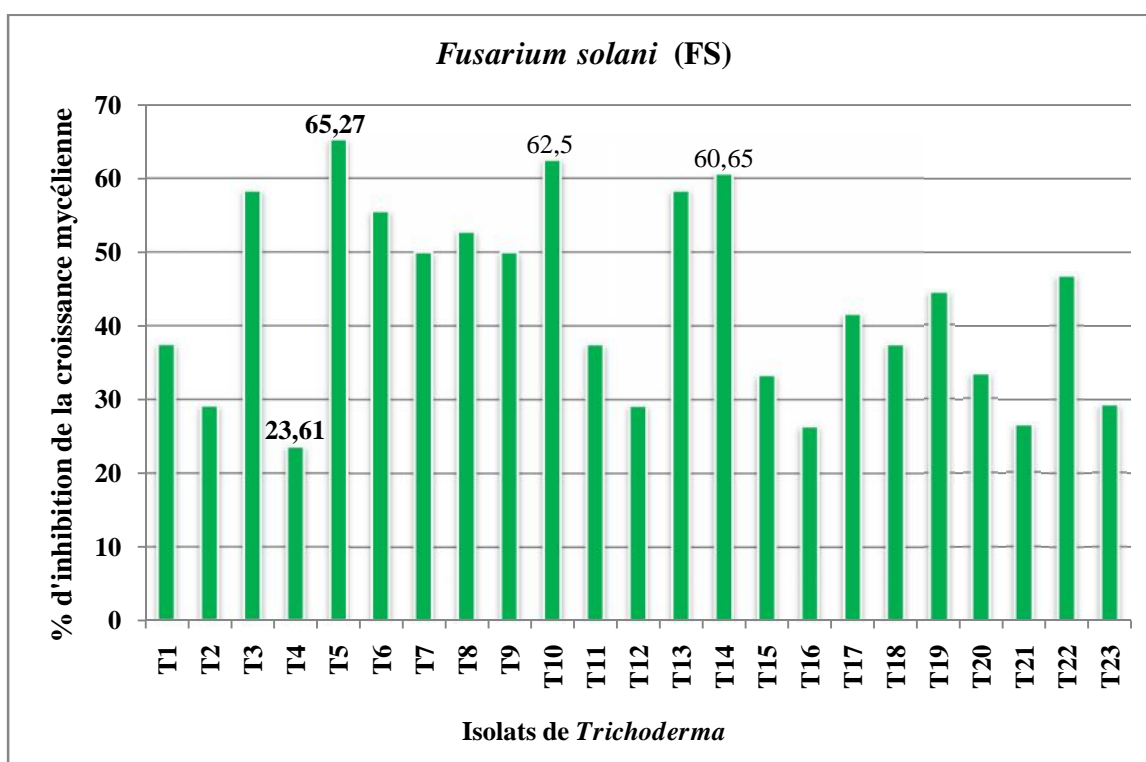


Fig. 36: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FS par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* après six jours d'incubation à 25°C.

2.3- Analyse *in vitro* de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma* sur la germination des conidies de FOC

L'action des filtrats de culture de *Trichoderma* a été évaluée *in vitro* sur le milieu liquide PDB ce qui nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur des substances non-volatiles (diffusibles) de 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* exercées sur la germination des conidies de FOC.

Une inhibition de la germination des conidies de FOC sous l'effet des filtrats des antagonistes par rapport au témoin (sans filtrat) a été observée et qui a évolué en fonction du temps d'incubation (Tableau 6 ; Figure 37). Les résultats obtenus ont montré une sensibilité des conidies de FOC vis-à-vis de 19 filtrats de culture sur 23 testés à des degrés variables (Tableau 6). Les isolats de *Trichoderma* diffèrent significativement entre eux (Annexe 3).

À 50% du filtrat de culture et après 72h d'incubation, le pourcentage moyen d'inhibition est variable de 22,65 % (T21) à 62,85% (T10) (Figure 38). Le pourcentage moyen de germination dans le cas du témoin est de 98,6%.

Les métabolites libérés dans le milieu de culture par les isolats T10, T3, T5 et T14 ont inhibé efficacement la germination conidienne de FOC à plus de 50% suivis de T6, T7, T8, T9, T11, T12, T13, T16 et T17 avec des pourcentages compris entre 41,42% et 48,57% (Figure 38).

Les quatre filtrats de culture issus des isolats de *Trichoderma* T1, T2, T19 et T22 inhibent moyennement la germination des conidies de FOC (de 32,85% à 35,71%). Par contre, les métabolites produits par T20 et T21 ont un faible effet sur la germination conidienne de FOC (< 30% d'inhibition).

Aucune action inhibitrice sur la germination n'a été détectée par les 4 filtrats de culture issus de T4, T15, T18 et T23.

Tableau 6 : Effet des substances non-volatiles de *Trichoderma* (%) sur la germination des conidies de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC).

Isolats de <i>Trichoderma</i>		% d'inhibition de la germination des conidies de FOC		
		24h ^a	48h ^a	72h ^{a, b}
T1	<i>T. harzianum</i>	6,67	14,28	35,71 ^j
T2	<i>T. harzianum</i>	7,83	16,67	32,85 ^l
T3	<i>T. harzianum</i>	35,29	41,17	55,71 ^b
T4	<i>T. harzianum</i>	-N-	-N-	-N-
T5	<i>T. harzianum</i>	33,34	42,85	51,28 ^c
T6	<i>T. koningii</i>	18,08	30	46,67 ^f
T7	<i>T. harzianum</i>	24,28	38,57	48,57 ^e
T8	<i>T. longibrachiatum</i>	13,04	20	44,77 ^g
T9	<i>T. longibrachiatum</i>	15,21	28,57	44,28 ^h
T10	<i>T. koningii</i>	27,14	38,57	62,85^a
T11	<i>T. longibrachiatum</i>	15,21	28,57	44,77 ^g
T12	<i>T. harzianum</i>	9,33	15,71	41,42 ⁱ
T13	<i>T. harzianum</i>	16,38	20	44,28 ^h
T14	<i>T. harzianum</i>	21,42	37,14	50,83 ^d
T15	<i>T. koningii</i>	-N-	-N-	-N-
T16	<i>T. harzianum</i>	19,23	30	46,67 ^f
T17	<i>T. koningii</i>	8,11	15,71	41,42 ⁱ
T18	<i>T. harzianum</i>	-N-	-N-	-N-
T19	<i>T. harzianum</i>	6,67	14,28	35,41 ^k
T20	<i>T. koningii</i>	6,67	14,11	25,71 ^m
T21	<i>T. harzianum</i>	6,67	13,04	22,65ⁿ
T22	<i>T. harzianum</i>	7,83	14,10	32,85 ^l
T23	<i>T. harzianum</i>	-N-	-N-	-N-

FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

·les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

^b les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P < 0.05$) (Annexe 3).

-N- : négatif.

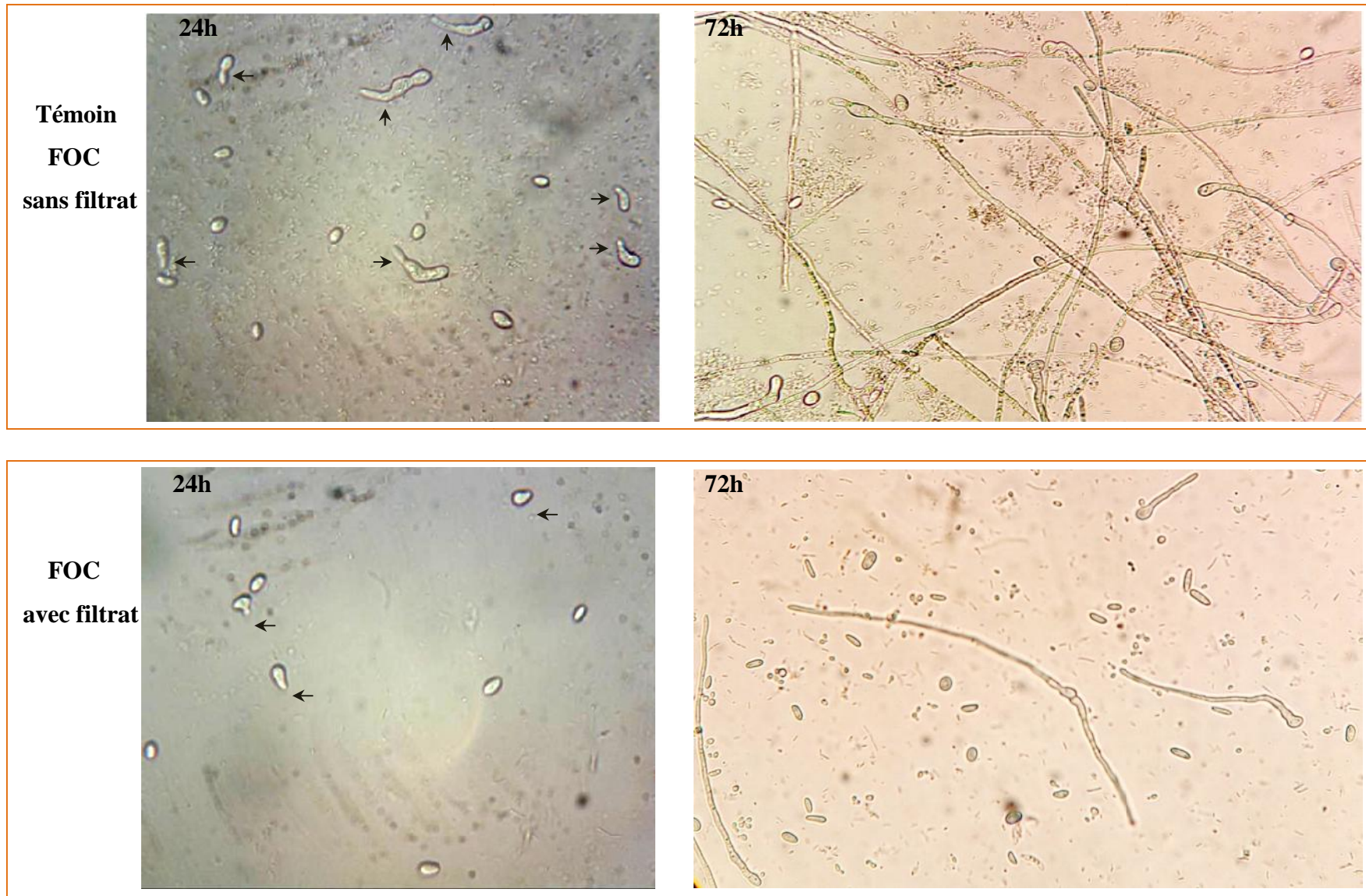


Figure 37 : Action du filtrat de culture de *T. harzianum* (T5) sur la germination des conidies de FOC en comparaison avec le témoin après 24h et 72h d'incubation

PARTIE 3 : Résultats et discussion

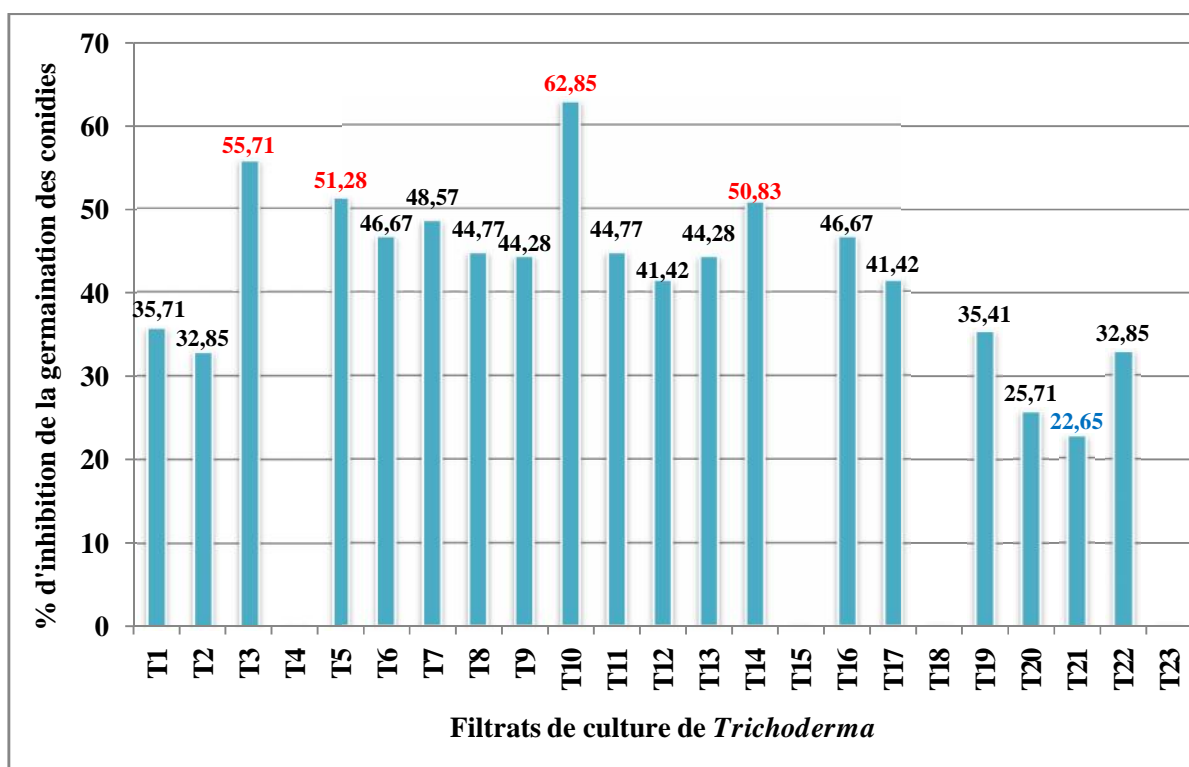


Figure 38 : Pourcentage d'inhibition de la germination des conidies de FOC par les filtrats de culture de 23 isolats de *Trichoderma* après 72h d'incubation

2.4- Relations entre le mycoparasitisme, la sécrétion des métabolites volatils et celles des substances diffusibles

Dans le but de rechercher des associations possibles qui peuvent exister entre les différents mécanismes d'antagonisme : le mycoparasitisme, la sécrétion des substances diffusibles et celle des métabolites volatils lors de la confrontation du pathogène et les différents antagonistes, des corrélations ont été recherchées entre ces différents paramètres au moyen d'un programme de régression linéaire.

Les résultats obtenus et illustrés sur les figures 39, 40 et 41 ont montré que l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* par le mycoparasitisme exercé lors de la confrontation directe, l'inhibition par la sécrétion des substances volatiles en confrontation à distance et de celle par la sécrétion des substances diffusibles (filtrats de cultures) sont positivement et significativement liées entre elles.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Figure 39 : Corrélation entre les valeurs moyennes de l'inhibition des 4 isolats de *Fusarium* par confrontation directe et celles de l'inhibition par les substances volatiles

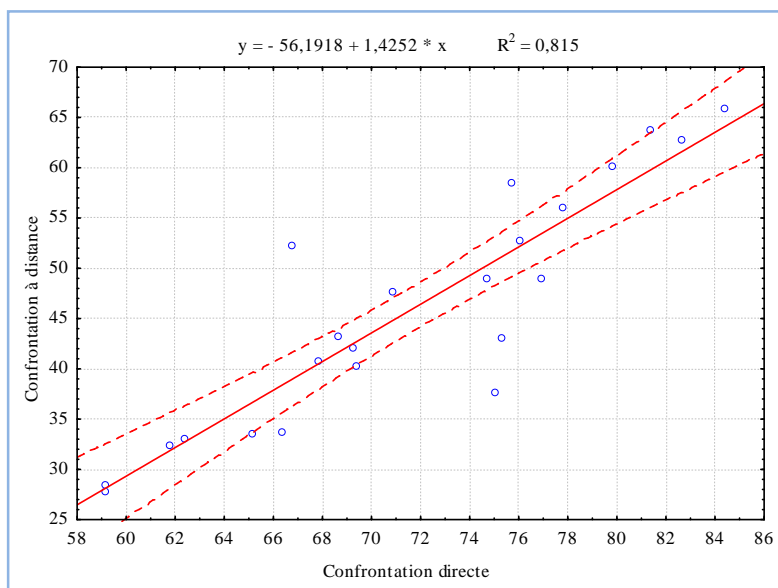


Figure 40 : Corrélation entre les valeurs moyennes de l'inhibition des 4 isolats de *Fusarium* par les substances volatiles et celles de l'inhibition par les filtrats de culture

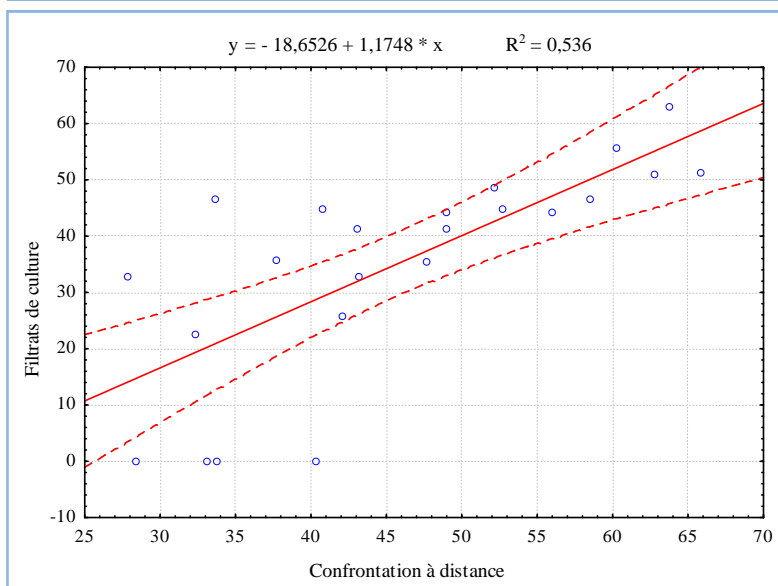
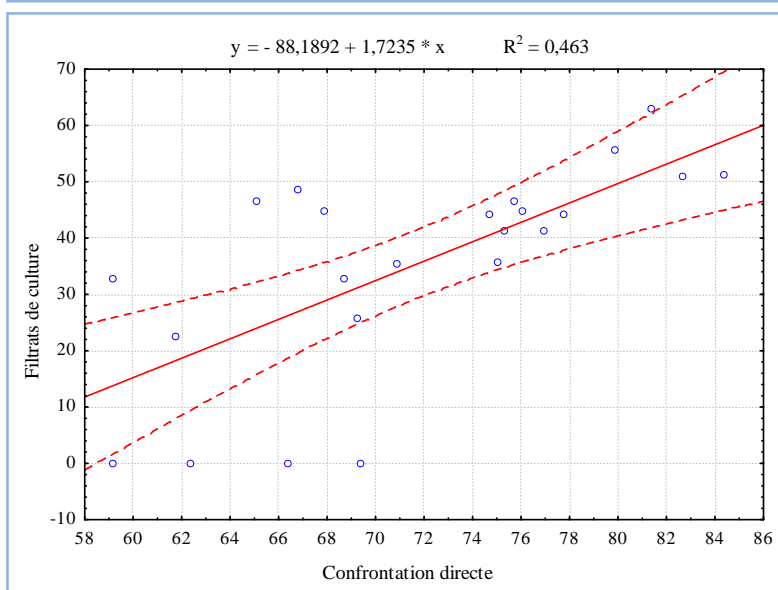


Figure 41 : Corrélation entre les valeurs moyennes de l'inhibition des 4 isolats de *Fusarium* par confrontation directe et celles de l'inhibition par les filtrats de culture



PARTIE 3 : Résultats et discussion

Le tableau 7, présente une matrice de corrélation entre les 3 paramètres étudiés : mycoparasitisme, substances volatiles et non volatiles.

Les résultats du mycoparasitisme (confrontation directe) ont donné une corrélation nette entre ce paramètre et les substances volatiles produites en confrontation à distance ($r=0,903$). Il en ressort que ces deux paramètres sont associés à l'activité antagoniste.

Le coefficient de corrélation obtenu entre les pourcentages d'inhibition par confrontation à distance (substances volatiles) et celle de l'inhibition par les substances non volatiles (filtrats de cultures) est élevé ($r = 0,732$) ce qui démontre une bonne corrélation (Tableau 7).

Aussi, une corrélation a été déterminée entre les valeurs moyennes de l'inhibition des 4 isolats de *Fusarium* par les substances non volatiles et celles de l'inhibition de FOC par les filtrats de culture ($r = 0,680$).

Cependant une variation considérable est notée quand à l'efficacité des modes d'action des différentes espèces et isolats de *Trichoderma* vis-à-vis les isolats de *Fusarium* testés.

Une classification des 23 isolats de *Trichoderma* a été réalisée suivant les 3 paramètres étudiés : mycoparasitisme, substances volatiles et non volatiles (Figures 42). Trois (03) groupes sont à distingués sur la figure 42. Les groupes 1 et 2 sont distingués à une distance euclidienne de 9 sur le dendrogramme.

- Le groupe 1 est constitué de 12 isolats qui ont prouvé une activité, qualifiée de bonne à moyenne, dans tous les paramètres étudiés.
- Le groupe 2 est constitué de 4 isolats (T10, T14, T5 et T3). Ces 4 isolats sont les plus actifs dans les 3 paramètres étudiés.
- Le groupe 3 (isolats non actifs) est constitué de 7 isolats (T15, T23, T18, T4, T21, T2 et T7). Ces isolats ont démontré une faible activité dans tous les paramètres étudiés.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 7 : Matrice de corrélation calculée sur 3 paramètres étudiés.

	Confrontation directe	Confrontation à distance	Filtrats de culture
Confrontation directe	1		
Confrontation à distance	0,903	1	
Filtrats de culture	0,680	0,732	1

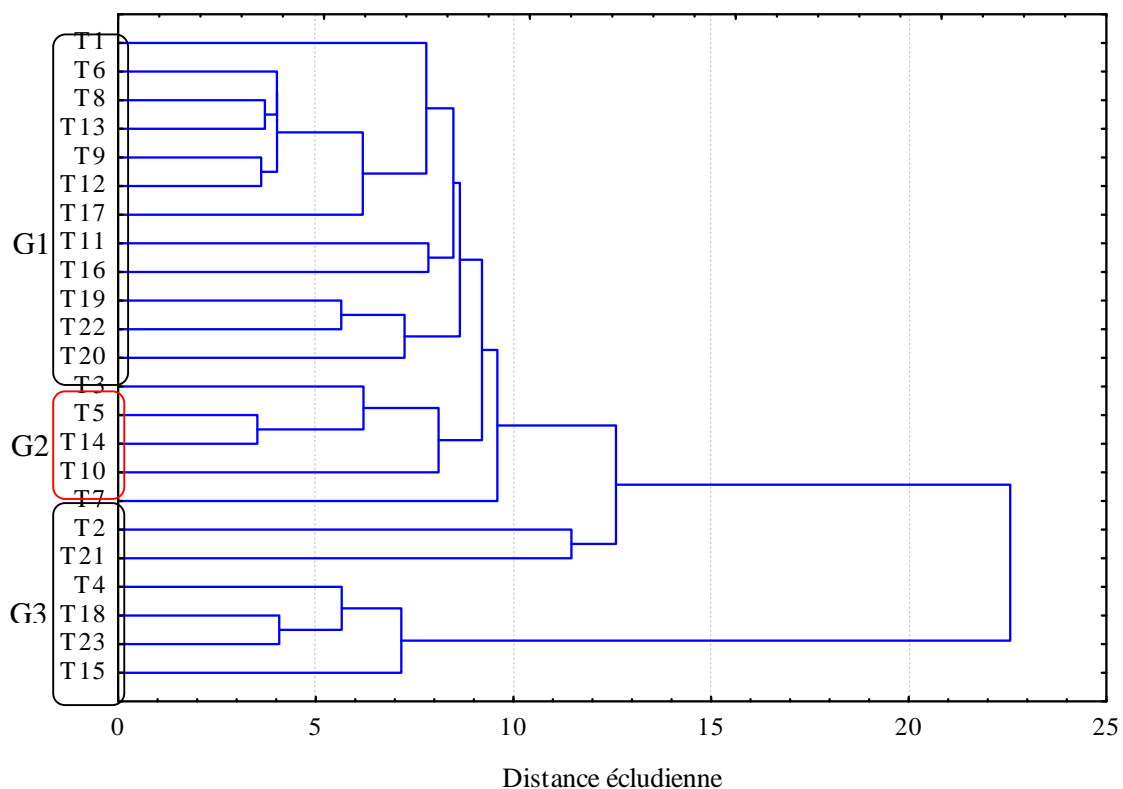


Figure 42 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 23 isolats de *Trichoderma* suivant les 3 paramètres étudiés

2. 4- Discussion

Il a été démontré dans cette étude que tous les isolats de *Trichoderma* ont inhibé la croissance mycélienne des pathogènes. Parmi les 23 isolats, *T. harzianum* (T5) a révélé d'être le plus antagoniste car il inhibe la croissance mycélienne des agents pathogènes après 2 jours d'incubation.

Le mécanisme d'inhibition peut être dû à la compétition pour les nutriments et l'espace (Chet, 1987). Les isolats de *Trichoderma* poussent rapidement et sont capables d'envahir le milieu de culture après 4 jours d'incubation. Ils ont une vitesse de croissance supérieure à celle de *Fusarium*. L'envahissement de *Trichoderma* a été rapide et intense. Les mêmes observations ont été faites par Brunner *et al.* (2005) ; Sharma (2011) ; Tanoh Hilaire *et al.* (2015). D'après Barbosa *et al.* (2001), la production d'amylase par *Trichoderma* spp. est en partie responsable de la croissance rapide des antagonistes sur le milieu PDA.

Lors de l'interaction entre les agents pathogènes et certains isolats de *Trichoderma*, un enroulement et une lyse des hyphes de *Fusarium* ont été observés. Le processus d'enroulement est associé à un mycoparasitisme interne (Howell, 2003). Nos résultats confirment les observations microscopiques similaires rapportées par Dubey *et al.* (2007) et El-Hassan *et al.* (2013). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des *Trichoderma* capables d'enrouler sur le mycélium de *Rhizoctonia solani* provoquant la désintégration du cytoplasme de l'agent pathogène (Shalini et Kotasthane, 2007). La dégradation des parois mycéliennes, remarquée suite au phénomène d'enroulement, se fait grâce à la présence d'enzymes telles les (1,3) glucanases, les chitinases, les protéases et parfois des cellulases (Harman *et al.*, 1993 ; El-Katatny *et al.*, 2001 ; De Castro *et al.*, 2010).

Nous avons aussi noté une vacuolisation du cytoplasme des hyphes du pathogène en présence de *Trichoderma* ce qui est en accord avec les résultats de Mouria *et al.* (2003) et El-Hassan *et al.* (2013). Bélanger *et al.* (1995) ont démontré, dans l'interaction entre *Trichoderma* et *Botrytis*, que des changements au niveau de la membrane de *Botrytis* ont été détectés 12 heures avant un contact physique entre les deux protagonistes. Ces interactions entraînent par conséquent la mort ou l'inactivation des hyphes de l'agent pathogène qui seront envahis plus facilement par les hyphes de l'antagoniste (Askary *et al.*, 1997 ; Bahous *et al.*, 2008 ; Padmaja *et al.*, 2013). Selon De Oliviera *et al.* (1984), la vacuolisation cytoplasmique des hyphes peut précéder la pénétration de l'antagoniste par la mise en jeu d'enzyme lytique.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Le mycoparasitisme des isolats de *Trichoderma* a été démontré sur un certain nombre de champignons phytopathogènes (Harman *et al.*, 2004 ; Vinale *et al.*, 2006 ; Bailey *et al.*, 2008, Hilaire *et al.*, 2015).

La formation de chlamydospores par les 4 espèces de *Fusarium* testées en présence de *Trichoderma* est une réponse défensive à un concurrent potentiel. La stimulation de la formation des formes de résistances par des espèces antagonistes de *Trichoderma* a été observée par plusieurs auteurs, qui ont suggéré qu'il est le résultat d'une action antagoniste (Sid Ahmed *et al.*, 1999).

Cependant, certains isolats de *Trichoderma* ont montré une capacité d'inhibition moyenne des espèces de *Fusarium* testées. Selon El-Hasan *et al.* (2008) et Sharma (2011), l'acide fusarique produit par *Fusarium oxysporum* et de nombreuses autres espèces de *Fusarium* est directement impliqué dans le retardement de la croissance du mycélium et la production de conidies de *Trichoderma*. Ces mycotoxines ont une activité antagoniste directe qui peut réduire le mycoparasitisme lié aux gènes de *Trichoderma* (El-Hasan *et al.*, 2008 ; Sharma, 2011).

