

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et la Géomatique

## THESE de DOCTORAT

Spécialité Microbiologie appliquée

Option Biotechnologie

Intitulée

**Activité antifongique de quelques champignons isolés de la grande sebkhia d'Oran sur certaines maladies cryptogamiques des plantes**

Présentée par : Chamekh Rajaa

Le 14/01/2021

Devant le jury :

Président	BENARBA B.	Professeur	Université de Mascara
Examineur	KIHEL M.	Professeur	Université d'Oran
Examineur	BELLAHCENE M.	Professeur	Université de Temouchent
Examineur	HADDAD M.	Maitre de conférences	Université de Sidi Bel-abbès
Examineur	BOUNGAB K.	Professeur	Université de Mascara
Encadreur	BELABID L.	Professeur	Université de Mascara

## Remerciement

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche sur les systèmes Biologiques et Géomatiques (LRBSG) de l'Université de Mascara.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Belabid L., doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mascara, pour m'avoir fait confiance et accepter d'assurer la direction scientifique de ce travail et qui m'a fait bénéficier de ces précieux conseils et directives. Il m'est agréable de pouvoir lui adresser mes vifs remerciements et immenses reconnaissances.

Je remercie Monsieur Benarba B., Maître de conférences à l'Université de Mascara de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également aux membres du jury Professeur Kihel M. de l'Université d'Oran, Professeur Bellahcen M. de l'Université de Temouchent, Monsieur Haddad M., Maître de conférences à l'Université de Sidi Bel-abbès et Madame Boungab K., Maître de conférences à l'Université de Mascara pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail.

La partie identification moléculaire et phylogénétique des champignons a été réalisée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), université de Brest, France. Je remercie le professeur Emmanuel Coton, directeur du LUBEM pour m'avoir permis de réaliser cette partie de ma thèse au sein du laboratoire.

Je suis très reconnaissante au Professeur Patrice Nodet de m'avoir appris les techniques de biologie moléculaire, m'avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques et d'avoir veillé sur la réalisation de mon travail et avec qui les discussions ont été toujours fructueuses ; ses directives et sa rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse.

Je remercie sincèrement Monsieur Jean-Luc J. de m'avoir initié aux techniques de phylogénie. Ces explications simplifiées m'ont aidé à mieux comprendre le domaine vaste et complexe de la taxonomie fongique.

Je souhaite aussi remercier Franck et Christelle pour leur gentillesse et leur disponibilité au quotidien qui a facilité mon travail ainsi que tous les membres du LUBEM. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes très chers parents, mes frères et ma sœur, ainsi que mes amis pour leur soutien moral, et leurs encouragements au long de l'élaboration de ce travail.

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.

## ملخص

سبخة وهران الكبرى عبارة عن منخفض مغلق تبلغ مساحته 1890 كيلومترًا مربعًا وتقع في شمال غرب الجزائر على بعد 12 كيلومترًا من البحر الأبيض المتوسط. على الرغم من تصنيف هذه السبخة بين الأراضي الرطبة ذات الأهمية العالمية من قبل اتفاقية رامسار في عام 2002 ، لم يتم إجراء دراسة عن المجتمع الفطري في هذه المنطقة. في دراستنا ، تم أخذ عينات من منطقتين مختلفتين على مساحة 5 كيلومتر مربع. تتميز المنطقة الأولى بالنباتات المحبة للملوحة ومحاصيل الحبوب والثانية بالغياب التام للنباتات. أظهرت النتائج أن تربة السبخة قلووية ، باستثناء تربة محاصيل الحبوب المتعادلة والملوحة للغاية. تم عزل إجمالي 136 عزلة من 24 جنسًا و 43 نوعًا من بينها 13 نوعًا غير معروف من المنطقتين. بشكل عام ، تشبه الفطريات المعزولة الفطريات الفطرية في النظم البيئية شديدة الملوحة. كانت المنطقة الأولى أكثر تنوعًا من خلال عزل 33 نوعًا من 17 جنسًا. كانت الأنواع السائدة متمثلة في *Fusarium* ، *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *A. amstelodami* ، *P. egyptiacum* و *P. egyptiacum* ، *Alternaria sp.* ، *Gymnoascus* و *A. amstelodami* ، *Gymnoascus dankaliensis* من بين هذه الفطريات المعزولة ، الأنواع *Gymnoascus halophilus* ، *Trichoderma gamsii* ، *Fusarium brachygibbosum* ، *Penicillium allii* تم عزلهم لأول مرة في الجزائر. كما أظهرت النتائج أيضا أن *Gymnoascus halophilus* ، *Walleimia sp.* هي الأنواع الوحيدة المحبة للملوحة الإجبارية.

جميع السلالات قادرة على إفراز واحد على الأقل من الإنزيمات الأربعة المختبرة (الأميليز ، الليباز ، البروتياز ، السليولاز ) ولوحظ أفضل نشاط إنزيمي في الأنواع *Aspergillus sp. souche A4* ، *Chaetomium sp. souche H1* ، *Gymnoascus halophilus* ، *Walleimia sp.* ، *Ustilago cynodonti* ، *Penicillium vinaceum* ،

أدت معظم السلالات إلى تثبيط نمو الفطر *Fusarium oxysporum* في المختبر بالتعرض المباشر في وسط بدون كلوريد الصوديوم. في وجود 2٪ كلوريد الصوديوم ، زاد متوسط معدل التثبيط لجميع السلالات بشكل كبير. لوحظ أفضل نشاط مضاد للفطريات في وجود وغياب كلوريد الصوديوم عند *Trichoderma gamsii* ، *Trichoderma sp.* أظهرت هاتان السلالتان أيضًا قوة مضادة للفطريات ضد أربعة أنواع من الفطريات الممرضة للنبات *R. solani* ، *Alternaria alternata* ، *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ، *S. sclerotiorum* ، عن طريق إفراز مواد مضادة للفطريات متطايرة. كلا السلالتين لهما تأثير وقائي وعلاجي كبير ضد اللفحة المبكرة للطمطم التي تسببها *Alternaria alternata* عن طريق تقليل قطر الآفات. على الرغم من صغر مساحة منطقة دراستنا ، فإن هذا العمل هو التقرير الأول عن التنوع البيولوجي الفطري في منطقة السبخة الكبرى بوهران والذي يوضح أن هذه التربة شديدة الملوحة تضم تنوعًا فطريًا ملحوظًا والتي يمكن أن تكون مصدرًا مهمًا لسلالات ذات مصلحة في مجال التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** السبخة ، التنوع الفطري ، تحمل الملوحة ، الإنزيمات ، النشاط المضاد للفطريات ، مكافحة البيولوجية.

## Résumé

La grande sebkha d'Oran est une dépression fermée d'une superficie de 1890 Km<sup>2</sup> située au nord-ouest de l'Algérie à 12 km de la Mer Méditerranée. Malgré le classement de cette sebkha parmi les zones humides d'importance mondiale par la convention de Ramsar en 2002, aucune étude sur la communauté fongique de cette zone n'a été réalisée. Dans notre étude, les échantillons ont été prélevés dans deux régions différentes sur une superficie de 5 km<sup>2</sup>. La première région est caractérisée par une végétation halophile et des cultures céréalières et la seconde par une absence totale de végétation. Les résultats ont montré que le sol de la sebkha est alcalin, à l'exception du sol des cultures céréalières qui est neutre, et extrêmement salin. Un total de 136 isolats de 24 genres et 43 espèces dont 13 espèces non identifiées ont été isolés dans les deux régions. En général, les champignons isolés sont similaires à la mycoflore des écosystèmes hypersalins. La première région a été plus diversifiée en isolant 32 espèces de 17 genres. Les genres prédominants étaient *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et leurs formes téléomorphes *Aspergillus amstelodami* et *Penicillium egyptiacum*. Dans la deuxième région, 21 espèces de 14 genres ont été isolées avec une prédominance des espèces *Aspergillus amstelodami*, *Penicillium egyptiacum*, *Alternaria sp.* et *Gymnoascus denkaiensis*. Parmi cette mycoflore isolée, les espèces *Gymnoascus halophilus*, *Trichoderma gamsii*, *Fusarium brachygibbosum* et *Penicillium allii* ont été isolées pour la première fois en Algérie. Les résultats ont également montré que *Gymnoascus halophilus* et *Wallemia sp.* sont les seules espèces halophiles obligatoires, les autres souches sont halotolérantes. Toutes les souches sont capables de sécréter au moins une des quatre enzymes testées (amylase, lipase, protéase, cellulase). La meilleure activité enzymatique a été observée chez les espèces *Aspergillus sp.* souche A4, *Chaetomium sp.* souche H1, *Penicillium vinaceum*, *Gymnoascus halophilus* et les deux basidiomycètes *Wallemia sp.* et *Ustilago cynodontis*. La plupart des souches ont inhibé *in vitro* la croissance de *Fusarium oxysporum* par confrontation directe sur milieu sans NaCl ; en présence de 2% NaCl, la moyenne du taux d'inhibition de l'ensemble des souches a significativement augmenté. La meilleure activité antifongique en présence et en absence du NaCl a été observée chez les deux souches *Trichoderma sp.* et *T. gamsii*. Ces deux souches ont montré aussi un pouvoir antagoniste *in vitro* important contre quatre champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata* en sécrétant des substances antifongiques volatiles. *In vivo*, les deux souches avaient un effet préventif et curatif significatif contre l'alternariose de la tomate causée par *Alternaria alternata* en réduisant le diamètre des lésions. Malgré la petite superficie de notre zone d'étude, ce travail est le premier rapport sur la biodiversité fongique de la grande sebkha d'Oran et qui montre que ce sol hypersalin abrite une remarquable diversité fongique et qui peut être une source importante de souches d'intérêt biotechnologique.

**Mots clés :** sebkha, diversité fongique, halotolérance, enzymes hydrolytiques, activité antifongique, contrôle biologique

## Abstract

The great sebkha of Oran is a closed depression with an area of 1890 km<sup>2</sup> located in the north-west of Algeria at 12 km from the Mediterranean Sea. Despite the classification of this sebkha among wetlands of global importance by the Ramsar convention in 2002, no study on the fungal community of this area has been carried out. In our study, samples were taken from two different regions over an area of 5 km<sup>2</sup>. The first region is characterized by halophilic vegetation and cereal crops and the second by a total absence of vegetation. The results showed that the soil of the sebkha is alkaline, with the exception of the soil of cereal crops which is neutral, and extremely saline. A total of 136 isolates from 24 genera and 43 species including 13 unidentified species were isolated in the two regions. In general, the isolated fungi are similar to the mycoflora of hypersaline ecosystems. The first region was more diverse by isolating 32 species from 17 genera. The predominant genera were *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and their teleomorphic forms *Aspergillus amstelodami* and *Penicillium egyptiacum*. In the second region, 21 species from 14 genera were isolated with a predominance of the species *A. amstelodami*, *P. egyptiacum*, *Alternaria sp.* and *Gymnoascus denkaliensis*. Among this isolated mycoflora, *Gymnoascus halophilus*, *Trichoderma gamsii*, *Fusarium brachygibbosum* and *Penicillium allii* were isolated for the first time in Algeria. The results also showed that *Gymnoascus halophilus* and *Wallemia sp.* are the only obligatory halophilic species, the other strains are halotolerant. All the strains are capable of secreting at least one of the four tested enzymes (amylase, lipase, protease, cellulase). The best enzymatic activity was observed in *Aspergillus sp.* strain A4, *Chaetomium sp.* strain H1, *Penicillium vinaceum*, *Gymnoascus halophilus* and the two basidiomycetes *Wallemia sp.* and *Ustilago cynodontis*. Most of the strains inhibited the growth of *F. oxysporum in vitro* on medium without NaCl; in the presence of 2% NaCl, the mean inhibition rate of all strains significantly increased. The best antifungal activity, in the presence or absence of NaCl, was observed in the two strains *Trichoderma sp.* and *T. gamsii*. These two strains also showed an important antagonist activity against four phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Alternaria alternata* by secreting volatile antifungal substances. *In vivo*, both strains had a significant preventive and curative effect against black spot of tomato caused by *Alternaria alternata* by reducing the diameter of the lesions. Despite the small surface of our study area, this work is the first report on the fungal biodiversity of the great sebkha of Oran and which shows that this hypersaline soil harbors a remarkable fungal diversity and which can be an important source of strains of biotechnological interest.

**Key words:** Sebkha, fungal diversity, halotolerance, hydrolytic enzymes, antifungal activity, biological control.

## Table des matières

ملخص .....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Sommaire .....	IV
Liste des tableaux .....	VIII
Liste des figures .....	IX
Liste des abréviations .....	XII
Introduction.....	1

### Première partie

#### Synthèse bibliographique

<b>I- Les environnements hypersalins.....</b>	<b>4</b>
1- Environnements extrêmes.....	4
2- Environnements hypersalins.....	4
2-1. Environnements thalassohalins.....	4
2-2. Environnements athalassohalins.....	4
2-3. Saumures océaniques profondes.....	5
3- Les chotts et sebkhas.....	5
4- La grande sebkha d'Oran.....	9
4.1. Description et situation géographique.....	9
4.2. Le lac.....	10
4.3. La végétation halophyte entourant la sebkha.....	10
4.4. Les sols agricoles.....	10
<b>II- Les champignons halophiles.....</b>	<b>11</b>
1- Le Règne des fungi.....	11
1.1. Généralité sur les champignons.....	11
1.2. Techniques d'identification des champignons.....	13
2- Définition de l'halophilie chez les champignons.....	18
3- Diversité fongique des milieux hypersalins.....	18
3.1. Levures noires.....	19
3.2. <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et leurs formes téléomorphes.....	19
3.3. Le genre <i>Cladosporium</i> .....	20
3.4. Levures non mélanisées.....	20
3.5. Le genre <i>Wallemia</i> .....	21
4- Adaptation des champignons au sel.....	21
4.1. Stratégie de solutés compatibles.....	22
4.2. Homéostasie ionique.....	23
4.3. Fluidité de la membrane plasmique.....	23

4.4. Détection des concentrations élevées de sel.....	24
<b>III- Importance biotechnologique des champignons halophiles.....</b>	<b>26</b>
1- Le rôle biotechnologique.....	26
2- Les champignons halotolérants comme agent de lutte biologique.....	28
2.1. Aux champs.....	28
2.2. En post récolte.....	29

## Deuxième partie

### Expérimentation et analyse des résultats

#### Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

<b>I- Isolement et identification des champignons.....</b>	<b>34</b>
1- Site d'étude.....	34
1.1. Situation géographique.....	34
1.2. Echantillonnage.....	36
1.3. Caractérisation physico-chimiques des échantillons du sol.....	36
2- Isolement, purification et conservation des isolats.....	36
3- Identification des isolats.....	37
3.1. Identification morphologique.....	37
3.2. Identification moléculaire.....	37
3.2.1. Extraction d'ADN.....	37
3.2.2. Amplification des fragments d'ADN.....	37
3.2.3. Electrophorèse .....	38
3.2.4. Purification et séquençage.....	38
3.3. Identification phylogénétique.....	39
<b>II- Caractérisation des souches.....</b>	<b>40</b>
1- Effet de la salinité sur la croissance radiale des souches.....	40
2- Production d'enzymes hydrolytiques.....	40
2.1. Amylase.....	40
2.2. Cellulase.....	40
2.3. Protéase.....	41
2.4. Lipase.....	41
<b>III- Sélection des souches à pouvoir antagoniste.....</b>	<b>41</b>
1- Champignons tests.....	41
2- Sélection <i>in vitro</i> des souches à activité antifongique.....	41
3- Pouvoir antagoniste, <i>in vitro</i> , de deux souches de <i>Trichoderma</i> .....	42
3.1. Test d'antagonisme par antibiose : cas d' <i>A. alternata</i> .....	42
3.2.1. Sécrétion des substances volatiles.....	42

3.2.2	Sécrétion des substances diffusibles.....	42
4-	Test de bio-protection des fruits de tomates : cas d' <i>A. alternata</i> .....	42
4.1	Préparation de l'inoculum.....	42
4.2	Technique d'inoculation.....	43
4.3	Lecture des résultats.....	43
<b>IV-</b>	<b>Analyse statistique.....</b>	<b>43</b>

## **Chapitre 2 : Isolement et identification des champignons halotolérants**

1-	Caractérisation physico-chimiques des échantillons du sol.....	45
2-	Identification des isolats.....	45
2.1.	Identification morphologique.....	45
2.1.1	Division Ascomycota.....	47
	Ordre des Eurotiales.....	47
	Ordre des Hypocreales.....	50
	Ordre des Microascales.....	54
	Ordre des Pleosporales et Capnodiales.....	54
2.1.2	Division Basidiomycota.....	56
	Ordre des Wallemiales.....	56
	Ordre des Ustilaginales.....	56
2.1.3	Isolats non identifiés.....	57
2.2.	Identification moléculaire et phylogénétique.....	58
2.2.1.	Ordre des Eurotiales.....	58
2.2.2.	Ordre des Onygenales.....	69
2.2.3.	Ordre des Hypocreales.....	72
2.2.4.	Ordre des Pleosporales.....	80
2.2.5.	Ordre des Sordariales.....	80
2.2.6.	Ordre des Microascales et Capnodiales.....	87
2.2.7.	Division Basidiomycota.....	87
3-	Discussion.....	88

## **Chapitre 3 : Répartition et caractérisation des souches**

1-	Répartition des souches.....	97
2-	Test d'halotolérance.....	103
3-	Production d'enzymes hydrolytiques.....	107
3.1.	Cellulase.....	109
3.2.	Protéase.....	111
3.3.	Lipase.....	112
3.4.	Amylase.....	113
4-	Discussion.....	114

## Chapitre 4 : Sélection des souches à pouvoir antagoniste

1- Sélection <i>in vitro</i> des souches à activité antifongique.....	121
1.1. Sur milieu sans NaCl.....	121
1.2. Effet du NaCl sur l'activité antifongique.....	124
2- Pouvoir antagoniste, <i>in vitro</i> , de deux souches de <i>Trichoderma</i> .....	128
2.1. Test d'antagonisme par confrontation direct.....	128
2.2. Test d'antagonisme par antibiose.....	130
3- Test de bio-protection des fruits de tomates (cas d' <i>A. alternata</i> ).....	131
4- Discussion.....	133
<b>Conclusion</b> .....	<b>140</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>143</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>172</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: Approches phénotypiques générales pour identifier et caractériser les champignons.....	14
Tableau 2: Produits naturels issus de champignons dérivés de milieux hypersalins.....	27
Tableau 3 : Les différents sites d'échantillonnage.....	35
Tableau 4 : Les amorces des gènes utilisées.....	39
Tableau 5: analyses physicochimiques des échantillons du sol.....	45
Tableau 6: Identification morphologique des isolats.....	46
Tableau 7: Identification moléculaire des souches de <i>Penicillium</i> .....	59
Tableau 8: Identification moléculaire des souches d' <i>Aspergillus</i> .....	63
Tableau 9 : Identification moléculaire des souches de l'ordre des Onygenales.....	69
Tableau 10 : Identification moléculaire des souches de l'ordre des Hypocreales.....	72
Tableau 11 : Identification moléculaire des souches de l'ordre des Pleosporales.....	80
Tableau 12 : Identification moléculaire des souches de l'Ordre des Sordariales.....	81
Tableau 13 : Identification moléculaire des souches B5 et R36.....	87
Tableau 14 : Identification moléculaire des souches H14 et H15.....	87
Tableau 15 : Répartition des souches dans les deux zones.....	102
Tableau 16 : La tolérance des souches au sel.....	106
Tableau 17 : Activité enzymatique des souches.....	107
Tableau 18 : Test de Newman Keuls du taux d'inhibition des souches par confrontation directe vis-à-vis d'une souche de <i>F. oxysporum</i> sur milieu PDA sans NaCl.....	123
Tableau 19 : Test de Newman Keuls du taux d'inhibition des souches par confrontation directe vis-à-vis d'une souche de <i>F. oxysporum</i> sur milieu PDA à 2% NaCl.....	126
Tableau 20: Effet des souches de <i>Trichoderma</i> sur le diamètre des lésions causées par <i>A. alternata</i> après une semaine d'incubation.....	131

## Liste des figures

Figure 1 : Sebka et/ou chott.....	6
Figure 2 : Répartition des lacs hypersalins dans le monde.....	7
Figure 3 : Répartition géographique des chotts et sebkhas en Algérie.....	8
Figure 4 : Situation géographique de la grande sebkha d'Oran.....	9
Figure 5 : Classification simplifiée du règne des champignons.....	12
Figure 6 : l'origine phylogénétique commune entre le règne des champignons et des animaux.....	12
Figure 7 : Le modèle d'adaptations à des concentrations élevées de sel chez <i>Hortaea werneckii</i> .....	25
Figure 8: <b>Chevauchement entre les caractères impliqués dans la pathogénèse et les caractères souhaitables en lutte biologique</b> .....	31
Figure 9: La carte de la grande sebkha d'Oran.....	34
Figure 10 : Les sites d'échantillonnage de la zone 1.....	35
Figure 11 : Les sites d'échantillonnage de la zone 2.....	36
Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus sp</i> .....	47
Figure 13 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Penicillium sp</i> .....	48
Figure 14 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Eurotium sp</i> .....	48
Figure 15 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Talaromyces sp</i> .....	49
Figure 16 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Eupenicillium sp</i> .....	50
Figure 17 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Fusarium sp</i> .....	51
Figure 18 : Aspect macroscopique de <i>Trichoderma sp</i> .....	51
Figure 19 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Acremonium sp</i> . souche R8.....	52
Figure 20 : aspect macroscopique de <i>Verticillium sp</i> . souche R29 (A) et C3 (B).....	52
Figure 21 : Aspect macroscopique de <i>Beauveria sp</i> . souche R13 (A) et <i>Peacilomyces</i> .....	53
Figure 22 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Gliocladium sp</i> . souche S3.....	53
Figure 23 : aspect macroscopique et microscopique de <i>Myrothecium sp</i> . souche R5.....	54
Figure 24 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Microascus sp</i> . souche B5.....	54
Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Alternaria sp</i> . souche G5 (A), <i>Helminthosporium sp</i> . souche R20 (B), <i>Stymphylium sp</i> . souche R43 (C), <i>Cladosporium sp</i> . souche R36 (D).....	55
Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Wallemia sp</i> . souche H15.....	56
Figure 27 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Ustilago sp</i> . souche H14.....	56
Figure 28 : Aspect macroscopique des isolats non identifiés morphologiquement.....	57
Figure 29 : Arbres phylogénétiques basés sur l'ITS et $\beta$ -tub des souches R32 et R33.....	60
Figure 30 : Arbres phylogénétiques basés sur CaM et RPB2 des souches R32 et R33.....	61
Figure 31 : Arbre phylogénétique concaténé à base d'ITS, $\beta$ -tub, CaM et RPB2 des souches R32 et R33.....	62
Figure 32 : Arbre phylogénétique concaténé à base d'ITS, $\beta$ -tub, CaM et RPB2 montrant la position des souches R32 et R33 dans le clade <i>P. egyptiacum</i> , <i>P. sinaicum</i> , <i>P. kewense</i> .....	61

Figure 33 : Arbres phylogénétiques basés sur $\beta$ -tub des souches A1 et A2.....	65
Figure 34 : Arbres phylogénétiques basés sur ITS et $\beta$ -tub des souches A4, E2 et E7.....	66
Figure 35 : Arbres phylogénétiques basés sur CaM et RPB2 des souches A4, E2 et E7.....	67
Figure 36 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur ITS, $\beta$ -tub, CaM et RPB2 des souches A4, E2 et E7.....	68
Figure 37 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche H18.....	70
Figure 38 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche H10.....	71
Figure 39 : Arbre phylogénétique basé sur TEF-1 $\alpha$ de la souche S2.....	73
Figure 40 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche B2.....	74
Figure 41 : Arbre phylogénétique basé sur SSU de la souche B2.....	74
Figure 42 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche R1.....	75
Figure 43 : Arbre phylogénétique basé sur TEF-1 $\alpha$ de la souche R1.....	76
Figure 44 : Arbre phylogénétique basé sur $\beta$ -tub de la souche R1.....	77
Figure 45 : Arbre phylogénétique basé sur RPB2 de la souche R1.....	78
Figure 46: Arbre phylogénétique basé sur RPB1 de la souche R1.....	78
Figure 47 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur TEF-1 $\alpha$ , $\beta$ -tub, ITS, LSU, RPB2 de la souche R1.....	79
Figure 48 : Arbre phylogénétique basé sur RPB2 des souches H1, H38 et H42.....	82/83
Figure 49 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS des souches H1, H38 et H42.....	84
Figure 50 : Arbre phylogénétique basé sur LSU des souches H1, H38 et H42.....	84
Figure 51 : Arbre phylogénétique basé sur $\beta$ -tub des souches H1, H38 et H42.....	85
Figure 52 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur ITS, LSU, $\beta$ -tub, RPB2 des souches H1, H38 et H42.....	86
Figure 53 : Répartition des isolats dans les deux zones.....	97
Figure 54: les Ordres fongiques isolés de la zon1.....	98
Figure 55 : les Ordres fongiques isolés de la zon2.....	98
Figure 56: Pourcentage d'isolement des espèces dans la zone 1.....	99
Figure 57 : Pourcentage d'isolement des espèces de <i>Fusarium</i> dans la zone 1.....	99
Figure 58 : Pourcentage d'isolement des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans la zone 1.....	99
Figure 59 : Pourcentage d'isolement d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans la zone 2.....	100
Figure 60 : Pourcentage d'isolement des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans la zone 2.....	101
Figure 61 : Pourcentage d'isolement des espèces de la zone 2 à l'exception des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .....	101
Figure 62 : Concentration saline optimale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Eurotiales, Onygenales et Microascales.....	104
Figure 63 : Concentration saline maximale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Eurotiales, Onygenales et Microascales.....	104

Figure 64 : Concentration saline optimale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Hypocreales, Sordariales, pleosporales, Capnodiales et les espèces Basidiomycètes.....	105
Figure 65 : Concentration saline maximale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Hypocreales, Sordariales, pleosporales, Capnodiales et les espèces Basidiomycètes.....	105
Figure 66 : pourcentage des souches sécrétant chaque enzyme.....	109
Figure 67 : Activité cellulasique des souches.....	110
Figure 68 : Souches présentant la plus forte activité cellulasique.....	110
Figure 69 : Activité protéolytique des souches.....	111
Figure 70 : Souches présentant la plus forte activité protéolytique.....	111
Figure 71 : Activité lipolytique des souches.....	112
Figure 72 : Souches présentant la plus forte activité lipolytique.....	112
Figure 73 : Activité amylolytique des souches.....	113
Figure 74 : Souches présentant la plus forte activité amylolytique.....	113
Figure 75: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporum</i> par confrontation direct sur milieu sans NaCl avec les souches appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales.....	122
Figure 76: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporum</i> par confrontation direct sur milieu sans NaCl avec les souches à l'exception de celles appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales.....	122
Figure 77 : effet du NaCl sur la moyenne du taux d'inhibition de l'ensemble des souches..	125
Figure 78: Effet du NaCl sur l'activité antifongique des souches appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales.....	125
Figure 79: Effet du NaCl sur l'activité antifongique des souches à l'exception de celles appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales.....	126
Figure 80 : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des champignons phytopathogènes par confrontation direct avec les deux souches de <i>Trichoderma</i> .....	128
Figure 81 : confrontation directe entre les deux souches de <i>Trichoderma</i> et les champignons phytopathogènes.....	129
Figure 82 : Taux d'inhibition de la croissance radiale d' <i>A. alternata</i> par les substances volatiles secretées par les deux souches de <i>Trichoderma</i> .....	130
Figure 83 : Action des substances volatiles des deux souches de <i>Trichoderma</i> sur la croissance radiale d' <i>A. alternata</i> .....	130
Figure 84: effet du traitement préventif et curatif par les deux souches de <i>Trichoderma</i> sur le développement de l'alternariose sur les fruits de tomate.....	132
Figure 85 : biocontrol d' <i>A. alternata</i> en utilisant les deux souches de <i>Trichoderma</i> comme traitement préventif (A) et curatif (B).....	132

## Liste des abréviations

**ACT** : Actine

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**a<sub>w</sub>** : Activité de l'eau

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**β-tub** : β-tubuline

**CaM** : Calmoduline

**HOG** : High-Osmolarity Glycerol

**HAP**: Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**IE** : Index enzymatique

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**LSU** : Grande sous-unité ribosomale

**M** : Molaire

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**Pb** : Paire de base

**PCR** : Polymerase Chain Reaction.

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**pH**: Potentiel Hydrogène

**RPB1** : La plus grande sous-unité d'ARN polymérase II

**RPB2** : La deuxième plus grande sous-unité d'ARN polymérase II

**SSU** : Petite sous-unité ribosomale

**T**: Témoin

**TEF1 α** : le facteur d'élongation de la traduction 1-α

**U.V**: Ultra violet

# *Introduction*

## Introduction

Les milieux hypersalins sont des environnements extrêmes qui ont des concentrations en sel beaucoup plus élevées que celles de l'eau de mer, souvent proches ou dépassant la saturation. Il existe de nombreux types de lacs hypersalins comme les thalassohalins, les athalassohalins, les bassins de saumure océanique profonde et les chotts et sebkha (McGenity et Oren, 2012 ; Boetius et Joye, 2009).