De plus, Sivan et Chet (1989) suggèrent que certaines souches de *F. oxysporum* ont des parois cellulaires contenant des composés protéiniques qui rendent ces souches plus résistantes au mycoparasitisme de *Trichoderma*. Cela pourrait s'expliquer aussi par une activation des mécanismes de détoxification mis en place par le pathogène contre les métabolites sécrétés par l'antagoniste en réduisant leurs toxicités ou les rendre inactives (Baker, 1988 ; Chet, 1990 ; Elad, 1993). Les travaux de Cooney et Lauren (1999) ont mis en évidence la capacité de *Botrytis cinerea* à biotransformer le métabolite secondaire antifongique 6-PP (6-pentyl-alpha-pyrone), produit par des isolats de *Trichoderma*, sur un milieu gélosé et une culture liquide. Bien qu'à des concentrations aussi élevées à 100 ppm, le 6-PP a été complètement métabolisé par *Botrytis cinerea* en quelques jours de culture liquide.

Par contre et dans de nombreux cas, les champignons antagonistes mycoparasitaires gèrent et tolèrent une variété de mycotoxines et d'antibiotiques, y compris leurs propres métabolites, et aussi de certains fongicides chimiques. Par conséquent, ces antagonistes possèdent un système membranaire à pompe complète et efficace qui élimine activement les différents composés toxiques (Ruocco *et al.*, 2009). Les résultats de l'étude menée par Malathi

PARTIE 3 : Résultats et discussion

et al. (2002) ont confirmé l'efficacité de certaines souches de *Trichoderma harzianum* et *Pseudomonas fluorescens* à détoxifier la toxine du pathogène *Colletotrichum falcatum*.

L'étude des mécanismes impliqués dans la relation antagoniste a révélé que les *Trichoderma* à agir par antibiose en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne et la germination des conidies. La production de ces substances par les espèces de *Trichoderma* a été rapportée par Dennis et Webster (1971a, b). Les propriétés antagonistes de *Trichoderma* spp. produisant des métabolites volatils et non volatils ont inhibé la croissance de divers agents pathogènes telluriques (Reddy *et al.*, 2014). Certains de ces métabolites ont été étudiés ; la production de l'acide harzianique, tricholine, peptaibole, viridine, gliovirine, alaméthicine et d'autres ont été décrits (Very *et al.*, 2001). Les substances volatiles produites par les antagonistes pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène *in vitro* et même dans le sol, elles diffusent facilement à travers les pores du sol et inhibent les pathogènes (Wheatley, 2002).

L'effet de *Trichoderma* sur la germination des spores a été rapporté par de nombreux travaux. L'antibiotique harzianolide produit par *T. harzianum* inhibe la germination des conidies et des chlamydospores de *Fusarium oxysporum*. La germination des spores d'un certain nombre de champignons est aussi inhibée par la viridine produite par *T. viride* (Harman et Kubicek, 1998).

En effet, chacune des espèces antagonistes possède une aptitude particulière pour éliminer l'agent pathogène. Les résultats obtenus dans cette étude montrent l'existence des corrélations entre les différents paramètres étudiés. Les différents modes d'action, l'antibiose et le parasitisme pouvaient être impliqués, simultanément ou séquentiellement. Ceci est en accord avec les résultats de Dennis et Webster (1971 a, b et c) et Mouria *et al.* (1997). En outre, l'efficacité d'un agent de contrôle biologique repose, non seulement sur un mécanisme unique, mais d'une combinaison de différents modes d'actions (Alabouvette *et al.*, 1993). Disposer d'un spectre d'action large contre les pathogènes est parmi les critères fondamentaux qui caractérisent l'antagoniste idéal (Baker et Cook, 1982).

3. Etude de quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de *Trichoderma*

3.1. Production des enzymes par les isolats antagonistes

3.1.1- Production de chitinase

Les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* ont été testés pour leur capacité de dégrader la chitine colloïdale comme seule source de carbone. Après 2 à 3 jours d'incubation à 25 °C, les vingt-trois isolats testés ont présentés un résultat positif à produire l'enzyme chitinase. Une zone de couleur violet pourpre a été formée autour de la colonie en croissance (Figure 43). La zone colorée a prouvé la présence de l'enzyme sécrétée.

La capacité de dégrader la chitine colloïdale par les 23 isolats de *Trichoderma* testés est présentée dans la figure 44. L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif ($P < 0.05$) de la production de l'enzyme chitinase (Annexe 4).

Parmi les 23 isolats, 10 isolats ont formés un grand halo avec un diamètre supérieur à 70 mm. La souche T5 a démontrée une bonne activité enzymatique à hydrolyser la chitine colloïdale avec un halo de 84 mm suivie des deux isolats T14 (83 mm) et T10 (81 mm). Le reste des isolats hydrolysent modérément la chitine et leurs diamètres varient de 43 mm à 70 mm.

Les diamètres minimums de 43 mm et 44 mm ont été enregistrés chez les deux isolats T2 et T4 respectivement.

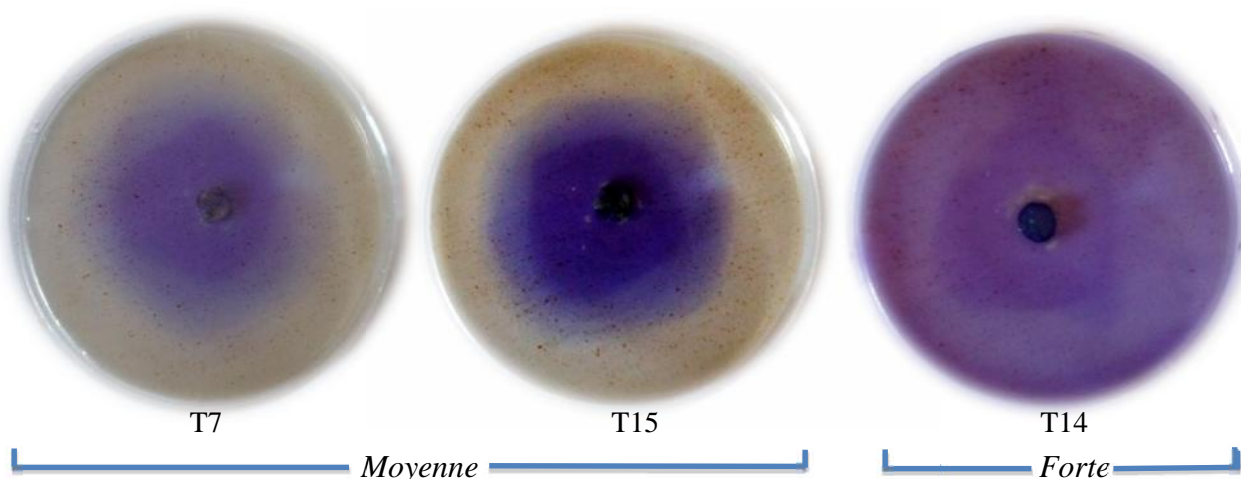


Fig. 43: Production des chitinases : un changement de couleur du jaune au violet pourpre dans la région de dégradation de la chitine autour des colonies de *Trichoderma* après 3 jours d'incubation à 25 °C.

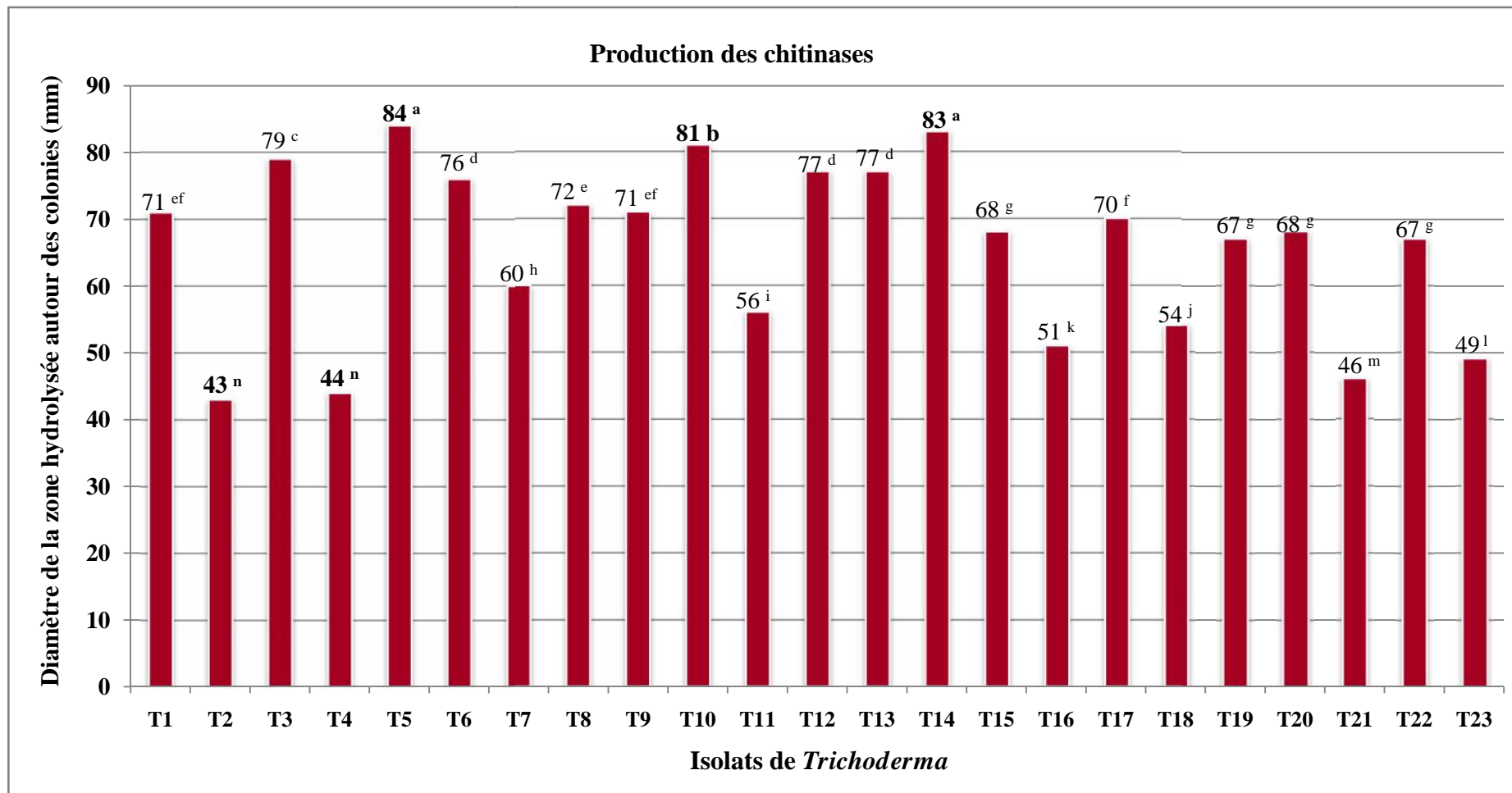


Figure 44 : Production des chitinases par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu à base de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone après 3 jours incubation à 25 °C

*: au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keuls au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions.

3.1.2- Production des cellulases

La production des cellulases a été détectée chez tous les isolats de *Trichoderma* testés. Ils ont démontré leur capacité à synthétiser les deux enzymes endoglucanase et cellobiohydrolase sur les deux milieux CMC et MCC, respectivement par la présence d'une zone claire autour des colonies avec des diamètres variables d'un isolat à un autre (Figure 45 et 46). Un effet très significatif ($P < 0.05$) de la production de la cellulase a été démontré (Annexe 4).

Les 5 isolats de *Trichoderma* T5, T8, T12, T13 et T14 ont montré une possibilité d'être les producteurs potentiels des enzymes endoglucanases (>80 mm) et cellobiohydrolases (>70 mm).

Par contre, l'isolat de *T. harzianum* T22 s'est montré comme étant un faible producteur de cellulase par rapport aux autres isolats (34 mm sur le milieu CMC et 24 mm sur le milieu MCC).

3.1.3- Production des protéases

La production de cette enzyme est positive pour tous les isolats testés avec des diamètres de zones hydrolysées variables. Ces variations s'étendent de 30 mm à 83 mm. Un effet très significatif ($P < 0.05$) de la production de l'enzyme protéase existe (Annexe 4).

Les quatre isolats T5, T6, T10 et T14 ont formés une grande zone claire de 83 mm sur gélose au lait écrémé (Figure 47). La zone claire a indiqué la présence des protéases (Figure 48). Le reste des isolats de *Trichoderma* ont une capacité moyenne à faible pour hydrolyser la caséine. Le plus faible diamètre de la zone hydrolysée est enregistré par l'isolat T11 (30 mm).

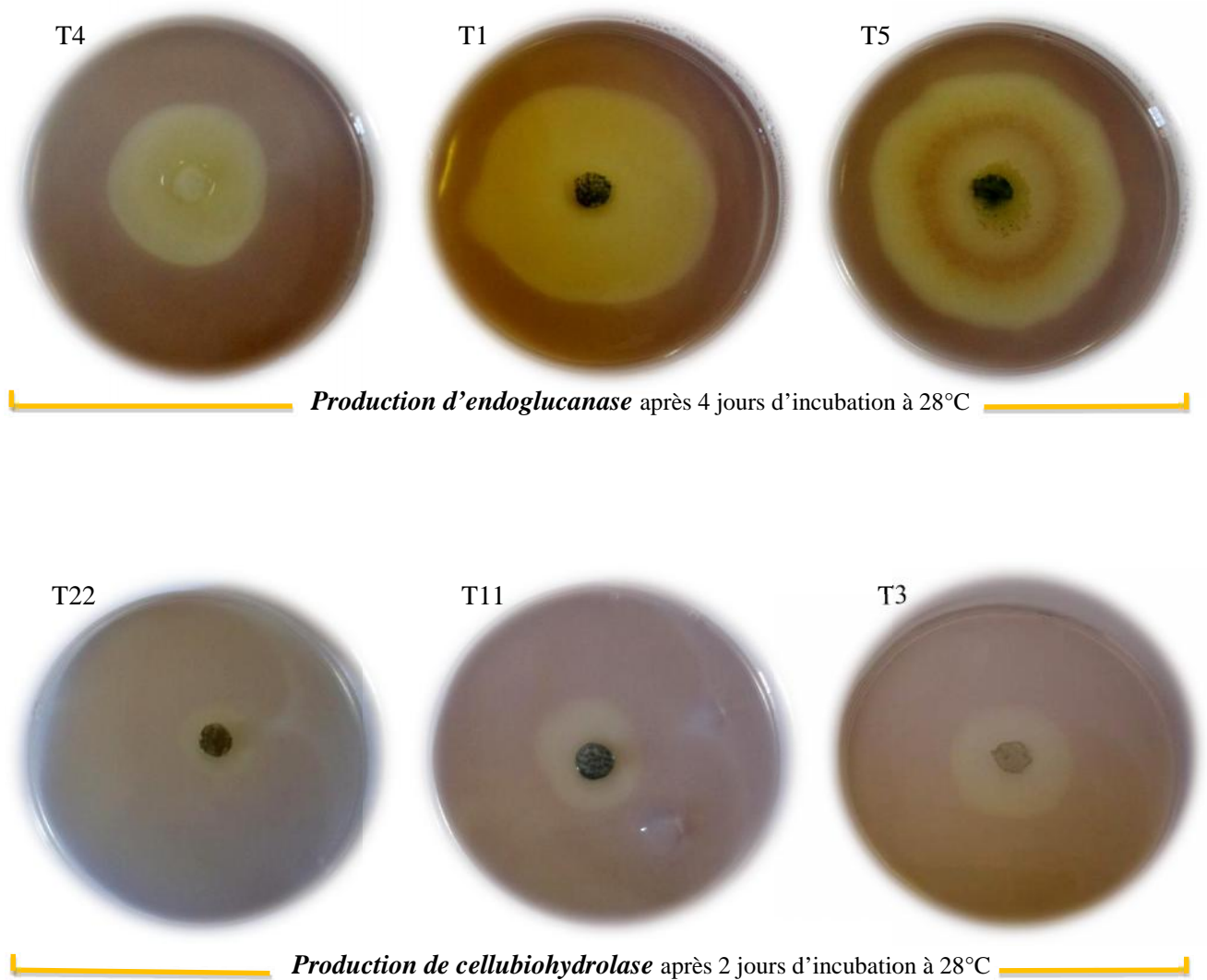


Fig. 45 : Formation d'un halo transparent autour des colonies de *Trichoderma* caractéristique de la production des cellulases de l'espèce testée

PARTIE 3 : Résultats et discussion

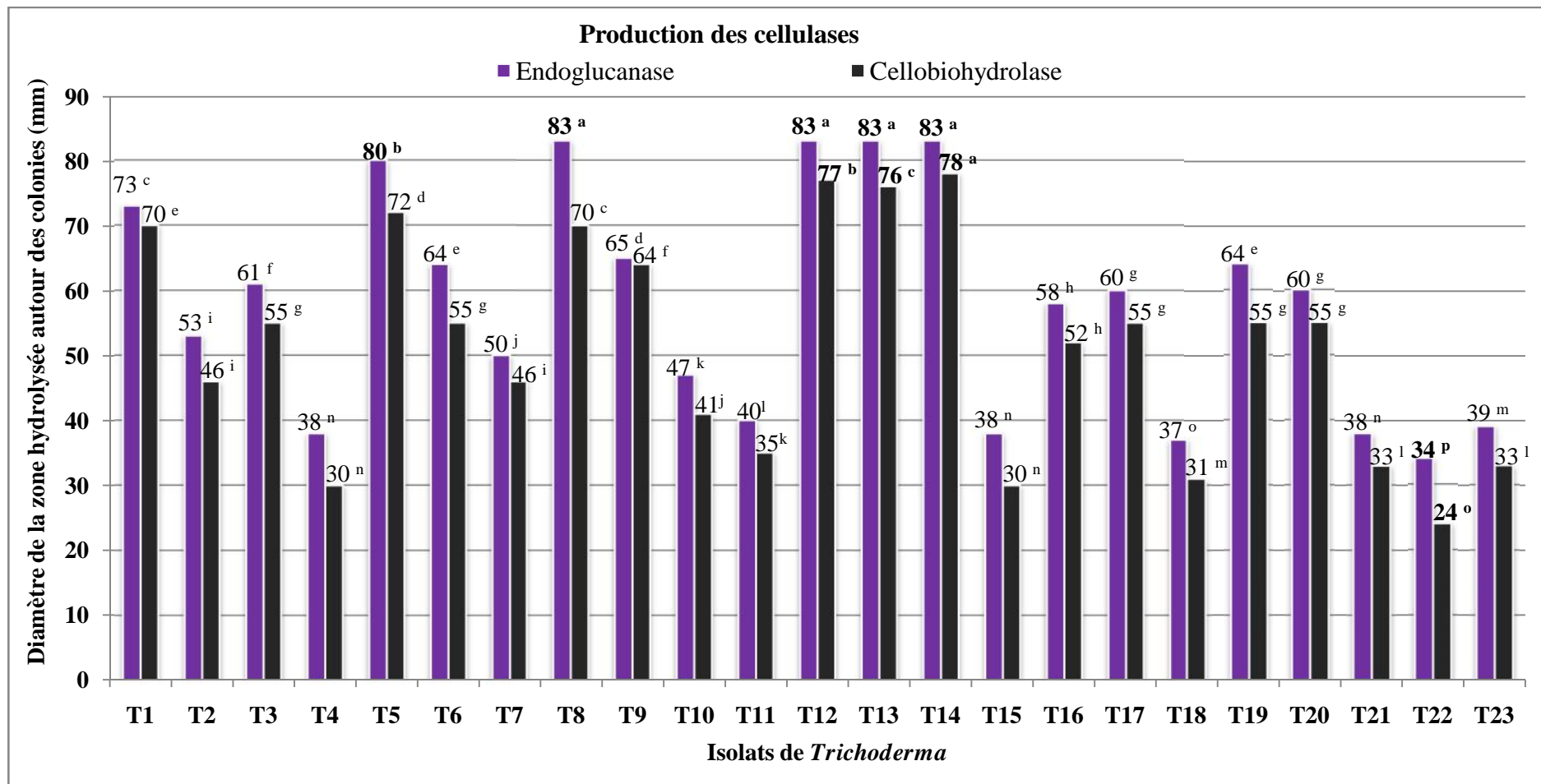


Figure 46 : Production des cellulases par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur deux milieux à base de la carboxyméthylcellulose (CMC) ou de la cellulose microcristalline (MCC) comme la seule source de carbone après incubation à 28°C pendant 7 jours en (CMC) et 3 jours en (MCC)

[‡] au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keul au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions.

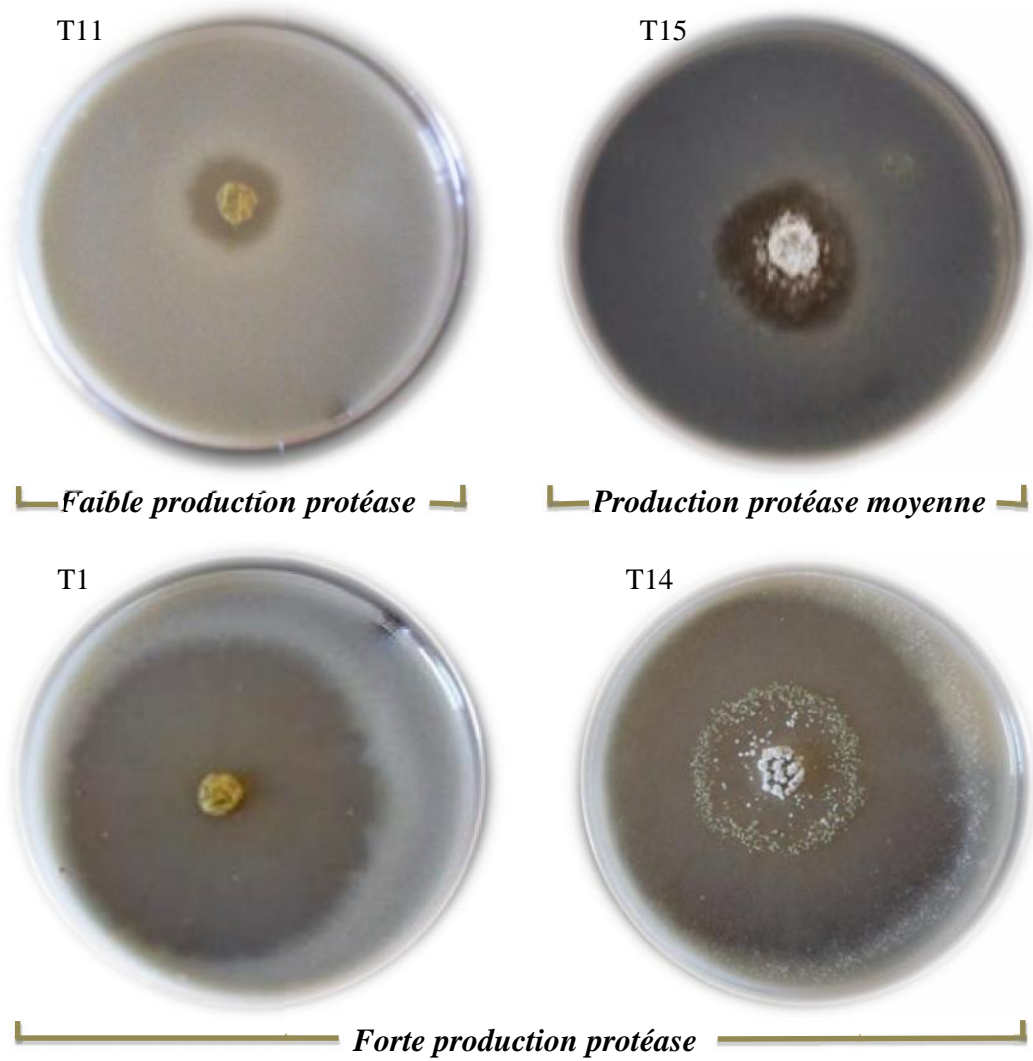


Fig. 47: Production des protéases après 3 jours d'incubation à 28°C : Halo transparent autour des colonies de *Trichoderma*

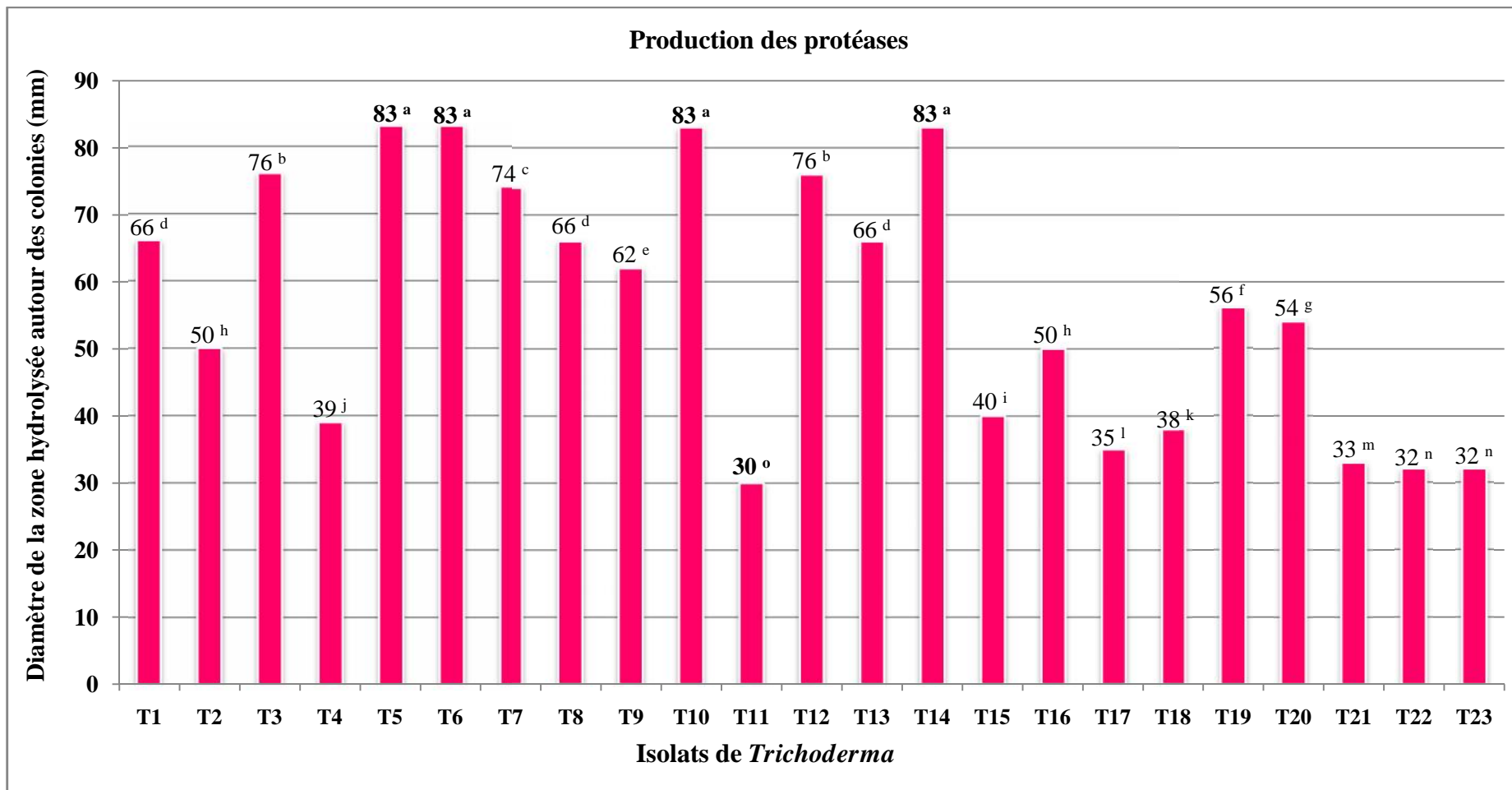


Figure 48 : Production des protéases par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu au lait écrémé comme la seule source de carbone après 4 jours incubation à 28°C

*: au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keul au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions.

3.1.4- Production des amylases

La plupart des isolats testés ont dégradé, à un certain degré, l'amidon après incubation à 28°C pendant 72h. La production d'amylase a été révélée par la présence d'un halo jaune clair autour de la colonie de chaque isolat (Figure 49). L'analyse de la variance a révélée un effet hautement significatif ($P < 0,05$) de la production des amylases (Annexe 4).

Les deux isolats de *Trichoderma* (T1) et (T5) ont exhibé une bonne production d'amylase avec des halos estimés à 75 mm et 68 mm respectivement. Par contre, le plus faible diamètre de la zone hydrolysée est enregistré par l'isolat T22 (26 mm) (Figure 50).