Sebkha est un mot arabe faisant référence à une dépression fermée occupée temporairement par un lac salé. Elle se caractérise par une abondance de sels solubles concentrés en surface ce qui empêche toute végétation (Moussa, 2006). Une végétation halophile apparaît dans les sols moins salés qui entourent la sebkha. En Algérie, plusieurs sebkhas ou lacs salés s'étendent de la côte nord algérienne jusqu'au Sahara. La grande sebkha d'Oran est la plus grande sebkha du nord-ouest de l'Algérie avec une superficie de 1890 km<sup>2</sup> et occupée temporairement par un lac salé de 300 km<sup>2</sup> dont la concentration en sel est estimée à plus de 100 g/l de sels dissous (Benziane, 2013).

Les environnements hypersalins sont parmi les écosystèmes les plus diversifiés sur Terre se caractérisant par une faune et une flore spécifiques. Outre cette population, plusieurs études ont montré que d'autres organismes tels que les eubactéries, les archées, les algues et les champignons peuvent se développer sous le stress salin et peupler les écosystèmes hypersalins (Oren, 2002; Gunde-Cimerman et al., 2004). Diverses recherches ont été menées sur la diversité fongique des environnements hypersalins dans le monde, en particulier les salins solaires (Gunde-Cimerman et al., 1997, 2000, Butinar et al., 2005, 2011; Cantrell et al., 2006, 2013; Nayak et al., 2012), la Mer Morte (Guiraud et al., 1995; Steiman et al., 1995; Buchalo et al., 1998; Grishkan et al., 2003, Nazareth et al., 2012), les déserts arides (Abdel-Hafez, 1982; Moubasher et al., 1985, 1990; Sterflinger et al., 2012) et certaines sebkhas (Al-Musallam et al., 2011; Jaouani et al., 2014).

En général, les communautés fongiques dominante dans les environnements hypersalins sont les *Aspergillus*, *Penicillium* et certains de leurs genres téléomorphes apparentés (anciennement *Eurotium*, *Emericella* et *Eupenicillium*). D'autres genres tels que *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Wallemia* et *Hortaea* ont également été signalés (Mandeel, 2006; Gunde-Cimerman et Zalar, 2014; Moubasher et al., 2018). Certaines nouvelles espèces ont été décrites dans des environnements hypersalins, notamment la levure noire *Trimmatostroma salinum* (Zalar et al., 1999), trois espèces du genre *Wallemia* (Zalar et al., 2005), douze espèces du genre *Cladosporium* (Zalar et al., 2007; Schubert et al., 2007), deux espèces du genre *Emericella* (Zalar et al., 2008) et trois espèces du genre *Gymnoascus* (Zhou et al., 2016).

Les principales raisons d'étudier les extrémophiles, y compris les micro-organismes halophiles, sont de comprendre leurs mécanismes impliqués dans l'adaptation au stress et les applications biotechnologiques de leurs métabolites capables d'agir dans des conditions extrêmes. La faible activité de l'eau et la forte concentration en sel des environnements

hypersalins font de ces habitats une source importante de microorganismes halophiles pouvant fournir des enzymes d'intérêt industriel (Oren, 2010). Plusieurs recherches sur les hydrolases halophiles telles que les amylases, les cellulases, les lipases et les protéases ont été effectuées sur des bactéries et des champignons halophiles (Moreno et *al.*, 2013; Damare et *al.*, 2012) mais il n'y a eu que peu d'études sur les enzymes des champignons halophiles obligatoires (Ali et *al.*, 2014).

Ces champignons dérivés des milieux hypersalins sont aussi considérées comme une source précieuse de nouveaux métabolites secondaires avec diverses activités biologiques (Shang et *al.*, 2012 ; Corral et *al.*, 2018 ; Jančič et *al.*, 2016a). L'activité antimicrobienne des champignons halophiles et leur tolérance aux différents facteurs de stress ont permis de les considérés comme des candidats plus appropriés pour une application comme des agents de lutte biologique robuste et efficace contre les champignons phytopathogènes lorsque ces agents sont administrés en post récolte ou pré-récolte dans les terrains irrigués par l'eau saline (Gal-Hemed et *al.*, 2011 ; Zajc et *al.*, 2019).

Bien que la grande sebkha d'Oran soit considérée comme un environnement extrême en raison de sa forte teneur en sel, aucune étude sur sa communauté fongique n'a été effectuée. Dans ce travail, nous rapportons la première étude sur la biodiversité fongique de la grande sebkha d'Oran en isolant des champignons halotolérants et halophiles du sol salin dans deux zones de la sebkha ; aucun isolement n'a été fait au niveau du lac en raison de la difficulté d'accès au centre de la sebkha. Les isolats fongiques ont été identifiés par des observations morphologiques et microscopiques et par l'utilisation de techniques moléculaires et phylogénétiques. Afin de sélectionner des souches d'intérêt biotechnologique, la tolérance au sel des isolats, leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques et leur potentiel d'utilisation comme agent de lutte biologique ont été évaluées.

***Première Partie***  
***Synthèse Bibliographique***

## I- Les environnements hypersalins

### 1- Environnements extrêmes

Un environnement extrême est un habitat où un ou plusieurs paramètres physicochimiques ont des valeurs en permanence au-delà des limites inférieures ou supérieures de l'intervalle optimal pour le développement de l'Homme (Gómez, 2011). Les organismes qui peuvent vivre dans ces conditions extrêmes sont appelés extrémophiles.

### 2- Environnements hypersalins

Les environnements hypersalins sont des milieux extrêmes qui ont des concentrations en sel beaucoup plus élevées que celles de l'eau de mer. Ces milieux sont extrêmement variables en termes de salinité globale et de composition ionique et diffèrent dans de nombreux autres aspects, tels que la température, la pression et l'état nutritionnel (McGenity et Oren, 2012). Selon l'origine des eaux, les milieux hypersalins sont classés en thalassohalins et athalassohalins. Des saumures au fond des mers et des océans ont été aussi décrites comme de nouveaux habitats hypersalins (Boetius et Joye, 2009).

#### 2-1. Environnements thalassohalins

Ces environnements proviennent de l'évaporation de l'eau de mer. Leurs compositions en sel reflètent la composition ionique de la mer, au moins pendant les premières étapes de l'évaporation où le chlorure de sodium est le sel prédominant avec des concentrations plus faibles de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  et  $SO_4^{2-}$ .

Lorsque l'évaporation se poursuit au stade où la limite de solubilité des minéraux est atteinte, certains changements se produisent de manière significative dans la composition ionique. Par exemple, la composition proportionnelle finale d'une saumure hypersaline sera différente de celle de l'eau de mer après la précipitation séquentielle de la calcite ( $CaCO_3$ ), le gypse ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ), l'halite (NaCl), la sylvite (KCl) et enfin la carnallite pour produire du sel marin dans les marais solaires. Les saumures thalassohalines sont caractérisées par des valeurs de pH neutres ou légèrement alcalines (7–8). Les marais salants créés afin de produire du sel, les lacs hypersalés de l'Antarctique, la sebkha Gavish et le grand lac salé de l'Utah sont des exemples d'environnements thalassohalins (Gostincar et *al.*, 2011 ; Oren, 2006 ; Oren, 2016).

#### 2-2. Environnements athalassohalins

Contrairement à celle des environnements thalassohalins, la composition ionique d'un environnement athalassohalin peut différer considérablement.

Les environnements athalassohalins sont formés par la dissolution des dépôts salés fossiles. Ces eaux peuvent avoir des proportions en sels bien différentes de celles de l'eau de mer car leur composition est fortement influencée par le cadre géologique de la région et la nature des dépôts.

Certains systèmes athalassohalins, comme la Mer Morte, sont dominés par les ions  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ , et l'eau est légèrement acide ( $pH \sim 6$ ). D'autres lacs tels que le lac Mono (Californie, États-Unis), le lac Magadi (Kenya), les lacs du Wadi An Natrun en Égypte et d'autres lacs de soude en Afrique de l'Est et en Chine, sont très alcalins ( $pH$  de 9 à 11) avec des concentrations élevées de  $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$  et de très faibles concentrations de  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Oren, 2016).

### 2-3. Saumures océaniques profonde

Récemment, des suintements aquifères souterrains, des bassins de saumure en eau profonde et une ancienne saumure sous-glaciaire, ont été décrits comme de nouveaux habitats salins (Boetius et Joye, 2009).

En Antarctique, Les lacs salins sous-glaciaires et les lacs ou fossés de saumure superficielle sont courants (Green et Lyons, 2009; Thomas et Dieckmann, 2002). Au fond des Mers Noire, Rouge et Méditerranéenne et dans le golfe du Mexique, les fluides souterrains interagissent avec d'anciens dépôts de sel ce qui forme des saumures chaudes qui migrent à travers les sédiments et qui sont expulsées au fond de la mer ou s'accumulent dans des bassins de saumure formant des lacs de saumure et des bassins anoxiques (Joye et *al.*, 2009).

Les bassins anoxiques hypersalins de la Méditerranée orientale résultent de la dissolution de dépôts de sel du Miocène exposés à l'eau de mer après une activité tectonique (van der Wielen et *al.*, 2005).

### 3- Les chotts et sebkhas

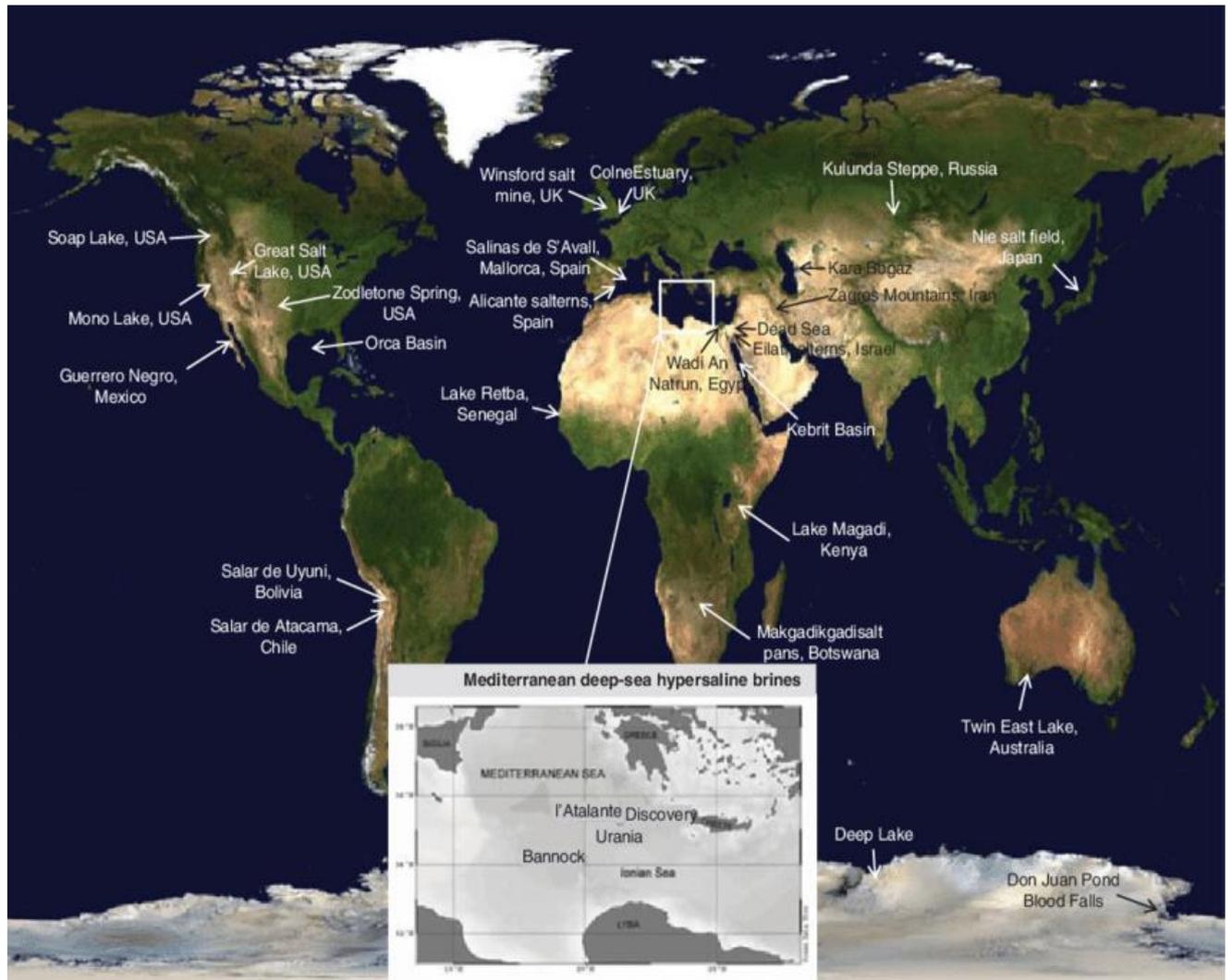
Chotts ou Sebkhas sont des vastes dépressions endoréiques d'Afrique du Nord. En générale, Les scientifiques s'accordent pour les considérer comme des dépressions fermées qui sont équivalent à des lacs salés. Cependant, la sebkha est définie comme une dépression fermée en forme de cuvette sans végétation à inondation temporaire dans laquelle se produit une accumulation de sel. Quant au terme de Chott, il représente seulement l'auréole plus ou moins large de steppe halophile qui entoure la sebkha (fig.1) (Dubost, 2002).



**Figure 1 : Sebka et/ou chott (absence de végétation au centre et une végétation halophile au périphérique)**

Les sebkhas ou lacs salés sont des zones humides qui se trouvent dans toutes les régions continentales, ils se limitent généralement dans les zones arides et semi-arides (fig.2) (Williams, 1998). Leur nomination diffère d'une région à autre, sebkha et garâa en Afrique du Nord, chott en pays désertique, kewir en Iran, playa au Mexique, salar ou salina dans les déserts sud-américains, takyr dans ceux de l'Asie centrale, Salt pans en Afrique du Sud, aux Etats-Unis et en Australie (Moussa, 2006 ; Demnati, 2013).

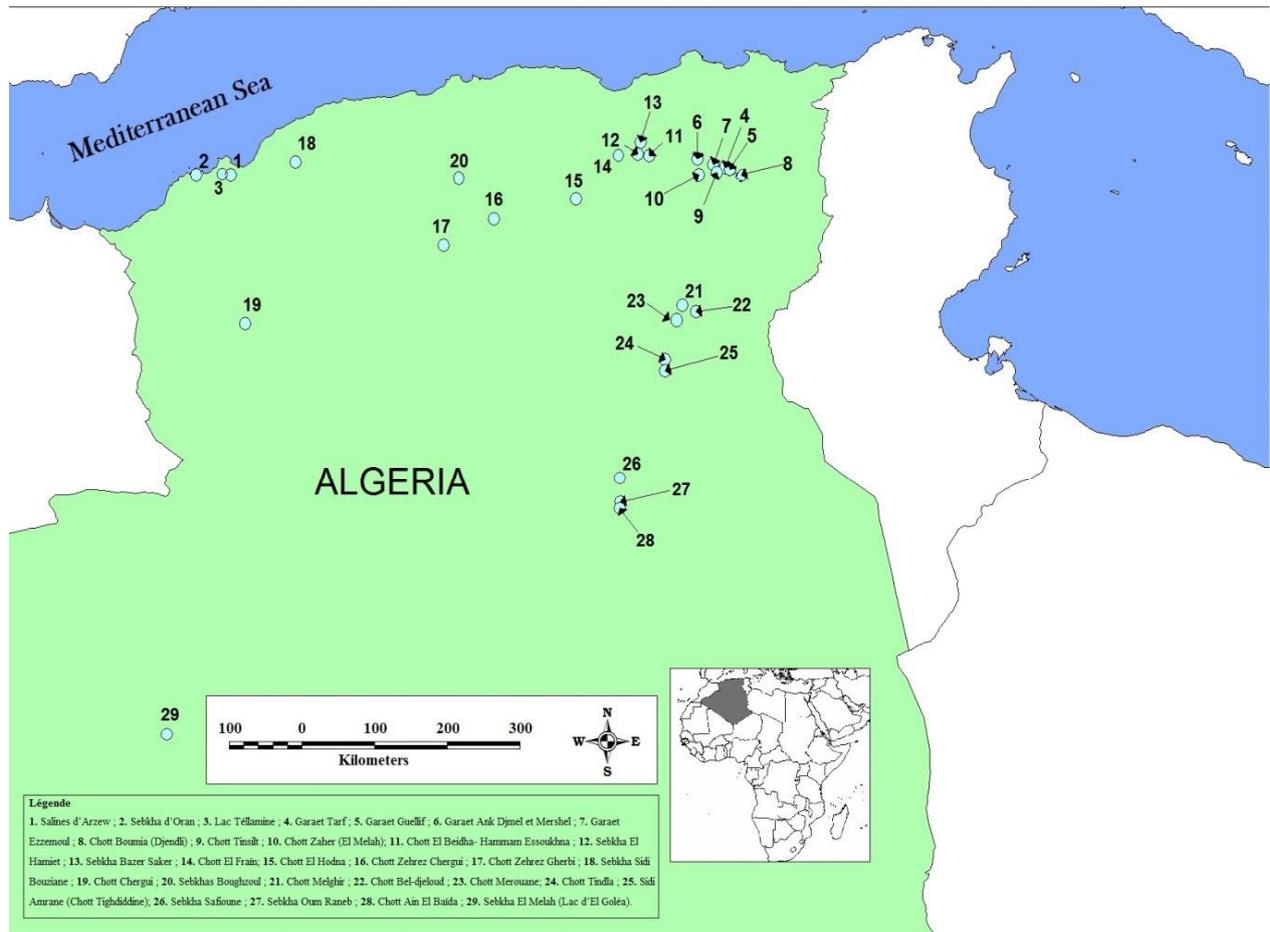
Ces zones humides incluent plusieurs grands lacs tel que la Mer Caspienne et la Mer Morte qui ne se dessèche jamais et autres lacs qui ne sont remplis d'eau qu'au cours de la saison pluvieuse tel que les chotts et sebkhas algériens (Aubert, 1976). Ces derniers sont périodiquement inondés et fonctionnent comme des bacs d'évaporation, qui après assèchement, laissent apparaître une couche de sel dont la concentration est maximale au centre et va en décroissant vers la périphérie (Boualla et *al.*, 2011).



**Figure 2 : Répartition des lacs hypersalins dans le monde (McGenity et Oren, 2012)**

L'Algérie regroupe un nombre important de chotts et sebkhas ; l'ensemble de ces sols hypersalins représentent 45,23% des zones humides algériennes protégées par la convention Ramsar couvrant environ une superficie de 2,07886 millions d'hectares (Koopmanschap et *al.*, 2011).

Les chotts et sebkhas s'étendent de la côte nord algérienne jusqu'au Sahara (fig.3) parmi les quelles on peut citer la sebkha d'Oran et les salines d'Arzew dans les plaines littorales, chott Chergui, sebkha de Naâma à l'ouest, le chott Hodna, le Zahres Chergui et Gherbi au centre, les chotts qui constituent le complexe de Oum El Bouaghi dans l'Est des hauts plateaux, chott Melghir et le chott Merouane au nord-est du Sahara, les chotts de Ain Beida, Oum Raneb, Sidi Amrane et Safioune dans la région de Ouargla et la sebkha El Melah dans la région de Ghardaïa (Samraoui et Samraoui, 2008 ; Demnati, 2013).



1. Salines d'Arzew, 2. Sebkhia d'Oran, 3. Lac Téllamine, 4. Garaet Tarf, 5. Garaet Guellif, 6. Garaet Ank Djmel et Mershel, 7. Garaet Ezzemoul, 8. Chott Boumia (Djendli), 9. Chott Tinsilt, 10. Chott Zaher (El Melah), 11. Chott El Hodna, 12. Chott El Fraïn, 13. Chott Zehrez Chergui, 14. Chott Zehrez Gherbi, 15. Sebkhia Bazer Saker, 16. Sebkhia El Hamiet, 17. Chott El Beidha - Hammam Essoukhna, 18. Sebkhia Sidi Bouziane, 19. Chott Chergui, 20. Sebkhias Boughzoul, 21. Chott Melghir, 22. Chott Merouane, 23. Chott Bel-djeloud, 24. Chott Tindla, 25. Sebkhia Safioune, 26. Sebkhia Oum Raneb, 27. Chott Ain El Baïda, 28. Sebkhia El Melah (Lac d'El Golea), 29. Sidi Amrane (Chott Tighdidine).

**Figure 3 : Répartition géographique des chotts et sebkhas en Algérie (Demnati, 2013)**

## 4- La grande sebkha d'Oran

### 4.1. Description et situation géographique

La grande sebkha d'Oran s'étend sur une superficie estimée à 1890 km<sup>2</sup>. Cette sebkha a été classée en 2002, par la convention de Ramsar, comme une zone humide d'importance mondiale. Elle est localisée au Sud Ouest du groupement urbain d'Oran. Cette superficie est comprise entre les longitudes 3°14' et 3°80' W et les latitudes 39°15' et 39°66'N (Boualla et *al.*, 2011).

C'est une dépression fermée limitée au Nord par le djebel Murdjadjo où plusieurs villes (Misserghin, BouTlélis et El Amria) sont implantées, au Sud par le massif des Tessala avec des villes comme Tamazougha et Arbal qui bordent la sebkha, à l'Est et à l'Ouest par des collines de faibles altitudes (fig.4). La sebkha est occupée temporairement par un lac salé dépourvue de végétation. Autour de la sebkha subsiste une végétation halophile et les terres avoisinant sont utilisées par l'agriculture (Boualla et *al.*, 2011 ; Moussa, 2006).

Depuis longtemps, la sebkha a retenu l'attention des chercheurs et plusieurs études physicochimiques, hydrologiques, géologiques et pédologiques ont été effectuées. Parmi ces études, on peut citer les travaux de Soletanche (1950), Sourisseau (1976), Hassani (1987), Benziane et *al.* (2012), Benziane (2013), Moussa (2006), Moussa et Saint Martin (2011), Boualla (2018).



Figure 4 : Situation géographique de la grande sebkha d'Oran (Boualla et *al.*, 2011)

#### 4.2. Le lac

C'est une dépression de forme elliptique d'une longueur de 40 km et largeur de 6 à 13 km. Ce lac qui s'étend sur une superficie de 300 km<sup>2</sup> a une teneur de la saumure estimée à plus de 100 g/l de sels dissous ce qui empêche toute forme de végétation. Le sol est de type alluvionnaire à texture argilo-sableuse. L'eau salée forme une pellicule de 10 à 30 cm qui varie en fonction de la pluviométrie. Cette pellicule s'assèche complètement durant l'été suite à une très forte évaporation et le sel cristallise en petits cristaux cubiques de couleur grise ou blanche (Benziane et *al.*, 2012 ; Bakkar et Ait Menguelet, 2001 ; Boualla et *al.*, 2011).

#### 4.3. La végétation halophyte entourant la sebkha

Les sols entourant le lac sont des sols sodiques salins de type sablo-argileux dominée par une végétation halophyte. Certains auteurs se sont intéressés à l'étude de la végétation halophytes des bassins fermés de l'Oranie et ils ont montré que cette flore est généralement composée des genres *Suaeda*, *Juncus*, *Atriplex*, *Salsola*, *Salicornia*, *Phragmites*, *Bromus*, *Limonium*, *Sphenopus*, *Plantago*, *Inula*, *Spergularia* et *Frankenia* (Simonneau, 1954 ; Dubuis et Simonneau, 1960 ; Bahi, 2012 ; Moussa et *al.*, 2014).

#### 4.4. Les sols agricoles

On distingue deux types de sols agricoles, les sols fersiallitiques qui sont des sols moyennement profonds, argileux, rouges qui sont considérés comme des terres de mauvaise qualité agrologique, et les sols alluviaux de bonne qualité agrologique, plus profonds, naturellement fertile, avec des propriétés chimiques favorables utilisés pour la culture des vignes, céréales, agrumes et arbres fruitiers (Boughalem et *al.*, 2016)

L'irrigation de la plupart des exploitations agricoles localisées sur le pourtour du lac salé est assurée principalement par le pompage des eaux souterraines qui présentent, de façon générale, une forte salinité avec une qualité mauvaise ; ces eaux ne convenant normalement pas à l'usage agricole. Les sols les plus affectés par la salinité sont localisés essentiellement dans la zone septentrionale du bassin, le long du couloir Misserghin-BouTlèlis (Boualla, 2018).

## II- Les champignons halophiles

### 1- Le Règne des fungi

#### 1.1. Généralité sur les champignons

Le règne des champignons englobe une énorme diversité de taxons avec des morphologies, des écologies et des cycles de vie très variés. Plusieurs études menées sur la diversité fongique ont estimé le nombre d'espèces entre 1,5 et 5,1 millions d'espèces avec la description de 5 à 6% d'entre eux seulement. Avec le développement de la phylogénie moléculaire, ce nombre a considérablement augmenté pour atteindre 12 millions d'unités taxonomiques fongiques (Blackwell, 2011 ; Wu et *al.*, 2019).

Les champignons étaient considérés comme des plantes dépourvues de chlorophylle. Ils ont acquis le statut de *Règne* à part au sein du vivant après la division des êtres vivants en cinq règnes : Animal, Champignon, Végétal, Protistes, et Monères (les Procaryotes) (Whittaker, 1969). Les termes Fungi ou Mycota sont utilisés pour désigner l'ensemble des vrais champignons ou Eumycota.

Quatre phylums majeurs ont été définis au sein des vrais champignons en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et reproductives: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Basidiomycota. Une taxonomie plus récente divise le règne des champignons en sept phylums : Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota et Basidiomycota et quatre subphylums : Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Zoopagomycotina et Kickxellomycotina (fig.5). Ensemble, ces lignées forment un clade monophylétique, Eumycota, qui est sœur d'un groupe de protozoaires amiboïdes (fig.6) (Hibbett et *al.*, 2007 ; Kwon-Chung, 2012).

Les champignons qui ont longtemps été considéré comme des plantes ont une origine commune avec des animaux. Cette origine a été confirmée par des études phylogénétiques des séquences nucléotidiques de plusieurs gènes conservés, tels que la petite sous-unité (SSU) 18S et la grande sous-unité (LSU) 26S de l'ADN ribosomal (ADNr), le facteur d'élongation, la tubuline et l'actine mais pas par les séquences du gène de l'ARN polymérase II (Mitchell, 2005).

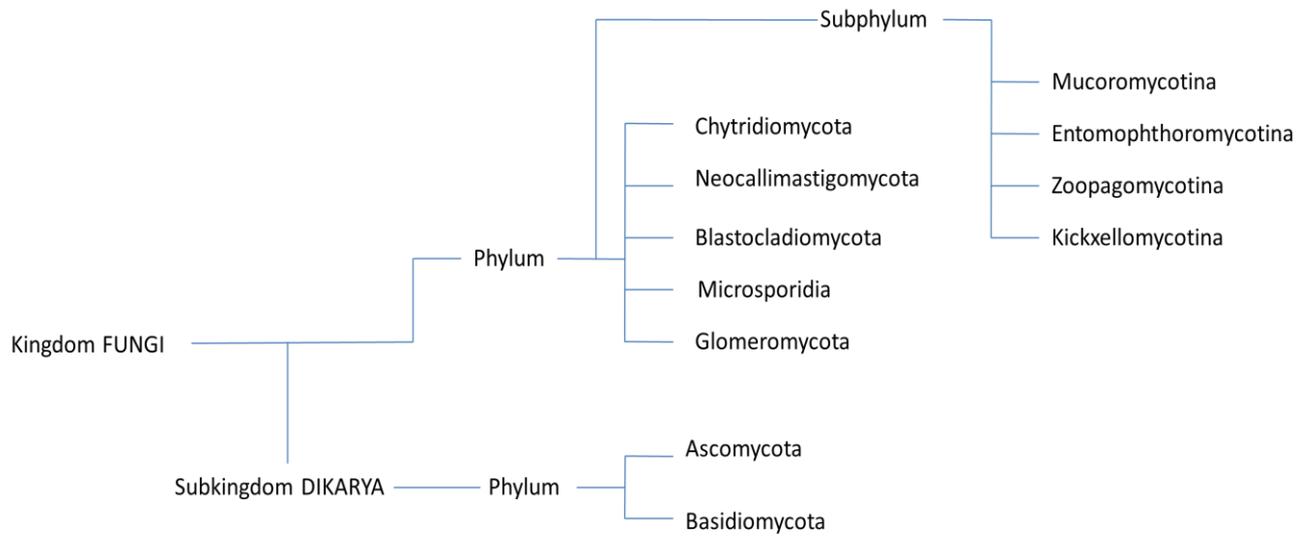


Figure 5 : Classification simplifiée du règne des champignons (Hibbett et al., 2007)

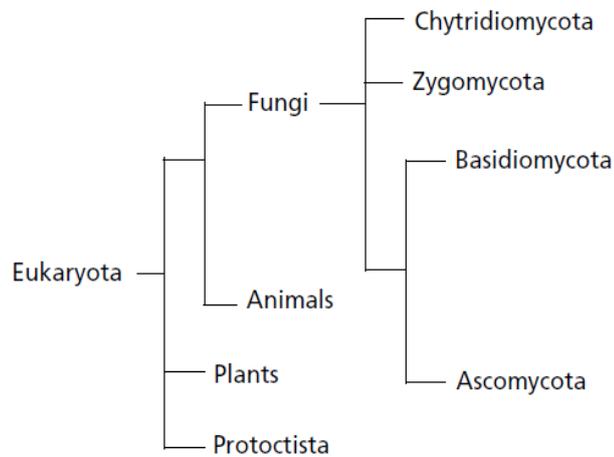


Figure 6 : l'origine phylogénétique commune entre le règne des champignons et des animaux

## **1.2 Techniques d'identification des champignons**

### **1.2.1 Identification phénotypique**

L'identification d'une espèce fongique a longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturels, physiologiques et morphologiques (tableau 1). Les critères morphologiques sont constitués des paramètres macroscopiques comme l'aspect et la couleur des colonies et de leur revers et microscopique des caractères morphologiques du thalle et des organes de reproduction sexuée et asexuée (Mitchell, 2005).

L'identification des isolats fongiques au niveau de l'espèce par les méthodes phénotypiques traditionnelles nécessite de l'expérience et est souvent longue et laborieuse et est entravée par la nature instable des caractéristiques phénotypiques, qui sont facilement influencées par les conditions de culture. En plus, une limitation claire des approches phénotypiques est qu'elles ne peuvent pas être appliquées à des champignons qui ne se développent pas en culture. Par conséquent, il existe de nombreux champignons qui ne seront pas classés tant que les taxonomistes s'appuient uniquement sur des caractéristiques phénotypiques. Un autre problème notable de classification basée sur des critères morphologiques est le double système de classification, sans corrélation cohérente entre les taxonomies des formes anamorphes et teleomorphes (Katoch et Kapoor, 2014).

Le caractère morphologique a également un rôle adaptatif et résulte parfois plus de la stratégie écologique que de l'origine évolutive des organismes ce qui risque de réunir des organismes partageant surtout les mêmes contraintes écologiques. Donc, les caractères morphologiques convergents rapprochent parfois des organismes différents, tandis qu'ils séparent des espèces proches (Selosse et Durrieu, 2004).

**Tableau 1: Approches phénotypiques générales pour identifier et caractériser les champignons (Mitchell, 2005).**

Caractères phénotypiques	Observation
Morphologie	Téléomorphe: reproduction sexuelle (zygospore, ascocarpe, basidiocarpe) Anamorphe: morphologie des mitospores (sporangies, conidiogénèse) Levure végétative ou morphologie hyphale (cloisonnée, dématiaccée) Texture de la colonie, pigment, taille Type de pore septal Dimorphisme
Macromolécules structurales	Polysaccharides de la paroi cellulaire (chitine, glucanes, mannanes) Unités d'isoprène Coenzyme Q Isozymes Antigènes
Métabolisme	Assimilation de composés particuliers en tant que sources uniques d'azote ou de carbone Fermentation de divers composés carbonés Voies métaboliques Besoins en vitamines (biotine, thiamine) Production d'enzymes (protéases, phospholipases, uréase, catalase, etc.) Métabolites secondaires (mycotoxines)
Paramètres de croissance	Gamme optimale et tolérable de température, pH, concentration de sels, besoins en oxygène, etc.
Sensibilité aux inhibiteurs	Composés inorganiques (sels de chlore) Fongicides, détergents, composés organiques (canavanine, benomyl, etc.) Médicaments (antibiotiques antifongiques, cycloheximide) Killer yeasts
Pathogénicité	Gamme d'hôtes Facteurs de virulence (adhésines, enzymes sécrétoires, etc.)

### 1.2.2 Identification moléculaire

Les méthodes moléculaires qui regroupent les êtres vivants sur la base d'homologies de leur ADN sont beaucoup plus rapides, plus spécifiques et plus précises pouvant distinguer des espèces étroitement apparentés. Cette identification moléculaire a été appliquée pour déterminer les espèces fongiques depuis les années 1990. Toutefois, à cause de la complexité du règne fongique, l'identification moléculaire ne peut pas remplacer complètement l'examen morphologique même si ce dernier présente de nombreuses variantes, il reste toujours nécessaire pour une identification correcte et fiable (White et *al.*, 1990 ; Bruns et *al.*, 1991 ; Katoch et Kapoor, 2014).

En 2003, l'approche du «code à barres ADN» (*DNA barcoding*) basée sur le séquençage de fragments génomiques standardisés a ensuite été proposé en tant que technique moléculaire pour l'identification des espèces qui utilise une région d'ADN standard, courte, variable et spécifique à un groupe taxonomique. Cette région d'ADN est appelé marqueur génétique (Hebert et *al.*, 2003 ; Hollingsworth, 2007).

Le choix d'un marqueur ou du code-barres dépend essentiellement du taux d'évolution, de la longueur de la séquence, des régions flanquantes conservées et de pouvoir discriminer les espèces étroitement apparentées (Yang et Rannala, 2012 ; Tekpinar et Kalmer, 2019). Le marqueur génétique idéal doit être d'une longueur moyenne (de 500 à 800 pb) nécessitant une seule amplification, avec une différence interspécifique qui dépasse la distance intraspécifique car, l'identification se fait lorsqu'une séquence est constante au sein d'une même espèce et ne se produit nulle part ailleurs, et sont délimités par des régions conservées pour attribuer des amorces universelles (Hebert et *al.*, 2003 ; Stielow et *al.*, 2015).

De nombreuses régions d'ADN, telles que les régions d'ADNr et certains gènes exprimant des protéines, peuvent être utilisées comme des marqueur génétique pour l'identification des champignons (White et *al.*, 1990; Hibbet et *al.*, 2007; Schoch et *al.*, 2012). Schoch et *al.* (2012) ont trouvé que la région ITS (*Internal Transcribed Spacer*) était parmi les marqueurs avec la plus forte probabilité d'identifications correctes pour un très large groupe de champignons. L'ITS est une région de l'ADN ribosomique comprenant les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 relativement variables et la petite sous unité ribosomale 5,8 S peu variable. Le choix de cette région comme un marqueur moléculaire principal a été basé sur la présence de cette région en plusieurs copies dans le génome facilitant ainsi son amplification, l'utilisation des amorces universelles et la disponibilité des séquences dans les bases de données en raison du fait que la plupart des espèces de champignons ont été déterminées sur la base de la séquence d'ADN de la région ITS (Schoch et *al.*, 2012 ; Rossman, 2007).

Cependant, une étude approfondie des séquences d'ITS a révélé que cette région n'est pas suffisamment variable dans tous les groupes de champignons (Nilsson et al., 2008). Pour certains genres d'Ascomycota, dont *Alternaria* (Pryor et Michailides, 2002), *Aspergillus* et *Penicillium* (Skouboe et al., 1999), *Cladosporium* (Schubert et al., 2007), *Trichoderma* (Raja et al., 2017) et *Fusarium* (O'Donnell et Cigelnik, 1997), l'ITS n'était pas discriminant.

Schoch et al. (2012) ont estimé que seulement environ 50% des séquences d'ITS déposées dans les bases de données sont annotées au niveau de l'espèce. De plus, Nilsson et al. (2006) ont estimé que plus de 10% des séquences d'ITS de champignons fongiques entièrement identifiées sont incorrectement annotées au niveau de l'espèce.

D'autres marqueurs génétiques secondaires ont été utilisés pour identifier les champignons jusqu'à l'espèce. Parmi ces marqueurs, les gènes codant pour la grande sous-unité ribosomale (LSU; ARNr 28S) et la petite sous-unité (SSU, ARNr 18S), la plus grande sous-unité d'ARN polymérase II (RPB1), la deuxième plus grande sous-unité d'ARN polymérase II (RPB2), la  $\beta$ -tubuline, le facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  ( $\alpha$ -TEF1) et la calmoduline (CaM) sont les plus utilisés seul ou avec différentes combinaisons pour déterminer les espèces et les relations phylogénétiques (Tekpinar et Kalmer, 2019).

- **ITS, LSU, SSU**

Les séquences d'ADN fongique de la grande sous-unité (LSU-26S ou 28S), la petite sous-unité (SSU-18S) et toute la région d'espacement interne transcrite (ITS1, 5.8S, ITS2) sont générées en utilisant les amorces décrites par White et al. (1990). Ces trois régions possèdent différents taux d'évolution. Le SSU est caractérisé par un taux d'évolution le plus lent possédant ainsi la plus faible variation parmi les taxons, tandis que l'ITS évolue le plus rapidement et présente la variation la plus élevée (Bruns et al., 1991 ; Mitchell et Zuccaro, 2006).

Le SSU peut être amplifié et séquencé en utilisant les amorces NS1 et NS4 pour identifier un champignon à des niveaux taxonomiques supérieurs (famille, ordre, classe et phyla) alors que la région LSU, qui contient les domaines hypervariables D1 et D2 peut être amplifié et séquencer en utilisant les amorces LROR et LR6 si l'identification doit être faite aux niveaux taxonomiques intermédiaires (famille, genres). Pour l'identification au niveau des espèces, l'ITS est le plus utile, car il s'agit de la partie à évolution la plus rapide (Raja et al., 2017).

- **RPB1 et RPB2**

Plusieurs études ont utilisé les régions RPB1 et RPB2 seules, ensemble ou combinées avec d'autres régions pour des études phylogénétiques de différents genres fongiques (O'Donnell et al., 2013 ; Matheny, 2005 ; Liu et al., 2006 ; Lombard et al., 2015 ; Zhu et al., 2019). Ces gènes codent pour la plus grande sous-unité et la deuxième plus grande sous-unité d'ARN polymérase II. Puisque ces gènes ont un rôle fonctionnel qui est essentiel, transcrivant tous les gènes codant pour l'ARNm, leur évolution est très contrainte et lente (Liu et al., 2006).

La partie initiale des gènes RPB1 et la région variable entre les domaines conservés 6 et 7 des gènes RPB2 sont phylogénétiquement utiles pour étudier les champignons à des niveaux taxonomiques inférieurs. Malgré que ces marqueurs protéiques ont un pouvoir de résolution élevé des espèces, les échecs de PCR, de séquençage, d'alignement et l'indisponibilité des séquences dans les bases de données limitent leur potentiel en tant que codes-barres universels (Visagie et al., 2014 ; Tekpinar et Kalmer, 2019)

- **La  $\beta$ -tubuline**

La  $\beta$ -tubuline est abondante dans les cellules eucaryotes et est le principal constituant des microtubules qui jouent un rôle crucial dans les processus cellulaires eucaryotes (Einax et Voigt, 2003). La séquence du gène de la  $\beta$ -tubuline contient 3,5 fois plus d'informations phylogénétiques que le gène SSU, en plus, la présence de nombreux représentants des séquences de  $\beta$ -tubuline pour Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota et Zygomycota dans les bases de données rend ce gène idéal pour les analyses phylogénétiques et résoudre les phylogénies de groupes d'espèces complexes (O'Donnell et al., 1998 ; Tekpinar et Kalmer, 2019).

En raison des limites de la région ITS en tant que code à barres, le gène de la  $\beta$ -tubuline a été recommandé comme code à barres secondaire pour l'identification des espèces de certains genres fongiques tels que *Penicillium* (Houbraken et al., 2012 ; Visagie et al., 2014 ; Visagie et al., 2016) et *Aspergillus* (Geiser et al., 2007).

- **$\alpha$ -TEF1**

Le facteur d'élongation de traduction  $\alpha$ -TEF1 est une protéine responsable de la réaction de liaison de l'aminoacyl-ARNt (AA-ARNt) aux ribosomes (Triana-Alonso et al., 1995). Le gène  $\alpha$ -TEF1 est recommandé comme marqueur utile pour l'identification de certains groupes d'Ascomycota tels que le *Fusarium* (Hibbett et al., 2017). De nombreuses souches appartenant aux espèces du complexe *Fusarium* ont été analysées phylogénétiquement sur la base de séquences TEF-1 $\alpha$  et les arbres phylogénétiques ont distingué des espèces étroitement apparentées (Geiser et al., 2004 ; Ramdial et al., 2016).

Le gène présente plusieurs avantages tels que la présence en tant que copie unique dans le génome avec un haut niveau de polymorphisme de séquence parmi les espèces apparentées et un alignement des séquences facile (Tekpinar et Kalmer, 2019)

- **Calmoduline**

La calmoduline est l'une des protéines les plus conservées connues à ce jour et est généralement représentée génétiquement par un seul gène. Cette protéine est un polypeptide monomère acide présent dans les cellules eucaryotes et appartient à une grande famille de protéines de liaison au calcium (Kretsinger, 1980 ; Barbato et al., 1992). Le gène de la calmoduline a été utilisé comme marqueur moléculaire secondaire pour identifier les espèces du genre *Penicillium* (Wang et Zhuang 2007). De plus, Samson et al. (2014) ont

proposé la calmoduline comme meilleur marqueur d'identification secondaire pour les espèces d'*Aspergillus* en combinaison avec d'autres marqueurs comme l'ITS,  $\beta$ tub et RPB2.

## 2- Définition de l'halophilie chez les champignons

En Mycologie, les champignons ont été considéré comme xérophiles ou osmophiles s'ils se développaient bien sur des substrats avec une activité d'eau  $a_w$  de 0,85, ce qui correspond à 17% de NaCl ou 50% de glucose dans leur milieu de croissance (Gunde-Cimerman et *al.*, 2005). Cependant, ces champignons ne peuvent pas seulement se développer à faible activité d'eau; certains montrent également des préférences pour la nature chimique des solutés qui abaissent l' $a_w$ . Par conséquent, les champignons osmotolérants / osmophiles peuvent vivre dans des environnements riches en sucre, tandis que ceux qui sont halotolérants / halophiles peuvent vivre dans des environnements riches en sel (Gunde-Cimerman et Plemenitas, 2006).

Lorsque les champignons ont été isolés des milieux hypersalins, ils étaient considérés comme halophiles s'ils étaient régulièrement isolés de l'eau à 17–32% NaCl, et s'ils pouvaient croître in vitro sur milieu de culture à 17% NaCl (Gunde-Cimerman et *al.*, 2000). Ces champignons halophiles ne nécessitaient pas de sel pour leur viabilité, car ils pouvaient se développer et s'adapter à toute la gamme de salinité, de l'eau douce jusqu'aux solutions presque saturées de NaCl. Plus tard, quelques espèces fongiques qui nécessitaient du NaCl pour leur croissance ont été signalées pour la première fois (Zalar et *al.*, 2005) d'où le terme de champignons halophiles devait être révisé.

Ainsi, les halotolérants et les halotolérants extrêmes sont maintenant les termes utilisés pour décrire les champignons qui peuvent se développer dans une gamme de concentrations de sel différentes, de l'eau douce à la saturation en NaCl et le terme halophile reste réservé à ceux qui ont besoin de sel pour leur croissance (Gunde-Cimerman et Plemenitas, 2006 ; Zajc et *al.*, 2012).

Les champignons halotolérant et halophiles sont aussi classés selon le degré de leurs besoins en sel en halophiles légers se développant de manière optimale à 0,2–0,85 M (1–5%) NaCl; halophiles modérés à 0,85–3,4 M (5–20%) NaCl et halophiles extrêmes à 3,4–5,1 M (20–30%) NaCl (DasSarma et DasSarma, 2012).

## 3- Diversité fongique des milieux hypersalins

Les environnements hypersalins sont peuplés d'une importante communauté microbienne qui appartient au trois domaine de la vie : Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren, 2002). Les environnements extrêmes, y compris les environnements hypersalins, ont longtemps été considérés comme étant peuplés presque exclusivement par des archées, des bactéries et l'algue *Dunaliella salina* (Rodriguez-Valera et *al.*, 1981; Oren, 2002; Oren 2005).

Avant le début des études sur les champignons dans les environnements hypersalins naturels, les représentants de ces groupes étaient décrits presque exclusivement comme des contaminants des aliments conservés en utilisant de fortes concentrations de sel ou de

sucré, avec une niche écologique primaire inconnue (Gunde-Cimerman et Zalar, 2014). Il a été supposé que ces champignons reflètent un phénotype xérophile général et qu'ils ne peupleraient donc pas les environnements hypersalins naturels. En 2000, les premiers rapports sont apparus montrant que les champignons sont des habitants actifs des milieux hypersalins et qu'ils sont reconnus comme faisant partie intégrante des communautés microbiennes indigènes (Gunde-Cimerman et *al.*, 2000).

La mycoflore des environnements hypersalins est considéré comme une biodiversité fongique importante de groupes de champignons halophiles et halotolérants phylogénétiquement indépendants avec une composition d'espèces cohérente et stable quelle que soit la localité géographique (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

En général, la mycoflore des milieux hypersalins autour du monde comprend :

### 3.1. Levures noires

Les champignons les plus dominants des milieux hypersalins sont les levures noires de la division Ascomycota. Ces champignons mélanisés polymorphes capables de développer une croissance semblable à une levure, filamenteuse ou méristématique, ont été détectés dans différents environnements extrêmes, tels que sur des surfaces rocheuses dans des déserts arides, semi-arides, chauds et froids qui étaient auparavant considérés comme dépourvus d'extrémophiles eucaryotes (Sterflinger et *al.*, 1999; Zajc et *al.*, 2012).

Les espèces halophiles et halotolérantes dominantes de levures noires sont représentées par *Hortaea werneckii* (Zalar et *al.*, 1999a) et *Phaeotheca triangularis* (Zalar et *al.*, 1999a; b) qui appartiennent à l'ordre des Capnodiales, *Aureobasidium pullulans* (Zalar et *al.*, 1999a) de l'ordre Dothideales, et *Trimmatostroma salinum* de l'ordre Helotiales (Zalar et *al.*, 1999c). À l'heure actuelle, *H. werneckii* est l'organisme eucaryote le plus étudié au niveau de sa réponse moléculaire à des concentrations élevées de NaCl (Plemenitas et *al.*, 2008)

### 3.2. *Aspergillus*, *Penicillium* et leurs formes téléomorphes

L'isolement et l'identification de 60 espèces différentes d'*Aspergillus* et de *Penicillium* confirment la diversité de ces deux genres dans les milieux hypersalins autour du monde. Les espèces les plus fréquemment isolées sont *Aspergillus niger*, *Aspergillus amstelodami* et *Penicillium chrysogenum* (Butinar et *al.*, 2011).

Dans une étude sur la diversité fongique de différents milieux hypersalins d'Europe, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Nord, six espèces différentes de la forme téléomorphe d'*Aspergillus* (*Eurotium*) ont été identifiées : *E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. rubrum*, *E. repens* et *E. halotolerans* avec prédominance de l'espèce *E. amstelodami* (Zajc et *al.*, 2012).

Les espèces du genre *Emericella* ont souvent été isolées de substrats secs dans des régions chaudes et arides du monde entier. Celles-ci semblent bien adaptées aux climats secs et chauds (Samson et Mouchacca, 1974) et à faible  $a_w$  (Zalar et *al.*, 2008).

*Aspergillus niger* et *A. caesiellus* font partie de la communauté fongique stable dans les eaux hypersalines naturelles, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. roseoglobulosus* et *A. tubingensis* sont principalement présents dans les environnements hypersalins où la température est élevée, tandis que *A. versicolor* et *A. sydowii* sont présents dans les environnements marins. *A. melleus*, *A. sclerotiorum* ne sont apparus que localement (Butinar et al., 2011).

Quelques espèces de *Penicillium* ont été aussi reconnues comme faisant partie des communautés fongiques indigènes des milieux hypersalins. En plus de *P. chrysogenum*, les espèces *P. citrinum*, *P. oxalicum* et *P. steckii* sont aussi régulièrement isolés des milieux hypersalins. Bien que *P. sizovae* et *P. westlingii* sont également fréquents, leur dénombrement diminue avec l'augmentation de la salinité et ils sont donc considérés comme des habitants temporels (Butinar et al., 2011).

### 3.3. Le genre *Cladosporium*

Le genre *Cladosporium* représente un groupe important de champignons extrémophiles au sein des Capnodiales. Ces dernières années, le genre a reçu beaucoup d'attention et de nombreuses nouvelles espèces ont été décrites. Certaines de ces nouvelles espèces ont été régulièrement isolées des milieux hypersalins du monde entier, où elles représentent les taxons fongiques les plus communs et les plus fréquents (Zajc et al., 2012 ; Gunde-Cimerman et Zalar, 2014).

Dans les eaux hypersalines, les espèces de *Cladosporium* sont les plus abondantes des champignons mélanisés et les plus fréquemment trouvées dans les environnements hypersalins tels que les marais salants solaires de Secovlje, Cabo Rojo et Porto Rico (Gunde-Cimerman et al., 2000; Butinar et al., 2005b, Cantrell et al., 2006)

Dans une étude écologique et phylogénétique des isolats provenant des eaux hypersalines des marais salants méditerranéens, de différentes zones côtières le long de l'océan Atlantique et de la Mer Rouge, de la Mer Morte et du lac salé Enriquillo (République dominicaine), sept espèces du genre *Cladosporium* ont été nouvellement décrites: *C. halotolerans*, *C. dominicanum*, *C. velox*, *C. psychrotolerans*, *C. spinulosum*, *C. salinae*, et *C. fusiforme*. La concentration maximale de NaCl pour le développement de colonies de ces différents représentants de *Cladosporium* halotolérants est de 17 à 20% (Zalar et al., 2007).

### 3.4. Levures non mélanisées

Bien que les levures dominantes en milieux hypersalins soient mélanisées, des levures non mélanisées ont également été isolées dans les marais salants et les lacs hypersalins du monde entier (Gunde-Cimerman et Zalar, 2014).

Jusqu'au 2005, rien ne prouvait que les milieux hypersalins naturelles contiennent une population de levures non mélanisées. Ensuite, quelques rapports sur l'existence de ces levures halotolérantes sont apparus dans la littérature et leur diversité a été signalée dans plusieurs environnements hypersalins dans le monde. Parmi les espèces obtenus de ces environnements : *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *M.*

*bicuspidata*, *Candida parapsilosis*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *Rhodosporidium babjevae*, et *Trichosporon mucoides* (Butinar et al., 2005a ; Zajc et al., 2012).

Contrairement aux levures mélanisées qui apparaissent en plus grand nombre lors de la cristallisation dans les marais salants solaires (Gunde-Cimerman et al., 2000; Butinar et al., 2005b), les levures non mélanisées ont été isolées principalement en dehors de la saison de production de sel ou dans les eaux avec des concentrations de NaCl inférieures à 20%. Ces levures ont été principalement isolées sur milieu à 10% de NaCl, et dans une moindre mesure sur des milieux avec 17–25% de NaCl (Butinar et al., 2005a).

### 3.5. Le genre *Wallemia*

Les champignons du genre *Wallemia* représentent l'un des taxons fongiques les plus xérophiles. Ces champignons d'origine alimentaire et aérienne ont également été isolés du sel marin et l'eau hypersaline (Zalar et al., 2005 ; Butinar et al., 2011).

Ce genre ne contenait que l'espèce *Wallemia sebi*. Cependant, sur la base d'analyses taxonomiques d'isolats provenant d'aliments sucrés, salés et séchés (Samson et al., 2004) et de marais salants et de lacs salés (Zalar et al., 2005), trois espèces ont été décrites: *W. sebi*, *W. muriae* et *W. ichthyophaga*. Les deux derniers nécessitent des solutés supplémentaires dans leurs milieux de croissance, comme le NaCl ou le sucre (Zalar et al., 2005).