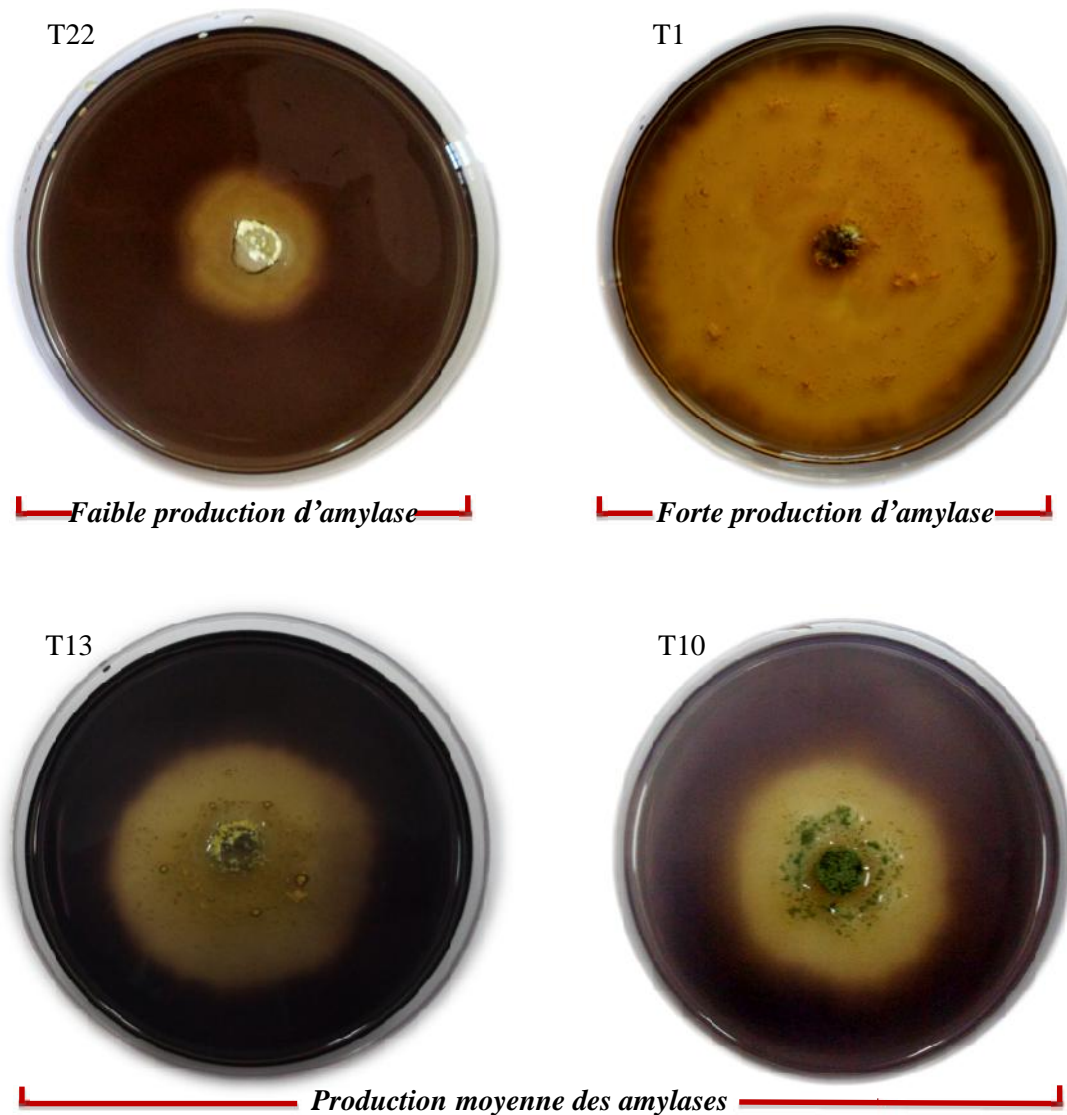


Fig. 49: Production des amylases après 2 jours d'incubation à 28 °C: Formation d'un halo transparent autour des colonies de *Trichoderma*

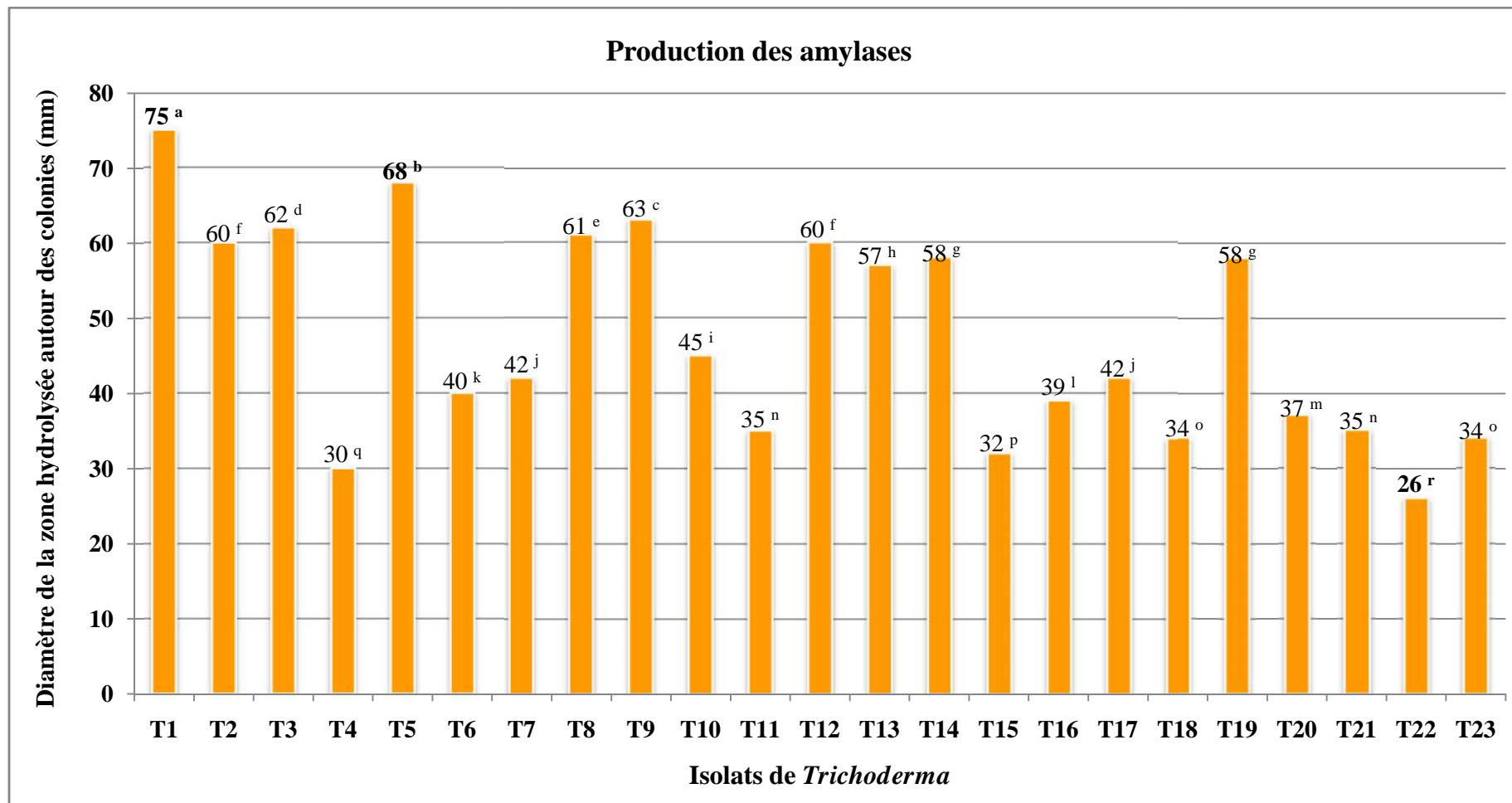


Figure 50 : Production d'amylase par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu à base de l'amidon comme seule source de carbone après 3 jours d'incubation à 28°C

*: au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keul au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions.

3.1.5- Production de ligninase

Tous les isolats testés ont été en mesure de se développer sur milieu à base de l'acide tannique où ils ont formé une zone brune foncée entourant les colonies après 4 jours d'incubation (Figure 51 et 52). L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif ($P < 0,05$) de la production de ligninase (Annexe 4).

Parmi eux, 11 isolats ont été capables de former une zone brun-foncée entre 56 à 68 mm. La souche T5 a produit significativement la plus grande zone avec un diamètre de 68 mm, suivie par T1 (66 mm), T3 (65 mm) et T14 (63 mm).

A moins de 30 mm de diamètre, les isolats T4, T15 et T23 se sont démontrés comme étant les plus faibles producteurs de ligninase.

3.1.6- Production de lipase

Les isolats de *Trichoderma* testés ont montré une activité lipolytique par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies sur le milieu de culture contenant du Tween 20 comme un substrat lipidique (Figure 53).

La capacité de dégrader le Tween 20 par les isolats de *Trichoderma* testés est présentée dans la figure 54. Un effet très significatif ($P < 0,05$) de la production de lipase a été déterminée (Annexe 4).

Les plus grands diamètres de la zone hydrolysée sont enregistrés par les 3 isolats T3 (65 mm), T14 (65 mm) et T13 (61 mm).

A moins de 30 mm de diamètre, les 2 isolats T21 et T23 sont jugés les plus faibles producteurs de lipase

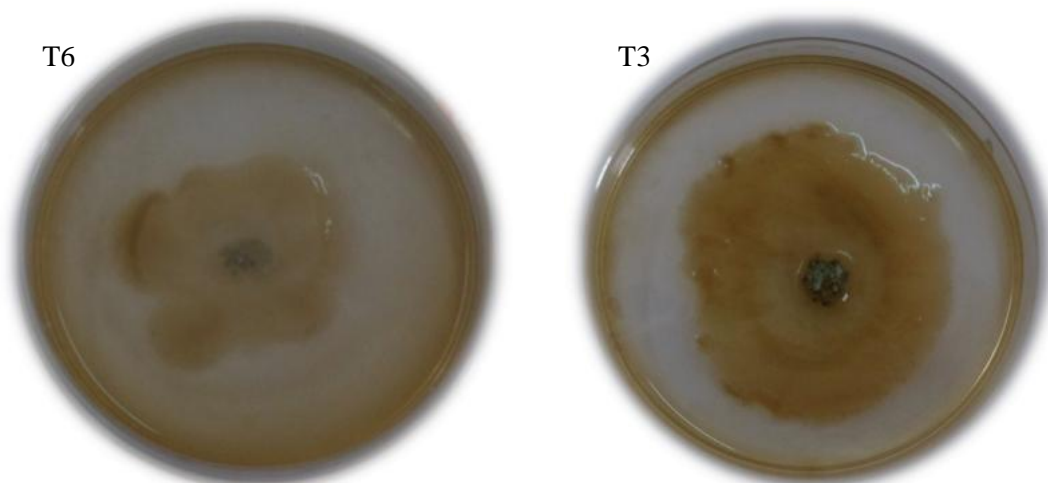


Fig. 51 : Formation d'un halo brun-foncé autour des colonies de *Trichoderma* caractéristique de la production de ligninase après 2 jours d'incubation.

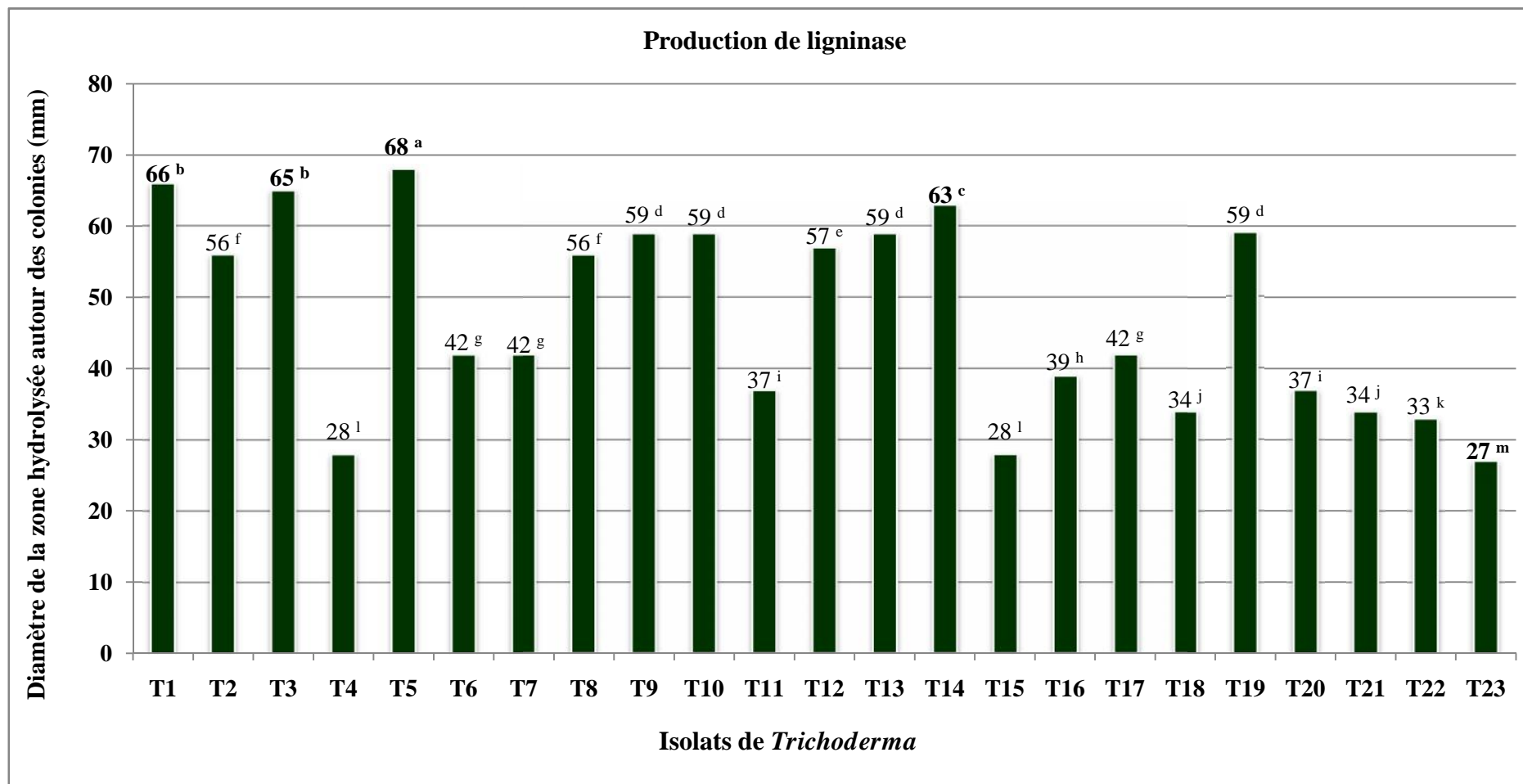


Figure 52 : Production de ligninase par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu contenant du l'acide tannique comme seule source de carbone après 4 jours incubation.

au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keul au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions.

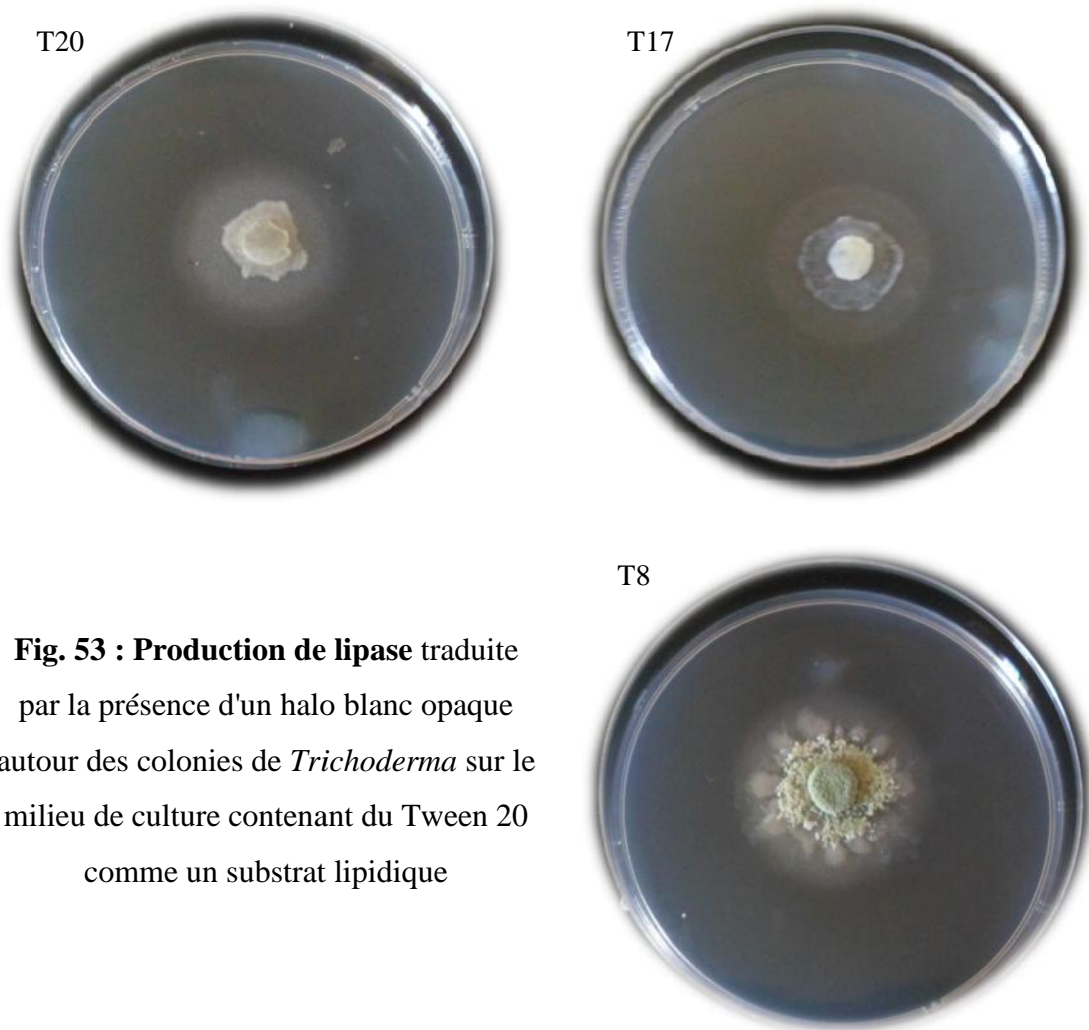


Fig. 53 : Production de lipase traduite par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies de *Trichoderma* sur le milieu de culture contenant du Tween 20 comme un substrat lipidique

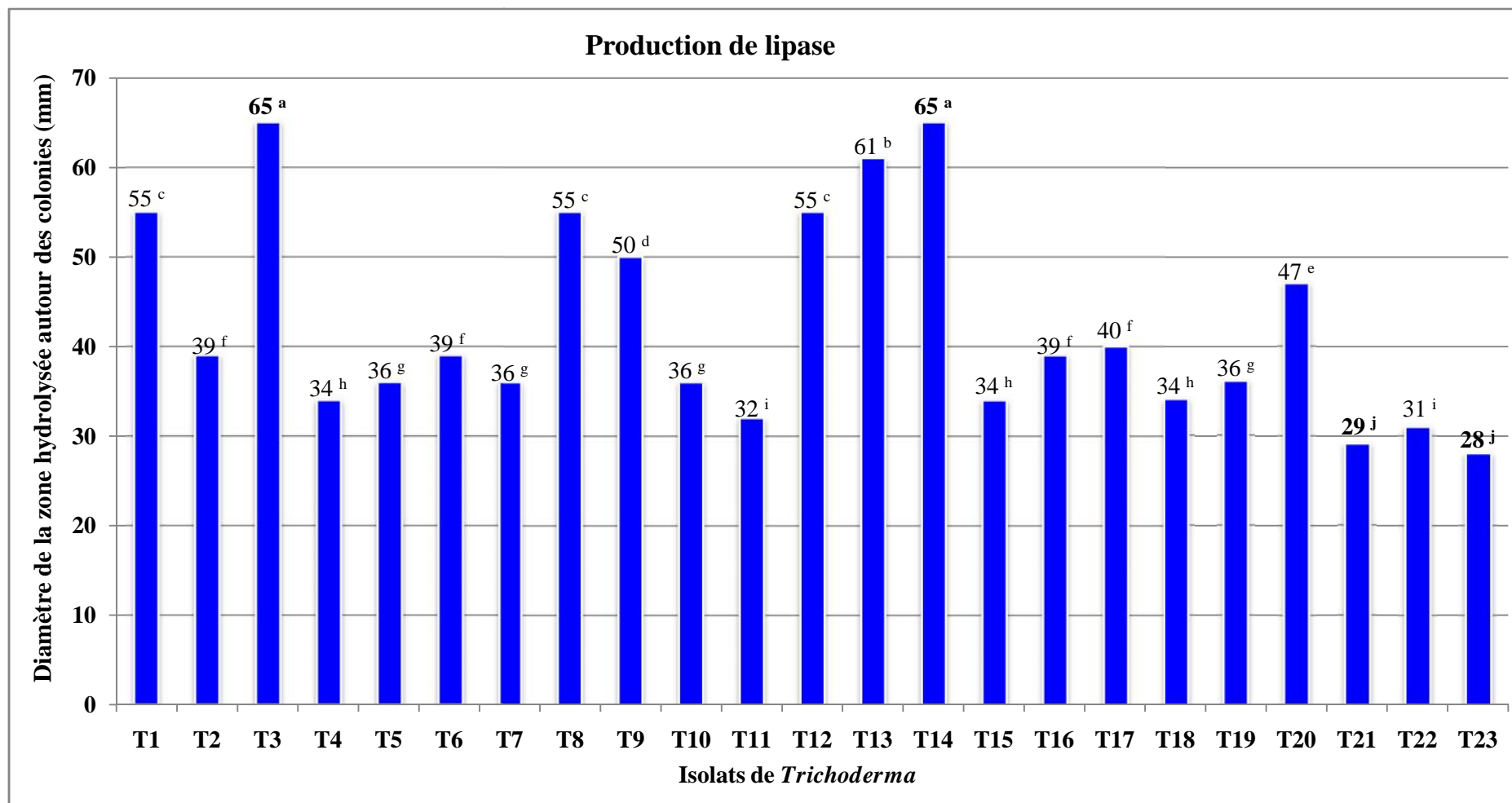


Figure 54 : Production de lipase par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu contenant du Tween 20 comme seule source de carbone après 3 jours incubation.

au niveau de chaque colonne, les moyennes des valeurs suivies par une même des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keul au seuil 5 % (Annexe 4). Chaque valeur représente une moyenne de 3 répétitions

3.1.7- Relations entre les différentes activités enzymatiques étudiées liées au mode d'action de *Trichoderma*

Dans le but de rechercher des associations possibles entre les 7 paramètres étudiés (production de la chitinase, l'endo-glucanase, la cellulohydrolase, la protéase, l'amylase, la ligninase et la lipase), nous avons calculé les coefficients de corrélations entre eux. Le tableau 8, présente une matrice de corrélation entre l'ensemble des activités enzymatiques étudiées.

L'analyse du tableau 8, nous a permis de remarquer l'existence d'une corrélation hautement significative entre la production de l'enzyme endoglucanase (CMCase) et la cellulohydrolase (MCCase) ($r= 0,990$) et en second une corrélation parfaite entre la production de l'amylase et de la ligninase ($r= 0,941$).

L'analyse des résultats effectués entre la production de la cellulase (CMCase et MCCase) et l'amylase révèle des corrélations positives ($r= 0,814$ et $r=0,831$).

Une classification des 23 isolats de *Trichoderma* a été réalisée suivant les résultats obtenus de l'étude des 7 paramètres de la production enzymatique. La classification est projetée sur la figure 55.

À une distance euclidienne de 29 sur le dendrogramme, trois (03) groupes sont à distinguer sur la figure 55.

Le groupe 1 est constitué de 10 isolats qui ont prouvé une bonne activité enzymatique dans tous les paramètres étudiés.

Le groupe 2 est constitué de 6 isolats qui ont une activité qualifiée de moyenne dans les 7 paramètres étudiés par rapport aux isolats regroupés dans le groupe 1.

Le groupe 3 (isolats peu actifs) est constitué de 7 isolats qui ont démontré une moyenne à faible activité dans tous les paramètres étudiés.

Les 4 isolats (T10, T14, T5 et T3), les plus actifs dans les 3 paramètres étudiés dans le chapitre II : le mycoparasitisme, les substances volatiles et non volatiles ont démontré une bonne production enzymatique. Les 3 isolats T14, T5 et T3 sont classés dans le groupe 1. Par contre, l'isolat T10 est classé dans le groupe 2.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 8: Matrice de corrélation calculée sur 7 paramètres de la production des enzymes étudiées.

Variables	Chitinase	Endo-glucanase	Cellubio-hydrolase	Protéase	Amylase	Ligninase	Lipase
Chitinase	1						
Endoglucanase	0,673	1					
Cellobiohydrolase	0,662	0,990	1				
Protéase	0,742	0,722	0,722	1			
Amylase	0,522	0,814	0,831	0,661	1		
Ligninase	0,663	0,791	0,802	0,766	0,941	1	
Lipase	0,603	0,784	0,800	0,603	0,688	0,690	1

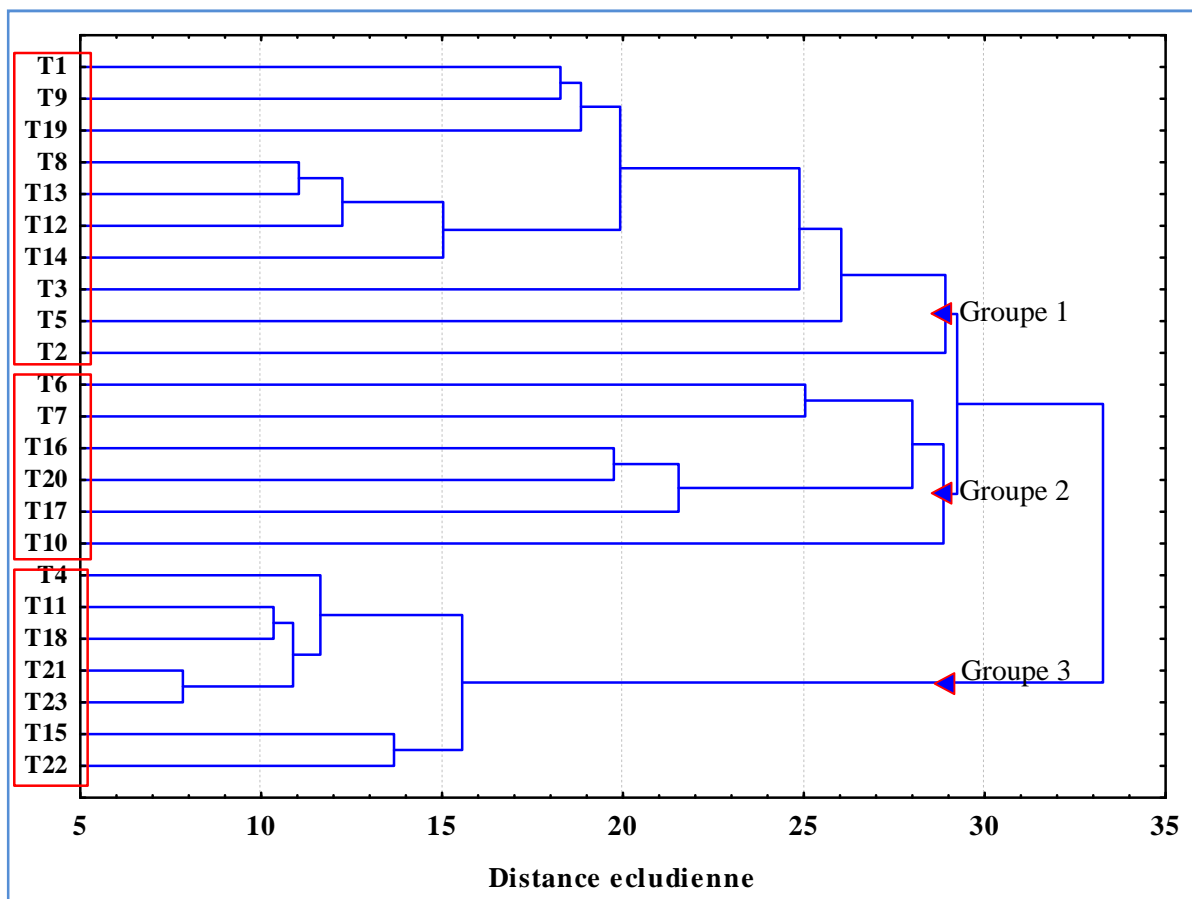


Figure 55 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des isolats de *Trichoderma* suivant les 3 paramètres d'antagonisme étudiés.

3.2. Étude de quelques paramètres liés à la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de *Trichoderma*

3.2.1- Solubilisation des phosphates (Biofertilisation)

Le test de solubilisation du phosphate (P) inorganique sur un milieu solide Pikovaskey (PVK) additionné de bleu de bromophénol et contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de P a montré que les isolats de *Trichoderma* testés possèdent un pouvoir solubilisateur de P après 7 jours d'incubation avec des indices de solubilisation variables d'un isolat à un autre (Tableau 9). Les 23 isolats ont produit une zone claire autour de la colonie (Figure 56).