Récemment, Jančič et al. (2015) ont montré que l'espèce *W. sebi* présente un complexe de quatre espèces: *W. sebi sensu-stricto*, *W. mellicola*, *W. canadensis* et *W. tropicalis*. En 2016, une nouvelle espèce *W. hederiae*, une sœur phylogénétique de *W. ichthyophaga*, a été décrite (Jančič et al., 2016a) et en 2017, une autre nouvelle espèce a été décrite: *W. peruviensis* qui est étroitement apparentée à *W. hederiae* (Díaz-Valderrama et al., 2017).

*Wallemia ichthyophaga* est actuellement le champignon le plus halophile connu à ce jour. Il montre une préférence pour les milieux supplémentés en sel par rapport aux milieux à forte concentration de glucose et ne croît qu'entre 10% de NaCl et la saturation (32% NaCl) (Gunde-Cimerman et Zalar, 2014).

Une telle halophilie obligatoire est courante dans les archées, mais unique dans les champignons. *Wallemia ichthyophaga* diffère des autres espèces de *Wallemia* par sa capacité à former des amas méristématiques multicellulaires de type sclérote, ressemblant à ceux observés dans les levures noires phylogénétiquement éloignées (Gunde-Cimerman et Zalar, 2014).

## 4- Adaptation des champignons au sel

Les halophiles ont adapté différentes stratégies pour faire face aux problèmes de toxicité ionique et de perte d'eau (fig.7). Les mécanismes de tolérance au sel chez les champignons ont été principalement étudiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann 2002). Cependant, cette levure n'est pas adaptée aux conditions hypersalines; la levure halotolérante *Debaryomyces hansenii*, la levure noire extrêmement halotolérante *Hortaea werneckii* et le véritable représentant halophile connu jusqu'à présent *Wallemia*

*ichthyophaga* sont des organismes modèles plus appropriés pour l'étude de l'halotolérance chez les eucaryotes que *S. cerevisiae* (Gunde-Cimerman et al., 2009). Ceux-ci peuvent croître respectivement à des concentrations de NaCl de 3,0 M (Prista et al., 2005), 5,0 M (Plemenitas et al., 2008) et à la saturation (5,2 M) (Zalar et al., 2005) et ils ont été isolés globalement des environnements naturels hypersalins.

#### 4.1. Stratégie de solutés compatibles

Les microorganismes exposés à une forte concentration saline doivent affronter deux stimuli environnementaux: le stress osmotique et le stress ionique. La plupart des microorganismes procaryotes et eucaryotes utilisent la stratégie d'accumulation de «solutés compatibles» pour maintenir leurs concentrations intracellulaires de Na<sup>+</sup> en dessous des niveaux toxiques pour les cellules (Gunde-Cimerman et al., 2009).

Le stress hyperosmotique déclenche, chez les organismes non halophiles, un afflux d'eau de la cellule qui entraîne une réduction de la pression de turgescence et une déshydratation du cytoplasme, augmentant ainsi la concentration de soluté dans le cytosol. D'autre part, le stress ionique fait entrer des ions (par exemple Na<sup>+</sup>) dans le cytoplasme, entraînant une augmentation supplémentaire de la concentration ionique et des dommages ultérieurs des systèmes membranaires et des protéines cellulaires.

Les microorganismes adaptés à la vie à une salinité élevée accumulent des solutés compatibles qui n'interfèrent pas avec les fonctions vitales de leurs protéines cellulaires pour contrer les changements de pression turgescence et maintenir une concentration intracellulaire de Na<sup>+</sup> en dessous des niveaux toxiques (Kogej et al., 2007). Les solutés compatibles, tels que l'ectoïne, la glycine bêtaïne, le glutamate et la proline sont accumulés par la plupart des bactéries halophiles, tandis que l'accumulation de glycérol est bien connue chez l'algue *Dunaliella salina* et chez la plupart des champignons (Blomberg et Adler, 1992 ; Burg et al., 2007).

Le glycérol en combinaison avec le tréhalose et d'autres polyols peut maintenir une pression de turgescence positive à haute salinité chez les espèces de levures modérément tolérantes au sel, comme *Debaryomyces hansenii*, *Candida versatilis*, *Rhodotorula mucilaginosa* ou *Pichia guilliermondii* (Almagro et al., 2000). Chez la levure noire *H. werneckii*, le glycérol, à faible concentration saline, peut être en combinaison avec la mycosporine-glutaminol-glucoside. Cette mycosporine était principalement connue comme étant impliquée dans la sporulation fongique et la protection contre les UV. À des salinités plus élevées, le glycérol peut être en combinaison avec d'autres polyols, tels que l'érythritol, l'arabitol et le mannitol (Kogej et al., 2006). Chez l'halophile obligatoire *W. ichthyophaga*, le glycérol est en combinaison avec de petites quantités d'arabitol et seulement des traces de mannitol (Zajc et al., 2013a).

## 4.2. Homéostasie ionique

La plupart des champignons utilisent des P-ATPases de type ENA comme un des mécanismes d'exportation de  $K^+$  et/ou  $Na^+$ , en particulier lorsqu'ils sont exposés à une concentration accrue de sodium et à un pH élevé. Dans un environnement hypersalin, de nombreux organismes excluent les ions  $Na^+$  du cytoplasme en raison des effets potentiellement toxiques, tandis que d'autres accumulent des concentrations relativement élevées de cet ion (Watanabe et al., 1999).

Des études sur *H. werneckii* et *W. ichthyophaga* ont montré que contrairement à la levure *D. hansenii*, qui accumule des quantités élevées de  $Na^+$ , ces deux champignons maintiennent de très faibles niveaux intracellulaires de  $K^+$  et de  $Na^+$  même lorsqu'ils sont cultivés en présence de 4,5 M de NaCl. Ainsi, en réponse à une concentration élevée en NaCl, *H. werneckii* peut efficacement extruder et empêcher l'afflux d'ions  $Na^+$ . Chez cette levure, deux P-ATPases de type ENA sensibles au sel, HwENA1 et HwENA2, ont été identifiées. L'expression des deux gènes HwENA a été fortement induite dans un environnement hypersalin (25% NaCl), alors qu'elle était relativement faible jusqu'à 17% de NaCl (Gorjan et Plemenitas, 2006).

En revanche, *Wallemia ichthyophaga* n'a pas la plupart des transporteurs de cations, présents dans le génome de *H. werneckii*, par conséquent, sa stratégie principale semble être la prévention de l'entrée d'ions, en raison de parois cellulaires extrêmement épaissies (Lenassi et al., 2013 ; Zajc et al., 2013a). Ces résultats indiquent l'évolution indépendante des mécanismes d'homéostasie ionique de ces champignons (Gunde-Cimerman et al., 2009).

## 4.3. Fluidité de la membrane plasmique

L'hyper-accumulation intracellulaire de glycérol comme principal soluté compatible à des concentrations élevées de NaCl est une réponse physiologique importante de plusieurs champignons. Cependant, le glycérol a une perméabilité élevée à travers les bicouches lipidiques d'où l'importance de la composition lipidique de la membrane plasmique dans la rétention du glycérol et la survie en milieu hypersalin (Oren, 1999).

En utilisant le glycérol comme soluté compatible, les cellules doivent l'accumuler à l'aide de systèmes de transport actif ou en modifiant les propriétés de leur membrane cellulaire, en augmentant la teneur en stérols ou en réduisant la fluidité de la membrane pour lutter contre la perte de glycérol qui en résulte (Oren, 1999).

*Hortaea werneckii* peut croître à des salinités très élevées, qui nécessitent de grandes quantités de glycérol intracellulaire, tout en conservant une membrane très fluide et une teneur en stérols constante. Au lieu de modifier ses propriétés membranaires, *H. werneckii* utilise sa paroi cellulaire mélanisée pour réduire les fuites de glycérol des cellules aux salinités optimales. La partie externe de la paroi cellulaire mélanisée a une couche continue de granules de mélanine qui minimise la perte de glycérol des cellules, car cette couche crée une barrière de perméabilité mécanique pour le glycérol en réduisant la taille des pores de la paroi cellulaire. Aux salinités plus élevées, la mélanisation est diminuée et la rétention de

glycérol est moins efficace; par conséquent, les taux de croissance de *H. werneckii* sont réduits (Kogej et al., 2007 ; Jacobson et Ikeda, 2005).

Il apparaît ainsi qu'en modifiant la structure de la paroi cellulaire au lieu d'abaisser directement la fluidité de la membrane, *H. werneckii* peut maintenir une fluidité élevée de la membrane même à des salinités élevées. Une plus grande fluidité de la membrane plasmique résulte d'une augmentation de la teneur en acides gras insaturés et de leur longueur, en raison du stress salin. L'un des mécanismes qui permet la régulation précise de la fluidité membranaire chez *H. werneckii* est le changement dans l'expression des enzymes modifiant les acides gras, telles que les désaturases et l'élongase (Gostincar et al., 2009).

#### 4.4. Détection des concentrations élevées de sel

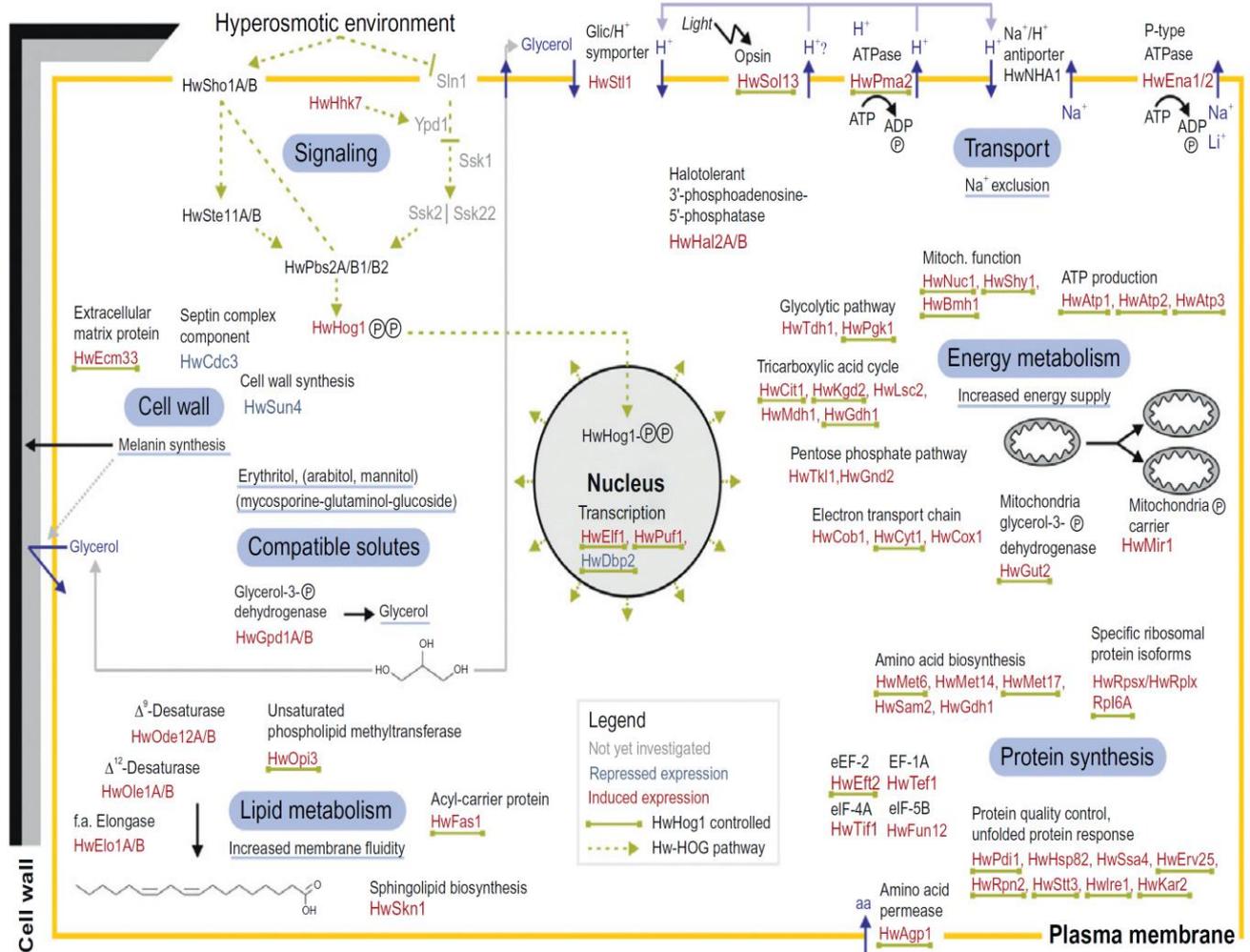
La capacité des cellules de détecter les changements des concentrations salines dans l'environnement est d'une importance vitale pour la survie dans les milieux hypersalins.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la principale voie impliquée dans la détection des changements d'osmolarité et dans la réponse à ceux-ci est connue sous le nom de la voie de signalisation du glycérol à haute osmolarité (HOG), qui fait également partie de l'une des cascades de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) les mieux connues (Hohmann, 2002).

L'existence d'une voie de signalisation chez *Hortaea werneckii* qui est similaire à la voie HOG de *S. cerevisiae* a été confirmée par l'identification de l'homologue de MAP kinase, HwHog1 impliquée dans la détection et la réponse aux augmentations de NaCl (Lenassi et al., 2007).

La protéine HwHog1 présente une homologie élevée avec HOG de *S. cerevisiae*, bien que chez *S. cerevisiae*, Hog1 est activé même à de très faibles concentrations de sel, tandis que HwHog1 n'est pleinement actif qu'à des concentrations de sel extrêmement élevées (Turk et Plemenitas, 2002).

La voie HOG contrôle l'expression des gènes sensibles au sel. Parmi les 95 gènes exprimés différemment en fonction du sel chez *H. werneckii*, un ensemble de 36 gènes s'est révélé dépendant de Hog1 dans l'adaptation à long terme de *H. werneckii* aux environnements extrêmes (Vaupotic et Plemenitas, 2007).



« Une haute salinité est détectée par des capteurs de la voie de signalisation HOG (flèches vertes), qui module l'expression d'un certain nombre de gènes sensibles au sel (souligné en vert). L'expression des autres gènes est également modifiée (les gènes ayant une expression plus élevée à haute salinité sont écrits en rouge, les gènes réprimés en bleu).»

Figure 7 : Le modèle d'adaptations à des concentrations élevées de sel chez *Hortaea werneckii* (Gostincar et al., 2011).

### III- Importance biotechnologique des champignons halophiles

#### 1- Le rôle biotechnologique

Les champignons filamenteux sont les eucaryotes les plus largement utilisés dans les applications industrielles et pharmaceutiques. Certains champignons halotolérants et halophiles ont d'importantes applications biotechnologiques grâce à leurs caractéristiques comprenant leurs mécanismes d'adaptation, leurs métabolites secondaires, enzymes et en particulier leurs solutés compatibles, qui ont une grande capacité à stabiliser les protéines et les acides nucléiques (Zajc et *al.*, 2012).

Bien que les applications réelles des champignons dérivés des milieux hypersalins en biotechnologie soient actuellement très limitées, le nombre de produits naturels provenant de ces champignons augmente progressivement. Les principaux composés secrétés par ces champignons sont les enzymes, y compris les mannanases, amylases, cellulase, xylanases, galactosidases, lipases et protéases (Chung et *al.*, 2019).

Plusieurs champignons producteurs d'enzymes halophiles ont été caractérisés dans les milieux hypersalins marins et terrestres. Ces enzymes halophiles remplissent les fonctions enzymatiques similaires à leurs homologues non halophiles, mais ces derniers peuvent rester stables et actives dans des conditions où la plupart des protéines s'agrègent ou se dénaturent. Ces enzymes sont adaptées pour fonctionner dans une gamme de conditions extrêmes en correspondance avec leur habitat naturel où elles sont confrontées à une salinité et une température élevées, à la dessiccation et au changement de pH (Patel et Saraf, 2015 ; Munawar et Engel, 2013).

Les champignons halophiles se sont également avérés être une source riche et prometteuse de nouveaux métabolites secondaires à activités antimicrobiennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires, cytotoxiques, immunostimulantes ou antioxydantes et de nombreux nouveaux métabolites ont été isolés (Liu et *al.*, 2017 ; Chung et *al.*, 2019 ; Damare et *al.*, 2012). Quelques enzymes et métabolites secondaires isolés des champignons halophiles sont résumés dans le tableau 2.

La bioremediation des environnements hypersalins est devenu un sujet de plus en plus important, ce qui a stimulé la recherche de microorganismes tolérants au sel pour être utilisés dans le traitement des marais salants pollués par le pétrole et les eaux usées salées résultant de nombreux processus industriels (Gostincar et *al.*, 2011).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont parmi les composants les plus importants et les plus dommageables pour l'environnement; Les champignons ligninolytiques peuvent oxyder les HAP en produisant un complexe extracellulaire enzymatique non spécifique qui est normalement utilisé pour la dépolymérisation de la lignine. L'utilisation de champignons ligninolytiques halophiles dans la biorestoration des milieux salins pollués peut être réalisée en raison de leur tolérance aux conditions salines (Damare et *al.*, 2012). Passarini et *al.* (2011) ont rapporté que les deux souches marines *Aspergillus sclerotiorum* qui a la capacité à métaboliser le pyrène et le benzo[a]pyrène à

99.7% et 76.6% respectivement et *Mucor racemosus* qui peut dégrader le benzo[a]pyrène à plus de 50% sont considérés comme des candidats appropriés pour la biorestauration des environnements salins, tels que l'océan et les sédiments marins contaminés par les HAP.

La salinisation progressive représente également un grave problème agricole dans le monde. Les champignons halophiles représentent désormais une source de gènes cibles qui peuvent être utilisés pour transmettre une tolérance au sel pour les plantes. Des études ont montré que l'insertion de la séquence codante d'une protéine 3'-phosphoadénosine-5'-phosphatase, ApHal2, de la levure halotolérante *Aureobasidium pullulans* a amélioré la tolérance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* au sel et à la sécheresse (Gostincar et al., 2012 ; Gunde-Cimerman et Zalar, 2014).

**Tableau 2 : Produits naturels issus de champignons dérivés de milieux hypersalins (Damare et al., 2012 ; Chung et al., 2019).**

Isolats fongiques	Composés naturels	Description
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> LMK002	Endo-1,4- $\beta$ -mannanase	-
<i>Verticillium dahlia</i> LMK006	Endoxylanase, cellulase et endomannanase	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Alcaline protease	Activité optimale à pH 9 et 45°C
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK004 et LMK008	Endo-1,4- $\beta$ -mannanase	-
<i>Candida quercitrusa</i> JHSb	Lipase	-
<i>Aspergillus gracilis</i>	Amylase et xylanase	-
<i>Aspergillus restrictus</i>	Cellulase, lipase, et protease	-
<i>Aspergillus tubingensis</i> GR1	$\beta$ -galactosidase	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2-3	lipase	-
<i>Aspergillus ustus</i>	Alcaline protease	-
<i>Beauveria bassiana</i>	L-Glutaminase	-
<i>Aspergillus niger</i>	Xylanase	-
<i>Halosphaeria mediosetigera</i>	Gelatinase	-
<i>Aspergillus flaviceps</i>	amylase	-
<i>flavodon flavus</i>	Laccase, Manganese peroxidase, Lignin peroxidase	-
<i>Aspergillus varicolor</i> B-17	Varicolorquinones A et B	Nouvelle quinone, cytotoxique

<i>Penicillium citrinum</i> B-57	Pennicitrinone C et penicitrinol B	Nouveaux dimères de citrinine
<i>Aspergillus terreus</i> Tsp22	Composés extracellulaires bruts	Antimicrobien
<i>Alternaria raphani</i>	Alternarosides A-C	Nouveaux cérébrosides
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> PT06-1	Indole-3-ethenamide	Nouveau, Cytotoxique
<i>Aspergillus terreus</i> PT06-2	Terremides A et B	Nouveau, antibactérien
	Terrelactone A	Nouveau composé
<i>Aspergillus</i> sp. nov. F1	Cytochalasin E et rosellichalasin	Cytotoxique
<i>Aspergillus flocculosus</i> PT05-1	Ergosteroids et pyrrole derivatives	Antimicrobien
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus gracilis</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i>	Composés extracellulaires bruts	Antibactérien
<i>A. flavus</i> et <i>A. penicillioides</i>	Composés extracellulaires bruts	Antioxydant
<i>Myrothecium</i> sp. GS-17	N-acetyl-2,4,10,17-tetrahydroxyheptadecylamine et -acetyl-3,5,11,18-tetrahydroxyoctadecyl-2-amine	Nouveaux amides, cytotoxique
<i>Yarrowia lipolytica</i> N-6	Composés extracellulaires bruts	Immunostimulant et antioxydant
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicitides A	cytotoxique

## 2- Les champignons halotolérants comme agent de lutte biologique

### 2.1. Au champ

Le stress salin, qui est considéré comme un des stress abiotiques les plus importants qui ont un impact négatif sur la croissance des plantes, peut augmenter la gravité des maladies des plantes causées par divers champignons phytopathogènes comme *Phytophthora* spp. (Bouchibi et al., 1990; Snapp et al., 1991; Sanogo, 2004), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Ghali et al., 1986 ; Triky-Dotan et al., 2005 ; Daami-Remadi et al., 2009), *Pythium ultimum* (Martin et Hancock 1981; Rasmussen et Stanghellini, 1988), *Rhizoctonia solani* (El-Abyad et al., 1992 ; Raykov et Tanova, 2016 ; Chang et al., 2019), *Alternaria solani* (Nachmias et al., 1993), *Verticillium dahliae* (Mohammadi et al., 2007), *Sclerotinia sclerotiorum* (Hassan et Shahzad, 2004). La salinité élevée des sols et des eaux d'irrigation affecte aussi la croissance et le mode d'action des agents de lutte biologique ce qui nécessite la recherche d'agents de biocontrôle halotolérants qui peuvent être appliqués dans l'agriculture en zone aride irriguée avec de l'eau saline (Gal-Hemed et al., 2011).

Les espèces du genre *Trichoderma* sont largement utilisées comme agents de lutte biologique et peuvent lutter contre les agents pathogènes des plantes par différents mécanismes tels que le mycoparasitisme, l'antibiose, la compétition et la stimulation des mécanismes de défense des plantes. Quelques espèces de *Trichoderma* ont la capacité d'induire la tolérance au stress environnemental en améliorant la croissance et la productivité des plantes, interagir avec plusieurs processus impliqués dans les réponses des plantes au stress et augmenter l'accumulation de composés antioxydants qui permettent une diminution de la sensibilité au stress (Poveda, 2020). Plusieurs auteurs ont rapporté que *T. harzianum* et *T. parareesei* peuvent réduire les effets du stress thermique, osmotique et salin et induire des changements physiologiques dans la plante contre les dommages oxydatifs (Mastouri et al., 2010 ; Rubio et al., 2017 ; Ghorbanpour et al., 2018 ; Poveda, 2020). En plus, des études ont montré que des souches halotolérantes de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride* et *T. asperelloides* ont montré un fort pouvoir antagoniste sous le stress salin contre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata* (Mohamed et al., 2006 ; Gal-Hemed et al., 2011 ; Guo et al., 2018).

Malgré ces résultats encourageantes, le potentiel d'utilisation de *Trichoderma* comme agent de lutte n'est pas encore pleinement exploité, principalement parce que la recherche dans ce domaine est encore confinée au laboratoire et que très peu d'attention a été accordée à la production des formulations commerciales d'agents biologiques (Fenta et al., 2019).

## 2.2 En post récolte

Les pertes économiques causées par les maladies post-récolte représentent un problème majeur dans le monde. Les maladies post-récolte se propagent principalement pendant le stockage, le transport et la vente causant une détérioration de la qualité et des pertes économiques ; en plus, les fruits et légumes infectés par des agents pathogènes fongiques peuvent entraîner des risques pour la santé puisque plusieurs champignons produisent des mycotoxines comme les aflatoxines, les ochratoxines, l'*alternaria* et la fumonisine qui sont secrétées par des espèces appartenant aux genres fongiques comme *Aspergillus*, *Alternaria* et *Fusarium* (Janisiewicz et Korsten, 2002 ; Sanzani et al., 2016).

La gestion des maladies post récolte est assurée par l'application de fongicides chimiques soit sur le terrain, soit pendant le stockage; cependant, l'utilisation excessive de ces fongicides synthétiques a des effets négatifs sur l'environnement et sur la santé humaine et a conduit à des cas de résistance microbienne, ce qui rend le contrôle des pathogènes difficile (Vitoratos et al., 2013 ; González-Estrada et al., 2019). L'utilisation d'agents de biocontrôle microbiens est une alternative pour la lutte contre les maladies poste récolte qui réduit le taux de contact humain avec les produits chimiques nocifs. Ces agents antagonistes peuvent être isolés de diverses sources comme le sol, les fruits, les feuilles et les milieux extrêmes comme les environnements marins (Droby et al., 2009 ; Sharma et al., 2009 ; Medina-Cordova et al., 2018).

Les champignons extrêmophiles qui tolèrent différents stress environnementaux sont hautement souhaitables pour leur application comme agent de biocontrôle post récolte. Plusieurs levures comme *Aureobasidium pullulans*, *Debayomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Metschnikowia fructicola* et *Rhodotorula mucilaginosa* sont généralement isolés des surfaces des plantes et des divers environnements extrêmes comme les aliments conservés au sel et séchés, les aliments congelés, les eaux hypersalines, les lacs acides, les lacs oligotrophes et les surfaces en polymère synthétique. Ces divers aspects de la polyextrémotolérance, y compris la tolérance aux basses températures, au pH, au sel et au manque de nutriments contribuent à ce que ces champignons présente une forte activité de lutte biologique contre les pourritures post-récolte sur divers fruits (Butinar et al., 2005a ; Russo et al., 2008 ; Libkind et al., 2004 ; Zajc et al., 2019 ; Zajc et al., 2020).

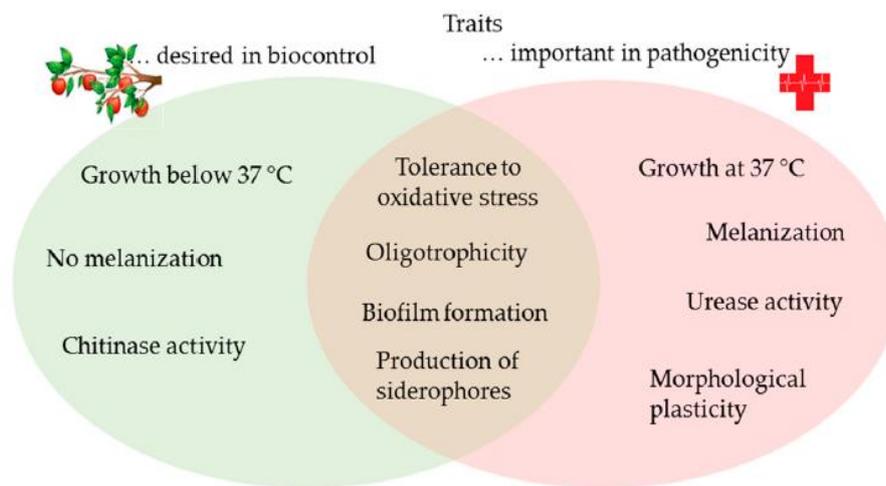
L'adhésion, la formation de biofilm et la croissance dans des conditions oligotrophes sont des principaux caractères qui permettent la diffusion de l'agent de biocontrôle à travers les surfaces des fruits, augmentent son aptitude à la compétition pour les nutriments et l'espace et renforcent sa résistance à de nombreux stress abiotiques et biotiques (Andrews et al., 1994 ; Pandin et al., 2017). Pour surmonter la faible disponibilité de nutriments, l'agent de biocontrôle produit des composés chélateurs du fer de haute affinité tels que les sidérophores. La séquestration du fer a été impliquée dans le contrôle des pourritures post-récolte des fruits par différentes levures comme *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* et *Metschnikowia pulcherrima* (Vero et al., 2009 ; Calvente et al., 1999 ; Sipiczki, 2006).