Le calcul de l'indice de solubilisation (IS) permet d'évaluer le pouvoir solubilisateur de *Trichoderma* et d'établir une comparaison entre les isolats testés. Un effet très significatif ($P < 0,05$) de solubilisation sur milieu PVK solide a été démontré (Annexe 4). Les trois isolats T6, T1 et T17 sont révélés très efficaces par rapport aux autres avec IS variant de 2,30 à 2,34 suivis de T16, T12, T20, T2 et T8 avec un IS compris entre 2,21 et 2,26. Les faibles IS ont été enregistrés chez les deux isolats T9 (1,87) et T7 (1,90). Le reste des isolats solubilise modérément le P et leurs IS varient de 2,04 à 2,19.

3.2.2 - Production des phytohormones AIA (Phytostimulation)

La capacité de production de l'AIA est testée sur le milieu liquide additionné de tryptophane (5g/l). L'intensité de la couleur rose-rouge est proportionnelle à la concentration de l'AIA (Figure 57). Les isolats de *Trichoderma* ont des taux de production très variables (Figure 58). Ces variations s'étendent de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ à 27,6 $\mu\text{g/ml}$. Les quatre isolats ayant un maximum de production sont dans l'ordre : T3 (27,6 $\mu\text{g/ml}$), T5 (24,4 $\mu\text{g/ml}$), T11 (17 $\mu\text{g/ml}$) et T9 (16,8 $\mu\text{g/ml}$), les quatre isolats en produisant des quantités supérieures de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'AIA sont dans l'ordre : T17 (10,2 $\mu\text{g/ml}$), T6 (12,4 $\mu\text{g/ml}$) et T16 (16,2 $\mu\text{g/ml}$), le reste d'isolats en produisant des quantités inférieures de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'AIA sont dans l'ordre : T (7,19, 12, 13, 1, 20, 2, 10 et 14) affichent des valeurs allant de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ à 9,6 $\mu\text{g/ml}$. Nous avons également noté une absence totale de production d'AIA chez 07 isolats (T4, T8, T15, T18, T21, T22 et T23).

L'analyse de la variance a révélé un effet significatif ($P < 0,05$) de la production de l'AIA en milieu liquide (Annexe 4).

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 9 : Indice de solubilisation de P par les isolats de *Trichoderma*

Isolats de <i>Trichoderma</i>		Solubilisation de P en milieu Solide		
		Ø halo + colonie (cm)	Ø colonie (cm)	IS solubilisation de P * = (Ø halo+ Ø colonie) / Ø colonie
T1	<i>T. harzianum</i>	5,4	4,1	2,31 ^{ab}
T2	<i>T. harzianum</i>	4,6	3,7	2,24 ^{bcd}
T3	<i>T. harzianum</i>	5,1	4,5	2,13 ^{fghi}
T4	<i>T. harzianum</i>	5,7	5,4	2,07 ^{ijk}
T5	<i>T. harzianum</i>	4,9	4,4	2,11 ^{ghij}
T6	<i>T. koningii</i>	4,3	3,2	2,34 ^a
T7	<i>T. harzianum</i>	2,7	3	1,90 ^l
T8	<i>T. longibrachiatum</i>	4,3	3,4	2,26 ^{bc}
T9	<i>T. longibrachiatum</i>	3,4	3,9	1,87 ^l
T10	<i>T. koningii</i>	4,9	4,1	2,19 ^{def}
T11	<i>T. longibrachiatum</i>	4,3	3,8	2,13 ^{fghi}
T12	<i>T. harzianum</i>	5,5	4,5	2,22 ^{cde}
T13	<i>T. harzianum</i>	4,7	4,2	2,11 ^{ghij}
T14	<i>T. harzianum</i>	4,8	4,6	2,04 ^k
T15	<i>T. koningii</i>	4,3	4,1	2,04 ^k
T16	<i>T. harzianum</i>	4,5	3,7	2,21 ^{cde}
T17	<i>T. koningii</i>	5,2	4	2,30 ^{ab}
T18	<i>T. harzianum</i>	4,1	3,9	2,05 ^{jk}
T19	<i>T. harzianum</i>	4,7	4,3	2,09 ^{hijk}
T20	<i>T. koningii</i>	4,3	3,5	2,22 ^{cde}
T21	<i>T. harzianum</i>	5,5	4,8	2,14 ^{fgh}
T22	<i>T. harzianum</i>	5,1	4,6	2,10 ^{ghijk}
T23	<i>T. harzianum</i>	4,2	3,6	2,16 ^{efg}

* : Au niveau de chaque ligne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P = 0,05$) (Annexe 4).

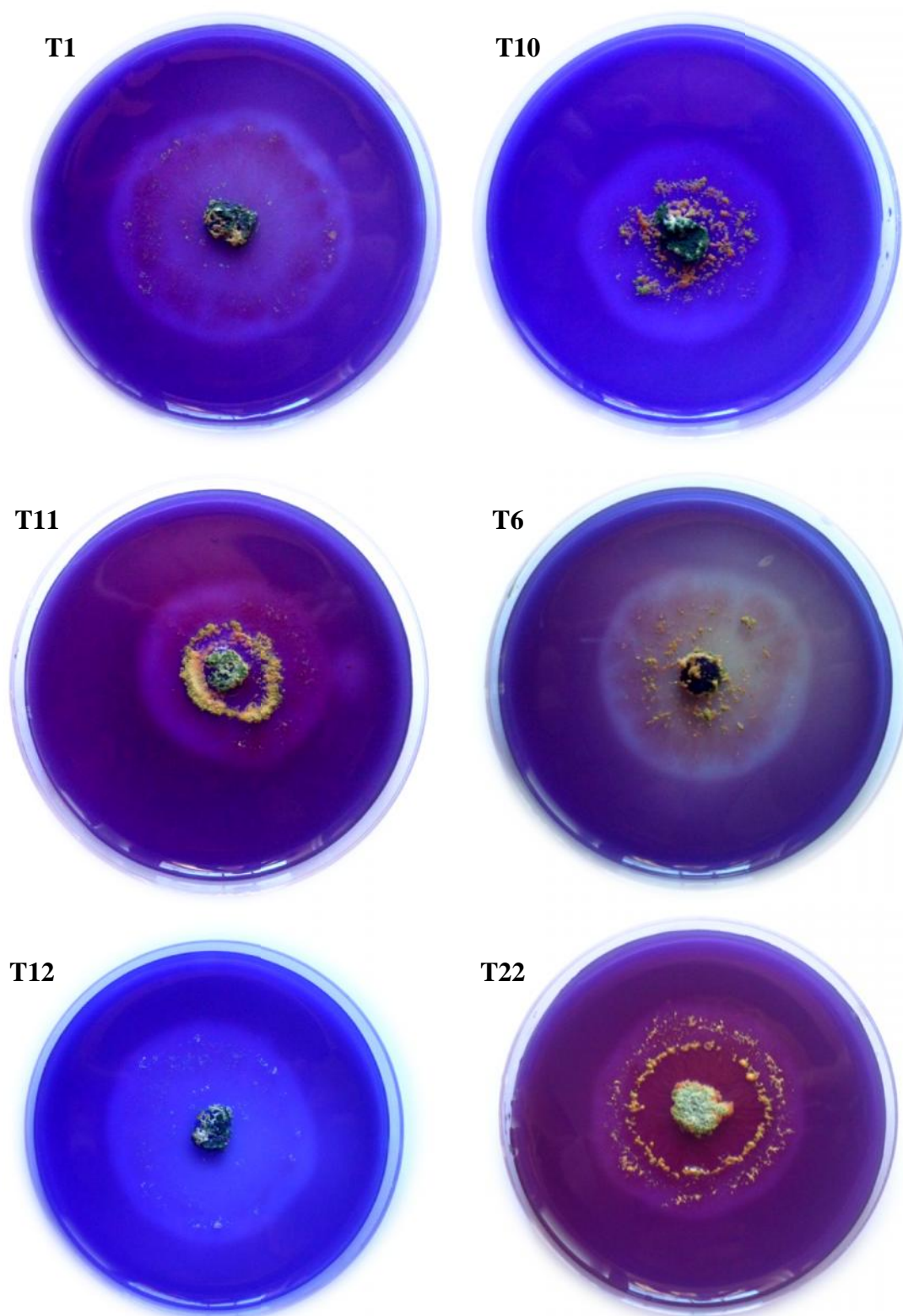


Figure 56: Halo transparent autour des colonies de *Trichoderma* caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK additionné de bleu de bromophénol après 5 jours d'incubation.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

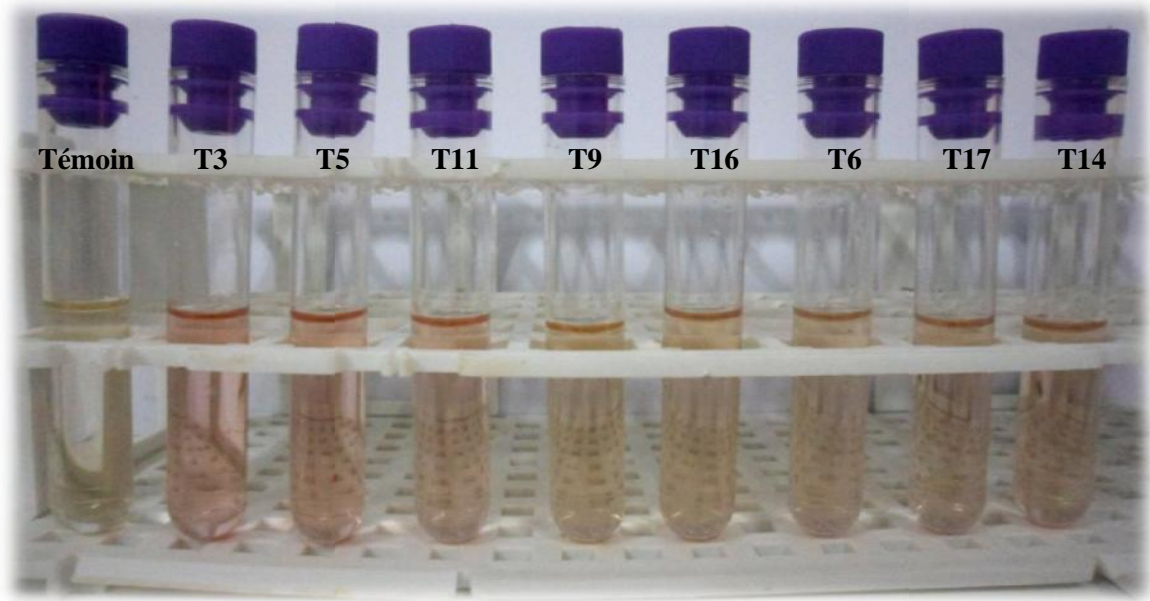


Figure 57 : Production d'AIA sur le milieu liquide additionné de tryptophane.

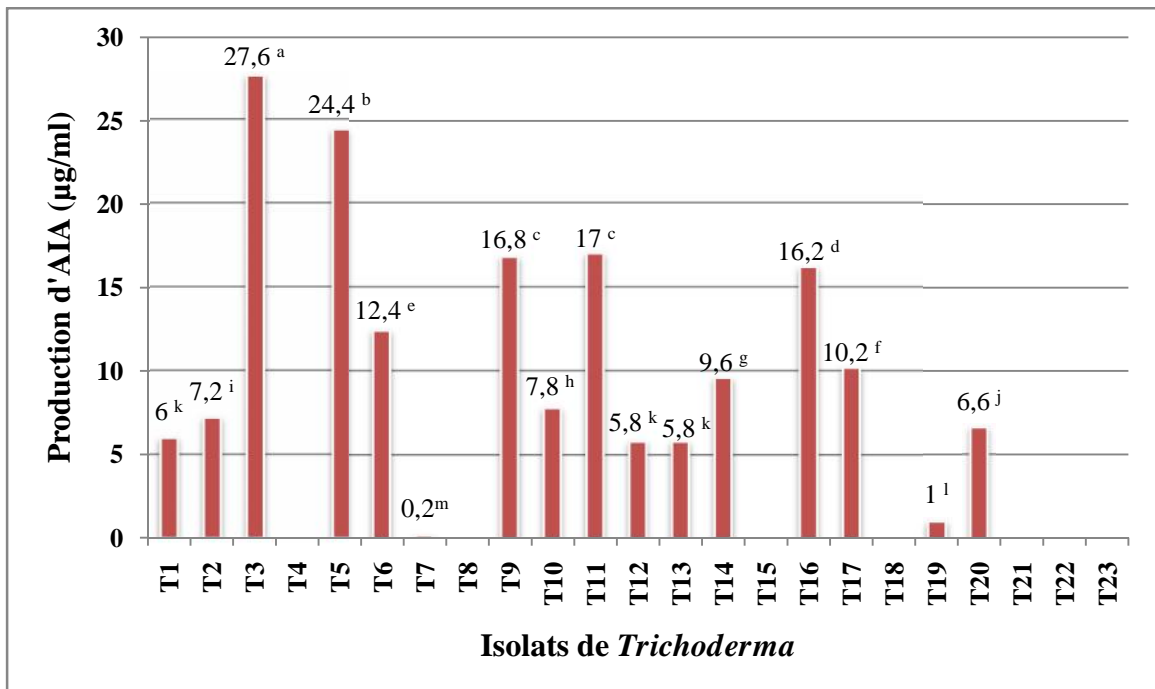


Figure 58 : Production de l'AIA (µg/ml) sur le milieu liquide additionné de tryptophane. Au niveau de chaque colonne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P < 0,05$) (Annexe 4).

3.3. Discussion

Comprendre les modes d'action des *Trichoderma* par rapport à leurs activités antagonistes sur les pathogènes des plantes est essentiel pour l'optimisation et la mise en œuvre des systèmes de lutte biologique. Les modes d'action des agents de lutte biologique sont généralement difficiles à déterminer *in vivo*. Par conséquent, les essais biologiques *in vitro* sont des outils très utiles pour déterminer les mécanismes possibles ou les plus probables.

Les essais sur les activités enzymatiques des isolats de *Trichoderma* ont mis en évidence la production des enzymes de dégradation à des niveaux élevés des chitinases, cellulases, protéases, amylases, ligninases et lipases.

Cette étude *in vitro* sur les enzymes nous a démontrée que les isolats de *Trichoderma* avaient un potentiel d'être des mycoparasites sur un agent pathogène, où le mycoparasitisme implique également la synthèse d'un mélange riche en enzymes hydrolytiques. Selon Howell (2003) et Harman *et al.* (2004), les protéases, les chitinases et/ou des enzymes glucanases ont une fonction en décomposant les polysaccharides, la chitine, et les β -glucanes qui sont responsables de la rigidité des parois des cellules fongiques, détruisant ainsi l'intégrité de la paroi cellulaire.

La production de cellulase, lipase et pectinase par *Trichoderma* spp. a également été associée au biocontrôle des agents phytopathogènes (Elad et Kapat, 1999 ; Barbosa *et al.*, 2001). Par conséquent, la protéase et la cellulase produites par *Trichoderma* spp. jouent 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 espèces de *Trichoderma* ont été signalées comme des producteurs d'amylase (Calistru *et al.*, 1997). Cependant, il n'y a pas de rapport avec la présence d'amidon et les parois cellulaires fongiques, mais elle a été suggérée pour aider dans la survie saprophytique (De Marco *et al.*, 2003). L'amidon est disponible et largement répandu dans la nature, d'où la production de amylase pourrait être utile pour dégrader l'amidon présent à des produits simples tels que le glucose pour maintenir leurs besoins métaboliques (De Marco *et al.*, 2003). D'après Barbosa *et al.* (2001), la production d'amylase par *Trichoderma* spp. est en partie responsable de la croissance rapide des antagonistes sur le milieu gélosé PDA.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Nos isolats antagonistes ont démontré une bonne capacité de dégrader la lignine. Dans cette étude, le changement de couleur sur le milieu de culture à base de l'acide tannique est utilisé comme un indicateur de la synthèse polyphénol-oxydase. La synthèse de la polyphénol-oxydase est nécessaire pour la dépolymérisation de la lignine. Bien que la lignine est structurellement différente de l'acide tannique, ce dernier est utilisé comme un indicateur des polyphénol-oxydases et pour sélectionner les microorganismes ligninolytiques (Thormann *et al.*, 2002 ; Mukhlis *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus concernant le phosphate solubilisé par les isolats de *Trichoderma* montrent que tous les isolats arrivent à solubiliser le phosphate tricalcique incorporé dans le milieu solide. L'activité solubilisatrice est mise en évidence par la présence d'un halo clair autour de la colonie de *Trichoderma*. L'intensité de cette activité varie selon l'isolat testé avec un IS allant de 1,87 à 2,34. Kapri et Tewari (2010) ont pu isoler 14 souches de *Trichoderma* de la rhizosphère de différentes espèces végétales ayant une capacité à solubiliser le phosphore. D'autres champignons, notamment des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*, possèdent également cette (Altomare *et al.*, 1999 ; Yedidia *et al.*, 2001, Coutinho *et al.*, 2012 ; Resende *et al.*, 2014). D'après Das *et al.* (2013), une activité solubilisatrice chez différents champignons de sols a été examinée. Ces chercheurs ont constaté que leur IS est de 1,87 pour *Trichoderma asperellum* et de 1,62 à 1,79 pour *T. harzianum*, *T. viride*, *T. citrinoviride*. Par contre les deux espèces *Aspergillus niger* et *A. flavus* ont montré une valeur d'IS de 1,58 et 1,52 respectivement. La plus faible valeur est notée pour *Penicillium funiculosum* avec un IS égale à 1,41. Selon Tarafdar *et al.* (2003), les *Trichoderma* sp. sont plus efficaces à solubiliser le P par rapport à d'autres champignons.

Le phosphore est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote (Nautiyal, 1999). Malheureusement dans les sols agricoles, environ 95 à 99% de la teneur totale en phosphate se présente sous une forme insoluble (Vassileva *et al.*, 1998) et donc non assimilable par les plantes.

Alors que l'engrais de phosphate représente un coût non négligeable aux agriculteurs, plus que les $\frac{3}{4}$ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol re-précipitent en des formes insolubles par des métaux cationiques du sol (Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{++}), augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément. Sous ces formes insolubles ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dans les sols alcalins et FePO_4 et AlPO_4 dans les sols acides), elles peuvent se

lessiver et contaminent les nappes phréatiques et les cours d'eaux (Goldstein, 1986 ; Subba Rao, 1999 ; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Dans de telle situation, plusieurs recherches ont été effectuées pour développer des méthodes alternatives à l'utilisation des fertilisants chimiques et de s'orienter vers des microorganismes du sol ayant la capacité à solubiliser le P afin de les utiliser comme inoculum pour la mobilisation de phosphore dans des sols pauvres (Cattelan *et al.*, 1999 ; Yasser *et al.*, 2014).

Les microorganismes solubilisant le phosphate ont attiré l'attention d'agronomes en les utilisant comme inoculum du sol pour améliorer la croissance et le rendement des plantes (Young, 1994; Young *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1999; Fasim *et al.*, 2002).

Cependant, la solubilisation du P est un phénomène complexe, qui dépend de plusieurs facteurs : nutritionnel, physiologique ainsi que les conditions de croissance de la culture (Reyes *et al.*, 1999). D'ailleurs plusieurs protocoles expérimentaux ont mis en évidence le rôle d'acides organiques dans la solubilisation du phosphate minérale (Halder *et al.*, 1990). Dans la plupart des cas rapportés, le processus de la solubilisation des phosphates inorganiques par les *Trichoderma* implique vraisemblablement la sécrétion d'acides organiques et de phosphatases en détruisant ainsi les liaisons ioniques fortes existant entre le calcium (ou autre ion constitutif) et le phosphate (Richardson *et al.*, 2000; Tarafdar *et al.*, 2003; Aseri *et al.*, 2009).

Nos résultats obtenus sur l'AIA (Acide indole acétique) ont montré que les isolats de *Trichoderma* sont en mesure de produire de l'AIA, un régulateur de croissance important chez la plante. La production de ce régulateur de croissance est d'ailleurs souvent associée à la stimulation de la croissance par les micro-organismes bénéfiques (Patten et Glick, 1996 ; 2002 ; Vassilev *et al.*, 2006, Greval *et al.*, 2007).

L'analyse des résultats de l'AIA révèle une production remarquable de cette hormone synthétisée. La production de ce composé est variable d'un isolat à l'autre allant de 0,2 µg/ml à 27,6 µg/ml en présence du L-tryptophane. Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone (Ali *et al.*, 2009). Cependant, les exsudats racinaires sont la source principale naturelle de L- tryptophane pour la microflore rhizosphérique (Spaenpen *et al.*, 2007; Dastager *et al.*, 2010).

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Les travaux de Greval *et al.*, (2007) portés sur la production de l'AIA par *Trichoderma atroviride* et *Pseudomonas putida* ont démontré que ces deux souches ont la capacité de synthétiser l'AIA à une quantité estimée à 6,2 et 3,3 µg/ml respectivement en présence du tryptophane et de 38,5 et 11,8 µg/ml respectivement en présence du tryptophane.

3.4- Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre ont mis en évidence la capacité des isolats de *Trichoderma* à produire des enzymes lytiques, à solubiliser le phosphate et à synthétiser l'hormone de croissance AIA à des degrés différents d'un isolat à un autre. Les taux des composés indoliques obtenus dans la présente étude par certains isolats de *Trichoderma* peuvent être considérés comme étant des PGPF (Plant Growth Promoting Fungi). À l'issue de l'analyse globale des résultats, nous supposons que l'utilisation de nos isolats peut démontrer *in vivo* une bonne protection des plantes contre les pathogènes suite à leurs capacités à sécréter des enzymes lytiques et un bon développement des plantes suite à leurs potentialités à synthétiser de l'AIA et à solubiliser le phosphate ayant un rôle dans la biofertilisation.

4. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur FOC en pots

4.1. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur l'incidence de la maladie

Au cours de cette expérience, l'effet protecteur de *Trichoderma* spp. à l'égard de FOC responsable du flétrissement vasculaire de pois chiche a été testé sur le cultivar sensible ILC 482. L'efficacité « *in vivo* » des trois isolats (T5, T10 et T14) sur l'incidence de la maladie a été évaluée au bout de 40 jours.

Les résultats obtenus montrent que les 1^{iers} symptômes ont été apparus le 14^{ème} jour après le semé des graines inoculées uniquement avec le FOC en pots où nous avons observé que la maladie s'est installée rapidement. Les observations régulières, notées, ont montré aussi que les symptômes typiques du flétrissement vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement débutant par les feuilles basales et montant progressivement vers celles du haut, ces symptômes sont représentatifs d'un niveau d'infection important (Figure 59a).

Dans ces essais, nous avons noté une variation de la maladie évaluée sous forme de pourcentage des plantes ayant atteintes un indice symptomatologique de 3,8 correspondant au flétrissement généralisé ou à la mort de la plante (Figure 59b). En effet, dans le cas des plantes inoculées par FOC, l'incidence de la maladie est de 98,33% et allant même jusqu'à la non germination de quelques semences et/ou une croissance ralentie. La pathogénicité de FOC s'est manifestée aussi bien au stade semence qu'au stade plantule, principalement par des manques à la levée, des mortalités élevées des plantules et une inhibition importante de la croissance racinaire.

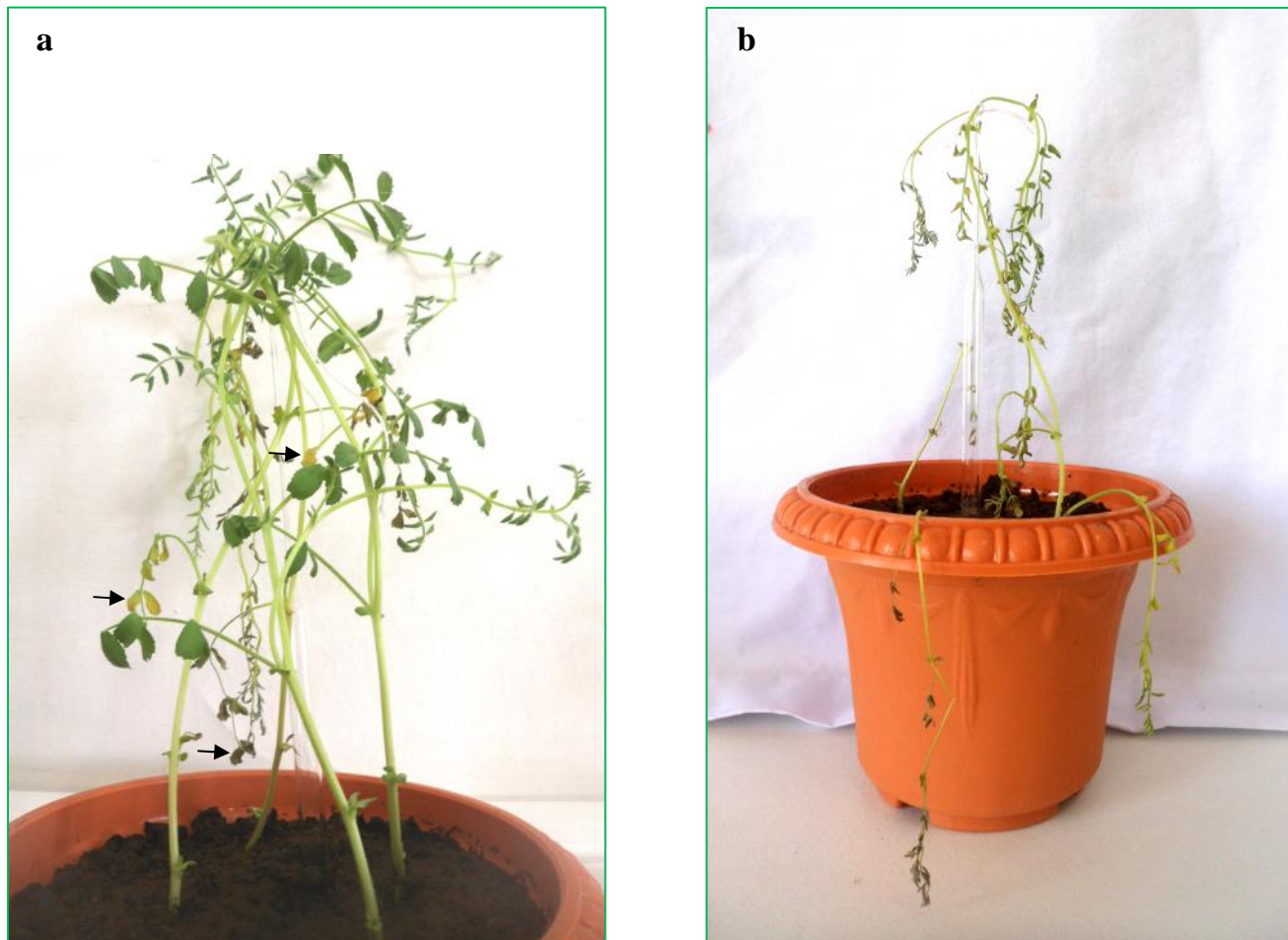


Fig. 59 : a. Symptômes typiques du flétrissement vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement et un flétrissement sur les feuilles de plantes inoculées par FOC après 19 jours de semés.

b. Plantes inoculées avec FOC montraient les symptômes caractéristiques de flétrissement vasculaire après 40 jours de semés.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Concernant les plantules issues des semences inoculées par FOC et traitées séparément par les trois isolats de *Trichoderma*, les symptômes n'apparaissent qu'après 24 à 31 jours, selon l'isolat testé (Tableau 10).

Une bioprotection des plantes *in vivo*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de FOC, a été induite. Au bout de 40 jours, des taux d'infection faibles de 6,33, 14,43 et 26,63% ont été enregistrés chez les plantes traitées avec les trois isolats T5, T14 et T10 respectivement avec des symptômes atténués principalement un jaunissement foliaire qui correspond à des indices de maladie moins de 1,79 (Figure 60 et 61).

L'analyse de l'incidence de la maladie (IM) lors de ce test montre que tous les isolats testés réduisent significativement l'incidence de la maladie (IM) par rapport au témoin (Annexe 5).

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des trois espèces de *Trichoderma* (T5), (T14) et (T10). En effet, leur application a réduit IM à 92%, 83,9% et 71,7% respectivement (Figure 61).

Tableau 10 : La durée d'apparition des 1^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots selon les traitements.

Traitements	La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes (jours)	Incidence de la maladie (IM %)*	La gravité de la maladie (échelle de 0 à 4)	Réduction d'incidence de la maladie (RM%)
FOC1	14	98,33 ^d	3,80	-
FOC1+ T5	31	6,33 ^a	1,13	92
FOC1 +T14	29	14,43 ^b	1,37	83,9
FOC1 +T10	24	26,63 ^c	1,79	71,7

*: au niveau de la colonne, les moyennes des valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keuls au seuil 5 % (Annexe 5).



Fig. 60 : Essai de lutte biologique en pots : (1) plantes traitées seulement par *T. harzianum* (T5), (2) plantes inoculées seulement par FOC, (3) plantes traitées par *T. harzianum* (T5) et inoculées par FOC, (4) témoin sain.