La tolérance au stress thermique est également un caractère de lutte biologique très important. La plupart des fruits ont une durée de conservation très limitée après la récolte s'ils sont conservés à des températures normales, pour cela, la réfrigération est la technique la plus utilisée pour la conservation des fruits frais (Usall et al., 2016). Certaines espèces de champignons phytopathogènes peuvent se développer rapidement à basse température, comme *Alternaria alternata*, *Penicillium spp.* et *Botrytis cinerea* et peuvent causer des pourritures pendant le stockage à froid (Troncoso-Rojas et Tiznado-Hernández, 2014 ; Plaza et al., 2003 ; Morales et al., 2010 ; Feliziani et Romanazzi, 2016). L'étude de microorganismes isolés des milieux froids comme ceux de l'Antarctique peut favoriser le développement de levures qui présentent une grande tolérance aux basses températures ce qui favorise leur utilisation comme agent de biocontrôle post récolte des fruits stockés ou transportés en chambre froide. Cependant, les travaux dans ce domaine de recherche sont encore limités (Ferreira et al., 2019).

Pour minimiser les dommages aux fruits lors de la manipulation après la récolte, les bacs contenant certains fruits sont immergés dans une solution saline d'une densité suffisante pour permettre aux fruits de flotter (Sugar, 1986). Pour cette raison, l'utilisation des agents de lutte qui tolèrent une salinité élevée est très souhaitable et compatible avec les pratiques post-récolte. L'halotolérance est également très importante de point de vue que ce caractère est généralement lié à l'adaptation à d'autres conditions de stress ; selon les deux

études récentes de Zajc et al. (2019) et Zajc et al. (2020), les agents de lutte biologique *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, fréquemment isolé des milieux hypersalins, sont halotolérante et ont l'aptitude à tolérer les conditions oligotrophes, le stress thermique, le stress oxydatif, ont la capacité à former des biofilms et à produire les sidérophores et les enzymes hydrolytiques.

Cependant, ces caractéristiques hautement souhaitables en lutte biologique (la croissance dans des conditions oligotrophes, la formation de biofilm, thermatolérance, production de sidérophores à 37°C, la tolérance au stress oxydatif et la sécrétion de certains enzymes comme l'uréase) peuvent également jouer un rôle dans la pathogénèse chez les mammifères (fig. 8). L'étude de ces caractéristiques peut être utile comme étapes initiales dans l'évaluation de la sécurité des agents de biocontrôle contre la pourriture des fruits avant de se lancer dans des tests de fruits longs et coûteux (Zajc et al., 2019 ; Zajc et al., 2020).



**Figure 8: Chevauchement entre les caractères impliqués dans la pathogénèse et les caractères souhaitables en lutte biologique (Zajc et al., 2019).**

***Deuxième partie***  
***Expérimentation et analyse des***  
***résultats***

***Chapitre 1***  
***Matériel et Méthodes***

## I- Isolement et identification des champignons

### 1- Site d'étude

#### 1.1. Situation géographique

Notre étude a été effectuée dans une zone de 5 km<sup>2</sup> située à la marge de la grande sebkha d'Oran entre Boutlelis (35°30'46''N 0°58'38''W) et Al Amria (35°28'49''N 1°00'57''W) (fig. 9). Les échantillons du sol ont été prélevés dans 9 sites répartis comme suit (tableau 3):

#### La zone 1

- Sites B, C, D, R caractérisés par une végétation halophile (fig. 10).
- Sites G et S caractérisés par des cultures céréalières (fig. 10).

#### La zone 2

- Sites A, E et H caractérisés par une absence totale de végétation (fig. 11).



Figure 9: La carte de la grande sebkha d'Oran.

Les lettres indiquent les sites d'échantillonnage

Tableau 3 : Les différents sites d'échantillonnage

Site du prélèvement		Code des isolats	Date du prélèvement
Zone1	Plantes halophiles	B, C, D, R	Décembre 2012
	Culture de céréales	G, S	Janvier 2015
Zone2	Absence totale de végétation	A, E	Décembre 2012
		H	Juillet 2015



Sites B et C



Sites D et R



Site S



Site G

Fig. 10 : Les sites d'échantillonnage de la zone 1



**Fig. 11 : Les sites d'échantillonnage de la zone 2**

### **1.2. Echantillonnage**

Les échantillons ont été prélevés après écartement de la couche superficielle du sol. A l'aide d'une spatule stérile, 100 à 150 g de terre sont prélevés à une profondeur de 5 à 15 cm et placés dans un flacon stérile puis transportés le plus rapidement possible au laboratoire.

### **1.3. Caractérisation physico-chimiques des échantillons du sol**

Des mesures du pH et de la conductivité électrique ont été effectuées pour les échantillons du sol. Pour cela, des suspensions ont été préparées dans l'eau distillée en mélangeant 10 g du sol dans 50 ml d'eau distillée. Les mesures du pH et de la conductivité ont été réalisées en utilisant respectivement un pH-mètre et un conductimètre.

### **2- Isolement, purification et conservation des champignons**

Après la récupération des échantillons, des suspensions du sol ont été préparées en eau physiologique stérile. Chaque suspension a subi une homogénéisation à l'aide d'un vortex puis un volume de 0,1 ml a été étalé à la surface du milieu PDA préparé à différentes concentrations de NaCl (5%, 10% et 15%) additionné de 5 mg/l de gentamycine. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 25°C pendant 1 mois. Après incubation, chaque colonie développée a été repiquée au centre du même milieu dans les mêmes conditions d'incubation.

Afin d'obtenir des cultures pures monospores, une suspension sporale a été préparée à partir de chaque colonie isolée puis diluée jusqu'à l'obtention d'une concentration voisine de 10 spores/ml. Un inoculum de 1ml a été étalé à la surface du milieu PDA et incubé pendant 24h à 48h. Après incubation, chaque conidie germée est repiquée sur milieu PDA et incubées à 25°C.

Les isolats fongiques issus de la culture monospore ont été repiqués sur gélose inclinée, incubées à 25°C pendant 7 à 15 jours puis stockés à 4°C. Pour une conservation de longue

durée, Les isolats ont été conservés sous forme de spores dans une solution de 30% de glycérol/eau physiologique à -20°C.

### 3- Identification des isolats

#### 3.1. Identification morphologique

L'identification morphologique des isolats a été basée sur une observation macroscopique des caractères culturels et une étude microscopique des caractères morphologiques du thalle et des organes de reproduction sexuée et asexuée après 7 à 15 jours d'incubation sur milieu PDA. En se référant aux clés d'identification de Pitt (1979,) Barnnet et Hunter (1998), Samson *et al.* (2002), Samson et Frisvad (2004), les isolats ont été identifiés et classés selon leur genre.

#### 3.2. Identification moléculaire

##### 3.2.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN génomique a été effectuée en utilisant le FastDNA® SPIN kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) en respectant le protocole proposé par le fabricant. Le mycélium des cultures âgées de 7 à 15 jours sur milieu PDA a été recueilli en utilisant un scalpel stérile puis transféré dans des tubes stériles de 2ml. Une quantité de 1ml de la solution de lyse a été ajoutée à chaque tube puis une homogénéisation au broyeur vibrant a été effectuée deux fois pendant 30 secondes à 30 Hz. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes. Le maximum du surnageant a été transféré dans des tubes Eppendorf de 2 ml puis une quantité de Binding Matrix équivalente du surnageant a été ajoutée. Après incubation des tubes pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante, une centrifugation 1 minute à 14000 g a été effectuée, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 500 ul de tampon SEWS-M. la suspension a été transférée dans des tubes avec colonne et centrifugée 1 minute à 14000 g. La colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube et l'ADN a été élué en remettant en suspension la Binding Matrix dans 70 ul de DES. Après une incubation de 15 minutes des tubes, une centrifugation 1 minute à 14000 g a été effectuée, la colonne a été jetée et l'ADN a été récupéré dans les tubes.

Après extraction, la qualité et la concentration d'ADN ont été vérifiées en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. Tous les extraits d'ADN ont ensuite été conservés à -20°C.

##### 3.2.2. Amplification des fragments d'ADN

En se basant sur l'identification morphologique, quatre régions ont été amplifiées selon les genres identifiés.

Le gène du facteur d'élongation de la traduction 1 $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) a été amplifié pour les souches appartenant au genre *Fusarium* en utilisant les amorces EF1F / EF1R (Brygoo et Gautier, 2007), Le gène  $\beta$ -tubuline pour les souches de *Talaromyces*, *Aspergillus* et

*Penicillium* et leurs formes téléomorphes en utilisant les amorces Bt2a / Bt2b (Glass et Donaldson, 1995), l'actine pour le genre *Cladosporium* en utilisant les amorces ACT-512F / ACT-783R (Carbone et Kohn, 1999). La région ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr a été amplifiée pour le reste des genres et pour les souches non identifiées par observation microscopique à l'aide des amorces ITS4 et ITS5 (White *et al.*, 1990).

Afin de confirmer l'identification de certaines souches pour les quelles l'identification par l'ITS, TEF-1 $\alpha$  ou  $\beta$ -tubuline était insuffisante pour déterminer l'espèce, les gènes RPB1, RPB2, LSU, SSU et calmoduline ont été amplifiés en utilisant les amorces Fa/G2R, 5f2/7cR, LR0R/LR5, NS1/NS24 et CF1d/CF4 respectivement (tableau 4).

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 $\mu$ l. Les solutions réactionnelles d'amplification contenaient généralement les mêmes réactifs à l'exception des amorces qui sont différentes selon le type de PCR (annexe 2). Les conditions d'amplification dépendaient des couples d'amorces utilisés (annexe 2).

### 3.2.3. Electrophorèse

Les produits d'amplification ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Ce gel a été préparé en mélangeant 1g d'agarose avec 100ml de tampon TAE 1 X (annexe 1) puis porté à ébullition dans un four à micro-ondes jusqu'à la formation d'un liquide clair. Le gel a été ensuite versé dans un support et un peigne a été inséré pour la formation des puits. Après solidification du gel, le peigne a été retiré et le support contenant le gel a été placé dans l'appareil d'électrophorèse. Le gel a été ensuite immergé dans le tampon TAE 1X.

Un volume de 8  $\mu$ l de chaque produit PCR a été mélangé avec le même volume de tampon de charge (annexe 1) et déposé dans les puits du gel pour une analyse par électrophorèse horizontale à 100 V. Le BenchTop 100-bp DNA ladder (Promega) a été utilisé comme un marqueur de taille. Une révélation post migration a été réalisée en immergeant le gel dans une solution de GelRed™ (Biotium Inc., CA) pendant 30mn. Le gel est ensuite visualisé et photographié sous UV.

### 3.2.4. Purification et séquençage

La purification et le séquençage des produits d'amplification dans les deux sens (forward et reverse) en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la PCR, ont été réalisées au laboratoire Eurofins MWG (Ebersberg, Allemagne). Les séquences obtenues ont ensuite été analysées par l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) sur le site Web du centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI).

Tableau 4 : Les amorces des gènes utilisées

Gène	Amorces	Séquences	Références
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
LSU	LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester, 1990
	LR5	TCCTGAGGGAACTTCG	
SSU	NS1	GTAGTCATATGCTTGCTCTC	White <i>et al.</i> , 1990
	NS24	AAACCTTGTTACGACTTTTA	Gargas and Taylor, 1992
$\beta$ -tub	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass et Donaldson, 1995
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
TEF-1 $\alpha$	EF1F	ATGGGTAAGGAGGACAAGACTCA	Brygoo et Gautier, 2007
	EF1R	TGGAGATACCAGCCTCGAAC	
Actine	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCG	Carbone et Kohn, 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
RPB1	Fa	CAYAARGARTCYATGATGGGWC	Hofstetter <i>et al.</i> , 2007
	G2R	GTCATYTGDTGDGCDGGYTCDC	O'Donnell <i>et al.</i> , 2010
RPB2	5f2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	Reeb <i>et al.</i> , 2004
	7cR	CCCATRGTCTGYTTRCCCAT	Liu <i>et al.</i> , 1999
CaM	CF1d	CAGGTCTCCGAGTACAAG	Peterson, 2004
	CF4	TTTTYGCATCATRAGYTGGAC	

D = A, G ou T; R = A ou G; W = A ou T; Y = C ou T

### 3.3. Identification phylogénétique

Afin de confirmer l'identification moléculaire basée sur la comparaison des séquences de chaque gène avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank, des analyses phylogénétiques ont été effectuées pour certaines souches. Un alignement individuel des séquences a été réalisé en utilisant le programme d'alignement multiple Clustal W puis des arbres phylogénétiques à base de chaque gène ont été construits à l'aide du logiciel MEGA version X (Kumar *et al.*, 2018) en utilisant la méthode de Maximum Likelihood (maximum de vraisemblance). La robustesse des nœuds a été évaluée à l'aide d'une analyse bootstrap de 1000 réplicats.

Cette étape consiste à évaluer la position taxonomique des souches et leur affiliation aux espèces homologues. Dans le cas où la position taxonomique d'une souche était ambiguë, une analyse multi-gènes a été ensuite réalisée. Les séquences alignées ont été concaténées puis utilisées pour construire un arbre phylogénétique à base d'une combinaison de gènes. Selon le genre fongique, nous avons utilisé les combinaisons suivantes : ITS,  $\beta$ -tub, CaM, RPB2 pour le genre *Aspergillus* et *Penicillium* (Houbraken *et al.*, 2014), TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, ITS, LSU, RPB2 pour le genre *Fusarium* (Schroers *et al.*, 2009) et ITS, LSU,  $\beta$ -tub, RPB2 pour le genre *Chaetomium* (Wang *et al.*, 2016).

## II- Caractérisation des souches

### 1- Effet de la salinité sur la croissance radiale des souches

L'halotolérance des souches a été étudiée sur le milieu PDA préparé à différentes concentrations de NaCl (du 0% au 20% avec un intervalle de 2.5).

Des disques d'inoculum de 8mm de diamètre, prélevés de chaque culture âgée d'une semaine, ont été inoculés au centre des boîtes de Petri contenant 15ml du milieu PDA et incubé pendant 10 jours. Trois répétitions en été réalisées pour chaque concentration et pour chaque souche. La mesure de la croissance radiale de chaque colonie a été réalisée chaque 48 heure sur deux diamètres perpendiculaires. Le rayon moyen a ensuite été calculé en retranchant celui du disque d'inoculum.

### 2- Production d'enzymes hydrolytiques

L'étude de la production des enzymes extracellulaire par l'ensemble de nos souches fongique a été évaluée sur milieu solide. Cette étude est basée sur l'ajout d'un substrat spécifique à chaque enzyme au milieu de culture comme source de carbone. Après inoculation et incubation des cultures, l'apparition d'un halo claire ou d'une précipitation autour des colonies indique la production d'enzyme (Ceska, 1971).

Pour chaque enzyme, un fragment de 8mm de diamètre prélevé de chaque culture âgée de 7 jours sur milieu PDA a été repiqué sur un milieu spécifique. Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C pendant 2 à 5 jours selon la vitesse de croissance des souches.

L'activité enzymatique a été déterminée par un index enzymatique (IE) comme décrit par Hankin et Anagnostakis (1975) où  $IE = R/r$ ,  $R$  est le diamètre de l'halo et le  $r$  est le diamètre de la colonie. Les souches qui présentent un IE égal ou supérieur à 2 sont considérées comme des bons producteurs de l'enzyme étudié.

La composition des milieux de culture et les réactifs utilisés sont mentionnés dans l'annexe (annexe 1).

#### 2.1. Amylase

La production d'amylase a été étudiée sur milieu gélose nutritive additionnée de 2 g/L d'amidon soluble. Après incubation, les cultures sont inondées par une solution d'iode pour la détection d'amidon dans le milieu. L'apparition d'une zone claire autour de la colonie révèle la présence d'amylase (Hankin et Anagnostakis, 1975).

#### 2.2. Cellulase

L'activité cellulolytique a été étudiée sur milieu de culture à 1% cellulose. A la fin de la période d'incubation, les cultures ont été mises à 50°C pendant 16h pour accélérer l'action de l'enzyme cellulase (Abe et al., 2015 ; Montenecourt et Eveleigh, 1977). Les cultures ont été ensuite inondées par 5ml d'iode puis rincées à l'eau distillée pour visualiser la zone d'hydrolyse (Kasana et al., 2008).

### 2.3. Protéase

L'enzyme protéase a été détecté sur milieu gélose au lait contenant 30% de lait écrémé. Après incubation, La dégradation de la caséine par l'enzyme se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Sarath et *al.*, 1989).

### 2.4. Lipase

L'activité lipolytique a été déterminée selon la méthode de Hankin et Anagnostakis (1975). Cette méthode consiste à utiliser un milieu de culture contenant le tween 20 comme substrat lipidique. Le tween 20 est stérilisé séparément et ajoutés au milieu stérile.

Après incubation, les cultures ont été mises à 4°C pendant 12h pour mieux visualiser l'apparition d'une précipitation opaque autour des colonies.

## III- Sélection des souches à pouvoir antagoniste

### 1- Champignon test

Les champignons phytopathogènes utilisés pour sélectionner les souches à activité antifongique et évaluer leur pouvoir antagoniste sont : *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata*. Ces souches ont été fournies par le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), France.

### 2- Sélection *in vitro* des souches à activité antifongique

L'activité antifongique des souches a été évaluée vis-à-vis d'une souche de *Fusarium oxysporum* en utilisant la technique de confrontation directe sur milieu PDA sans NaCl et à 2% NaCl.

Cette technique a été effectuée selon la méthode de Camporota (1985) en déposant deux explants de 8 mm de diamètre constitués par l'inoculum du pathogène et celui de l'antagoniste dans une boîte de Petri contenant le milieu PDA. Les deux explants sont séparés de 4 cm l'un de l'autre. Le témoin est représenté par un repiquage du pathogène à la périphérie de la boîte. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche.

L'activité antagoniste a été évaluée après cinq jours d'incubation à l'obscurité à 25°C. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène par les antagonistes a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

**D1** : est le diamètre des colonies témoin

**D2** : est le diamètre des colonies en présence de l'antagoniste

### **3-Pouvoir antagoniste, *in vitro*, de deux souches de *Trichoderma***

#### **3.1. Test d'antagonisme par confrontation direct**

Le pouvoir antagoniste des deux souches de *Trichoderma* a été testé vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata* en utilisant la même technique de confrontation directe citée au paragraphe précédent.

#### **3.2. Test d'antagonisme par antibiose : cas d'*A. Alternata***

##### **3.2.1. Sécrétion des substances volatiles**

Cette technique consiste à repiquer le pathogène et l'antagoniste séparément dans deux boîtes de Pétri selon la méthode décrite par Dennis et Webster (1971a).

Un explant de 8mm de diamètre prélevé d'une culture jeune du pathogène et un autre de l'antagoniste sont repiqués chacun au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu PDA. Les couvercles sont ensuite enlevés aseptiquement et les deux fonds des boîtes sont rassemblés et entourés avec une bande de parafilm en plaçant le fond contenant le pathogène en dessus de celui contenant l'antagoniste. De cette manière, le pathogène est exposé aux gaz émis par l'antagoniste. Les cultures témoins ne sont pas confrontées aux antagonistes. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque traitement et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène a été calculé après 8 jours d'incubation à l'obscurité à 25°C.

##### **3.2.2. Sécrétion des substances diffusibles**

La mise en évidence de la sécrétion des substances diffusibles par les souches antagonistes a été réalisée selon la technique de Dennis et Webster (1971b). Dans chaque boîte de Petri contenant du milieu PDA, une rondelle de cellophane stérile a été déposée sur la surface du milieu. Après 24 heures, un disque de 8 mm de diamètre d'une culture jeune de l'antagoniste a été déposé au centre de la boîte de Petri. Après 48 heures d'incubation, la colonie de l'antagoniste et la rondelle de cellophane ont été enlevées et un disque mycélien du pathogène a été placé au centre de la boîte. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque traitement. Après 8 jours d'incubation à l'obscurité à 25°C, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène a été calculé par rapport au témoin.

### **4- Test de bio-protection des fruits de tomate: cas d'*A. alternata***

#### **4.1. Préparation de l'inoculum**

A partir des cultures âgées de 15 jours de *Trichoderma* et *A. alternata*, l'inoculum est préparé par grattage de la surface des cultures après leur inondation par de l'eau distillée stérile. La suspension recueillie est filtrée sur papier Watman n1 et ajustée à une concentration de  $10^7$  spores/ml pour *Trichoderma* et de  $5 \times 10^4$  spores/ml pour *A. alternata* en utilisant une cellule de Malassez. Une goutte de tween 80 à 0.05% est ajoutée à chaque suspension (Batta, 2001 ; Wang et al., 2008).

#### 4.2. Technique d'inoculation

Les fruits de tomate ont été désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% pendant 15 min puis rincés avec de l'eau distillée stérile et séchés sous hotte à flux laminaire. Des blessures de 5mm de diamètre et de 3mm de profondeur ont été créées sur les fruits de tomate à l'aide d'une aiguille stérile. Trois fruits ont été utilisés pour chaque traitement.

Les fruits ont été inoculés au niveau des blessures avec 10 µl de la suspension sporale d'*A. Alternata*. En même temps (traitement préventif) ou après 24h (traitement curatif), 20 µl de la suspension sporale de *Trichoderma* ont ensuite été inoculé.

Les témoins positifs ont été constitués de fruits inoculés par *A. alternata* sans traitement par l'antagoniste alors que les témoins négatifs ont été inoculés uniquement par l'antagoniste.

Les fruits inoculés ont été placés dans des bacs en plastique sur papier filtre stérile humidifié et incubés à 20°C pendant une semaine (Batta, 2001).

#### 4.3. Lecture des résultats

Après la période d'incubation, L'efficacité du traitement par les deux souches de *Trichoderma* contre *A. alternata* a été évaluée en mesurant le diamètre des lésions formées autour des sites d'inoculation (Batta, 2001). Le pourcentage de la réduction des taches noires causé par le pathogène sur les fruits de la tomate est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de la réduction} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

**D1** : est le diamètre de la lésion formé autour des sites inoculé par le pathogène seul.

**D2** : est le diamètre de la lésion formé autour des sites inoculé par le pathogène et l'antagoniste

#### IV- Analyse statistique

Les résultats de l'activité antagonistes des souches ont été soumis à des analyses statistiques à l'aide du logiciel Statistica 8. L'analyse de la variance ANOVA a été effectuée en utilisant le test de Newman Keuls (au seuil de 5%).

## ***Chapitre 2***

# ***Isolement et identification des champignons***

## 1- Caractérisation physico-chimiques des échantillons du sol

Le résultat des analyses physico-chimiques (tableau 5) montre que les sols caractérisés par une absence totale de végétation (sites A, E et H) ou dominés par une végétation halophiles (sites B, C, D et R) sont alcalins avec un pH entre 7.7 et 8.2 et ont un taux de salinité très élevé (entre 28 et 46 g/l). Le sol où les cultures de céréales prédominent (sites G et S) est neutre (pH 7.2) et moins salin (CE de 6). Selon Durand (1983), ces sols sont classés parmi les sols extrêmement salins.

**Tableau 5: Analyses physicochimiques des échantillons du sol.**

Site de prélèvement		Code des isolats	pH	Conductivité électrique ms/cm	Salinité g/l
Zone1	Plantes halophiles	B, C, D, R	8.0	57.5	37
	Culture de céréales	G, S	7.2	6	3.8
Zone2	Absence totale de végétation	A, E	7.7	43	28
		H	8.2	71.5	46

## 2- Identification des isolats

### 2.1. Identification morphologique

Un total de 136 isolats a été isolé sur milieu PDA à 5, 10 et 15% de NaCl. Après purification des cultures, les isolats ont été identifiés par observation macroscopique et microscopique. En se basant sur les clés d'identification de Pitt (1979), Barnett et Hunter (1998), Samson *et al.* (2002), Samson et Frisvad (2004), Sugita *et al.* (2003), Zalar *et al.* (2005), 120 isolats ont été identifiés et classés dans 20 genres appartenant à 5 ordres de la division Ascomycota et 2 ordres de la division Basidiomycota (tableau 6). L'aspect macroscopique et/ou microscopique des représentants de chaque genre sélectionnés pour une identification moléculaire sont présentés dans les figures numérotées de 12 à 27.

Tableau 6: Identification morphologique des isolats

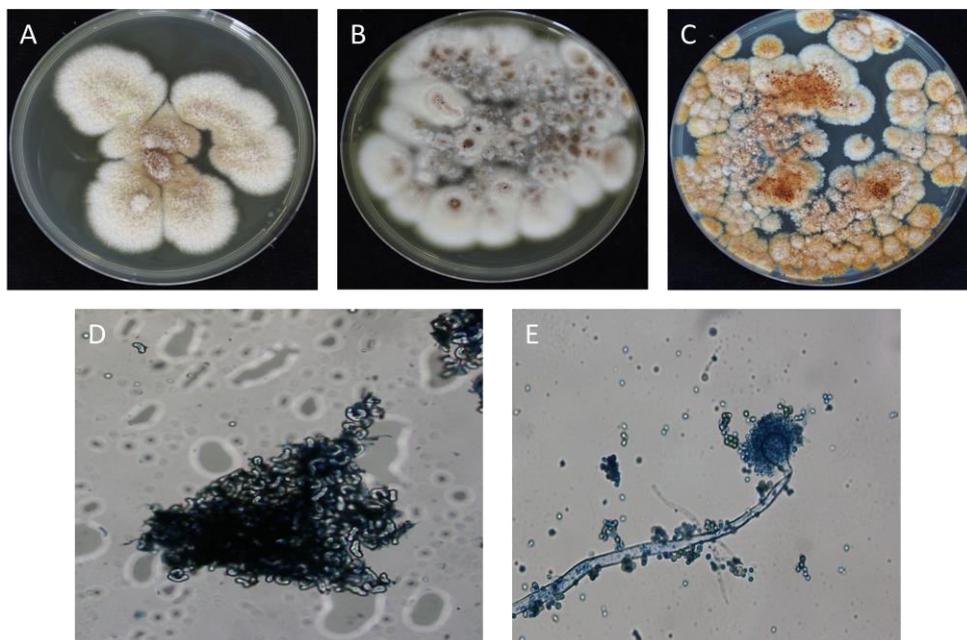
Identification morphologique	Isolats
<b>Eurotiales</b>	
<i>Aspergillus</i>	S20, S11
<i>Aspergillus ustus</i>	S1, S13, S15, H25, H17
<i>Penicillium</i>	S16, G17, D6, E15, H32, S17, S10, R9, C2, H36, E10, E17, S18, S30, S19, S22, H22
<i>Eurotium</i>	D1, D8, D12, C9, R12, R31, H11, H12, H30, E1, E4
<i>Eupenicillium</i>	S12, D2, R32, R33, E9, E3, E8, E11, H3, H4, B9, D20, D23, R15, D30
<i>Talaromyces</i>	H2, H6, H7, H8, H9, H35
<b>Hypocreales</b>	
<i>Fusarium</i>	B7, B8, R23, R30, R17, R16, S5, D3, S6, G3, B4, R4, R21, R22, R26, R10, D4, G4, R11, R18, D17, R38, G1, S8, S7, S9, R1
<i>Acremonium</i>	R8, C1, H13, E6
<i>Trichoderma</i>	S2, G15
<i>Peacilomyces</i>	B1, C5
<i>Myrothecium</i>	R5
<i>Gliocladium</i>	S3
<i>Verticillium</i>	R29, C3, C6
<i>Beauveria</i>	R13
<b>Microascales</b>	
<i>Microascus</i>	B5
<b>Pleosporales</b>	
<i>Alternaria</i>	G5, R2, G8, H34, H39, H37, H5, H16
<i>Stemphylium</i>	R3, H43
<i>Helminthosporium</i>	R20, H28
<b>Capnodiales</b>	
<i>Cladosporium</i>	R36, R25, G9, D32, H23, H24, E5
<b>Basidiomycètes</b>	
<i>Wallemia</i>	H15
<i>Ustilago</i>	H14, H26
Non identifiées	A1, A2, A3, A4, E2, E7, R6, R7, H19, H20, H1, H38, H42, H10, H18, B2

### 2.1.1. Division Ascomycota

- **Ordre des Eurotiales**

#### **Genre *Aspergillus***

Sept isolats ont été classés parmi le genre *Aspergillus*. Cette identification a été basée sur l'aspect poudreux des colonies et l'observation microscopique de filaments hyalins cloisonnés et des têtes aspergillaires formées sur des conidiophores non cloisonnés. La présence de cellules de Hülle hyalines, des conidiophores à parois lisses et des conidies globuleuses et rugueuses chez 5 isolats d'*Aspergillus* a permis de les identifier comme *Aspergillus ustus* (fig. 12).

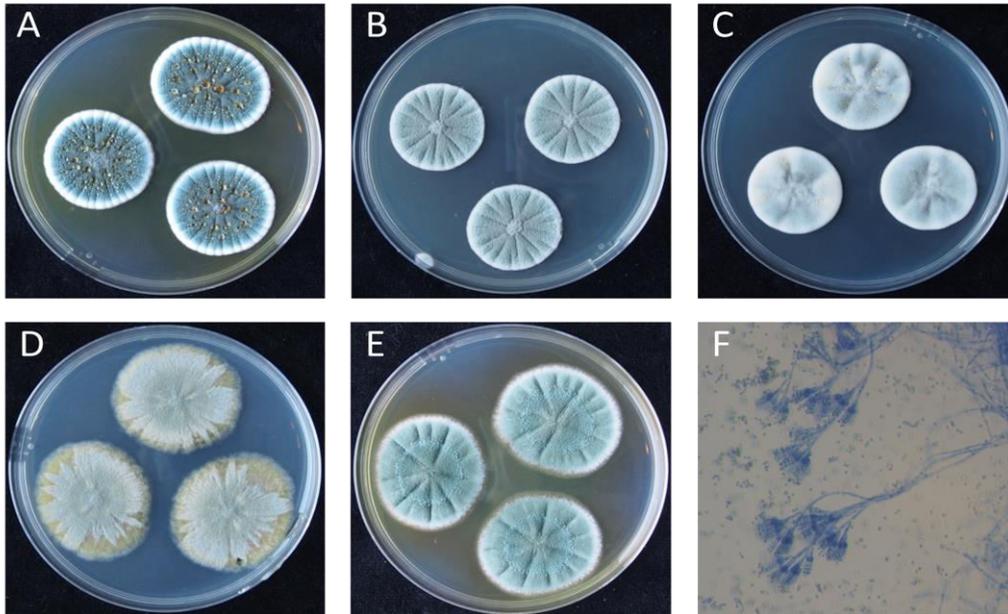


**Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* sp.**

**A : souche S11, B : souche S15, C : souche S20, D : cellules de Hülle,  
E : tête aspergillaire**

#### **Genre *Penicillium***

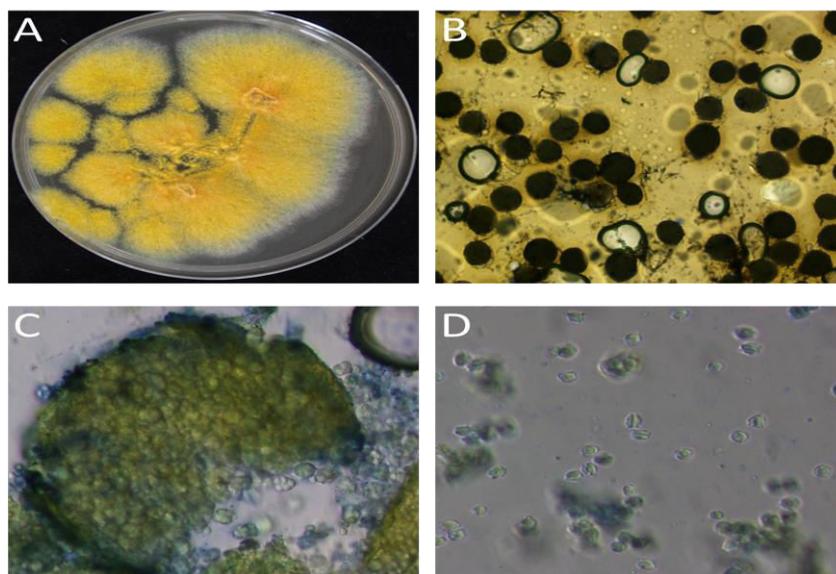
Dix-sept isolats ont été classés parmi le genre *Penicillium* en se basant sur l'observation microscopique de phialides en pinceau productrices de longues chainettes de spores rondes, placées sur des métules portées par des conidiophores ramifiés (fig. 13).



**Figure 13 : Aspect macroscopique et microscopique de *Penicillium sp.***  
**A : souche S16, B : souche S17, C : souche S18, D : souche S19, E : souche H22,**  
**F : spores et phialides en pinceau.**

### **Genre *Eurotium***

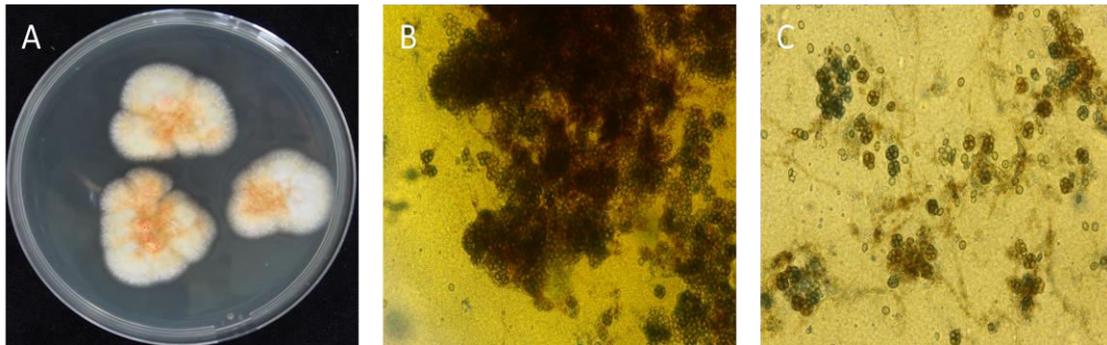
Onze isolats appartiennent au genre *Eurotium*, une forme sexuée d'*Aspergillus*. La présence de cleistothèses et des asques globuleux et des ascospores unicellulaires lenticulaires et rugueuses avec un sillon équatorial ainsi que leur caractère xérophilique nous a permis de les classer parmi ce genre (fig. 14).



**Figure 14 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Eurotium sp.***  
**A : souche H12, B : cleistothèses, C : cleistothèses et asques, D : ascospores avec un**  
**sillon équatorial**

### Genre *Talaromyces*

Six isolats ont été identifiés comme *Talaromyces*, une forme sexuée de *Penicillium*. Cette identification a été basée sur l'observation microscopique de gymnothèse globuleux jaunâtre ou rosâtre à parois faites d'un feutrage de filaments lâches et jaunâtre. Asques ellipsoïdaux à subglobuleux. Ascospores échinulées jaunes ou rougeâtres à parois épaisses (fig.15).



**Figure 15 : Aspect macroscopique et microscopique de *Talaromyces sp.*  
A : souche H2, B : gymnothèse et asques, C : asque et ascospores**

### Genre *Eupenicillium*

Quinze isolats ont été identifiés comme *Eupenicillium*, une deuxième forme sexuée de *Penicillium*. Les cultures de ces isolats étaient caractérisées par un aspect cotonneux d'une couleur blanchâtre au cours du deuxième ou du troisième jour de la culture. À la fin de la semaine, les cultures donnaient un aspect brun et granuleux. L'observation microscopique a mis en évidence la présence de cleistothèces à parois lisses et de couleurs vives. Ces cleistothèces qui sont dures et macroscopiques donnant la couleur brune et l'aspect granuleux aux colonies donnent de nombreux asques à huit ascospores après maturation. Les ascospores sont unicellulaires, échinulées, lenticulaires, entourées d'une épaisse couche externe et un sillon équatorial (fig. 16).

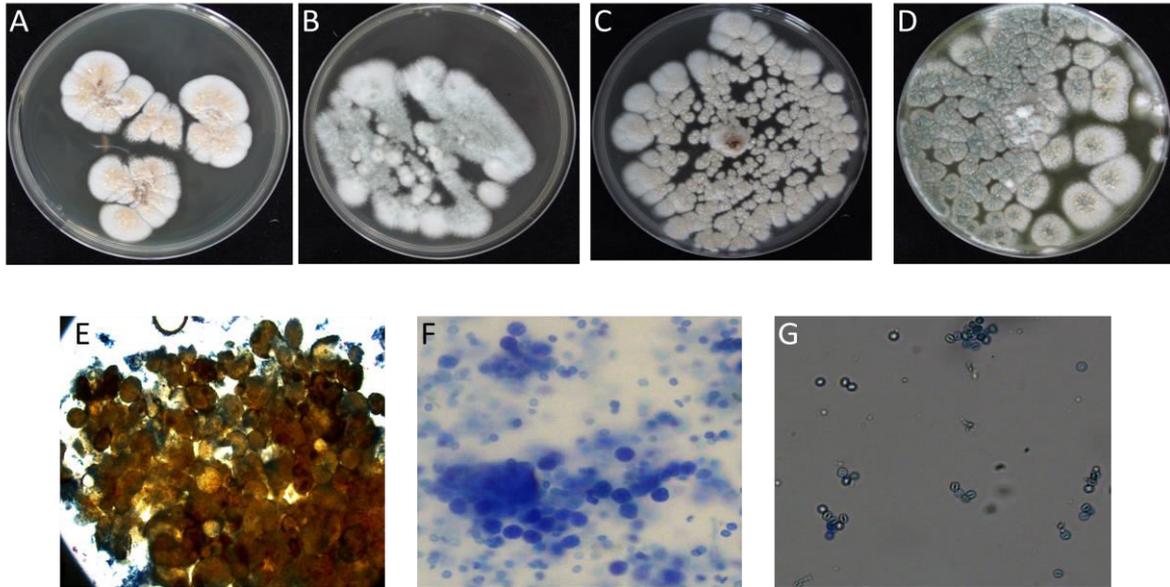


Figure 16 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Eupenicillium sp.*

A : souche E9, B : souche R32, C : R33, D : S12, E : cleistothèses, F : asques et ascospores, G : ascospores avec un sillon équatorial

- **Ordre des Hypocreales**

**Genre *Fusarium***

vingt sept isolats présentaient des colonies cotonneuses, à l'exception de deux isolats qui avaient un aspect ras, de couleur qui varie du blanc crème au rose violet avec une vitesse de croissance moyenne. L'observation microscopique a révélé la présence de macroconidies et/ou des microconidies fusiforme cloisonnées transversalement de taille différente et des chlamydospores en chaine chez quelques isolats. Ces isolats ont été identifiés comme *Fusarium sp.* (fig. 17).

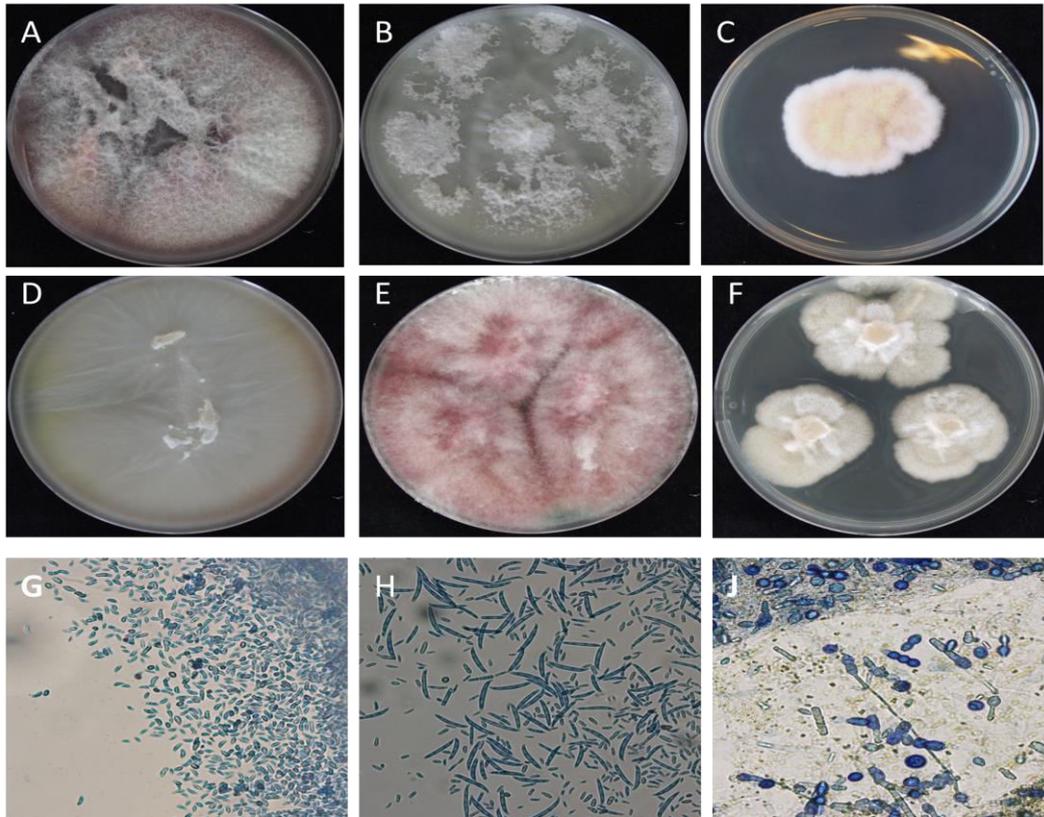


Figure 17 : Aspect macroscopique et microscopique de *Fusarium sp.*

A : souche B8, B : souche D3, C : souche S8, D : souche S7, E, souche R38, F : souche R1,  
G : microconidies, H : macroconidies, J : chlamydospores

### Genre *Trichoderma*

La croissance rapide et l'aspect verdâtre des colonies de 2 isolats a permis de les classer parmi les *Trichoderma sp.* Cette identification a été confirmée par l'observation microscopique de conidiophores hyalins non verticillé ramifiés à angle droit par rapport à l'axe principal et des phialides ovoïdes isolés ou en groupes donnant naissance à des conidies unicellulaires hyalines rondes lisses de couleur verte produites en masses au sommet des phialides (fig. 18).

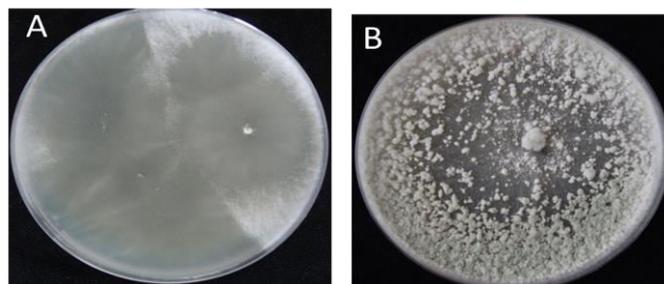


Figure 18 : Aspect macroscopique de *Trichoderma sp.*

A: souche S2, B : souche G15

### Genre *Acremonium*

L'observation de colonies blanchâtres devenant rose pâle à croissance lente, veloutées spécialement au centre et la présence de conidies cylindrique droites hyalines à paroi lisse produites au sommet des conidiophores solitaires qui prennent naissance à angle droit des hyphes et l'absence de chlamydospores ont permis de classer 4 isolats parmi le genre *Acremonium* (fig. 19).

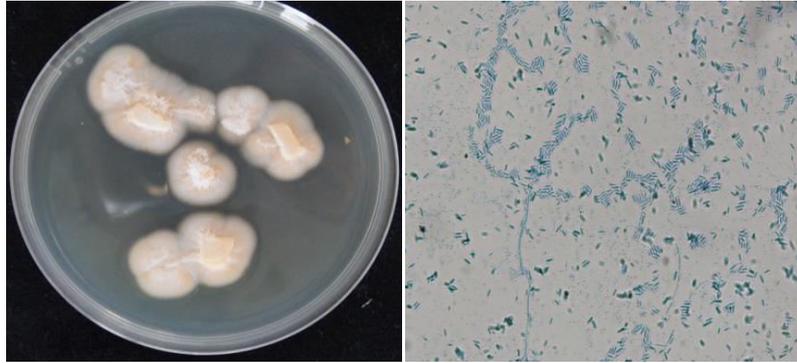


Figure 19 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Acremonium sp.* souche R8

### Genre *Verticillium*

Trois isolats caractérisés par une croissance modérément rapide, des colonies blanches au début de la croissance, avec un mycélium aérien, des conidies unicellulaires ellipsoïdales, hyalines, produites à l'extrémité de cellules conidiogènes longues et étroites sur des conidiophores minces, hyalins, verticillés ont été identifiés comme *Verticillium sp.*(fig. 20).

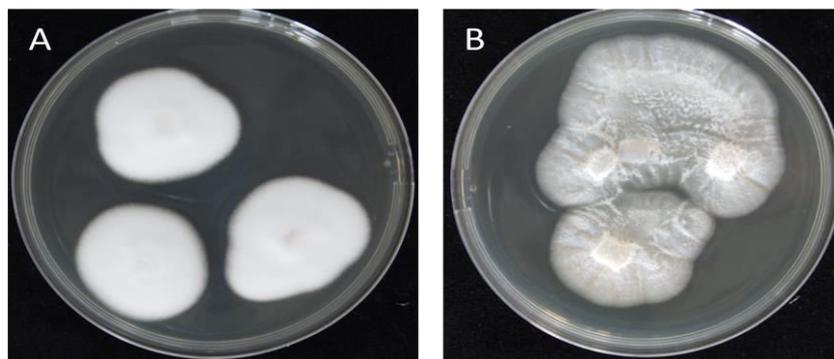


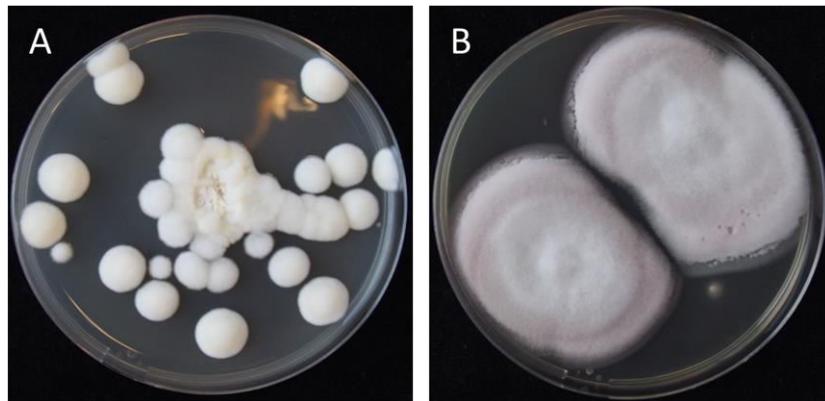
Figure 20 : aspect macroscopique de *Verticillium sp.* souche R29 (A) et C3 (B).

**Genre *Beauveria*, *Peecilomyces*, *Gliocladium*, *Myrothecium***

Cinq isolats ont été identifiés comme *Beauveria sp.*, *Peecilomyces sp.*, *Gliocladium sp.* et *Myrothecium sp.* (fig. 21, 22, 23).

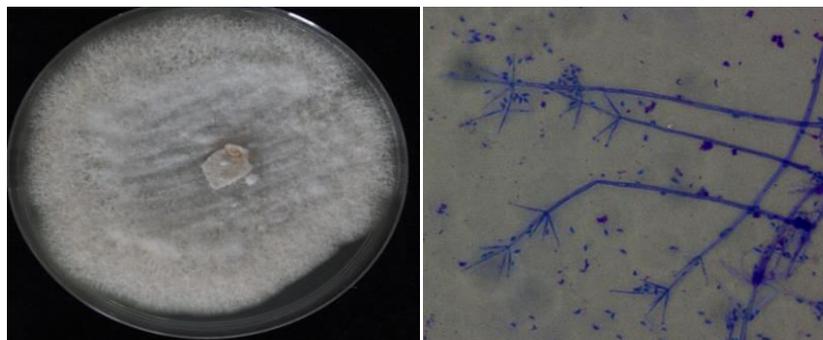
*Beauveria sp.* est caractérisé par une colonie à croissance lente d'aspect poudreux, blanche au départ puis devenant jaunâtre, des conidiophores à base renflée et à extrémité terminale en zig-zag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires.

*Peecilomyces sp.* est caractérisé par une colonie à croissance lente d'aspect laineux à poudreux, des conidiophores ramifiés en verticilles portant des phialides renflées dans la partie inférieure et à col long. Les conidies unicellulaires, ovoïdes, sont disposées en très longues chaînes.



**Figure 21 : Aspect macroscopique de *Beauveria sp.* souche R13 (A) et *Peecilomyces sp.* souche B1 (B).**

La colonie de *Gliocladium sp.* est duveteuse de couleur rose à saumon et à croissance rapide. Les conidiophores sont ramifiés en forme de pinceaux. Les conidies unicellulaires lisses hyalines ou légèrement colorées sont agglomérées en une tête commune à toutes les phialides d'un pinceau formant une masse mucilagineuse.



**Figure 22 : Aspect macroscopique et microscopique de *Gliocladium sp.* souche S3**

La colonie de *Myrothecium sp.* est floconneuse de couleur blanche devenant noirâtre. Les conidiophores sont subhyalins ramifiés à plusieurs reprises groupés en sporodochies et portent des conidies terminales unicellulaires subhyalines lisses ovoïdes pourvues d'un appendice en éventail.

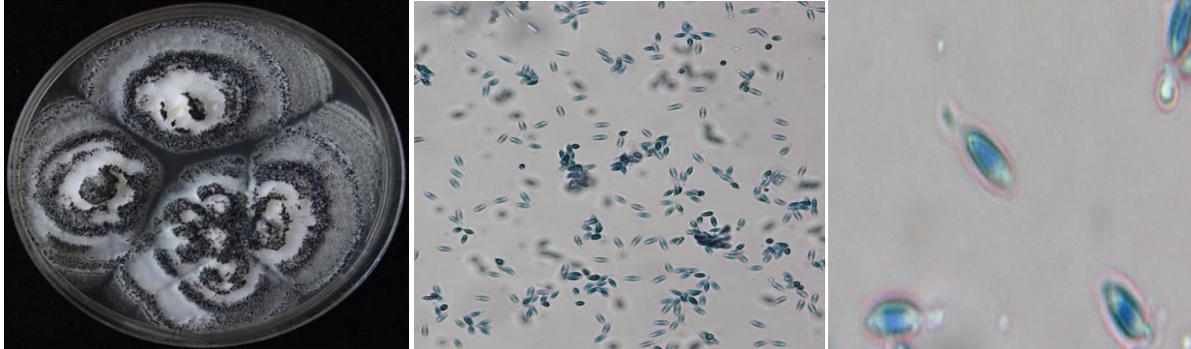


Figure 23 : Aspect macroscopique et microscopique de *Myrothecium sp.* souche R5

- **Order des Microascales**

Un isolat appartient à l'ordre des Microascales genre *Microascus* qui se caractérise par des conidiophores hyalins simple ou ramifié et des conidies unicellulaires hyalines aplaties à la base et arrondi à l'apex formées en chaînes (fig. 24).

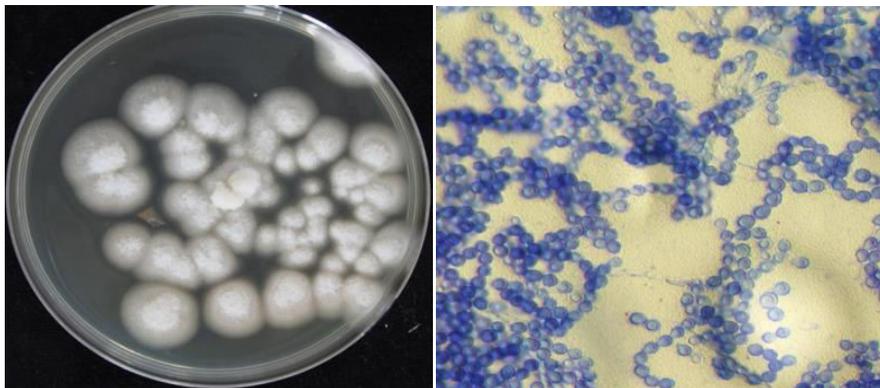


Figure 24 : Aspect macroscopique et microscopique de *Microascus sp.* souche B5.

- **Ordre des Pleosporales et Capnodiales**

Douze isolats ont été classé parmi les Pleosporales, 8 isolat d'*Alternaria*, 2 isolats d'*Helminthosporium* et 2 isolats de *Stemphylium*, et 7 isolats parmi les Capnodiales, genre *Cladosporium*.

Ces quatre genres se caractérisent par un mycélium cloisonné très coloré et des spores pluricellulaires. La forme et le mode d'association des spores diffèrent entre ces genres. *Alternaria* forme des conidies cloisonnées dans les deux sens et en chaîne alors que les conidies d'*Helminthosporium* sont cylindriques cloisonnées transversalement en plus de

deux loges et isolées. Les spores de *Stemphylium* sont globuleuses, isolées et cloisonnées dans les deux sens. *Cladosporium* se caractérise par des conidiophores ramifiés et des conidies unicellulaires ou bicellulaires produites en chaînes acropétales de forme et de taille variables, ovoïdes à cylindriques (fig. 25).