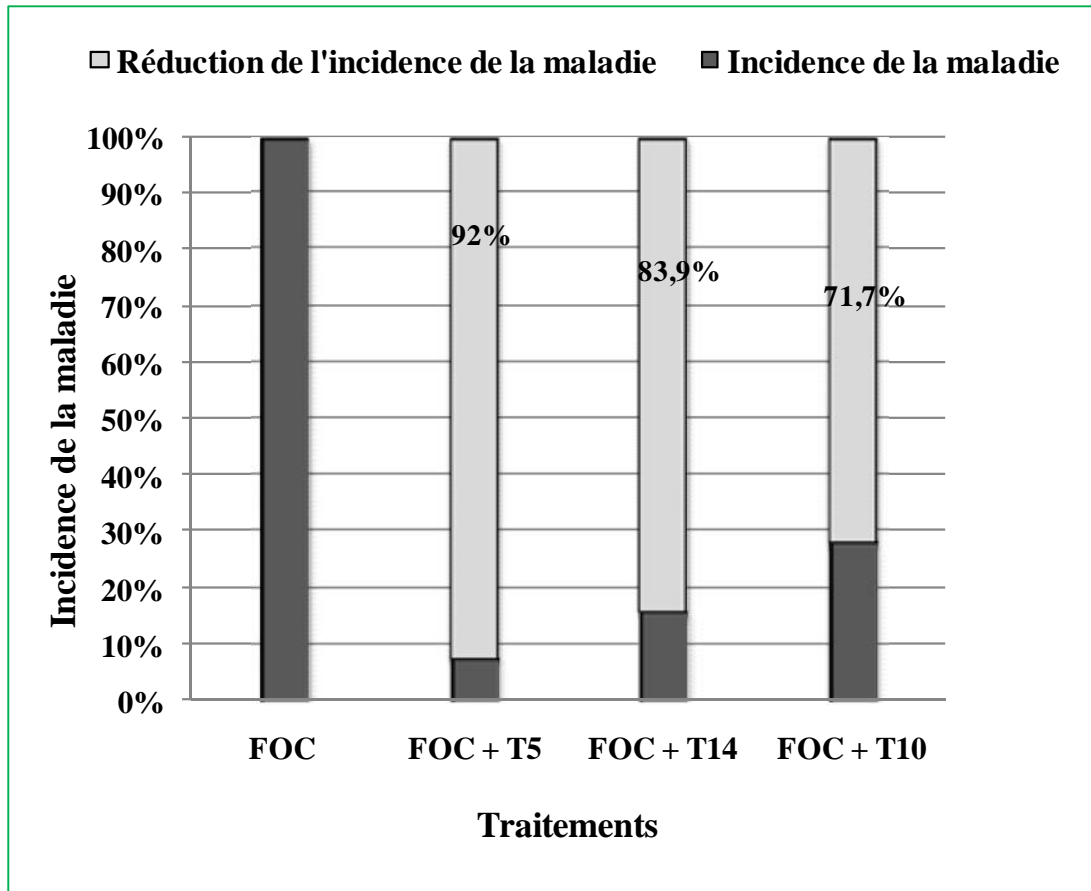


Fig. 61: Incidence et réduction du flétrissement vasculaire (%) en pots en comparaison avec les plantes issues des graines inoculées seulement avec FOC et les plantes issues des graines inoculées et traitées par *Trichoderma* spp.

4.2. Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur les paramètres de développement végétatif de pois chiche

Le traitement des graines par les trois *Trichoderma* (T5, T14 et T10) a un effet bénéfique dès la germination en favorisant le développement des graines en présence de pathogène et en retardant l'apparition des symptômes (Figure 62).



Fig. 62 : Effet de traitement des graines d'ILC 482 par *T. harzianum* (T5) sur la germination, en comparaison avec le témoin non traité et les graines inoculées par FOC et traitées par T5.

En conséquence, les plantes issues des graines traitées séparément par les trois espèces antagonistes présentent un développement végétatif plus important comparativement à ceux du témoin sain et de plantes issues des graines inoculées par le pathogène et traitées par l'antagoniste (Figure 63 et Figure 64).

Mieux encore, l'observation de l'état des plantes inoculées par le pathogène et par l'antagoniste, comparativement à celui du témoin sain (non inoculé et non traité), montre que les plants traités par *T. harzianum* (T5) présentent un développement végétatif plus important (Figure 63). De même, la comparaison du système racinaire des plantes traitées par les isolats de *Trichoderma* à celui des plantes inoculées seulement par FOC, montre une nette différence entre les deux (Figure 64). En effet, pour les plantes traitées avec ces antagonistes, le système racinaire se développe normalement et aucun brunissement ou pourriture ne sont observés.

Il est à noter que les paramètres de développement végétatif ont été mesurés à la fin de l'essai en pots. L'effet de traitement des semences de pois chiche par les espèces de *Trichoderma* sur les paramètres de croissance végétative est représenté dans le tableau 11.



Fig. 63 : Etat des plantes inoculées par le pathogène et par l'antagoniste, comparativement à ceux du témoin sain et traité, les plants traités par *T. harzianum* (T5) présentent un développement végétatif plus important.



Fig. 64 : Effet bio-stimulateur de *Trichoderma* (T5) sur la croissance racinaire du pois chiche ILC482.

- a-** Témoign (non inoculé par FOC et non traité par *Trichoderma* (T5)),
- b-** plante traitée par *Trichoderma* (T5) et non inoculée par FOC ;
- c-** plante traitée par *Trichoderma* (T5) et inoculée par FOC ;
- d-** plante inoculée par FOC uniquement.

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 11 : Variation des paramètres de développement végétatif des plantes de pois chiche traitées par les trois isolats de *Trichoderma* en présence et en absence du FOC

Traitements	Paramètres						
	Longueur (cm)		Poids frais		Poids sec		Finesse racinaire (cm/g)
	tige (cm)	racine (cm)	aérien (g / plant)	racinaire (g/ plant)	aérien (g/ plant)	racinaire (g/ plant)	
Témoin	41,33 ^d	16,10 ^g	3,53 ^f	1,96 ^g	0,56 ^e	0,21 ^e	76,66 ^b
T5	49,13 ^a	19,86 ^a	4,89 ^a	3,51 ^a	0,78 ^a	0,35 ^a	56,74 ^f
T14	45,16 ^b	19,46 ^b	4,42 ^b	3,38 ^b	0,71 ^b	0,34 ^{ab}	57,23 ^f
T10	45,13 ^b	19,13 ^c	4,28 ^c	3,31 ^c	0,67 ^c	0,33 ^{ab}	57,96 ^f
FOC	37,40 ^f	14,76 ^h	2,92 ^g	1,27 ^h	0,47 ^g	0,12 ^f	123 ^a
T5+ FOC	42,10 ^c	18,93 ^d	4,10 ^d	3,14 ^d	0,66 ^c	0,31 ^{bc}	61,06 ^e
T14+ FOC	41,26 ^{de}	18,63 ^e	3,97 ^e	2,91 ^e	0,63 ^d	0,29 ^{cd}	64,24 ^d
T10+ FOC	41,23 ^e	18,43 ^f	3,55 ^f	2,64 ^f	0,57 ^e	0,27 ^d	68,25 ^c

LT : Longueur de la tige ; **LR :** Longueur de la racine ; **PFP :** Poids frais de la partie aérienne ; **PFR :** Poids frais des racines ; **PSP :** Poids sec de la partie aérienne ; **PSR :** Poids sec des racines ; **FR :** la finesse racinaire ; Les valeurs d'une même colonne accompagnées de différentes lettres sont significativement différentes au seuil de 5% (test SNK).

L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif pour la longueur de la tige, longueur de la racine, le poids frais de la partie aérienne, le poids frais des racines, le poids sec de la partie aérienne, le poids sec des racines et la finesse racinaire (Annexe 5).

La longueur de la tige des plantes traitées est variable de 45,13 à 49,13 cm selon l'isolat testé par rapport au témoin. Ainsi que, les plantes inoculées par FOC et traitées par *Trichoderma* spp. ont enregistré des longueurs plus élevées allant de 41,23 à 42,10 cm en comparaison avec les plantes inoculées uniquement par FOC et qui ont présenté la petite longueur de la tige (37,40 cm) (Tableau 11).

La longueur de la racine des plantes traitées est variée de 19,13 à 19,86 cm selon l'isolat testé par rapport au témoin. Ainsi que, les plantes inoculées par FOC et traitées par *Trichoderma* spp. ont enregistré des longueurs plus élevées allant de 18,43 à 18,93 cm en comparaison avec les plantes inoculées uniquement par FOC et qui ont présenté la petite longueur de la racine (14,76 cm) (Tableau 11).

Un effet significatif de l'amélioration de la croissance des plantes a été observé en présence des trois isolats. Comparativement au témoin, tous les traitements ont donné des valeurs de mesure supérieure et qui sont significativement différentes (Annexe 5).

PARTIE 3 : Résultats et discussion

T. hazrianum (T5) qui a conféré l'indice de la maladie le plus faible a également donné des plantes vigoureuses.

Chez les plantes traitées, le poids frais de la partie aérienne et des racines varie de 4,28 à 4,89 g et de 3,31 à 3,51 g respectivement. Le poids sec de la partie aérienne et des racines varie de 0,67 à 0,78 g et de 0,33 à 0,35 g respectivement (Tableau 11). Par contre, chez les plantes inoculées par FOC et traitées par *Trichoderma* spp., le poids frais de la partie aérienne et des racines varie de 3,55 à 4,10 g et de 2,64 à 3,14 g respectivement. Le poids sec de la partie aérienne et des racines varie de 0,57 à 0,66 g et de 0,27 à 0,31 g respectivement.

Les résultats du poids frais et du poids sec, de la partie aérienne et des racines, sont hautement significatifs dans le cas du traitement de la variété ILC482 du pois chiche par les trois isolats de *Trichoderma* comparativement au témoin inoculé par FOC.

La finesse racinaire ou longueur spécifique des racines des plantes traitées varie de 56,74 à 57,96 cm/g. Chez les plantes inoculées par FOC et traitées par *Trichoderma* spp., la finesse racinaire varie de 61,06 à 68,25 cm/g (Tableau 11). Par contre, une finesse racinaire de 123 cm/g a été enregistrée chez les plantes inoculées par FOC seulement.

Il est à noter l'existence d'une corrélation positive entre la capacité phytoprotectrice des isolats de *Trichoderma* spp. et la stimulation de la croissance végétative (Tableau 12). Cette corrélation apparaît dans le classement des isolats par ordre d'efficacité qui est le même pour la protection des plants et l'augmentation de la hauteur de la taille des plantes de pois chiche.

L'analyse des résultats obtenus entre l'incidence de la maladie et la finesse racinaire révèle une corrélation positive ($r=0,931$). Le test de la corrélation montre que l'incidence de la maladie, à des pourcentages élevés provoquant un stress hydrique important, est associé à une augmentation de la finesse racinaire.

Il est à rappeler que les trois isolats testés avaient démontré *in vitro* une meilleure activité antagoniste contre les 4 champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium*, une capacité à produire l'hormone de croissance AIA et une bonne solubilisation de phosphate.

Une caractérisation *in vitro* plus poussée de trois isolats testés *in vivo* a alors été entreprise: solubilisation de phosphate, production de phytohormone AIA, production des enzymes chitinase, cellulase, protéase, amylase, ligninase et lipase (Tableau 13).

PARTIE 3 : Résultats et discussion

Tableau 12 : Corrélation entre l'incidence de la maladie et les paramètres de développement végétatif de la variété ILC 482 du pois chiche

Paramètres		Longueur		Poids frais		Poids sec		Finesse	Incidence
		LT	LR	PFP	PFR	PSP	PSR	FR	IM (%)
Longueur	LT	1							
	LR	0,838	1						
Poids frais	PFP	0,955	0,957	1					
	PFR	0,850	0,997	0,959	1				
Poids sec	PSP	0,948	0,955	0,998	0,955	1			
	PSR	0,861	0,991	0,962	0,997	0,957	1		
Finesse	FR	-0,787	-0,920	-0,891	-0,933	-0,880	-0,956	1	
Incidence	IM (%)	-0,746	-0,744	-0,778	-0,776	-0,764	-0,821	0,931	1

LT : Longueur de la tige ; LR : Longueur de la racine ; PFP : Poids frais de la partie aérienne ; PFR : Poids frais des racines ; PSP : Poids sec de la partie aérienne ; PSR : Poids sec des racines ; FR : la finesse racinaire

Tableau 13 : Les caractéristiques *in vitro* de *Trichoderma* spp. testés *in vivo*

Isolats de <i>Trichoderma</i>	Moyenne ICM de <i>Fusarium</i> (%)		Solubilisation de phosphate (IS)	Production de l'AIA (µg/ml)	Production d'enzymes (halo en mm)							Protection en pot (%)
	CD	C à D			Chitinase	Endo-glucanase	Cellubio-hydrolase	Protéase	Amylase	Ligninase	Lipase	
<i>T. harzianum</i> T5	84,39	65,85	2,11	24,4	84	80	72	83	68	68	36	92
<i>T. harzianum</i> T14	82,67	62,81	2,19	9,6	83	83	78	83	58	63	65	83,9
<i>T. koningii</i> T10	81,35	63,75	2,04	7,8	81	47	41	83	45	59	36	71,7

ICM : Inhibition de la croissance mycélienne ; CD : confrontation directe ; C à D : confrontation à distance ; IS : indice de solubilisation

PARTIE 3 : Résultats et discussion

La colonisation des racines des plants de pois chiche par *Trichoderma* est illustrée dans la figure 65. Cependant, il existe une différence entre l'aptitude de ces isolats à empêcher les champignons du sol de pénétrer dans les racines (Fig. 54c). En effet, le repiquage sur milieu gélosé des racines des plantes traitées par *Trichoderma* n'a révélé la présence d'aucune autre espèce de champignons.



4. 3. Discussion

Notre étude s'appuie sur la sélection des *Trichoderma* capables de protéger les plantes de pois chiche vis-à-vis FOC. L'utilisation des champignons indigènes en lutte biologique peut contribuer à préserver non seulement l'équilibre de l'agrosystème, mais aussi le caractère du rendement.

Le traitement des graines de pois chiche avec les trois isolats de *Trichoderma* est très efficace et par conséquent a réduit l'expression du flétrissement vasculaire de 71,7 à 92%. *T. harzianum* (T5) est le champignon qui avait une plus forte capacité à contrôler FOC par rapport à la bonne capacité protectrice démontrée par les autres isolats.

Plusieurs travaux indiquent que les espèces de *Trichoderma* peuvent effectivement limiter la pathogénicité des *Fusarium* (Gajera *et al.*, 2013), et d'autres agents phytopathogènes (Benitez *et al.*, 2004 ; Carvalho *et al.*, 2014 ; Naher *et al.*, 2014).

Une expérience sur pots, menée par Dubey *et al.* (2007), pour l'évaluation des espèces de *Trichoderma* contre le FOC par l'enrobage des graines du pois chiche avec ces derniers a montré l'effet protecteur et stimulateur de croissance de *T. harzianum* où ce dernier a réduit l'incidence de la maladie avec 60,3%. Poddar *et al.* (2004) ont aussi démontrés la potentialité de *T. harzianum* à diminuer l'incidence du flétrissement du pois chiche. Les travaux de Kari Dolatabadi *et al.* (2012) ont également montré l'efficacité des isolats de *Trichoderma* spp. sur le développement de *F. oxysporum* f. sp. *lentis in vitro* et en pots. L'efficacité de *T. harzianum* contre d'autres formes spéciales (f. sp) de *Fusarium* a été signalée par plusieurs auteurs comme f. sp. *cubense* (Thangavelu *et al.*, 2003), f. sp. *dianthi* (Shanmagum *et al.*, 2008) f. sp. *melongenae*, f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* et f. sp. *melonis* (Altinok et Erdogan, 2015).

L'effet bénéfique du *T. harzianum* a été signalé aussi par Sivan *et al.* (1987) qui ont montré que l'enrobage des semences de tomate à l'aide de cet antagoniste a réduit de 80% l'attaque de la fusariose des racines et du collet de la tomate. De plus l'application de *T. harzianum* dans le substrat de culture réduit significativement l'incidence de la maladie durant la saison de culture et par conséquent une augmentation significative de 18,8 % du rendement.

Plusieurs modes d'action ont été proposées pour expliquer le contrôle biologique des agents phytopathogènes par *Trichoderma* ; ceux-ci comprennent, la production des enzymes dégradant la paroi cellulaire du pathogène et des antibiotiques ainsi que le mycoparasitisme. Les *Trichoderma* spp. se sont révélés être des producteurs très efficaces d'enzymes extracellulaires, et certaines d'entre eux ont été impliqués dans la lutte

PARTIE 3 : Résultats et discussion

biologique contre les maladies des plantes (Monte, 2001; Harman, 2006). Ces explications nous laissent suggérer que le mécanisme de protection du pois chiche contre le flétrissement vasculaire pourrait être dû à un degré élevé du mycoparasitisme et de la production de certaines enzymes lytiques par les trois isolats de *Trichoderma* T5, T10 et T14 déjà démontré *in vitro*.

Beaucoup de travaux ont expliqué la bioprotection et la stimulation du développement des plantes à la suite de l'application du *T. harzianum* par l'inhibition des pathogènes et une activation du système de défense de la plante en induisant une résistance systémique ou localisée chez ces plants. Plusieurs *Trichoderma* spp peuvent activer la résistance systémique induite chez les plantes (Yedidia, 2000 ; Brunner *et al.*, 2005 ; Hibar *et al.*, 2005 ; Tran, 2010 ; Shores *et al.*, 2010 ; Perazzolli *et al.*, 2012).

Le traitement des graines a conduit à une protection du cultivar sensible ILC482 contre le pathogène. Cette protection a favorisé la germination des graines. Une augmentation de taux de germination des semences a été exhibée par un traitement avec les trois isolats de *Trichoderma*. La germination est considérée comme une étape critique dans l'établissement des semis et ainsi la détermination d'une production agricole réussie (Benidire *et al.*, 2015).

Dans ce même sens, Windham *et al.* (1986) ont montré que l'addition de *T. harzianum* et de *T. koningii* à un sol préalablement stérilisé a augmenté le pourcentage de germination des semences de tomate et du tabac en le comparant au témoin. Plusieurs résultats sont soutenus avec les observations que les espèces de *Trichoderma* ont augmenté le taux de germination de graines (Harman, 2011 ; Shakshi *et al.*, 2014).

Nos résultats montrent que les trois isolats de *Trichoderma* sont parvenus à stimuler les paramètres de croissance des plants de pois chiche à des degrés variables. Cette stimulation s'est traduite essentiellement par une meilleure croissance axiale et une biomasse plus importante. La stimulation de la biomasse a été observée non seulement dans les parties aériennes, mais aussi dans les parties racinaires.

En effet, Gupta *et al.*, (2006) ont montré que le traitement des graines du pois chiche par *T. viride* a amélioré la biomasse, le poids sec et le rendement en comparaison avec le témoin non traité.

L'amélioration de la croissance végétative des plantes sous l'action du *Trichoderma* spp. a été observée par Windham *et al.* (1986) qui ont montré que

PARTIE 3 : Résultats et discussion

l'application de deux espèces de *Trichoderma* au substrat de culture stérilisé peut améliorer le poids sec des racines et de la partie aérienne de la tomate et du tabac.

La capacité des racines de pénétrer profondément dans le sol pourrait être due à des changements des propriétés mécaniques des membranes cellulaires qui tendent à faire augmenter leur pression de croissance (Whalley *et al.*, 1998 cité par ben Mebarek, 2011). En fait, le choix d'un enracinement profond a été préconisé pour augmenter la productivité des légumineuses à graines sous des conditions d'humidité limitée (Erskine *et al.*, 1994).

Le flétrissement vasculaire est une maladie prédispose le pois chiche à souffrir d'un stress hydrique. La finesse racinaire joue un rôle déterminant dans la résistance à la sécheresse. La souplesse du système racinaire est traduite par l'accumulation de peu de matière sèche au niveau des racines sous des conditions favorables et l'amélioration de la croissance de son système racinaire sous des conditions de déficit hydrique par l'affectation de plus de matière sèche (Daaloul *et al.*, 2007 cités par Ben Mebarek, 2011).

Cette augmentation a été notée aussi bien pour les poids frais que pour les poids secs, ce qui montre qu'il s'agit d'un accroissement général du métabolisme et non seulement d'une absorption excessive d'eau.

Mieux encore, Hibar *et al.* (2005) ont comparé l'état des plantes de tomate inoculées par une souche pathogène du *F. oxysporum* et traitées par *T. harzianum* avec des plantes témoins saines non inoculées et non traitées. Ils ont constaté que les plantes inoculées par le pathogène et traitées par l'antagoniste présentaient un développement végétatif et racinaire plus important que les plants témoins.

Néanmoins, les travaux de Mouria *et al.* (2008) ont mis en évidence l'aptitude des espèces du *Trichoderma* à stimuler la croissance des plantes indépendamment de tout agent pathogène, ce qui est aussi confirmé dans notre étude où ils ont expliqué que cette stimulation est due à l'influence des souches de *Trichoderma* sur le métabolisme et l'activité enzymatique des plantes et non pas seulement les systèmes de défense. Dans ce même sens, Greval *et al.* (2007) et Salas-Marina *et al.* (2011) ont suggéré que les *Trichoderma* ont la capacité de produire des phytohormones comme l'AIA (acide indole acétique) qui peuvent agir d'une façon directe sur l'amélioration de la croissance des plantes. Ces phytohormones agiraient par renforcement ou accélération du développement à la fois du système racinaire et de la partie aérienne des plantes. Par conséquent, la surface

des racines est amplifiée ; ce qui intensifie l'absorption des éléments nutritifs, de l'eau et des minéraux par les plantes.

Les résultats obtenus montrent que les 3 isolats de *Trichoderma* testés sont parvenus à promouvoir la croissance des plants de pois chiche à des valeurs de mesure variables. Cette stimulation s'est traduite essentiellement par une meilleure croissance axiale et une biomasse plus importante. Ce qui corrobore avec les résultats de plusieurs auteurs (Greal *et al.*, 2007 ; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009 ; Sofo *et al.*, 2011 ; Salas-Marina *et al.*, 2011).

4. 4- Conclusion

L'étude réalisée sur les *Trichoderma* isolés de différents sols du nord-ouest Algérien a montré qu'ils sont capables de parasiter les champignons phytopathogènes et à diminuer l'incidence de la maladie du flétrissement vasculaire du pois chiche.

Cette étude a montré que l'action des *Trichoderma* testée ne se limite pas seulement à la protection de la plante mais aussi à la stimulation de la croissance des plantes. De plus, les résultats obtenus par une caractérisation de ces souches y compris la production des substances favorisant la croissance des plantes (AIA,...) et la solubilisation de phosphate, suggèrent que ces isolats peuvent être des PGPF présentant des compétences rhizosphériques en stimulant la croissance végétative. En effet, une meilleure utilisation de ces champignons nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui interviennent pour stimuler la croissance et/ou protéger la plante.

Conclusion générale et perspectives

Les cultures intensives, paient un lourd tribut au parasitisme. Cette situation des agents pathogènes rend compte des difficultés rencontrées quand les moyens de lutte chimique sont préconisés. Nous avons, donc cherché d'autres alternatives de lutte contre ces champignons modèles, à savoir les espèces de *Fusarium sp.*, entre autres par la lutte biologique. L'agent actif de lutte biologique utilisé est le *Trichoderma*. Une collection de 23 isolats de *Trichoderma spp.*, isolés à partir des sols de quatre régions du nord-ouest Algérien (Mascara, Mostaganem, Oran et Tlemcen), présentant trois espèces du genre *Trichoderma* à savoir *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. longibrachiatum*.

Les travaux présentés dans cette thèse visaient l'élaboration d'une stratégie de lutte envers des *Fusarium* phytopathogènes, par une approche exploitant l'effet bénéfique des *Trichoderma* originaires de cultures différentes. Dans ce contexte, la lutte biologique contre les agents causals du flétrissement vasculaire et la pourriture racinaire à l'aide de champignons antagonistes semble être une alternative prometteuse à l'emploi des fongicides.

Le pouvoir antagoniste des 23 isolats de *Trichoderma* a été testé et qui est un critère de sélection important, sélection généralement effectuée *in vitro*, sur milieu de culture. Bien que contestable pour juger le comportement de l'antagoniste dans son milieu naturel, l'étude en laboratoire de ces modes d'action renseigne sur le potentiel d'un champignon antagoniste à l'égard du pathogène.

La caractérisation *in vitro* des *Trichoderma* antagonistes a démontré que l'ensemble de ces dernières ont la capacité de produire des métabolites secondaires volatils et non-volatils, des phytohormones (AIA) et des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire du pathogène (chitinase, cellulase, protéases et lipases), même qu'ils ont l'aptitude de solubiliser le phosphate. Toutes ces caractéristiques rendent ces isolats de champignons promoteurs de la croissance des plantes (PGPF).

Trois isolats T5, T10 et T14 ont été choisis comme des *Trichoderma* antagonistes les plus performants ; il s'agit de *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. harzianum* respectivement. Une identification moléculaire a affirmé l'identité de l'isolat T5.

Les essais *in vivo*, ont montré que les trois espèces de *Trichoderma* sélectionnés protégeaient, de manière évidente et à des degrés variables, les plantes de pois chiche traitées contre le flétrissement vasculaire, en réduisant l'incidence de cette maladie (IM) en

pots. En effet, l'effet répressif de *Trichoderma* spp. a résulté d'une augmentation de la croissance végétative des plantes de pois chiche.

En conclusion, si nous nous reportons au point de départ de cette étude, soit la détection et l'isolement de souches pour le développement d'agents de biocontrôle, nous pouvons affirmer avoir atteint ces objectifs. En effet, nous avons isolé un bon nombre de *Trichoderma* antagonistes et certains de ces isolats ont montré une forte capacité à inhiber la croissance du pathogène, lors de tests de confrontation *in vitro*, et à empêcher l'expression du FOC par une forte réduction de la maladie *in vivo*.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- il faudra s'intéresser à l'augmentation de la taille de l'échantillonnage, il est probable de trouver d'autres espèces qui jouent un rôle protecteur et stimulateur de la croissance végétale.
- Le principe reposerait sur la combinaison de techniques standardisées d'analyse moléculaires à celles morphologiques et métaboliques (dans notre cas la biosynthèse des substances volatiles et non volatiles). Il serait alors nécessaire de disposer d'un grand nombre d'isolats pour constituer une base de données de référence et de purifier les métabolites secondaires produits par les espèces de *Trichoderma* et déterminer leur structure.
- Etudier le mécanisme d'action d'éventuelle PGPF : induction du système de la résistance de la plante.

Les résultats obtenus sont encourageants. Certes, divers travaux restent à faire pour finir de développer un produit biologique efficace et employé à grande échelle. La capacité de *Trichoderma* spp. à contrôler des agents phtopathogènes du sol est connue depuis le début XX^{ième} siècle, mais ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de biopesticide, ce qui indique la somme considérable des connaissances qu'il faut acquérir avant de permettre l'utilisation pratique d'une telle méthode de lutte (Lepoivre, 2003).

Il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle des espèces pathogènes de *Fusarium*, ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de ces maladies. Il est donc impératif de poursuivre la recherche en vue d'établir la meilleure combinaison des traitements susceptible de conférer une protection maximale de cultures contre les maladies des plantes.

- Abe C.A.L., Faria C.B., de Castro F.F., de Souza S.R., Santos F.C., da Silva C.N., Tessmann D.J. and Barbosa-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., 1988.** Plant Pathology, In: Noriega Group, editor. Plant Pathology, 3rd ed. Mexico: Academic Press, 803pp.
- Agrios G.N., 2005.** Plant Pathology, 5th Edition, Elsevier Acad. Press, pp: 163-164.
- Aimé S., Cordier C., Alabouvette C., Olivain C., 2008.** Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 73 : 9–15.
- Alabouvette C., 1986.** *Fusarium*-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of 10-years study, *Agronomie*, 6: 273–84.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., and Louvet J., 1984.** Recherches sur la résistance des sols aux maladies. X-Comparaison de la mycoflore colonisant les racines de melons cultivés dans un sol résistant ou dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires, *Agronomie*, 4: 735.
- Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C., 2006.** Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 329–341.
- Ali B., Sabri A.N., Ljung K. and Hasnain S., 2009.** Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 542–547.
- Altinok H. and Erdogan O., 2015.** Determination of the *In vitro* Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Not Bot Horti Agrobo*, 43(2):494-500.
- Altomare C., Norvell W.A., Bjorkman T. and Harman G.E., 1999.** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2926–2933.
- Amini J., Sidovich D.F., 2010.** The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.*, 50: 172–178.
- Anderson R.D., 1993.** Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dans : *Proceedings of the International Symposium Cellular and Molecular Aspects of Biosynthesis and Action of the Plant Hormone Ethylene.* (Agen, France, 31 août – 4 septembre, 1992). Pech J.C., Latché A. & Balagué C. (éds.). New York, Springer, pp 197-204.
- Andrabi M., Vaid A., Razdan V.K., 2011.** Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *J Plant Prot Res* 51: 5–59.
- Appel O. and Wollenweber H.W., 1910.** Die Kultur als Grundlage zur besseren Unterscheidung systematisch schwieriger Hyphomyceten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 28: 435–448.
- Aseri G.K., Jain N., Tarafdar J.C., 2009.** Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi-arid soils of India. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 5: 564-570.
- Askary H., Benhamou N., and Brodeur J., 1997.** Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, 87:359-368.

- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. et Tweddell R.J. , 2008.** Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1733-1740.
- Baayen R.P, van den Boogert P.H.J.F., Bonants P.J.M., Poll J.T.K., Blok W.J., Waalwijk C., 2000.** *Fusarium redolens* f.sp *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 907–12.
- Badri D.V., Weir T.L., van der Lelie D., Vivanco J.M., 2009.** Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol*, 20: 642–650.
- Bahous M., Ouazzani Touhami A. et Douira A., 2008.** Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire.
- Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T., and Holmes K.A., 2008.** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential in *Theobroma cacao*. *Biol. Control*, 46:24–35.
- Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T. and Holmes K.A., 2008.** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46: 24-35.
- 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.
- Baker K.F., 1988.** *Trichoderma* spp as plant-growth stimulants - C. R. C. Crit. Rev. Biotechnol, 7(2): 97-106.
- Baker K.F. and Cook R.J., 1982.** *Biological Control of Plant Pathogens*. St Paul: APS Press, 433 pp.
- Balajee S.A. Borman A.M., Brandt M.E., Cano J., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Guarro J., Haase G., Kibbler C.C. & other authors, 2009.** Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol*, 47: 877–884.
- 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.
- Beckman C.H., 1987.** *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press).
- Beckman C.H., Roberts E.M., 1995.** On the nature genetic basis for resistance tolerance of fungal wilt diseases. *Advances in Botanical Research*, 21: 35-77.
- 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. & Srini.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.

- Belabid L., Baum M., Fortes Z., Bouznad Z. and Eujayl I., 2004.** Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol*, 3: 25-31.
- Bélangier R.R., Dufour N., Caron J. et Benhamou N., 1995.** Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* : Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology*, 5 : 41-53.
- Ben Mbarek K., 2011.** Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type « kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, 280p.
- Benbrook C.M., Groth E., Halloran J.M., Hansen M.K. and Marquardt S., 1996.** Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers. 272.
- Benhamou N. et Chet I., 1997.** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*". *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 2095–2099.
- Benidire L., Daoui K., Fatemi Z.A., Achouak W., Bouarab L., Oufdou K., 2015.** Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L. (Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.). *J. Mater. Environ. Sci*, 6 (3): 840-851.
- Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C. and Codon A.C., 2004.** Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbio*, 7: 249-260.
- Bent E., 2006.** Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Tuzun, S., Bent, E. (Eds.), *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, US, pp. 225–258.
- Benzohra I.E., Megateli M. and Berdja R., 2015.** Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management, *14(7)*: 542-550.
- 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.
- Berg G., Smalla K., 2009.** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol*, 68: 1–13.
- Berg G., Zachow C., Lottmann J., Götz M., Costa R., Smalla K., 2005.** Impact of soil type and plant species on fungi antagonistic to *Verticillium dahliae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 71 : 4203–4213.
- Besri M. et Diatta F., 1985.** Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. *Bull. OEPP*, 15(3) : 379-386.
- 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* sect. nov. *Can. J. Bot*, 62:924-931.
- Bissett J., 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Can. J. Bot*, 60:2357-2372.

- Bissett J., 1991b.** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. Can. J. Bot, 69:2373-2417.
- Bissett J., 1991c.** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Can. J. Bot, 69:2418-2420.
- Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., and Samuels G.J., 2015.** Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA FUNGUS, 6(2): 263–295. doi:10.5598/imafungus.
- Blancard D., 1988.** Maladie de la tomate. INRA Paris, PHM Limoges, 212 p.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T., 2009.** Maladies de la tomate : identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae : 679 pages
- Blaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jedryczka M., 2014.** *Trichoderma* spp. application and prospects for use in organic farming and industry. J Plant Prot Res, 54:309–317.
- Boisson C. et Renard J.L., 1987.** Les maladies cryptogamiques des plantes maraichères en Cote d'Ivoire. Horticole, 398: 36-40.
- Bolton A.T., 1984.** Root rot of *Ficus benjamina*. Plant Dis, 68: 816–817.
- Bolwerk A., Lagopodi A.L., Wijfjes A.H.M., Lamers G.E.M., Chin-A-Woeng T.F.C., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V., 2003.** Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrolstrains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. MolPlant Microbe Interact, 11:983–993
- Booth C., 1971.** The genus *Fusarium*. Kew (surrey): Common Wealth Mycologica Institute, England. pp 137.
- Bourguignon E., 2008.** Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Ph.D.Thesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand. pp, 235.
- 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. et Silverstone S.E., 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized. on a nitrocellulose membrane. Appl. Env. Microbiol, 533-538.
- Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Woo S.L., Lorito M., Kubicek C.P., et al. 2005.** Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 3959-3965.
- Bulit J., Louvet J., Bouhot D., Toutain G., 1967.** Recherches sur les fusarioses. I. Travaux sur le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. Ann Epiphyties, 18, 231-239.
- Cai G., Gale L.R., Schneider R.W., Kistler H.C., Davis R.M., Elias K.S., Miyao E.M., 2003.** Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology, 93: 1014–1022.

- 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.
- Caron J., Laverdière L., Thibodeau P.O. et Bélanger R.R., 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 : 73-87.
- Carvalho D.D.C., Junior M.L., Martins I., Inglis P.W., Mello S.C.M., 2014.** Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by *Trichoderma harzianum* and its use of common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39(5):384-391.
- Cattelan A.J., Hartel P.G. and Fuhrmann J.J., 1999.** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680.
- Ceska M., 1971.** Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.*, 22, 186–192.
- 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.
- Chandrakala A., Chandrashekar S.C., Jyothi, G. et Ravikumar B.M., 2012.** Effect of cell-free culture filtrates of bio-control agents on the spore germination and infection by *Phytophthora infestans* causing late blight of potato. *G.J. B.A.H.S.*, 1(2): 40-45.
- Chang Y.C., R. Baker O. Kleifeld et Chet I., 1986.** Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. *Plant Disease*, 70: 145-148.
- 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., and Samuels G.J., 2004.** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Stud. Mycol*, 48:1-116.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb 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.
- Chaverri P., Castlebury L.A., Samuels G.J., Geiser D.M., 2003.** Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol*, 27:302–313.
- Chet I., 1990.** Mycoparasitism, recognition, physiology and ecology. In Baker (R.), Dunn (P.) (Eds), *New direction in Biological Control - Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. New York: R. Alan, Liss Inc, 725-733.
- Chet I., 1987.** *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. New York: Wiley and Sons; *Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. pp, 137–160.

- Chevenet F., Brun Ch., Bañuls A.L., Jacq B. and Christen R., 2006.** TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees BMC Bioinformatics, 7:439, doi:10.1186/1471-2105-7-439.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J., 2009.** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 149: 1579–1592.
- Cook R.J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol, 31: 53-80.
- Cook R.J., and K.F. Baker., 1983.** The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota. 539 pp.
- Cooney J.M. and Lauren D.R., 1999.** Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl 2H-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. J. Nat. Prod, 62: 681–683.
- Correa S.O. and Soria A.M., 2011.** Potential of Bacilli for biocontrol and its exploitation in sustainable agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 197–209.
- Coutinho F.P., Felix W.P., Melo A.M.Y., 2012.** Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Ecol. Eng, 42: 85-89.
- Cummings N.J., Ambrose A., Braithwaite M., Bissett J., Roslan H.A., Abdullah J., Stewart A., Agbayani F.V., Steyaert J., Hill R.A., 2016.** Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. Mycol Progress, 15: 50.
- Das A., Dutta B.K. et Barooah A. K., 2013.** *In vitro* Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Fungi Isolated from Tea Agroecosystem Soil of Barak Valley, Southern Assam. International Journal of Microbiological Research, 4 (3): 336-341.
- Dastager S.G., Deepa C. K. and Pandey A., 2010 .**Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol*, **27**: 259-265.
- Datta B.S., Das A.K. and Ghosh S.N., 2004.** Fungal antagonists of some plant pathogens. Mycopathology, 1: 15-17.
- 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). Devannas, M.A., D.Rafaeli-Eshbol et G. Stotzky (éds). Versailles, INRA, pp. 159-168.
- Davet P., Camporota P., 1986.** Etude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. Agronomie, 6 (6): 575-581.
- De Castro A.M., Ferreira M.C., Da Cruz J.C., Pedro K.C.N.R., Carvalho D.F., Leite S.G.F., Pereira Jr N., 2010.** High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. Enzyme Res, 1 (1): 1–8.

- De Marco J.L.**, Valadares-Inglis M.C., Felix C.R. (2003). Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the casual agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian J. Microbiol*, 34: 33-38.
- De Oliveira V.**, Bellei M. et Borges A.C., 1984. Control of white rot of garlic by antagonistic fungi under controlled environmental conditions. *Can J. of Microbiol*, 30: 884-889.
- Dean R. et al.**, 2012. « *The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology* », *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, n° 4, p. 414–430.
- Dekkers L.C.**, Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Chin A-Woeng T.F.C., Wijfjes A.H.M., and Lugtenberg, B.J.J., 2000. The sss colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365can improve rootcolonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 1177–1183.
- Dennis C. and Webster J.**, 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc*, 57: 25–39.
- Dennis C. and Webster J.**, 1971a. Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br MycolSoc*, 57: 41-48
- Dennis C. and Webster J.**, 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc*, 57: 363-369.
- Dereeper A.**, Audic S., Claverie J.M., Blanc G., 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol*, 12(10):8
- Dereeper A.**, Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S, Lefort V., Lescit M., Claverie J.M., Gascuel O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl Acids Res*, 36:465–469.
- Di Pietro A.**, Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M.I.G., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular Plant Pathology*, 4: 315-325.
- Diener A.C.**, Ausubel F.M., 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene is not race-specific. *Genetics*, 171: 305-321.
- Digat B.**, 1992. Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation [PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), EPR (emergence promotion rhizobacteria)]. *Phytoma La Defense des Vegetaux*, 441: 35-38.
- Doi Y.**, Abe Y., and Sugiyama J., 1987. *Trichoderma* Sect. Saturni-sporum, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. *Bull. Natl. Sci. Mus. Ser. B (Bot.)*, 13:1-9.
- Druzhinina I.**, Koptchinski A., komon M., Bisset J., Szakacs G., Kubicek C.P., 2005. An oligonucleotide barcode for speciesidentification in *Hypocrea* and *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:813-828.
- Druzhinina I. and Kopchinskiy A.**, 2006. *Hypocrea/Trichoderma* Biodiversity [Online]. Available at: <http://www.isth.info/biodiversity/index.php> [Accessed: 16 March 2013].
- Druzhinina I.**, Kopchinskiy A., & Kubicek C., 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, Vol.47 No. 2, pp. 55–64, ISSN 1618-2545.

- Druzhinina I., Kubicek C., 2005.** Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. Journal of Zhejiang University SCIENCE. Vol. 6B, No. 2, pp. 100-112, ISSN 1009-3095.
- Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., 2011.** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat. Microbiol. Rev,16:749–759.
- Dubey S.C., 2007.** Integrating bioagent with botanical and fungicide in different modes of application for better management of web blight and mungbean (*Vigna radiata*) yield. Indian Journal of Agricultural Sciences, 77: 162-165.
- Dubey S.C., Suresh M., Singh B., 2007.** Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusariumoxysporumf.spicicris* for integrated management of chickpea wilt. BiolCont, 40: 118-127.
- 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), pp 37-49.
- Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G and Alabouvette C., 1995.** Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phtopathology, 85: 579-585.
- Edi-Premono M, Moawad A. M. et Vlek P. L. G., 1996.** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indones. J. Crop Sci, 11:13-23
- El Komy M.H., Saleh A.A., Eranthodi A., & Molan, Y.Y., 2015.** Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. Plant Pathology Journal, 31: 50–60.
- Elad Y., 1993.** Mycoparasitism. In Singh (U.S.), Kohmoto (K.), Singh (R.P.) (Eds.), *Pathogenesis and host specificity in plant diseases.* Volume II. Pergamon Publishers, p. 289-307.
- Elad Y. and Kapat A., 1999.** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*.Eur. J. Plant Pathol, 105: 177-189
- Elad Y., Chet, I and Henis H., 1982.** Degradation of plant pathogenic fungi by *Tichoderma harzianum*. Can. J . Microbiol, 28: 719-726.
- El-Hasan A, Walker F, Buchenauer H. 2008.** *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-Pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. J Phytopathol.; 156:79–87.
- El-Hassan S.A., Gowen S.R., Pembroke B., 2013.** Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. J. Plant Prot. Res, 53 (1): 12–26.
- El-Katatny M.H., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M.A., Gübitz G.M., 2001.** Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 56 (1): 137–143.

- El-Mohamedy R.S.R. and Abd El-Baky M.M. H., 2008.** Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement, growth and yield quality of pea plant in Nabaria province. *Res.J. Aric & Boil.Sci.*, 4(6): 611-622.
- El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K., 2006.** Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47:25-35.
- Epstein L., Kwon Y.H., Almond D. E., Schached L.M et Jones M.J. 1994.** Genetic and biochemical characterization of *Nectria haematococca* strains with adhesive and adhesion reduced macroconidia. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 524-530.
- Erskine W., Tufil M., Russell A., Tyagi M.C., Rahman M.M. et Saxena M.C., 1994.** Current and future Strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses, *Euphytica*, 73: 127-135.
- Espinel-Ingroff A., 1998.** Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *J. Clin.Microbiol*, 36:2950–2956.
- Eziashi E.I., Uma N.U., Adekunle A.A., Airede C.E., 2006.** Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *Afr J Biotechnol*, 5:703–706.
- Faeth S.H., 2002.** Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos*, 98:25–36.
- Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P. and Rossman A.Y., 1989.** Fungi on plant and plant product in the United States. American Phytophythological Society, St. Paul.
- Fasim F., Ahmed N., Parson R., Gadd G.M., 2002.** Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. *FEMS Microbiol. Lett*, 213: 1–6.
- Federici F., 1982.** Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 74: 738 -743.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C., 2003.** *Fusarium oxysporum* its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493–502.
- Frederix M.J.J., Den Brader K., 1989.** Résultats des essais de désinfection des sols contenant des échantillons de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. FAO/PNUD/ RAB/88/024. Ghardaia, Algérie.
- Fries E., 1825.** *Systema Orbis Vegetabilis*.
- Fuchs Y., Saxena A., Gamble H.R., Anderson J.D., 1989.** Ethylene biosynthesis-inducing protein from Cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol*, 89: 138-143.
- Gajera H., Domadiya R., Patel S., Kapopara M., Golakiya B., 2013.** Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.*, 1:133-142.
- Gams W, Bissett 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. pp. 3–34.

- Gams W.** and 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, pp. 3-31.
- Geiser D.M.**, Aoki T., Bacon C.W., Baker S.E., Bhattacharyya M.K., Brandt M.E., et al., **2013**. LETTER TO THE EDITOR: One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103: 400–408.
- Gerhardson B.**, **2002**. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol*, 20: 338-343.
- Gherbawy Y.**, Druzhinina I., Shaban G.M., Wuczkowsky M., Yaser M., El-Naghy M.A., Prillinger H., Kubicek C.P., **2004**. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol. Prog*, 3: 211–218.
- Ghisalberti E.L.** and Sivasithamparam, K., **1991**. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol Biochem*, 23: 1011–1020.
- Goldstein, A.H.**, **1986**. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *Am. J. Altern. Agricult.* 1, 57–65.
- Goldstein, A.H.**, Braverman, K., Osorio, N., **1999**. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 3, 295–300.
- Gravel V.**, **Antoun V.** and **Tweddell R.J.**, **2007**. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 39: 1968–1977.
- Guindon S.**, et Gascuel O., **2003**. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52 (5): 696–704.
- Gupta O.M.**, Kotasthane S.R. et Khare M.M., **1986**. *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum*). *Agricult. Rev*, 7: 87-97.
- Gupta S.B.**, Thakur K.S., Tedia K. & Singh K., **2006**. Influence of *Trichoderma viride* on Performance of chickpea in wilt complex area. *Ann. Pl. Protec. Sci*, 14(1):120-124.
- Gyaneshwar P.**, Kumar G.N., Parekh L.J. and Poole P.S., **2002**. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245:83-93.
- Halder A.K.**, Mishra A.K., Bhattacharya P., Chakrabarty P.K., **1990**. Solubilization of rock phosphate by Rhizobium and Bradyrhizobium. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 36: 81–92.
- Halila I.**, Cobos M.J., Rubio J., Millán T., Kharrat M., Marrakchi M., Gil J., **2008**. Tagging mapping a second resistance gene for *Fusarium* wilt race 0 in chickpea. *European Journal of Plant Pathology*, 124:87-92.
- Hammill T. M.**, **1974**. Septal pore structure in *Trichoderma saturnisporum*. *Amer. J. Bot.* 61: 767-771.
- Hankin L.** et Anagnostakis, S.L., **1975**. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597–607.

- Harman G.E., 2000.** Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Pl Dis*, 84: 377-391.
- Harman G.E., 2001.** Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. In D.D.S. Tzeng (Eds.), *Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century-mode of Action and Application Technology* (pp. 71-84). Taichung City, Taiwan: National Chung Hsing University. //4-1-4-14 in: *Int Symp Biol Contl. Pl Dis New Century-Mode Action Application Technol. Incomplete*///
- Harman G.E., 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.
- Harman G.E., 2011.** Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol*, 189: 647-649.
- Harman G.E., Hayes C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietro A., Peterbauer C. et Tronsmo A., 1993.** Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* : purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83: 313-318.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M., 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews of Microbiology*, 2:43-58.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004 -** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2:43-56
- Harman G.E., Kubicek C.P., 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium* (Vol.2). Taylor and Francis Ltd. U.K.
- Hassan N., Shimizu M. et Hyakumachi M., 2014.** Occurrence of Root Rot and Vascular Wilt Diseases in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Upper Egypt. *Mycobiology*, 42(1): 66-72.
- Haware M.P, Nene Y. L and Mathur S.B., 1986.** Seed-borne diseases of chickpea. Technical Bulletin, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.
- Haware M.P., Nene, Y.L. and Rajeshware R., 1978.** Eradication of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. *Phytopathology*, 68:1364-1367.
- Hawkins L.K., Dane F., Kubisiak T.L., Rhodes B.B., Jarret R.L., 2001.** Linkage mapping in a watermelon population segregating for *Fusarium* wilt resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126:344-350.
- Hermosa R., Botella L., Keck E., Jimenez J.A., Montero-Barrientos M., Arbona V., Gomez-Cadenas A., Monte E. & Nicolas C., 2011.** The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. *J Plant Physiol*, 168: 1295-1302.
- Hermosa R., Viterbo A., Chetand I., Monte E., 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158:17-25.
- Hibar K., Mejda D.R., Haifa K., and Mohamed E., 2005.** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 9(5): 163-171.
- Hilaire K.T., Antoine B.B., Faustin S.D., Souleymane C., Laurent K.K., Tchoa K. et Daouda K., 2015.** Biopotential of Some *Trichoderma* spp. against Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp.

- Vasinfestum* Causal Agent of Cotton Wilt. British Microbiology Research Journal, 10 (5): 1-11 pp.
- Howell C.R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Diseases, 87: 4–10.
- Huang C.C., Lindhout P., 1997.** Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicirace* 1 and race 2. Euphytica, 93: 145–153.
- Jaklitsch W.M., 2009.** European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. Studies in Mycology, 63: 1-91.
- Jaklitsch W.M., 2011.** European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. Fungal Diversity, 48: 1 250.
- Jaklitsch W.M., Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B.S., Druzhinina I.S., 2006.** *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Studies in Mycology, 55: 135–177.
- Jaulneau V., 2010.** Caractérisation moléculaire d'un extrait d'algues vertes, stimulateur des défenses des plantes contre les agents pathogènes. Thèse de doctorat, université de Toulouse, 334p.
- Jeleń H., Błaszczuk L., Chełkowski J., Rogowicz K., Strakowska J., 2013.** Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. Mycol. Prog, 13: 589–600. 10.1007/s11557-013-0942-2
- Jiménez-Díaz R.M, Castillo P, Jiménez-Gasco M.d.M, Landa B., Navas-Cortés J.A., 2015.** Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management, Crop Protection. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- Kamala T., IndiraDevi S., 2011;** Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythiumaphanidermatum* on common beans. 3. Biotech, 1:217–225.
- Kapri A. and Tewari L., 2010.** Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. Braz J Microbiol, 41 : 787-795.
- Kapri A. et Tewari L., 2010.** Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 787–795.
- Kari Dolatabadi H., Mohammadi Goltapeh E., Mohammadi N., Rabiey M., Rohani N. et Varma A., 2012.** Biocontrol Potential of Root Endophytic Fungi and *Trichoderma* species against *Fusarium* wilt of lentil under *in vitro* and greenhouse conditions. J. Agr. Sci. Tech., 14: 407-420.
- Kasana R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, A. Gulati. 2008.** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. Curr. Microbiol, 57: 503–507.
- Kaur R., Kaur J. and Singh R. S., 2010.** Nonpathogenic *Fusarium* as a Biological Control Agent. Plant Pathology Journal, 9: 79-91.
- Kausar H, Sariah M, Saud HM, Alam MZ, Ismail MR, 2010.** Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases. International Biodeterioration & Biodegradation, 64 (7): 594-600.

- Kindermann J.**, El-Ayouti Y., Samuels G.J., and Kubicek C.P., **1998**. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet. Biol.*, 24:298-309.
- Klein D.** et Eveleigh 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, pp. 57–74.
- Klein K.K.** and Correll J.C., **2001**. Vegetative compatibility group diversity. In: Summerell BA, Leslie JF, Beckhouse D, Bryden WL, Burgess LW (eds) *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St Paul, MN, pp 83–96.
- Kopchinskiy A.G.**, Komo M., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., **2005**. TrichoBLAST: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tools. *Mycol Res*, 109(6):658–660.
- Kredics L.**, Hatvani L., Naeimi S., Körmöczi P., Manczinger L., Vágvölgyi C., Druzhinina I., **2014**. Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In: Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R.S., Druzhinina I., Tuohy M.G., editors. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. London: Elsevier, pp. 3–24.
- Kredics L.**, Ládai M., Körmöczi P., Manczinger L., Rákhely G., Vágvölgyi C. and Szekeres A., **2012**. *Acta. Biologica. Szegediensis*, Vol. 56, No. 2, pp. 141-149.
- Kubicek C.P.**, Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G., **2003**. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 310-319. doi: 10.1016/s1087-1845(02)00583-2.
- Kubicek C.P.**, Bissett J., Kullnig-Gradinger C.M., Druzhinina I.S., Szakacs G., **2003**. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol*, 38(3):310–317. doi: 10.1016/S1087-1845(02)00583-2.
- Kubicek C.P.**, Komon-Zelazowska M., Druzhinina I.S., **2008**. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 9, pp753–763.
- Kuhls K.**, Lieckfeldt E., Samuels G.J., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Borner T., and Kubicek C.P., **1996**. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7755–7760.
- Kuhls K.**, Lieckfeldt E., Samuels G.J., Meyer W., Kubicek C.P., and Borner T., **1997**. Revision of *Trichoderma* section Longibrachiatum including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89: 442–460.
- Kullnig-Gradinger C.M.**, Szakacs G., and Kubicek C.P., **2002**. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. *Mycol. Res*, 106:757-767.
- Landa B.B.**, Hervas A., Bethiol W., Jimenez-Diaz R.M., **1997**. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25 (4): 305–318.
- Lemanceau P.**, **1992**. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. *fluorescents*. *Agronomie*, 12 :413-437.

- Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie., Edition De Boeck Université rue des minimes 39, B-1000. Bruxelles, 427 P.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual; Blackwell Publishing: Oxford, UK. Ltd, Iowa.p. 109.
- Leuchtman A., Samuels G.J., and Petrini O., 1996.** Isoenzyme subgroups in *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. Mycologia, 88: 384–394.
- Li R.X., Cai F., Pang G., Shen Q.R., Li R., Chen W., 2015.** Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. PLoS ONE, 10(6): 1-16.
- Li S., and Hartman G.L. 2003.** Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil. Plant Pathol, 52:74-83.
- Liang C., Li B., Lu G., 2004.** *Gliocladium* and *Trichoderma* in agricultural soil. J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci, 30: 415.
- Lieckfeldt E. et al., 1999.** A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? Applied and Environmental Microbiology, 65: 2418-2428.
- 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.
- Link H.F., 1809.** Observations in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin, 3: 3–42.
- Llorens A., Hinojo M.J, Mateo R., Gonzalez-Jaeén M., Valle-Algarra F.M., Logrieco A., Jiménez M., 2006.** Characterization of *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). Int J Food Microbiol, 106(3): 297-306.
- Loper J. E et M. N. Scroth., 1986.** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. Phytopathology, 76: 386-389.
- Mahaffee W.F. and Backman P.A., 1993.** Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphère colonization of cotton by *Bacillus* GB03. Phtopatholog, 83: 1120-1125.
- Malathi P., Viswanathan R., Padmanaban P., Mohanraj D. et Ramesh Sundar A., 2002.** Microbial detoxification of *Colletotrichum falcatum* toxin. Current science, 83(6): 745-749.
- Matuo T., and Snyder W.C., 1973.** Use of morphology and mating populations in the identification of formae specialis in *Fusarium solani*. Phytopathology, 63: 562–565.
- Meinck R., Weinert N., Radl V., Schlöter M., Smalla K., Berg G., 2010.** Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. J. Microbiol. Methods, 80: 63–69.
- Metcalf D.A. et C.R. Wilson., 2001.** The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathology, 50: 249-257.
- Michielse C.B., Rep M., 2009.** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Mol Plant Pathol, 10: 311-324.

- Miguel A.**, Maroto J.V., San Bautista A., Baixauli C., Cebolla V., Pascual B., Lopez-Galarza S., Guardiola J.L., **2004**. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt. *Sci. Hortic*, 103: 9–17.
- Monte E.**, **2001**. Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. *Int Microbiol*, 4: 1-4.
- 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.
- Mouria A.**, Ouazzani Touhami A. et Douira A., **2003**. Etude de certains facteurs favorisant le maintien de l'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* à l'égard de *Helminthosporium oryzae* sur les feuilles de riz. *Cah. Rech. Université Hassan II*, sér. A (Sciences et Techniques), 5 : 51-66.
- Mouria A.**, Ouazzani Touhami A., Douira A., Benkirane R., Mlaiki A., El Yachoui M., **1997**. Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Pyricularia oryzae*. *Al Awamia*, 96 : pp 9-17.
- Mouria B.**, Ouazzani-Touhami A. et Douira A., **2008**. Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, 88(3): 103-110.
- Mukherjee A.K.**, Mukherjee P.K., Kranthi S., **2013**. *Sclerotium delphinii* infecting cultivated cotton in India- a first record. *New Disease Reports* (Submitted).
- Mukhlis Saud H.M.**, Sariah M., Ismail M.R., Kausar H. and Habib S.H., **2013**. Potential lignocellulolytic *Trichoderma* for bioconversion of oil palm empty fruit bunches. *Australian Journal of Crop Science*, 7(3):425-431.
- Mulaw T.B.**, Druzhinina I.S., Kubicek C.P. et Atanasova L., **2013**. Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity*, 5: 750-766.
- Nagy E.**, Has V., Kadar R., **2006**. The influence of *Fusarium* ear infection on the maize yield and quality (Transilvania – Romania). *Commun Agric. Appl. Biol. Sci*, 7: 1147-1150.
- Naher L.**, Yusuf U.K., Ismail A., Hossain K., **2014**. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak J Bot*, 46:1489–1493.
- Nasraoui B.**, **2000**. Champignons mitosporés Dans : Introduction à la phytomycologie: morphologie, biologie et systématique appliquée aux champignons phytopathogènes. Tunis, Tunisie, Centre de publication universitaire. pp.155-183.
- Nautiyal C.S.**, **1999**. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett*, 170: 2017-2021.
- Nelson P.E.**, Toussoun T.A. and Marasas W.F.O., **1983**. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.
- O'Donnell K.**, Kistler H., Tacke B., & Casper H., **2000**. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14): 7905–7910, ISSN 1091-6490.