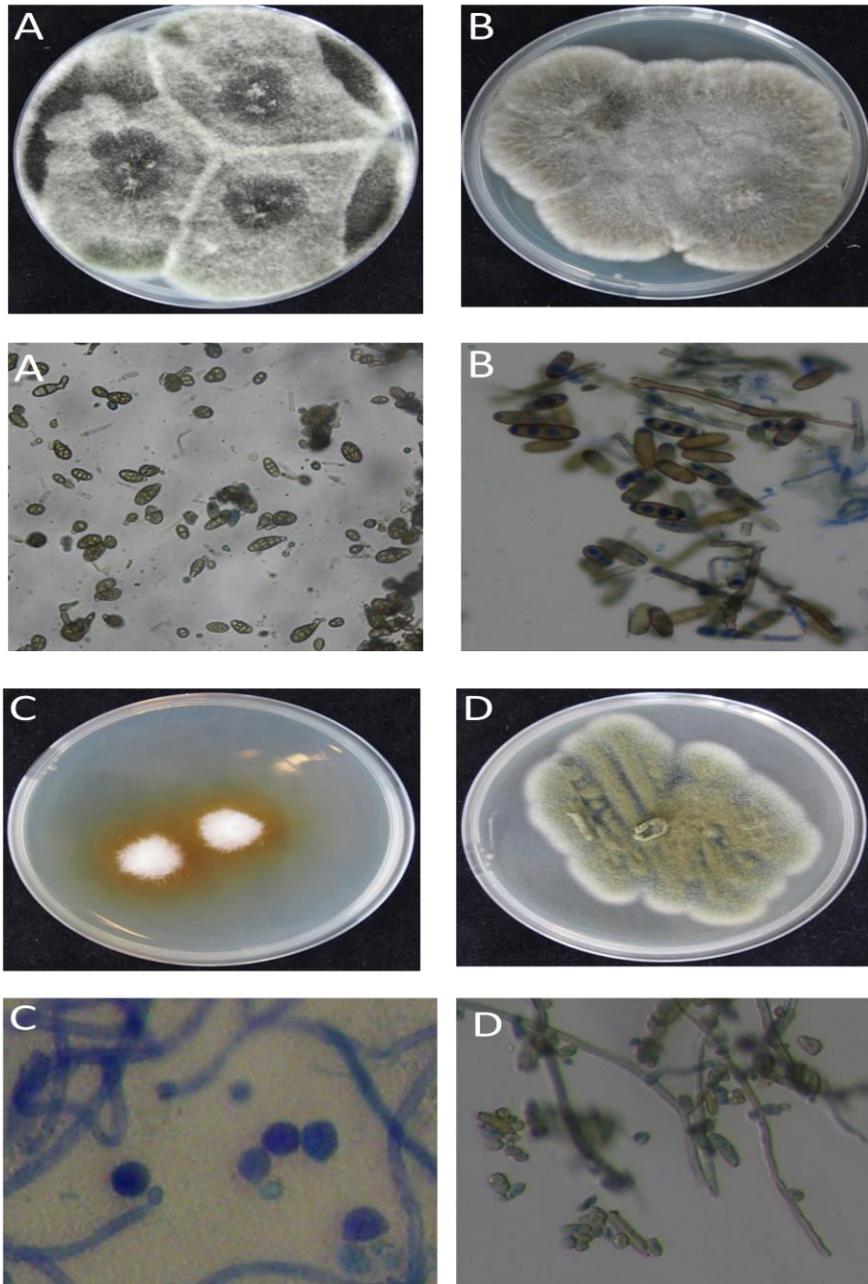


Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Alternaria sp.* souche G5 (A), *Helminthosporium sp.* souche R20 (B), *Stemphylium sp.* souche R43 (C), *Cladosporium sp.* souche R36 (D).

### 2.1.2. Division Basidiomycota

- **Ordre des Wallemiales**

Un isolat a été identifié comme *Wallemia sp.*. cet isolat est xérophilique qui se caractérise par une colonie à croissance très lente, de couleur brune, punctiformes et poudreuses en masse, des hyphes hyalins et des conidies unicellulaires, brun pâle, initialement cubiques, devenant rapidement sphériques à parois verruqueuses (fig. 26).



Figure 26 : Aspect macroscopique de *Wallemia sp.* souche H15

- **Ordre des Ustilaginales**

Deux isolats ont été identifiés comme *Ustilago sp.* qui se caractérise par des colonies blanc-orange et ridées. Sous le microscope, ces isolats montrent des levures fusiformes qui bourgeonnent formant des blastoconidies allongées et ellipsoïdales (fig. 27).

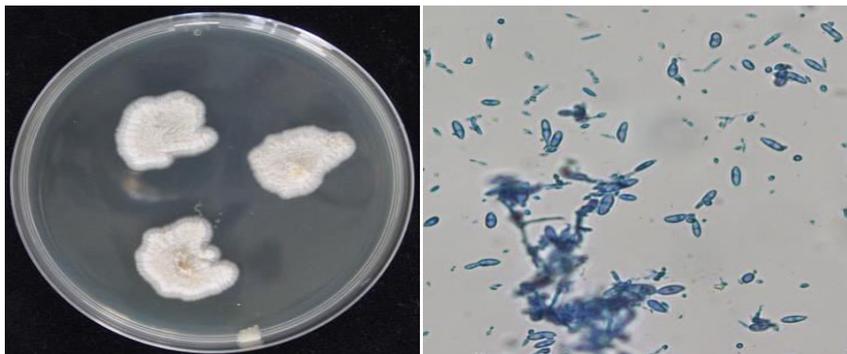


Figure 27 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Ustilago sp.* souche H14.

### 2.1.3 Isolats non identifiés

Seize isolats n'ont pas été identifiés par observation macroscopique et microscopique, ces isolats avaient un mycélium stérile à l'exception des souches B2, H10 et H18. L'aspect macroscopique des isolats non identifiés sélectionnés pour une identification moléculaire est représenté dans la figure 28.

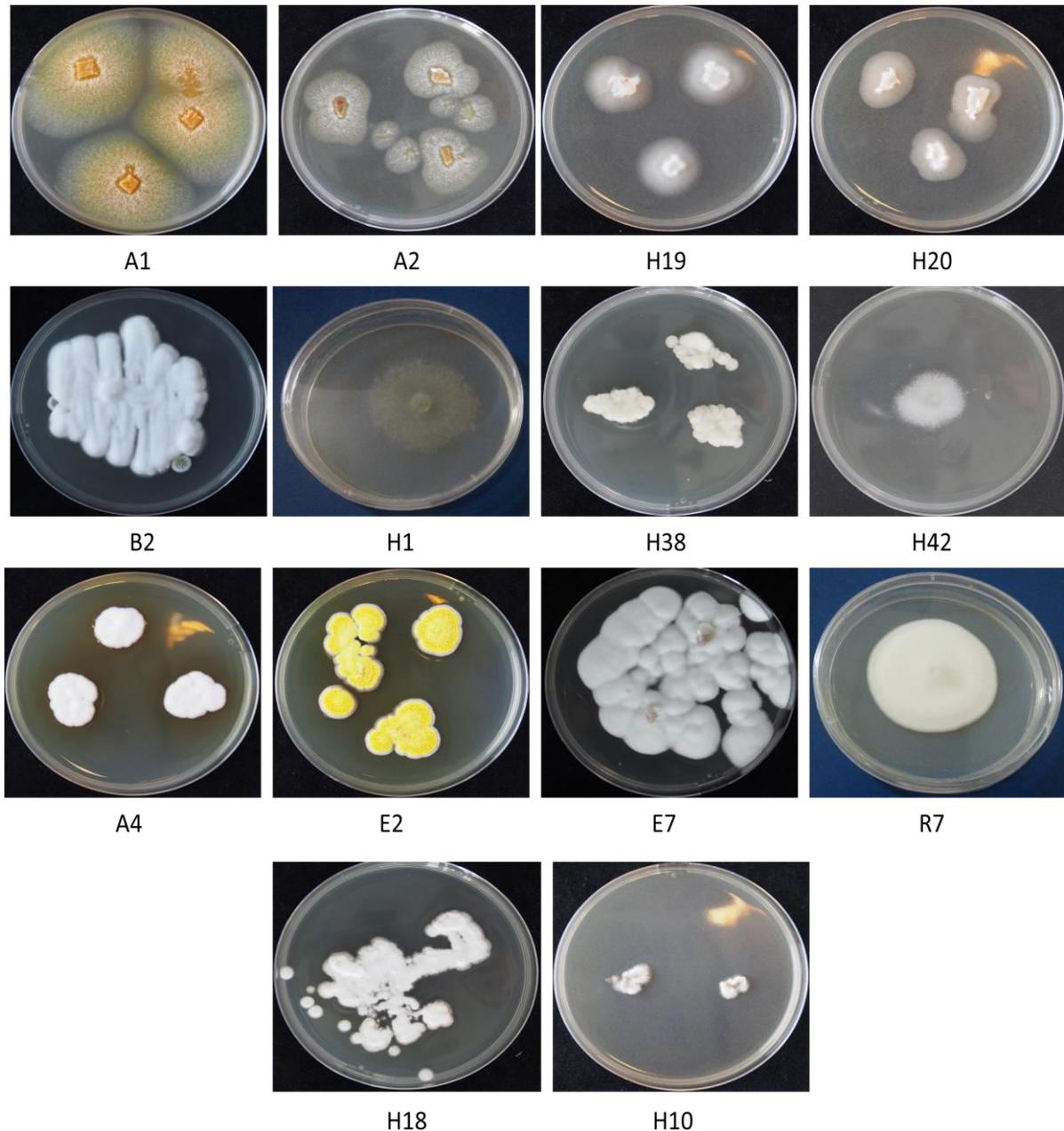


Figure 28 : Aspect macroscopique des isolats non identifiés morphologiquement

## 2.2. Identification moléculaire et phylogénétique

Les isolats non identifiés par observation microscopique ont été identifiés en premier par leurs séquences d'ITS. L'analyse de ces séquences a montré que les isolats A1, A2, A4, E2, E7 appartiennent au genre *Aspergillus*, l'isolat R7 au genre *Penicillium*, les deux isolats H19 et H20 au genre *Gymnoascus*, les isolats H1, H38 et H42 au genre *Chaetomium*, l'isolat H10 au genre *Arachnomyces*, l'isolat H18 au genre *Chrysosporium* et l'isolat B2 aux genres *Tritirachium*, *Engyodontium* et *Parengyodontium*.

### 2.2.1. Ordre des Eurotiales

Le gène  $\beta$ -tubuline a été utilisé pour identifier les espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (tableau 7 et 8). L'analyse de cette séquence a permis d'identifier les souches de *Penicillium* S16, S17, S18, S19 H22, R7, S12 et E9 jusqu'à l'espèce comme: *P. flavigenum*, *P. griseofulvum*, *P. canescens*, *P. mariae-crucis*, *P. allii*, *P. vinaceum*, *P. longicatenatum* et *P. egyptiacum* respectivement avec un pourcentage de similarité  $\geq 97\%$ . L'espèce des deux souches R32 et R33 n'a pas été identifiée en se basant uniquement sur les séquences de  $\beta$ -tub. Ces séquences ont montré une similitude  $\geq 97\%$  avec les deux espèces *P. egyptiacum* et *P. kewense*. Afin de pouvoir identifier l'espèce de ces deux souches, les gènes ITS, CaM et RPB2 ont été séquencés et analysés. L'ITS a donné le même résultat que le  $\beta$ -tub alors que les séquences du RPB2 et CaM ont été similaires à 99% avec celles de *P. sinaicum*. Une étude phylogénétique de chaque gène et une étude concaténée des quatre gènes (ITS,  $\beta$ -tub, Cam, RPB2) ont ensuite été effectuées. Les résultats des études phylogénétiques sont représentés dans les figures 29, 30, 31 et 32.

Tableau 7: Identification moléculaire des souches de *Penicillium*.

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
S16	$\beta$ -tub	451	<i>Penicillium flavigenum</i>	98	MK361164
S17	$\beta$ -tub	452	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100	MK361165
S18	$\beta$ -tub	451	<i>Penicillium canescens</i>	97	MK361166
S19	$\beta$ -tub	509	<i>Penicillium mariae-crucis</i>	100	MK361167
H22	$\beta$ -tub	408	<i>Penicillium allii</i>	100	MK361168
R7	ITS	537	<i>Penicillium rubidurum</i>	100	
			<i>Penicillium pimateouiense</i>	99	
<i>Penicillium vinaceum</i>			99		
	$\beta$ -tub	463	<i>Penicillium vinaceum</i>	99	MK361169
E9	$\beta$ -tub	445	<i>Penicillium egyptiacum</i>	99	MK361170
S12	$\beta$ -tub	450	<i>Penicillium longicatenatum</i>	99	MK361171
R32	ITS	574	<i>Penicillium egyptiacum</i>	99	
			<i>Penicillium kewense</i>	99	
	$\beta$ -tub	446	<i>Penicillium egyptiacum</i>	98	MK361172
			<i>Penicillium kewense</i>	98	
RPB2	925	<i>Penicillium sinaicum</i>	99		
CaM	403	<i>Penicillium sinaicum</i>	99		
R33	ITS	571	<i>Penicillium egyptiacum</i>	99	
			<i>Penicillium kewense</i>	99	
	$\beta$ -tub	474	<i>Penicillium egyptiacum</i>	97	MK361173
			<i>Penicillium kewense</i>	98	
RPB2	922	<i>Penicillium sinaicum</i>	99		
CaM	400	<i>Penicillium sinaicum</i>	99		

Selon l'étude phylogénétique de chaque gène, l'ITS n'était pas suffisamment variable pour distinguer les espèces de *Penicillium* de la section *Chrysogena*,  $\beta$ -tub a classé les deux souches avec l'espèce *P. egyptiacum* alors que CaM et RPB2 ont apparenté les deux souches à l'espèce *P. sinaicum*.

L'étude concaténée des quatre gènes n'a apparenté les deux souches à aucune espèce. Une étude phylogénétique des gènes concaténés a été ensuite réalisée pour le clade *P. egyptiacum*, *P. sinaicum* et *P. kewense*, ce qui a permis de bien visualiser la position taxonomique des souches R32 et R33 parmi ces espèces. Selon cet arbre concaténé, les souches R32 et R33 forment une branche séparée des autres espèces avec une valeur de bootstrap de 100%. Ces deux souches peuvent être une nouvelle espèce de *Penicillium* appartenant à la section *Chrysogena* clade *P. egyptiacum*, *P. sinaicum*, *P. kewense* qui se caractérise par une reproduction sexuée.

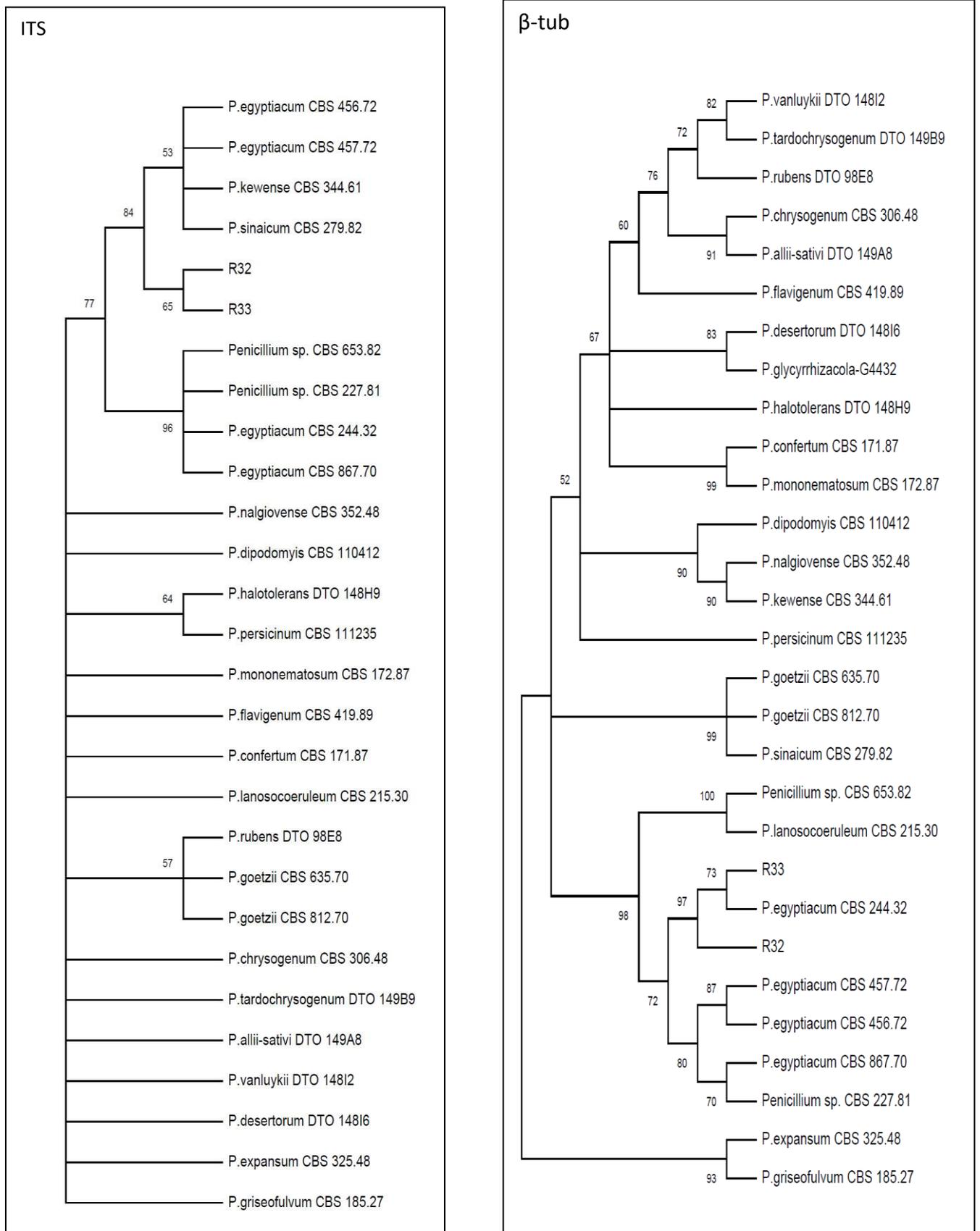


Figure 29 : Arbres phylogénétiques basés sur l'ITS et β-tub des souches R32 et R33

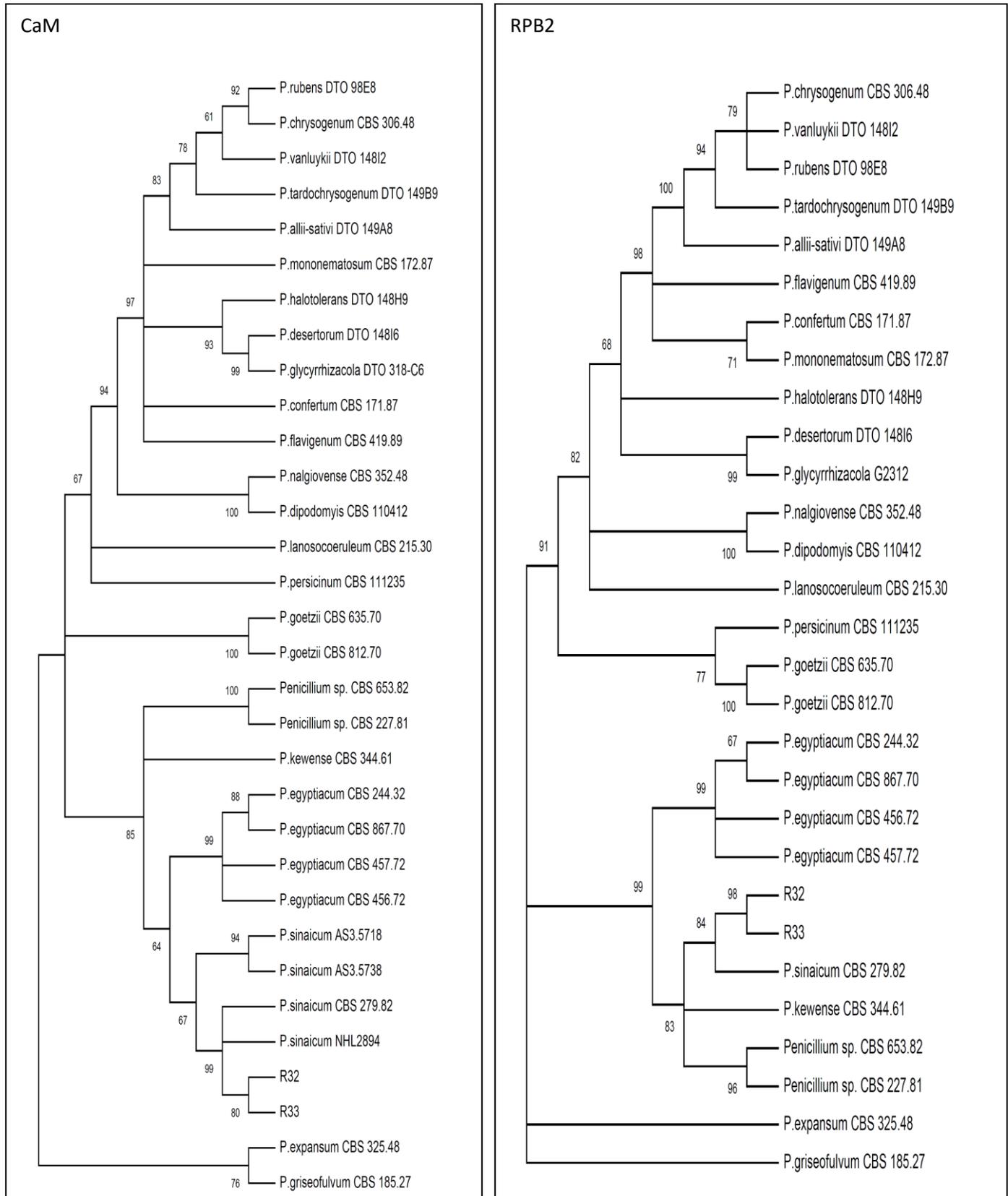


Figure 30 : Arbres phylogénétiques basés sur CaM et RPB2 des souches R32 et R33

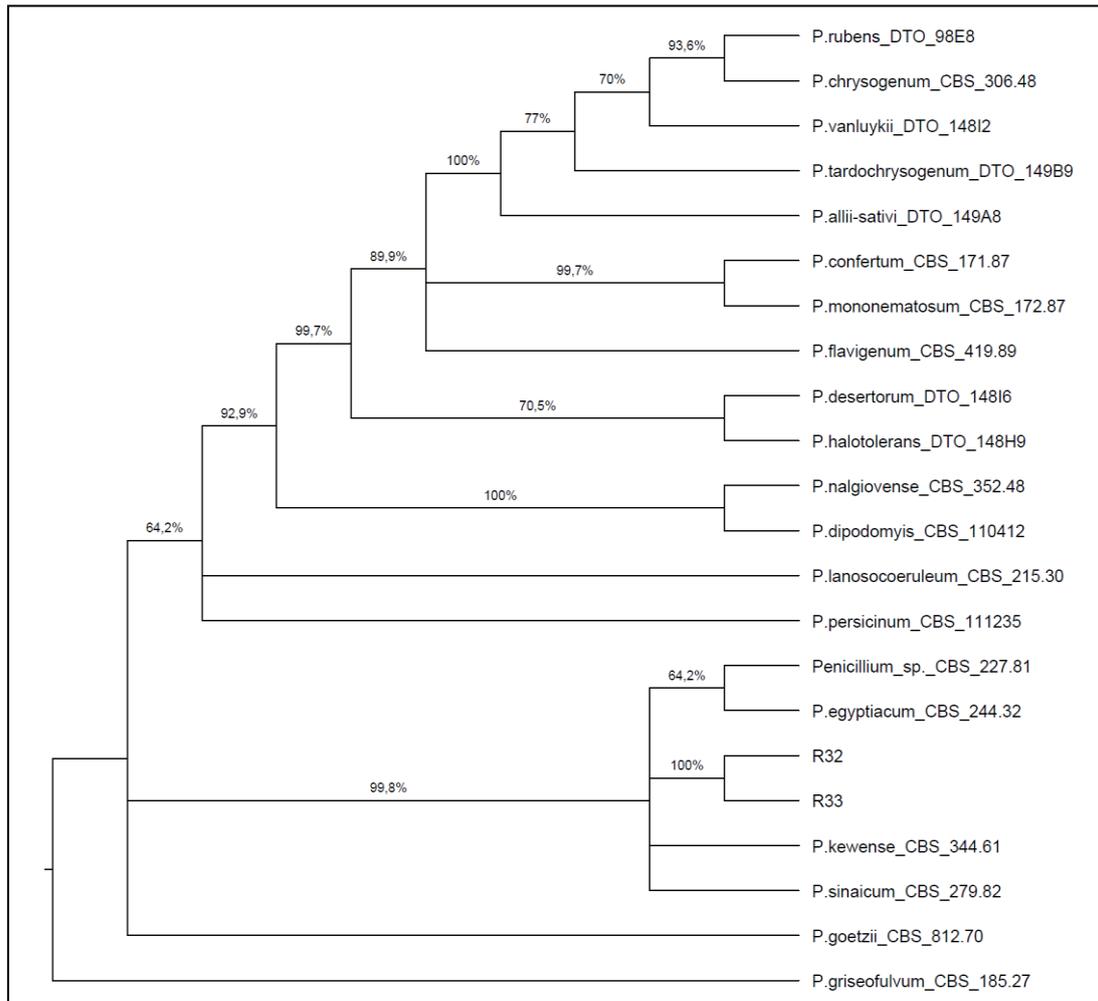


Figure 31: Arbre phylogénétique concaténé à base d'ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 des souches R32 et R33

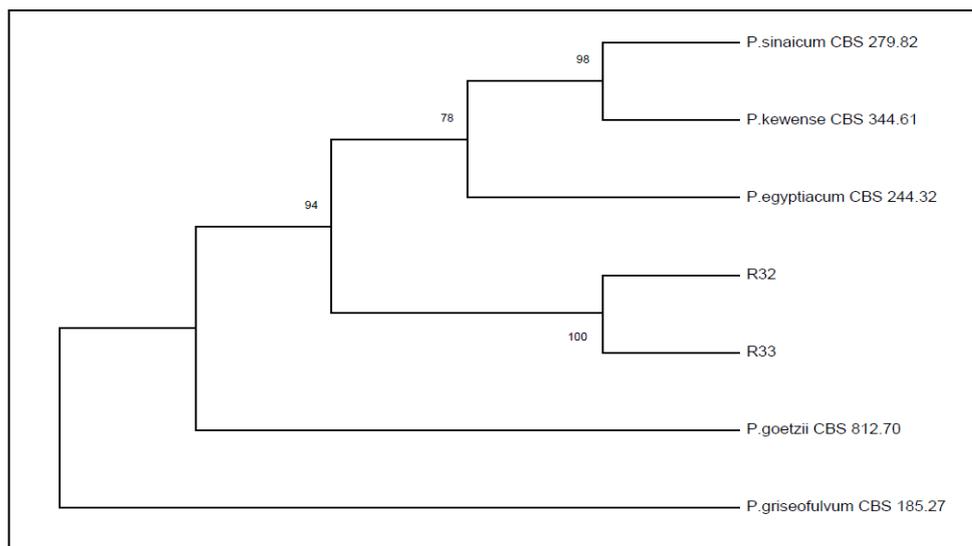


Figure 32 : Arbre phylogénétique concaténé à base d'ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 montrant la position des souches R32 et R33 dans le clade *P. egyptiacum*, *P. sinaicum*, *P. kewense*

L'analyse de la séquence de  $\beta$ -tub des souches d'*Aspergillus* a permis d'identifier les souches S11, S15, S20 et H12 comme *A. terreus*, *A. calidoustus*, *A. europaeus* et *A. amstelodami* respectivement avec un pourcentage de similarité  $\geq 97\%$ , les séquences des deux souches A1 et A2 ont été similaires aux espèces *A. persii* et *A. subramanianii* à plus de 97% alors que les trois souches A4 et E2 et E7 ont montrés un faible pourcentage de similarité ( $\leq 97\%$ ) avec l'espèce *A. micronesiensis*. Pour une identification plus précise de ces trois souches, les séquences de RPB2 et CaM ont été analysées. Le RPB2 a donné le même résultat obtenu avec  $\beta$ -tub mais avec un pourcentage de similarité de 97%. Le résultat du CaM était différent en identifiant les trois souches comme *Aspergillus neoflavipes* mais avec un faible pourcentage de similarité de 94% (tableau 8).