- O'Donnell K.**, Ward T.J., Robert V.A.R.G., Crous P.W., Geiser D.M., and Kang S., **2015**. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43: 583-595.
- Okuda T.**, Fujiwara A., and Fujiwara M., **1982**. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitril antibiotics. *Agric. Biol. Chem*, 46:1811–1822.
- Ozbay N.**, **2004**. *Fusarium* crown and root tomato and control methods. *Plant Pathol. J.*, 3: 9-18.
- Padmaja M.**, Swathi J., Narendra K., Sowjanya KM, Babu P., Jawahar; Satya, A. Krishna, **2013**. *Trichoderma* SP as a microbial antagonist against *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*; Vol. 5 Issue Supp 4, p322.
- Papavizas G.G.**, **1985**. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 23: 23 - 54.
- Patten C. L.**, Glick B. R., **1996**. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.
- Patten C.L.** Click, B.R., **2002**. Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ.l Microb*, 68 : 3795-3801.
- Perazzolli M.**, Moretto M., Fontana P., Ferrarini A., Velasco R., Moser C., Delledonne M., Pertot I., **2012**. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevine espartially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics*, 13: 660.
- Persoon C.H.**, **1794**. *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag. Bot, 1:81-128.
- Picot A.**, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, **2012**. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* 61, 140-151.
- Pikovskaya R.I.**, **1948**. Mobilization of phosphorus in soil inconnection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*,17: 362-370.
- Poddar R.K.**, Singh D.V. and Dubey S.C. **2004**. Integrated Application of *Trichoderma harzianum* Mutants and Carbendazim to Manage Chickpea Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*). *Indian J. Agric. Sci.*, 74: 346-348.
- Rapilly F.**, **1968**. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann Épiphyt* 19, (n° HS).
- Reddy, B.N.**, K.V. Saritha and A. Hindumathi, **2014**. *In vitro* screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. *Res. J. Biol.*, 2: 29-36.
- Reino J.L.**, Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G., **2008**. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*, 7:89–123.
- Resende M.P.**, Jakoby I.C.MC., dos Santos L.C.R., Soares M.A., Pereira F.D., Souchie E.L., and Silva F.G., **2014**. Phosphate solubilization and phytohormone production By endophytic and rhizosphere *Trichoderma* Isolates of Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). *Afr.J.Microbiol*, 27:2616-2623.

- Reyes I., Bernier L., Simard R., Antoun H., 1999.** Effect of nitrogen source on solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 281–290.
- Richardson A. E.; Hadobas P.A. and Hayes J.E., 2000.** Acid Phosphomonoesterase and Phytase Activities of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Roots and Utilization of Organic Phosphorous Substrates by Seedlings Grown in Sterile Culture. *Plant, Cell and Environment*, Vol. 23, No.4, pp. 397-40,
- Rifai M.A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*-Mycol. Pap, 116: 1-56.
- Rifai M.A., and Webster J., 1966.** Culture studies of *Hypocrea* and *Trichoderma* II. *H. aureo-viridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49:296.
- Rioux S., Denis V., Anne et Barbara, 2011.** Fongicides chez les céréales : résultats d'essais menés au Québec en 2009 et 2010. Journée INPACQ Grandes cultures et conservation des sols, Ottawa Canada.
- Roskopf E.N., Chellemi D.O., Kokalis-Burelle N., Church G.T., 2005.** Alternatives to methyl bromide: A Florida perspective. doi:10.1094/PHP-2005-1027-01-RV.
- Ruocco M, Lanzuise S Vinale F, Marra R, Turrà D, Woo SL, Lorito M., 2009.** Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant Microbe Interact*, 22:291–301
- Sabbagh S.K., 2008.** Adaptation à la pénétration racinaire de deux Ustilaginaceae parasites du maïs : *Ustilago maydis* et *Sporisorium reilianum* – Analyse microscopique et transcriptomique. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France, 98 p.
- Salas-Marina M.A., Silva-Flores M.A., Uresti-Rivera E.E., Castro-Longoria E., Herrera-Estrella A., Casas-Flores S., 2011.** Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol*, 131:15–26.
- Samuels G.J., 2006.** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96:195-206.
- Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., and McCray E.B., 2004.** *Trichoderma* Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 31, 2004, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- Samuels G.J., Petrini O., and Manguin S., 1994.** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86:421-435.
- Samuels G. J. et al., 2002.** *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.
- Samuels G.J. Chaverri P., Farr D.F., and McCray E.B., 2015.** *Trichoderma* Online [Online]. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [consulté le : 05 janvier 2015].

- Saravanakumar K.**, Shanmuga Arasu V., Kathiresan K., **2013**. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquatic Botany*, 104: 101–105.
- Schardl C.L.**, Leuchtman A, Spiering M.J., **2004**. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 315–340.
- Schneider K.A.**, Grafton K.F., Kelly J.D., **2001**. QTL Analysis of Resistance to *Fusarium* Root Rot in Bean. *Crop Science*, 41: 535–542.
- Schroers H.J.**, Geldenhuis M.M., Wingfield M.J., Schoeman M.H., Yen Y.F., Shen W.C., Wingfield B.D., **2005**. Classification of the guava wilt fungus *Myxosporium psidii*, the palm pathogen *Gliocladium vermoeseni* and the persimmon wilt fungus *Acremonium diospyri* in Nalanthamala. *Mycologia*, 97: 375–395.
- Schuster A.**, Schmoll M., **2010**. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 87 (3): 789–799.
- Scott J.C.**, Gordon T.R., Kirkpatrick S.C., Koike S.T., Matheron M.E., Ochoa O.E., Truco M.J., and Michelmore R.W., **2012**. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. *California Agriculture*, 66:20-24.
- Sedra My H.** et Basri M.,**1994**. Évaluation de la résistance du palmier dattier au bayoud causé par *Fusarium oxysporum* f sp albedinis. Recherche d'une méthode de discrimination des vitroplants acclimatés en serre. *Agronomie, Pathologie végétale*, 14: 467-472.
- Seifert K.A.**, **2001**. *Fusarium* and anamorph generic concepts. 15–28. In: Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., Burgess L.W. (eds): *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Shakshi S.**, Asha S., Shrvan K. and Sanwar M.Y., **2014**. Determination of seed germination percent and effect of *Trichoderma harzianum* rafai on fresh and stored seed by different methods. *The Ecoscan Special issue.VI*:181-185.
- Shalini S.** and Kotasthane A.S., **2007**. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *EJEAFChe*, 6(8): 2272-2281.
- Shanmugam V.**, Sharma V., Ananthapadmanaban., **2008**. Genetics relatedness of *Trichoderma* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* inflicting carnation wilt. *Folia Microbiol*, 53: 130-138.
- Sharma K.K.** and **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.
- Sharma P.**, **2011**. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Aust J Crop Sci.*, 5: 1027–1038.
- Shoresh M.**, Harman G.E., Mastoury F., **2010**. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol*, 48: 21–43.
- Shoresh M.**, Yedidia I. & Chet I., **2005**. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95: 76–84.

- Shukla K.P., Sharma S., Singh N.K., Singh V., Tiwari K., Singh S., 2011.** Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. *Afr. J. Biotechnol*, 10 : 9717–9724.
- Sid Ahmed A., C. Perez-Sanchez, C. Egea and M.E. Candela, 1999.** Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48: 58–65.
- Sidhu G.S., Webster J.M., 1979.** A study of heterokaryosis and its influence on virulence in *Fusarium oxysporum lycopersici*. *Can. J. Bot*, 57: 548–555.
- Simons M., van der Bij A.J., Brand J., de Weger L. A., Wijffelman C.A., and Lugtenberg B.J.J., 1996.** Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 9:600-607.
- Singh H.B., Kalra A., Patra N.K., Kumar S., Pandey R., Khanuja S.P.S. and 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*, 6: 511-821.
- Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A., Kumar V., 2014.** Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology and Mycology*, 3(1): 127–134.
- Sivan A., Chet I., 1989.** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J General Microbiol*, 135:675–682.
- Sivan A., Ucko O. and Chet I., 1987.** Biological control of *Fusarium* rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*, 71:587-592.
- Smith I.M., J. Dunez D.H. Phillips R.A. Lelliott S.A. Archer eds., 1988.** European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford. 583pp.
- Snyder W.C. and Hansen H.N., 1940.** The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27, 69.
- Sofa A., Scopa A., Manfra M., De Nisco M., Tenore G., Troisi J., et al., 2011.** *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P-canescens*). *Plant Growth Regul*, 65 (2): 421–425.
- Song W., Zhou L., Yang C., Cao X., Zhang L., Liu X., 2004.** Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Prot*, 23: 243–247.
- Spaenpen S., Vanderleyden J. et Remans R., 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev*, 31 (4): 425-448.
- Srivastava M, Pandey S, Shahid S, Sharma A, Singh A, et al., 2014.** Induction of chitinase, β -1 glucanase, xylanase taken from *Trichoderma* sp. on different sources: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 3131-3135.
- Strange, R.N. and Scott P.R., 2005.** Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 83–116.
- Subba Rao N.S., 1999.** In *Soil Microbiology* Fourth Edition of *Soil Microorganisms and Plant Growth* Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

- Suga H.**, Hasegawa T., Mitsui H., Kageyama K. and Hyakumachi M., **2000**. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycol Res*, 104: 1175–1183.
- Supothina S.**, Isaka M., & Wongsap P., **2007**. Optimization of culture conditions for production of the anti-tubercular alkaloid hirsutellone A by *Trichoderma gelatinosum* BCC 7579. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5): 531-537, ISSN 0266-8254.
- Suty L.**, **2010**. La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Eds Quae, 323 pages.
- Tarafdar J.C.**; Bareja M. and Panwar J., **2003**. Efficiency of Some Phosphatase Producing Soil-Fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 43, (1):27-32.
- Thangavelu R.**, Palaniswami A., Velazhahan., **2003**. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing Fusarium wilt of banana. *Agric Ecosyst Environ*, 103: 259–263
- Thangavelu R.**, Palaniswami A., Velazhahan R., **2004**. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103: 259–263.
- 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
- Thrane U.**, **2001**. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica*, 93: 145–153.
- Tondje, P.R.**, Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A., Begoude, A.D., M., Bateman, R., Fontem, D. and Hebbat, K.P. (**2007**) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control*, 43: 202–212.
- Toussaint V.**, **1996**. Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maîtrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Toyoda H.**, Hashimoto H., Utsumi R., Kobayashi H. and Ouchi S., **1988**. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology*, 78: 1307–1311.
- Tran N.H.**, **2010**. Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. *Journal of ISSAAS*, 16 (1):1721.
- Tronsmo A.** and Hjeljord L.G., **1998**. Biological control with *Trichoderma* species. In G.S. Boland and L.D. Kuykendall (Eds.), *Plant-microbe interactions and biological control*, p. 111-124.
- Tulasne L.R.**, and Tulasne C., **1865**. *Selecta fungorum carpologia*. Jussu, Paris.
- Vassilev N.**, Vassileva M., Nikolaeva I., **2006**. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biot*, 71: 137-144.
- Vassileva M.**, Azcon R., Barea J.M., Vassilev N., **1998**. Application of encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *J Biotechnol*, 63:67–72

- Verma M.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Sahai V., Prévost D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., **2007**. Benchscale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41 (6): 764–771.
- Vey A**, Hoagland R, Butt T., **2001**. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. CAB International, Bristol.
- Villajuan-Abgona R.**, Kagayama K., Hyakumachi M., **1996**. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. *Eur. J. Plant Pathol*, 102: 227-235.
- Vinale F.** et al., **2007**. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, pp. 1-10.
- Vinale F.**, Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M., **2009**. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 48:705–711.
- Vinale F.**, Marra R., Scale F., Ghisalberti E.L., Lorito M. et Sivasithamparam K., **2006**. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active different phytopathogens. *Letter in Applied Microbial*, 43:143-148.
- Vinale F.**, Sivasithamparam K., Ghisalberti L.E., Marra R., Woo L.S. and Lorito M., **2008**. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil. Biol. Biochem*, 40: 1-10.
- Viterbo A.**, Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I., 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*, 305:42–48.
- Wainwright M.**, Ali T.A. & Killham K., **1994**. Anaerobic growth of fungal mycelium from soil particles onto nutrient-free silica gel. *Mycol. Res*, 98: 761-762.
- Waterman M.S.**, **1986**. Multiple sequence alignment by consensus. *Nucleic Acids Res*, 14: 9095–9102.
- Webster J.**, and Rifai M.A., **1968**. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* IV. *Hypocrea pilulifera* sp. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 51:511-514.
- Westerlund F.V.**, Campbell R.N. and Kimble K.A., **1974**. Fungal root rot and wilt of chickpea in California. *Phytopathology*, 64: 432–436.
- Wheatley R.E.**, **2002**. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw J Microb*, 81:357–364.
- Whipps J.M.**, **2001**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- White T.J.**, Bruns T., Lee S., Taylor J., **1990**. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315-322.
- Windham M.T.** Elad R., Baker R., **1986**. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76: 518-521.

- Woo S.L.**, Scala F., Ruocco M., Lorito M., **2006**. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96:181–185.
- Xia X.**, Lie T.K., Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y., **2011**. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots, 61 (3):619-25.
- Xiao-Yan S.**, Qing-Tao S., Shu-Tao X., Xiu-Lan C., Cai-Yun S., & Yu-Zhong Z., **2006**. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 260, No. 1, (April 2006), pp. 119–125, ISSN 1574-6968.
- Yasser M.M.**, Mousa A.S.M., Massoud O.N., Nasr S.H., **2014**. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from Egyptian soils. *J Biol Earth Sci*, 4(1): B83-B90.
- Yedidia I.**, Benhamou N., Chet I., **1999**. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65:1061-1070.
- Yedidia I.**, Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I., **2000**. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem*, 38: 863–873.
- Yedidia I.**, Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I., **2001**. Effects of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*, 235: 235–242.
- Yobo K.S.**, Laing M.D., Hunter C.H. & M.J. Morris., **2004**. Biological control of *Rhizoctonia solani* by two *Trichoderma* species isolated from South African composted soil, *South African Journal of Plant and Soil*, 21:3, 139-144, DOI: 10.1080/02571862.2004.10635039.
- Young, C.C.**, **1994**. Selection and application of biofertilizers in Taiwan. *Food and Fertilizer Technology Center. Tech. Bull*, 141: 1–9.
- Young, C.C.**, Chang, C.H., Chen, L.F., Chao, C.C., **1998**. Characterization of the nitrogen fixing and ferric phosphate solubilizing bacteria isolated from Taiwan soil. *J. Chin. Agricult. Chem. Soc*, 36: 201–210.
- Zaim S.**, Belabid L., Bayaa B., and Bekkar A.A., **2016**. Biological Control of Chickpea Fusarium Wilts Using Rhizobacteria “PGPR”. In Choudhary D.K. and Varma A. (eds): *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*, DOI 10.1007/978-981-10-0388-2_1
- Zaim S.**, Belabid L., Bellahcene M. **2013**. Biocontrol of chickpea Fusarium wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. *J. Plant Prot. Res*, 53 (2): 177–183.
- Zhang Y.**, Fernando W.G.D., de Kievit T., Berry C., Daayf F., Paulitz T.C., **2006**. Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents using polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol*, 52: 476–481.
- Zhdanova N.N.**, Zakharchenko V.A., Vember V.A., Nakonechnaya L.T., **2000**. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged damaged nuclear reactor. *Mycol. Res*, 104:1421-1426.

Composition des différents milieux de cultures utilisées

- **Milieu TSM** (*Trichoderma* selective medium) (Askew et Laing, 1993)

MgSO₄, 7H₂O	0,2 g
KH₂PO₄	0,9 g
KCl	150 mg
NH₄NO₃	1 g
Glucose	3 g
Rose bengale	150 mg
Chloramphénicol	250 mg
Fénaminosulf	300 mg
Quintozène	200 mg
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 104°C pendant 30 minutes

- **Milieu PDA** (Potato Dextrose Agar) (**Rapilly, 1968**)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

- **Milieu liquide PDB** (Potato Dextrose Broth) (**Rapilly, 1968**)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

- **Milieu utilisé pour la production de chitinase** (Kamala et Indira Devi , 2011)

Glucose	5 g
Na₂HPO₄	3g
NH₄Cl	1g
NaCl	0,5 g
CaCl₂	0,1
MgSO₄	0,12g
Chitine colloïdale	1% (p:v)
Agar	20g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH a été ajusté à 4,7.

- **Milieu minimal utilisé pour la production de cellulase** (Kausar *et al.*, 2010 ; Kamala et Indira Devi, 2011)

-Activité cellobiohydrolase

KH₂PO₄	7 g
K₂HPO₄	2 g
MgSO₄·7H₂O	0,1 g
(NH₄)₂SO₄	1 g
Extrait de levure	0,6 g
Cellulose microcristalline (MCC)	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L

-Activité endoglucanase

Carboxy-méthyl-cellulose(CMC)	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L

Ces milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

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

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

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

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

Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Amidon soluble	2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de ligninase** (Thomann *et al.*, 2002)

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

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de lipase** (Abe *et al.*, 2015)

Tween 20	10 mL
Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl₂·2H₂O	0,1 g
Agar	17 g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu Pikovaskey solide de bleu de bromophérol (Pikovskaya, 1948)**

Ca₃(Po₄)₂	5g
(NH₄)₂SO₄	0,5g
KCl	0,2g
MgSO₄, 7H₂O	0,1g
Glucose	10g
FeSO₄	0,005g
Bleu bromophérol	0,25g
Agar	15g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

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

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

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

- **Solution de Salkowski** est composée de 2% de FeCl₃ (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique.

Séquence de *Trichoderma harzianum* (Isolat T5)

Numéro d'accèsion KX523899	440 bp
-----------------------------------	---------------

Amplification de la région ITS : Paire d'amorces universelles utilisée

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Référence: White *et al.*, (1990)

```
GGTGTTTAACGGCTGTGGACGCGCCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACACTAC
TGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCC
GCTAAGGGAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTT
GAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGCAATGTG
CGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT
GATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAGGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAA
AAAACCCGCGAGGGGGTATACAATAAGAGTTTTAGGTTGGTCCTCCGGCGGG
CGCCTTGGTCCGGGGC
```

Séquence de *Trichoderma harzianum* (Isolat T5)

Numéro d'accèsion KX674063	513 bp
-----------------------------------	---------------

Amplification du gène *tef 1* : Paire d'amorces utilisée

EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') et *tef1*-rev (5'-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3')

Références : Kullnig-Gradinger *et al.*, (2002) ; Chaverri *et al.*, (2003)

```
AGTACCAGTGATCATGTTCTAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGTGAATTGCTT
GTTAGCACTGGCTTGTAATCGCTGTGTGAAGTTGATGGAAAGAACATACCAAT
GACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTTCCACAGAGCAATGTTCGATGG
TGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAGAACCCAAGCGTACTTG
AAGGAACCCTTGCCGAGTTCGGCGGCTTCCTATTGATGGAAAAGTGGTTAGCA
TCGCTGAAAGTGATGAGACGCAGAGCACGTTGAATGATGGCTGGGCAGTAAG
AGCGAAGCAGAAAAAAGCAGTGACCTAGTGGGGTGCACGAGAAACCCCACT
AAAACCAAACGACAGCCAAAAAATTTGCGTCGCTGCAAAGGAGGGGTAATG
CAAATCGGGGTGATGAAAAATTGTCGACACGAAAATTCTCTGCAGAATTATCG
GGCACAATTAATGTGGAGGGAGAATCGAGGCGAAAAT
```

**Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis des
Fusarium phytopathogènes «*in vitro*»**

- Analyse de la variance de la confrontation directe, confrontation à distance entre les 23 isolats de *Trichoderma* et les 4 *Fusarium* phytopathogènes.

Analyse de la variance	Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Confrontation directe	Entre Groupes	22	217,316	5,11
	A l'intérieur des groupes	68	42,507	
	Total	90		
Confrontation à distance	Entre Groupes	22	542,01	15,85
	A l'intérieur des groupes	68	34,18	
	Total	90		

- Analyse de la variance de l'effet des inhibiteurs non-volatils de 23 isolats de *Trichoderma* exercé sur la germination conidienne de FOC

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	22	1055,45	229230,45
A l'intérieur des groupes	46	0,005	
Total	68		

Etude de quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation par les isolats de *Trichoderma*

- Analyse de la variance de la production de chitinase, cellulase (Endo-glucanase), cellulase (Cellobio-hydrolase), protéase, amylase, ligninase et lipase par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma*

Analyse de la variance	Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Production de chitinase	Entre Groupes	22	498,31	2577,49 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,193	
Production de cellulase (Endoglucanase)	Entre Groupes	22	870,16	14945,50*
	A l'intérieur des groupes	45	0,058	
Production de cellulase (Cellobiohydrolase)	Entre Groupes	22	870,62	10822,66 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,08	
Production de protéase	Entre Groupes	22	1101,11	17952,95 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,061	
Production d' amylase	Entre Groupes	22	568,41	6757,86 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,084	
Production de ligninase	Entre Groupes	22	558,14	6635,85 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,084	
Production de lipase	Entre Groupes	22	396,27	3348,83 *
	A l'intérieur des groupes	45	0,118	

*significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Fischer

- Analyse de la variance de la solubilisation de P par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma* en milieu solide

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	22	0,041	23,92 *
A l'intérieur des groupes	45	0,002	

*significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Fischer

- Analyse de la variance de la production d'AIA par les 23 isolats antagonistes de *Trichoderma*

Source de variation	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	22	201,154	9733,26*
A l'intérieur des groupes	45	0,021	

*Significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Fischer

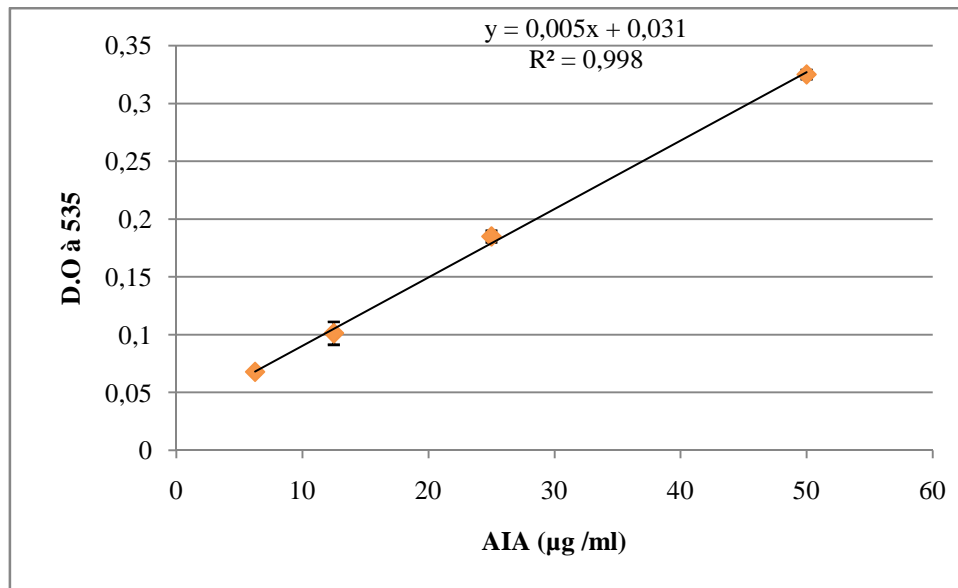


Figure : Courbe d'étalonnage de l'AIA

Effacité *in vivo* de quelques isolats de *Trichoderma* spp. sur FOC en pots

- Analyse statistique de la réduction de l'incidence de la maladie

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	3	3924,34	27877,44*
A l'intérieur des groupes	7	0,14	

*significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Fischer

- Analyse de la variance de **LT** : Longueur de la tige, **LR** : Longueur de la racine, **PFP** : Poids frais de la partie aérienne, **PSP** : Poids sec de la partie aérienne, **PFR** : Poids frais des racines, **PSR** : Poids sec des racines et **FR** : la finesse racinaire

analyse de la variance	<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
LT : Longueur de la tige	Entre Groupes	7	37,258	38676,57 *
	A l'intérieur des groupes	15	0,001	
LR : Longueur de la racine	Entre Groupes	7	8,897	11915,98*
	A l'intérieur des groupes	15	0,001	
PFP : Poids frais de la partie aérienne	Entre Groupes	7	0,002	10,787*
	A l'intérieur des groupes	15	0,000	
PSP : Poids sec de la partie aérienne	Entre Groupes	7	9,857	13441,08*
	A l'intérieur des groupes	15	0,001	
PFR : Poids frais des racines	Entre Groupes	7	0,248	1161,96 *
	A l'intérieur des groupes	15	0,000	
PSR : Poids sec des racines	Entre Groupes	7	15,652	15651,92 *
	A l'intérieur des groupes	15	0,001	
FR : la finesse racinaire	Entre Groupes	7	0,152	192,82 *
	A l'intérieur des groupes	15	0,001	

*significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Fischer

Biocontrol of Phytopathogenic *Fusarium* spp. by Antagonistic *Trichoderma*

A. A. BEKKAR*, L. BELABID AND S. ZAIM

Laboratory for Research on Biological Systems and Geomatics
Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara
Mascara-29000, Algeria

KEY WORDS

Biological control
Mechanisms
Fusarium
Hydrolytic enzymes
Mycoparasitism
Trichoderma

ABSTRACT Twenty three isolates of *Trichoderma* spp. were evaluated for their antagonistic effects and their mechanisms against four phytopathogenic *Fusarium* spp. In dual culture, *Trichoderma* isolates significantly reduced the mycelial growth of the target pathogens with varying percentage of inhibition from 45 to 90%. Treatments of T5, T10 and T14 isolates suffered strong resistance from all *Fusarium* isolates suggesting its mycoparasitic potential. Coiling of *Trichoderma* hyphae around those pathogens and the vacuolization and disintegration of the host hyphae was observed. In order to study biological control mechanisms, the ability of *Trichoderma* isolates to produce volatile compounds was investigated. The result showed that all 23 isolates were able to produce volatile compounds. The production of hydrolytic enzymes of the antagonistic isolates was also measured. All the isolates have shown chitinolytic, proteolytic and cellulolytic activities. In pot trials with chickpea plants, the percentage of chickpea plants inoculated with *F. oxysporum* f.sp. and subsequent treatment by three highest antagonistic *Trichoderma*, T5, T10 and T14 showed significant reduction of *Fusarium* wilt incidence from 92.0–71.7% compared to the untreated plants. These isolates and their multiple mechanisms suggest their potential as biocontrol measures for the management of the diseases caused by *Fusarium*.

INTRODUCTION

Plant fungal diseases are responsible for tremendous losses in world-wide agriculture. They reduce yield, productivity and growth of several economical crops (Strange and Scott, 2005). The

genus *Fusarium* is one of such soil borne fungal pathogens consisting of many species that cause different types of diseases in a wide range of plant species. Some species of *Fusarium* like *Fusarium solani* is responsible for root rots. Vascular wilts of

*Corresponding author: E-Mail: a.bekkar@univ-mascara.dz



©2016 (KRF)

Journal Homepage : www.connectjournals.com/bi

In association with :

CONNECT
Journals™

www.connectjournals.com

some of the most important field and vegetable crops such as the *Fusarium* wilt of date palm is caused by *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, of tomato caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and that of chickpea caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Benzohra *et al.*, 2015; El Komy *et al.*, 2015; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

The effective control of diseases is an essential component in every crop production system. Resistant plant cultivars, cultural practices, and chemical applications are often used to control plant disease. Whereas the chemical control is accompanied by pesticides resistance development, cultural practices are not always economically or technologically feasible (Correa and Soria, 2011).

Impacts of the use of fungicides and synthetic fertilizers have led researchers worldwide to encourage the search for environment friendly alternatives for plant disease control. Biological control using antagonistic fungi offers an interesting and potential alternative for crop protection (Vincent *et al.*, 2007). *Trichoderma* spp. are considered as promising fungal biological agents for the management of plant diseases, especially against soil borne pathogens (Elad *et al.* 2004). These are soil-borne fungi having significant antagonistic potential against a wide range of phytopathogenic fungi (Tondje *et al.*, 2007). Microbial control agents of the genus *Trichoderma* are marketed as biological control agents of numerous plant pathogens (Verma *et al.*, 2007).

Several mechanisms are responsible for such biocontrol by *Trichoderma* spp. including competition, mycoparasitism, antibiosis, hyphal interactions, and enzymatic lysis (Howell, 2003; Harman, 2006). Furthermore, resistance induction and/or growth promotion of the plant host may also contribute to this biocontrol (Harman *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2007). Thus, objective of the present study was to obtain local isolates of *Trichoderma* with promising antagonistic efficiency and increased secretion of extracellular lytic enzymes.

Accordingly, the study was carried out to evaluate the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against four phytopathogenic fungi belonging to the genus *Fusarium*. Furthermore, the mechanisms

involved were also elucidated.

MATERIALS AND METHODS

Isolation, Identification and Screening of Antagonistic *Trichoderma*

Rhizosphere soil samples were collected from various locations of agricultural fields in north-western Algeria, namely Mascara, Mostaganem, Tlemcen and Oran. The fungal antagonists were isolated using dilution plate techniques on *Trichoderma* selective medium (TSM) (Elad *et al.*, 1981). They were transferred and purified by single spore method on Potato Dextrose Agar (PDA) at 25°C until fungi colonies become visible. *Trichoderma* isolates were identified to species level based on morphological and microscopical features following the taxonomic key of Samuels *et al.* (2004). The isolates were stored on PDA at 4°C until use.

To find out the most effective isolates of *Trichoderma*, one isolate of *Fusarium solani* (FS) (causal agent of chickpea black root rot) and 3 isolates of *Fusarium oxysporum* (FO) representing 3 different forms of pathogen: *albedinis*, *lycopersici* and *ciceris*, which are causal agents of *Fusarium* wilt in date palm, tomato and chickpea, respectively were selected for this study and were obtained from our lab collections at University of Mascara, Algeria. Antagonistic activity of *Trichoderma* isolates was studied against four phytopathogenic fungi using the dual culture technique described by Sivan and Chet (1989). A 6 mm agar disc from fresh PDA cultures of 7-day-old *Trichoderma* and pathogen were taken and co-inoculated at 3 cm from each other on Petri dishes containing PDA. Plates with pathogen only served as controls. Inoculated plates were incubated at 25°C and mycoparasitism was determined by measuring the diameter of phytopathogenic fungi colonies after 2, 4, and 6 days post-inoculation. The percentage growth inhibition was calculated in comparison with that of control (Datta *et al.*, 2004). Each test was replicated three times. After 2 to 6 days of incubation, the interface region was observed under light microscope, noting any morphological changes.

Volatile Compounds Production

Production of volatile antifungal substances were measured as described by Dennis and Webster (1971). *Trichoderma* isolates were centrally inoculated by placing 6 mm discs on the PDA plates taken from the margin of 7-day-old cultures and incubated at 25°C. The top of each Petri dish was replaced with the

bottom of the PDA plates and then inoculated centrally with the pathogen. Plates without *Trichoderma* spp. were used as control. Three replicates were maintained for each treatment. The pairs of each Petri dish were sealed together with paraffin tape to prevent gas diffusion and then they were incubated at 25°C. Colony diameter of the pathogen was measured after an incubation period of 6 days and the percent inhibition of mycelial growth was calculated.

Detection of Cell Wall Degrading Enzymes

Chitinase activity of the *Trichoderma* isolates was measured according to Kamala and IndiraDevi (2011). This activity was determined on chitin detection medium with colloidal chitin as sole carbon source supplemented with Bromocresol purple; pH was adjusted to 4.7. Fresh culture plugs of the isolates to be tested for chitinase activity were inoculated into the medium and incubated at 25 ± 2°C for 2–3 days. Change of colour from yellow to purple could be seen in the region of chitin utilization around the colonies. Colour intensity and diameter of the purple coloured zone were taken as the criteria to determine the chitinase activity.

Protease production by *Trichoderma* isolates was tested using Skim milk agar (Berg *et al.*, 2002). After 3 days of incubation at 28°C, an ability to clear the Skim milk suspension in the agar around the colony of *Trichoderma* isolates was taken as evidence for the secretion of protease.

To demonstrate the production of cellulase activity from the *Trichoderma* isolates, two sources of cellulose were used; carboxymethyl cellulose (CMC) and microcrystalline cellulose (MCC), for determination of endoglucanase and cellobiohydrolase enzyme activity, respectively (Kausar *et al.*, 2010; Kamala and IndiraDevi, 2011). The discs of 6 mm of *Trichoderma* cultures were inoculated on each agar medium and incubated at 28 ± 2°C for seven days and 2-3 days of the CMC medium and MCC medium, respectively. Glucanase activity on the plates was observed by dipping in 0.1% congo red (1mg/mL) for 15 min and were further treated by flooding with 1M NaCl for 15 min. Degradation of cellulose was visualized as a clearing zone around the fungal colony. The CCM cultures were then incubated further at

50°C for 16 h before evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases (Abe *et al.*, 2015). After this incubation time, the cultures were flooded with 5 mL of iodine reagent (1% KI; 0.5% I₂ w/v) (Kasana *et al.*, 2008), which formed a bluish-black complex with cellulose, giving a sharp and distinct zone around the cellulase-producing colonies within 3 to 5 min. The diameter of the each colour zone around colonies was used to assay the degree of endoglucanase and cellobiohydrolase activity (Kausar *et al.*, 2010).

Enzymatic degradation of the tested enzyme was evaluated by measuring the halo of hydrolysis zone around colonies on a 0-4 rating scale as follows: 0 = no change; 1 = positive; 2 = halo zone of 10-30 mm; 3 = halo zone of 40-60 mm and 4 = halo zone of 70 mm and above.

Pot Trials

Based on biocontrol potency exhibited by the *Trichoderma* isolates, three isolates T5, T10 and T14 were selected for pot culture experiments to determine if they possessed the ability to suppress *Fusarium* wilt of chickpea. Each *Trichoderma* isolate was prepared from cultures grown on PDA for 1 week at 25°C as aqueous suspension in sterile distilled water. Concentrations of propagules in suspension were standardized to 10⁸ conidia/mL (Bailey *et al.*, 2008). The inoculum of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) was prepared as described earlier (Zaim *et al.*, 2013). Concentration of the propagule suspension was 10⁶ microconidia/mL.

The experiment was conducted in a completely randomized block design with three replicates/treatment. Each replicate consisted of 70 mm diameter surface sterilized plastic pots containing 150 g of a mixture sterilized soil and peat (V/V). The surface disinfected seeds of the susceptible cultivar ILC 482 of chickpea were inoculated with pathogen and treated with each *Trichoderma* suspension (V/V) by soaking for 30 min and then dried. Control treatments consisted of seeds inoculated with pathogen only. Three seeds were sown in each pot. Wilt incidence was recorded. Disease was assessed up to 5 weeks

after sowing on individual plant, using a 0 to 4 rating scale described by Landa *et al.*, (1997). This scale was based on the percentage of wilt and foliage with yellowing and necrosis as 0 = healthy, 1 = 1–33%, 2 = 33–66%, 3 = 66–100%, 4 = dead plant.

Statistical Analysis

All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the Statistica 8.0 software and significant means were segregated by Newman-Keuls multiple range test ($P < 0.05$).

RESULTS

Identification and *In Vitro* Screening of *Trichoderma* Isolates

As shown in Table 1, 23 *Trichoderma* isolates were obtained and identified as: *T. harzianum* (15 isolates), *T. koningii* (5 isolates) and *T. longibrachiatum* (3 isolates). Regarding the *in vitro* antagonistic activity of 23 isolates tested, our results showed a growth inhibition ranging from 52.85 to 86.48%, after 6 days post incubation. Furthermore, *T. harzianum* T5, *T. harzianum* T14 and *T. koningii* T10 exhibited the highest inhibition of mycelium growth of all the four pathogens and showed good antifungal activity, when compared to the other isolates (Table 1). These isolates invaded the pathogen's colonies and sporulated, revealing their important mycoparasitic ability. On the other hand, the weakest inhibition was recorded for *T. harzianum* T4 (52.85%) against *F. solani*. The mean mycelium growth inhibition of the most effective *Trichoderma*

Table 1. Average percentage inhibition of mycelial growth of the test pathogens in dual culture and volatile assay method by *Trichoderma* isolates and their hydrolytic enzyme activities

<i>Trichoderma</i> isolates	Means of PIMG of pathogens (%)								Means of PIMG (%)		Activity of hydrolytic enzymes			
	FOA		FOL		FOC		FS		All pathogens		Chit-inase	Prot-ease	Endo-glucanase	Cellobio-hydrolase
	D.C	VM	D.C	VM	D.C	VM	D.C	VM	D.C	VM				
T1 <i>T. harzianum</i>	84.23	35.13	65.06	38.27	77.91	40	72.85	37.50	75.01 ^{bedef}	37.72 ^{ghi}	3	3	4	4
T2 <i>T. harzianum</i>	70.27	25.52	55.42	25.92	56.61	30.76	54.28	29.16	59.14 ^{ghi}	27.84 ⁱ	3	2	3	3
T3 <i>T. harzianum</i>	82.97	61.44	78.31	64.19	80	56.92	78.10	58.33	79.84 ^{ab}	60.22 ^{abc}	4	4	4	4
T4 <i>T. harzianum</i>	66.66	25.52	53.01	30.86	64.03	33.84	52.85	23.61	59.13 ^{ghi}	28.45 ⁱ	2	2	2	2
T5 <i>T. harzianum</i>	86.48	67.10	80.72	66.43	84.66	64.61	85.71	65.27	84.39 ^a	65.85 ^a	4	4	4	4
T6 <i>T. koningii</i>	75.67	60.52	69.87	62.96	79.16	54.87	78.10	55.55	75.70 ^{abcde}	58.47 ^{abcd}	2	2	3	3
T7 <i>T. harzianum</i>	77.02	56.18	65.06	58.02	59.26	44.61	65.71	50	66.76 ^{efghi}	52.20 ^{bedef}	2	3	3	3
T8 <i>T. longibrachiatum</i>	79.72	48.28	69.87	59.25	78.84	50.76	75.71	52.77	76.03 ^{abcde}	52.76 ^{bcde}	3	3	4	3
T9 <i>T. longibrachiatum</i>	78.78	47.36	67.46	49.38	78.84	49.23	73.81	50	74.72 ^{bedef}	48.99 ^{defg}	3	3	3	3
T10 <i>T. koningii</i>	82.97	65.35	78.31	66.66	84.12	60.52	80	62.50	81.35 ^{ab}	63.75 ^a	4	4	3	3
T11 <i>T. longibrachiatum</i>	74.32	35.13	61.44	51.85	75.66	38.46	60	37.50	67.85 ^{defgh}	40.73 ^{fgh}	3	2	3	2
T12 <i>T. harzianum</i>	81.08	56.18	72.28	56.79	78.31	53.84	76.10	29.16	76.94 ^{abcd}	48.99 ^{defg}	4	3	4	4
T13 <i>T. harzianum</i>	81.21	61.44	75.90	49.38	78.31	54.87	75.71	58.33	77.78 ^{abc}	56.00 ^{abcd}	4	3	4	3
T14 <i>T. harzianum</i>	84.23	64.47	79.51	64.61	84.12	61.53	82.85	60.65	82.67 ^{ab}	62.8 ^{lab}	4	4	4	4
T15 <i>T. koningii</i>	75.67	34.21	61.44	46.91	80.83	46.67	59.52	33.33	69.36 ^{cdefg}	40.28 ^{gh}	2	3	3	2
T16 <i>T. harzianum</i>	74.32	29.82	59.03	44.44	71.42	33.84	55.71	26.38	65.12 ^{ghi}	33.62 ^{hi}	3	2	3	2
T17 <i>T. koningii</i>	79.72	43.02	77.10	40.74	77.25	46.67	67.14	41.66	75.30 ^{bedef}	43.02 ^{efgh}	4	3	3	3
T18 <i>T. harzianum</i>	74.32	29.82	59.03	30.86	75	36.92	57.14	37.50	66.37 ^{fghi}	33.77 ^{hi}	2	2	2	2
T19 <i>T. harzianum</i>	77.02	35.13	65.06	54.32	75.66	56.92	65.71	44.44	70.86 ^{cdefg}	47.70 ^{defg}	3	3	4	3
T20 <i>T. koningii</i>	75.67	43.02	63.85	51.85	73.55	40	63.81	33.33	69.22 ^{cdefg}	42.05 ^{efgh}	3	2	3	2
T21 <i>T. harzianum</i>	72.97	25.52	57.83	40.74	61.90	36.92	54.28	26.38	61.74 ^{ghi}	32.39 ^{hi}	2	2	2	2
T22 <i>T. harzianum</i>	75.67	43.02	61.44	44.44	75.66	38.46	61.91	46.76	68.67 ^{cdefg}	43.17 ^{efgh}	2	2	3	2
T23 <i>T. harzianum</i>	71.62	34.21	55.42	38.27	66.66	30.76	55.71	29.16	62.35 ^{ghi}	33.10 ^{hi}	2	1	2	2

PIMG: inhibition percentage of radial growth; D.C: Dual culture assay; V.M: Volatile metabolites production; FO: *Fusarium oxysporum* and subspecies A: *albidenis*; L: *lycopersici*; C: *ciceris*– FS: *Fusarium solani*.

Means of PIMG having different letters within a column are significantly different at $P > 0.05$

isolates was highly significant ($P < 0.05$).

Microscopic examination of the interactive zone showed vacuolization of the pathogen hyphae (Fig. 1a) followed by cell disintegration. The hyphae of *T.*

harzianum T5 were observed coiled around those pathogens (Fig. 1b). Production of chlamydo spores was stimulated in all combinations. In this case, the destructive effect of pathogen by *Trichoderma* was high, resulting

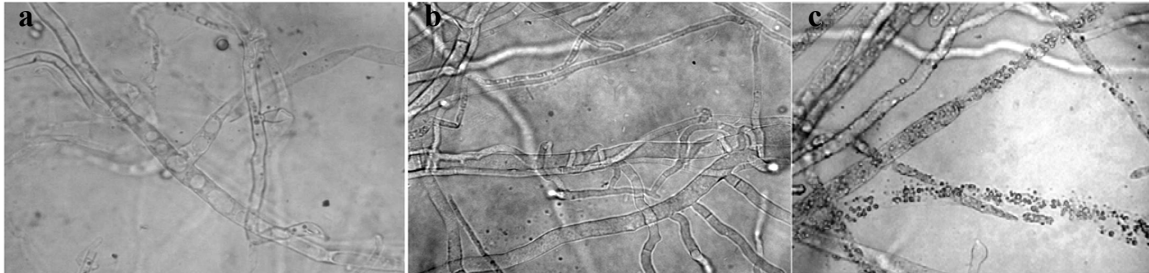


Fig. 1. Microscopic examination of hyphal interaction between *Fusarium* spp. isolates with *Trichoderma* spp.: vacuolization of the pathogen hyphae (a), antagonist hyphae coiling around host hyphae (b), and the pathogen hyphae underwent lysis (c).

in serious damage of the hyphae (Fig. 1c).

Production of Volatile Metabolites

Our results showed differences in isolates' ability to produce metabolites involved in growth inhibition of tested pathogens. The volatile compounds released by *Trichoderma* spp. have also exerted inhibitory effect on the mycelial growth of the selected pathogens (Table 1).

Higher volatile metabolites were produced by isolates of *T. harzianum* (T5), *T. harzianum* (T14), and *T. koningii* (T10) at a rate varying from 67.10% to 60.52%. *T. harzianum* (T5) induced maximum growth inhibition for FOA (67.10%) followed by FOL (66.43%), FS (65.27%) and FOC (64.61%). The weakest effect was recorded for *T. harzianum* (T4) (23.61%) against FS. *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* showed strong sensitivity to the volatile compounds followed by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* and *F. solani*.

Detection of Extracellular Enzymatic Activity

The ability to degrade chitin, casein and cellulose by 23 *Trichoderma* isolates tested on solid medium are shown in Table 1. All the tested isolates grew to some degree on all test substrates demonstrating their ability to utilize the specific substrates as the major carbon sources. All the 23 isolates were able to produce chitinase, protease, endoglucanase and cellobiohydrolase enzymes at different degrees on

colloidal chitin, Skim milk agar, CMC and MCC-amended media. Large colored zones around the growing colonies revealed the ability of tested isolates to hydrolyze colloidal chitin as the sole carbon source. Among them, 9 isolates were found to form the largest zone of 80 mm diameter. Comparably, T23, T15 and T4 isolates produced clearing zones of 20, 17 and 16 mm, respectively. A higher clearing zone (80 mm) on Skim milk agar was observed for *T. koningii* (T10) followed by T5, T3 and T14. Moreover, complete degradation of the casein was realized by these isolates as revealed by a clearing in the somewhat opaque agar around colonies. All the rest fungal isolates exhibited a moderate or low ability to degrade casein.

T. harzianum T5 and T14 isolates showed a possibility of being high producers of endoglucanase and cellobiohydrolase with a clear zone diameter estimated to 80 mm. *T. harzianum* T22 exhibited lower production of cellulase.

Pot Trials

Three *Trichoderma* isolates showing the highest in vitro inhibitory activity were tested for their biocontrol activity against *Fusarium* wilt pathogens of chickpea in culture pots. The first disease's symptom appeared 14 days after sowing in all seedlings that were inoculated with FOC. The typical yellowing form of symptoms was observed. Five

weeks after sowing, there was 98.33% more disease on wilted plants that corresponds to 3.8 average wilt severities.

Seeds treated with T5, T10 and T14 significantly reduced disease incidence caused by FOC from 92–

71.7%. The effect of these isolates on the disease incidence in seed treatments are shown in Fig. 2. The response to suppress disease symptoms was dependent on *Trichoderma* isolates. *T. harzianum* (T5) isolate was the most effective suppressing

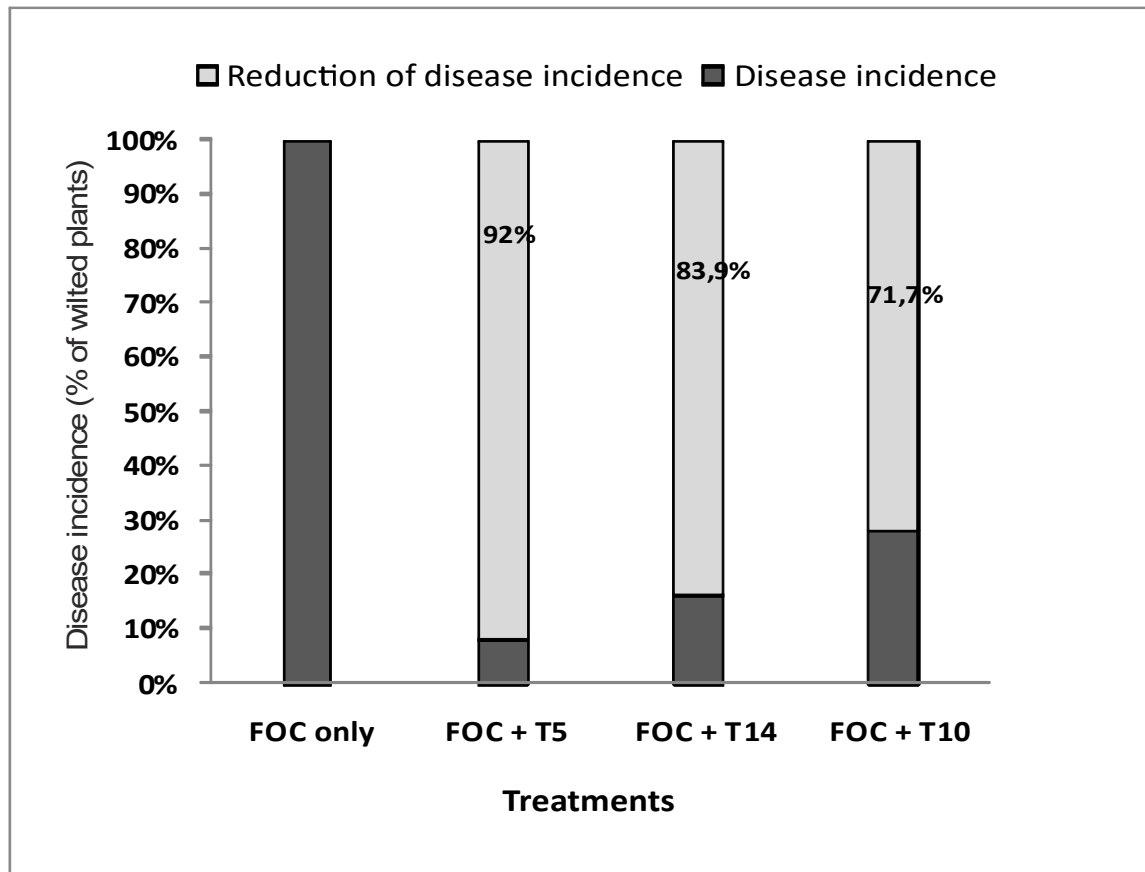


Fig. 2. Reduction of Fusarium wilt (%) in pots and a comparison between inoculated plants by FOC (*Fusarium oxysporum ciceris*) alone and inoculated plants treated by *Trichoderma* spp.

disease by 92%, followed by *T. harzianum* (T14) (83.9%) and *T. koningii* (T10) (71.7%) isolates.

DISCUSSION

Our results showed that all the isolates of *Trichoderma* inhibited mycelial growth of the pathogen. Among all isolates, *T. harzianum* (T5) was most antagonistic as it inhibited pathogen mycelial growth within 2 days of post inoculation, which could be due to the competition for nutrients and space (Chet, 1987). Following interaction between pathogen and some *Trichoderma* isolates, coiling interaction and lysis of hyphae of *Fusarium* were observed. The coiling process

was associated with internal mycoparasitism (Howell, 2003). Our results support microscopic observations reported by Dubey *et al.* (2007). Isolates of *Trichoderma* have been demonstrated to be mycoparasitic on a number of fungi (Harman *et al.*, 2004). However, some do show only average inhibitory capacity against *Fusarium* tested. El-Hasan *et al.* (2008) reported that fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* and several other *Fusarium* species is directly involved in retarding mycelia growth and conidia production in *Trichoderma*. These mycotoxins have direct antagonistic activity that can down regulate *Trichoderma* mycoparasitism related genes (El-Hasan

et al., 2008; Sharma, 2011). Moreover, Sivan and Chet (1989) suggested that some *F. oxysporum* strains have cell walls containing proteinaceous compounds that make these strains more resistant to *Trichoderma* mycoparasitism.

The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. are mediated through the production of volatile metabolites that inhibit the growth of various soil borne pathogens (Reddy et al., 2014). Some of these metabolites have been studied and the production of harzianic acid, tricholin, peptaiboles, viridin, gliovirin, alamethicins and others have been described (Very et al., 2001).

Enzyme assays with the *Trichoderma* isolates have revealed the production of high levels of degradative proteases, cellulases and chitinases enzymes. In our study, *in vitro* enzyme assays were used to demonstrate the mycoparasitic ability of *Trichoderma* isolates on a pathogen. Mycoparasitism also involves synthesis of a rich mixture of hydrolytic enzymes. According to Howell (2003) and Harman et al. (2004) proteases, chitinases and/or glucanases function by breaking down the polysaccharides, chitin, and β -glucans that are responsible of the rigidity of fungal cell walls, thereby destroying cell wall integrity. Protease production by *Trichoderma* spp. has also been associated with biocontrol of the plant pathogen (Elad and Kapat, 1999). Hence, protease and cellulase production by *Trichoderma* spp. plays an important role in organic decomposition, nutrient mineralization and promoting plant growth (Lima et al., 1998). However, The chlamydospores formation by *Fusarium oxysporum* in response to *Trichoderma* is a defensive response to a potential competitor. The Stimulation of the resistances by antagonistic species of *Trichoderma* has been observed by several investigators (Sid Ahmed et al., 1999).

The current study indicated the possibility of managing chickpea *Fusarium* wilt disease efficiently by seed treatments with antagonistic *Trichoderma* isolates. Several reports indicate that *Trichoderma* species can effectively suppress *Fusarium* wilt pathogens (Sivan and Chet, 1986), soil borne pathogens and others various pathogens (Benítez et al., 2004). Obviously T5 isolate of *T. harzianum* was

potentially significant as it suppressed the expression of wilt disease by 92% in the presence of FOC and strongly reduced the gravity of the disease. Similarly, the isolate T10 (*T. koningii*) and T14 (*T. harzianum*) were also equally antagonistic towards *F. oxysporum ciceris* in dual culture when compared to the antagonism observed in culture pots.

The study carried out on *Trichoderma* isolated from different rhizosphere soils from north-west of Algeria has shown their ability to parasitize phytopathogenic fungi and to diminish the incidence disease of chickpea *Fusarium* wilt, possibly through a combination of mechanisms to control the growth of pathogen. The antagonistic *Trichoderma* isolated in the present study are being studied in field trials to test their effectiveness in countering soil-borne diseases of different crops. The potential strains obtained in the present study clearly demonstrate their impact as biocontrol agents for the management of the diseases caused by *Fusarium* and if proved in field studies they could be used under local conditions in Algeria.

REFERENCES

- Abe, C.A.L., Faria, C.B., de Castro, F.F., de Souza, S.R., Santos, F.C., da Silva, C.N., Tessmann, D.J. and Barbosa-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.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A. (2008) Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential in *Theobroma cacao*. *Biol. Control*, **46**, 24–35.
- Benítez, T., Rincón, M.A., Limón, M.C. and Codón, C.A. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.*, **7**, 249–260.
- Benzohra, I.E., Megateli, M. and Berdja, R. (2015) Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *Afr. J. Biotechnol.*, **14**, 542–550.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. and Hallmann, J. (2002) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic

- function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **51**, 215–229.
- Chet, I. (1987) *Trichoderma* application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soil-borne pathogenic fungi. In I. Chet, (ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, John Wiley, New York, pp. 137–160.
- Datta, B.S., Das, A.K. and Ghosh, S.N. (2004) Fungal antagonists of some plant pathogens. *J. Mycol. Plant Pathol.*, **42**, 15–17.
- Dennis, C. and Webster, J. (1971) Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **57**, 41–48.
- Dubey, S.C., Suresh, M., and Singh, B. (2007) Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control*, **40**, 118–127.
- El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A. and Molan, Y.Y. (2015) Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* Wilt. *Plant Pathol. J.*, **31**, 50–60.
- Elad, Y. and Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **105**, 177–189.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems- an introduction. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen (eds.), *Botrytis, Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 1–8.
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. (1981) A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, **9**, 59–67.
- El-Hasan, A., Walker, F. and Buchenauer, H. (2008) *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Phytopathol.*, **156**, 79–87.
- Harman, G.E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, **96**, 190–194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 43–56.
- Howell, C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, **87**, 4–10.
- Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M.M., Landa, B.B. and Navas-Cortés, J.A. (2015) Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Prot.*, **73**, 16–27.
- Kamala, T. and IndiraDevi, S. (2011) Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech.*, **1**, 217–225.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and 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., Sariah, M., Saud, H.M., Alam, M.Z. and Ismail, M.R. (2010) Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. Evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **64**, 594–600.
- Landa, B.B., Hervàs, A., Bettioli, W. and Jiménez-Díaz, R.M. (1997) Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, **25**, 305–318.
- Lima, G., De-Curtis, F., Castoria, R. and De-Cicco, V. (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *BioControl Sci. Technol.*, **8**, 257–267.
- Reddy, B.N., Saritha, K.V. and Hindumathi, A. (2014) *In vitro* screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. *J. Biol. Res.*, **2**, 29–36.
- Samuels, G.J., Chaverri, D.F., Farr, D.F. and McCray, E.B. (2004) *Trichoderma* online systematic Botany and Mycology Laboratory. ARS, USDA. [Revised 2014 Apr 16; cited 2014 Apr 16]. Available from: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- Sharma, P. (2011) Complexity of *Trichoderma-Fusarium*

- interaction and manifestation of biological control. *Aust. J. Crop Sci.*, **5**, 1027–1038.
- Sid Ahmed, A., Perez-Sanchez, C., Egea, C. and Candela, M.E. (1999) Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathol.*, **48**, 58–65.
- Sivan, A. and Chet, I. (1986) Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *J. Phytopathol.*, **116**, 39–47.
- Sivan, A. and Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 675–682.
- Strange, R.N. and Scott P.R. (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 83–116.
- Susana Correa, O. and Abel Soria, M. (2011) Potential of Bacilli for biocontrol and its exploitation in sustainable agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 197–209.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndounbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D. and Hebbbar, K.P. (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control*, **43**, 202–212.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. and Valér, J.R. (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp., Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.*, **37**, 1–20.
- Vey, A., Hoagland, R.E. and Butt, T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In T.M. Butt, C.N. Jackson and N. Magan (eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CAB international, Bristol, p. 311–346.
- Vincent, C., Goettel, M.S. and Lazarovits, G. (2007) Biological control: A global perspective: Case studies from around the world. CAB International, Wallingford, UK.
- Zaim, S., Belabid, L. and Bellahcene, M. (2013) Biocontrol of chickpea *Fusarium* wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. *J. Plant Prot. Res.*, **53**, 177–183.

Trichoderma harzianum isolate T5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: KX523899.1

LOCUS KX523899 440 bp DNA linear PLN 20-JUL-2016

DEFINITION Trichoderma harzianum isolate T5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION KX523899

VERSION KX523899.1 GI:1043682923

KEYWORDS .

SOURCE Trichoderma harzianum

ORGANISM [Trichoderma harzianum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; Trichoderma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 440)

AUTHORS Bekkar,A.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-JUL-2016) Agronomy Department, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara, 19 Rue Ali Moussa Bouskrine, Mascara 29000, Algeria

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..440
	/organism="Trichoderma harzianum"
	/mol_type="genomic DNA"
	/isolate="T5"
	/host="soil"
	/db_xref="taxon: 5544 "
	/country="Algeria: Mascara"
misc_RNA	<1..>440
	/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```
1  gccccggacc aaggcgcccc cggaggacc aacctaaaac tcttattgta taccacctcg
61  cgggtttttt tttataatct gagccttctc ggcgcctctc gtaggcgttt cgaaaatgaa
121 tcaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc
181 gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcga tctttgaacg cacattgctc
241 ccgccagtat tctggcgggc atgcctgtcc gagcgtcatt tcaaccctcg aaccctccg
301 gggggtcggc gttggggatc ggccctcctc tagcgggtgg ccgtctccga aatacagtg
361 cggctctgcc gcagcctctc ctgcgcagta gtttgacac tcgcatcggg agcgcggcgc
421 gtccacagcc gttaaacacc
```

//