**Tableau 8: Identification moléculaire des souches d'*Aspergillus*.**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
A1	ITS	598	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus bridgeri</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100 99 99	MK361155
	TUB	545	<i>Aspergillus persii</i> <i>Aspergillus subramanianii</i>	98 99	
A2	ITS	602	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus bridgeri</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100 99 99	MK361156
	TUB	506	<i>Aspergillus persii</i> <i>Aspergillus subramanianii</i>	98 98	
S11	TUB	535	<i>Aspergillus terreus</i>	100	MK361157
S15	TUB	447	<i>Aspergillus calidoustus</i>	99	MK361158
S20	TUB	469	<i>Aspergillus europaeus</i>	99	MK361159
H12	TUB	429	<i>Aspergillus amstelodami</i>	97	MK361163
A4	ITS	581	<i>Aspergillus neoflavipes</i> <i>Aspergillus micronesiensis</i>	99 99	MK361160
	TUB	514	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	95	
	RPB2	1082	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	97	
	CaM	715	<i>Aspergillus neoflavipes</i>	94	
E2	ITS	533	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	95	MK361161
	TUB	535	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	95	
	RPB2	1060	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	97	
	CaM	600	<i>Aspergillus neoflavipes</i>	94	
E7	ITS	581	<i>Aspergillus neoflavipes</i> <i>Aspergillus micronesiensis</i>	99 99	MK361162
	TUB	493	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	95	
	RPB2	1085	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	97	
	CaM	738	<i>Aspergillus neoflavipes</i>	94	

La position taxonomique des 5 souches A1, A2, A4, E2 et E7 a été confirmée par une étude phylogénétique à base de  $\beta$ -tub pour les souches A1 et A2 et une étude phylogénétique de chaque gène (ITS,  $\beta$ -tub, CaM, RPB2) et une étude concaténée des quatre gènes pour les trois souches A4, E2 et E7.

L'arbre phylogénétique présenté dans la figure 33 confirme l'affiliation des deux souches A1 et A2 à l'espèce *A. subramanianii* avec une valeur de bootstrap de 98%.

Les résultats des arbres phylogénétiques présentés dans les figures 34, 35 et 36 montrent que les séquences d'ITS n'ont pas permis de construire un arbre phylogénétique robuste ne permettant pas une bonne distinction entre les espèces. L'analyse phylogénétique des gènes  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 et l'analyse concaténée des quatre gènes montrent que les trois souches A4, E2 et E7 forment une branche à part avec une valeur de bootstrap de 100% ce qui indique que ces trois souches représentent une nouvelle espèce d'*Aspergillus* de la section *Flavipedes*.

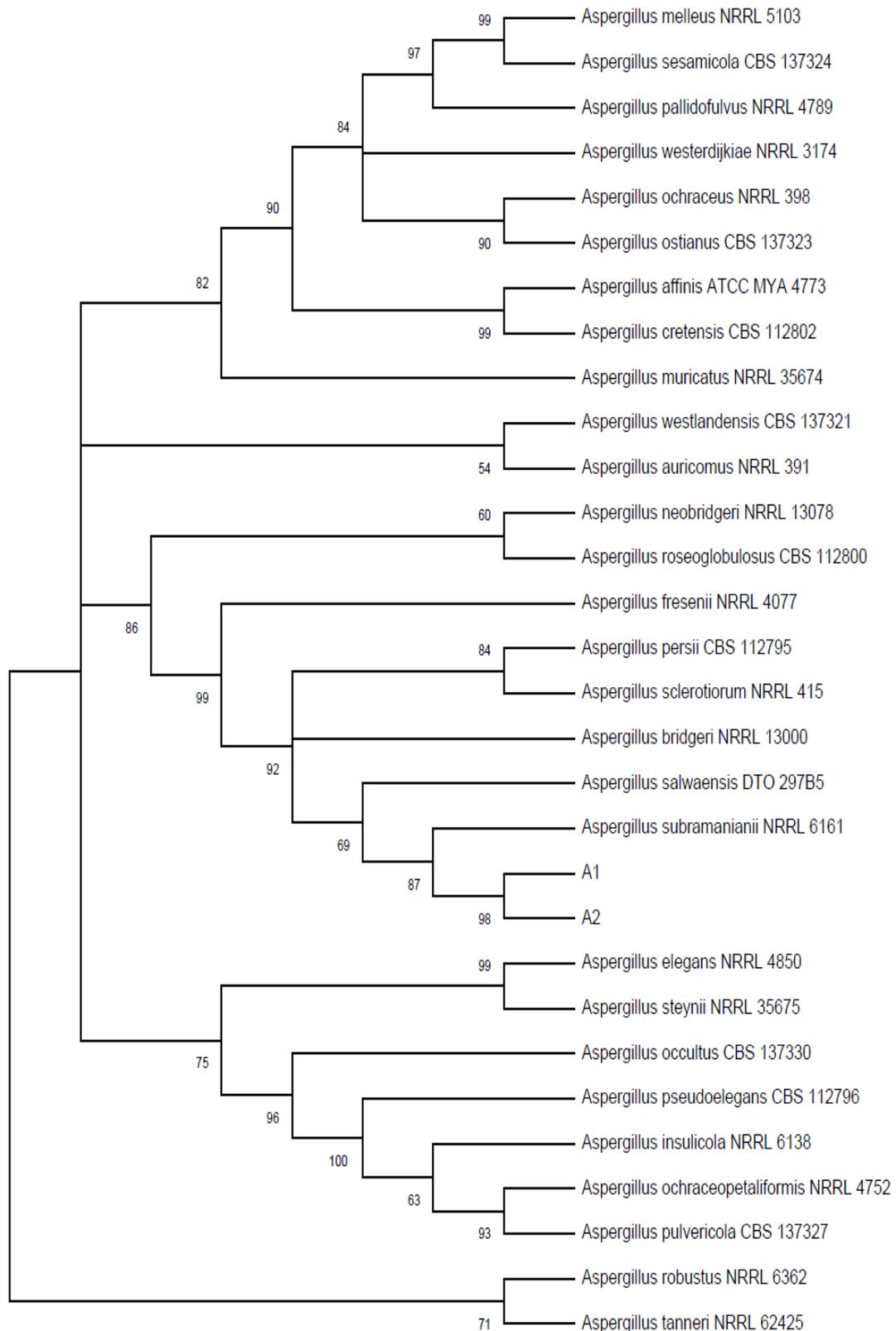


Figure 33 : Arbres phylogénétiques basés sur  $\beta$ -tub des souches A1 et A2.

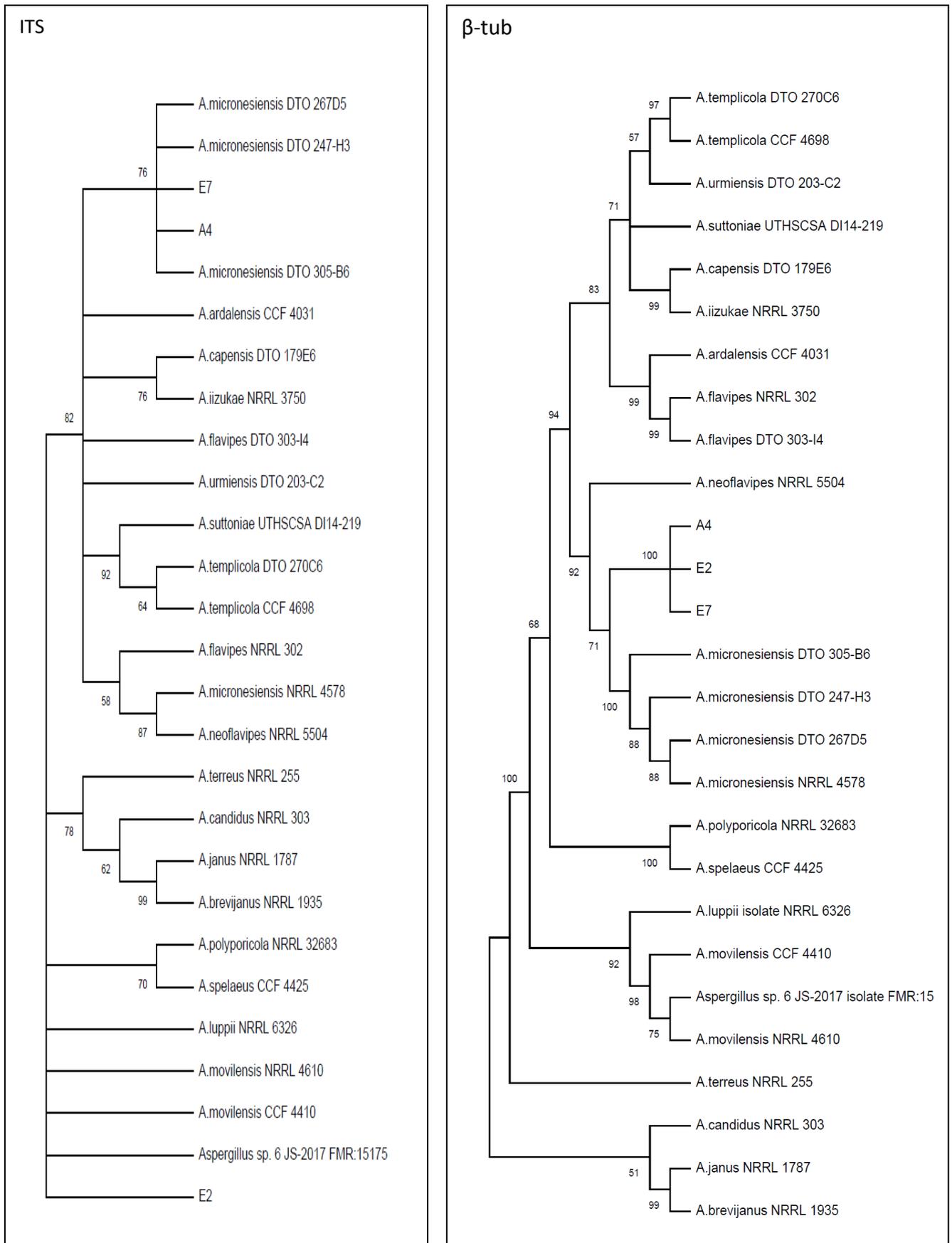


Figure 34 : Arbres phylogénétiques basés sur ITS et β-tub des souches A4, E2 et E7.

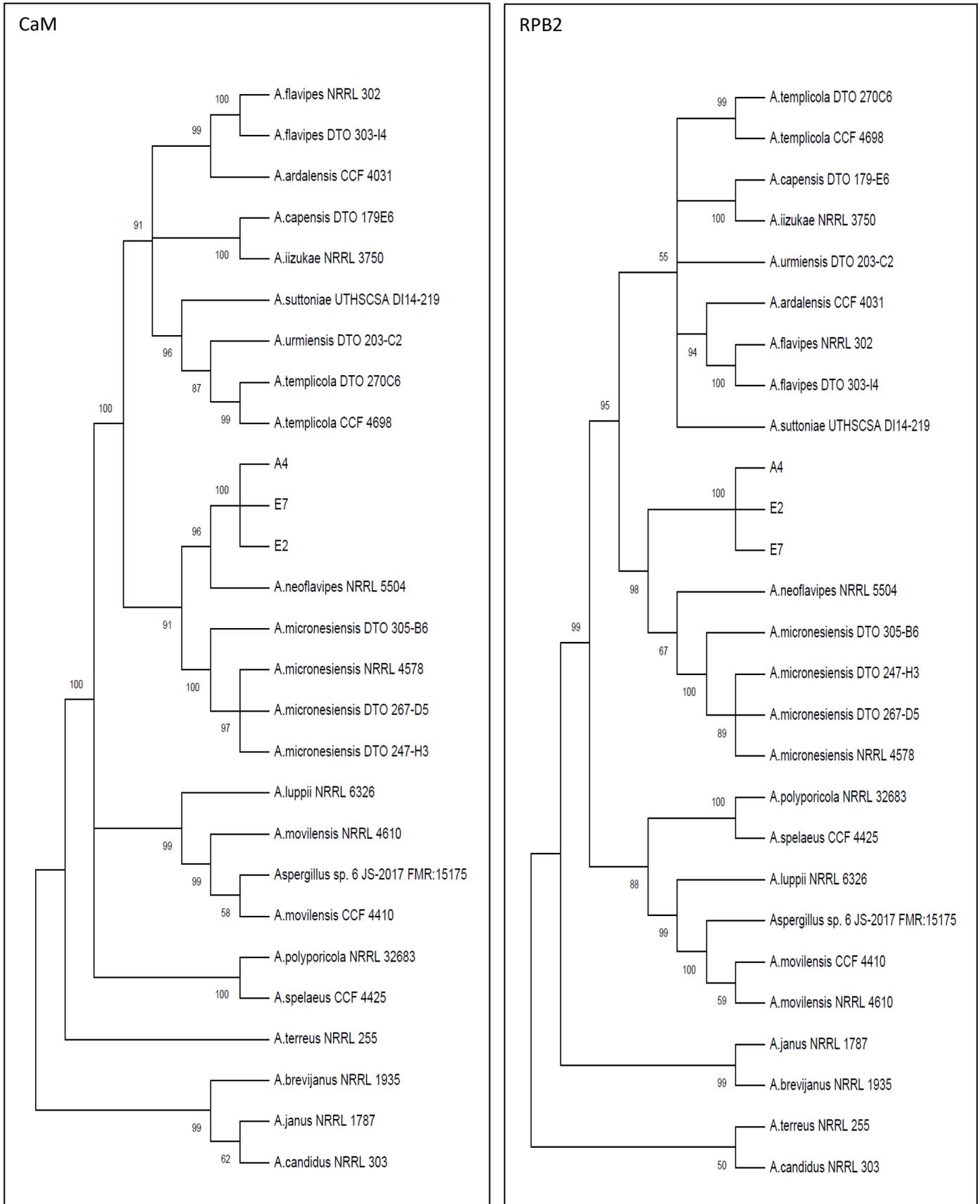


Figure 35 : Arbres phylogénétiques basés sur CaM et RPB2 des souches A4, E2 et E7.

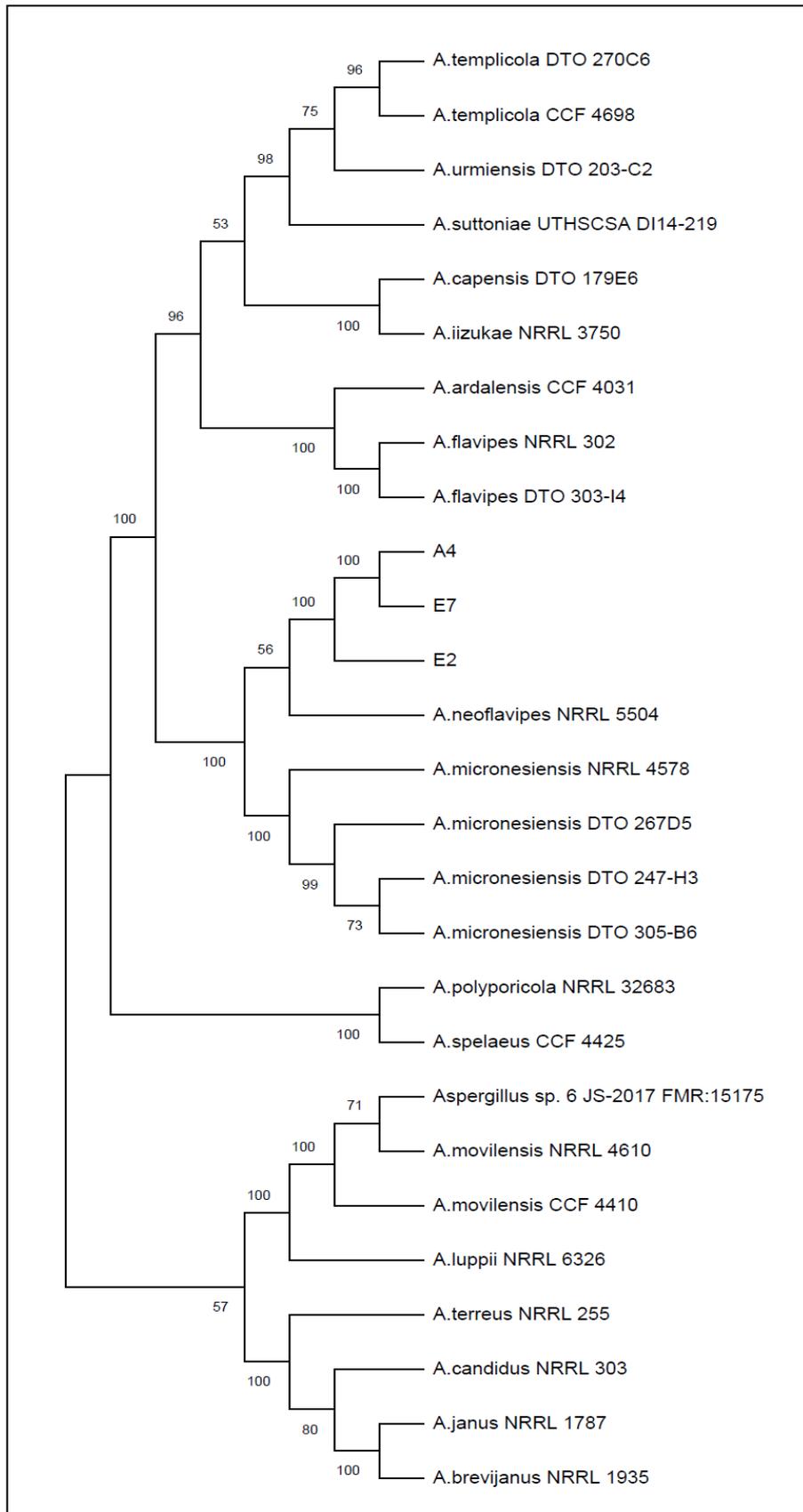


Figure 36 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 des souches A4, E2 et E7.

### 2.2.2 Ordre des Onygenales

La souche H2 identifié morphologiquement comme *Talaromyces sp.* a été identifié par l'ITS comme *Gymnoascus dankaliensis* à 100% de similarité. Les deux souches H19 et H20 ont été identifié à 100% d'ITS comme *Gymnoascus halophilus*. Les séquences d'ITS des deux souches H10 et H18 n'ont pas permis de les identifier jusqu'à l'espèce (tableau 9).

La souche H18 a une similarité de 100% avec l'espèce non identifiée *Chrysosporium sp.* SA2013. Selon l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 37, la souche H18 et les deux souches *Chrysosporium sp.* SA2013 et *Chrysosporium sp.* SAG1 peuvent être une nouvelle espèce puisque qu'elles forment une branche séparée de *Chrysosporium carmichaelii* avec une valeur de bootstrap de 100% et le pourcentage de similarité entre la souche H18 et *Chrysosporium carmichaelii* est de 90% seulement. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

L'espèce la plus proche de la souche H10 en analysant sa séquence d'ITS est *Arachnomyces peruvianus* avec un pourcentage de similarité de 93% seulement. L'étude phylogénétique présentée dans la figure 38 montre que la souche H10 n'est pas apparentée à cette espèce. D'autres séquences doivent être analysées pour mieux identifier cette souche.

**Tableau 9 : Identification moléculaire des souches de l'ordre des Onygenales**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accension
H2	ITS	650	<i>Gymnoascus dankaliensis</i>	100	MK361132
H18	ITS	636	<i>Chrysosporium sp.</i>	100	MK361133
H10	ITS	614	<i>Arachnomyces peruvianus</i>	93	MK361134
H19	ITS	617	<i>Gymnoascus halophilus</i>	100	MK361135
H20	ITS	615	<i>Gymnoascus halophilus</i>	100	MK361136

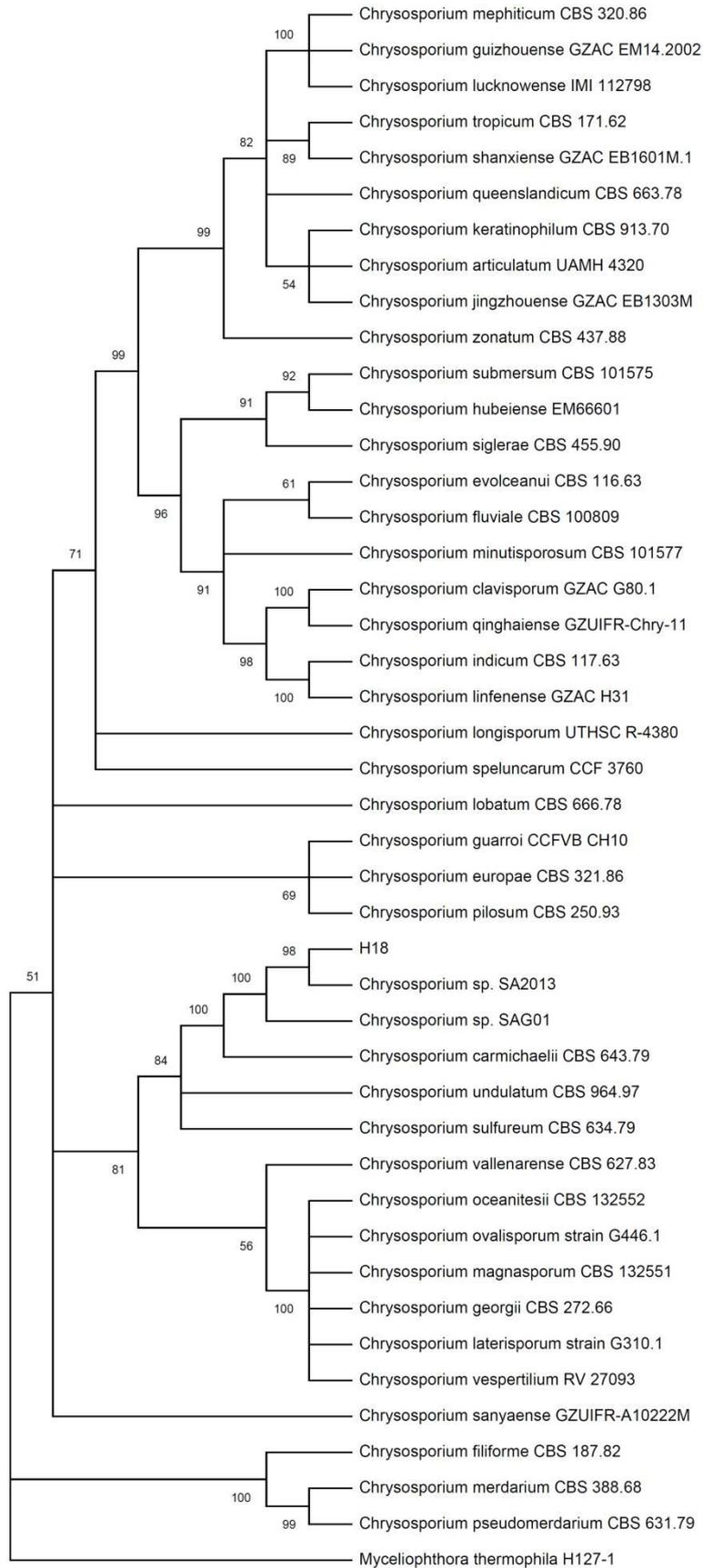


Figure 37 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche H18

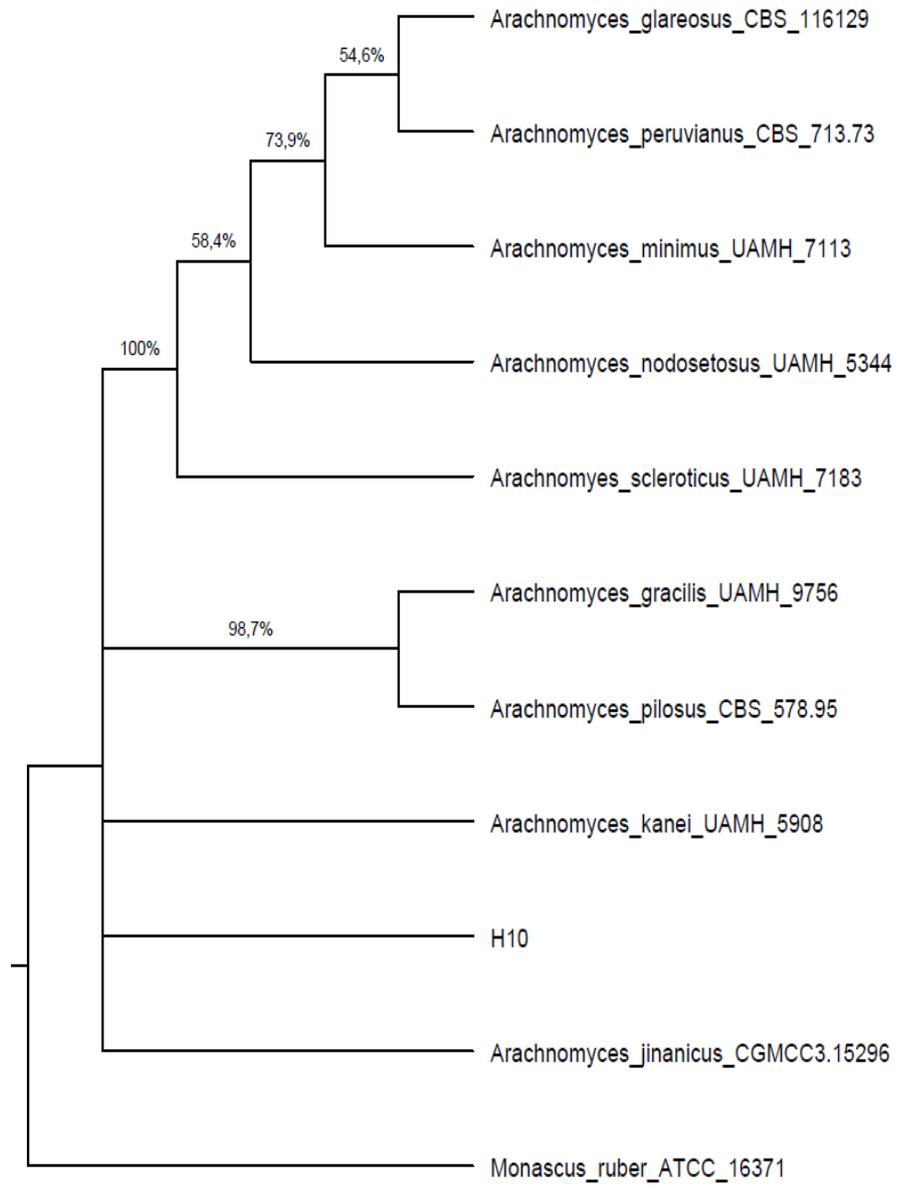


Figure 38 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche H10.

### 2.2.3 Ordre des Hypocreales

Les séquences de TEF-1 $\alpha$  ont été utilisées pour identifier les souches appartenant au genre *Fusarium* et les séquences d'ITS pour le reste des souches de l'ordre des Hypocreales (tableau 10).

**Tableau 10 : Résultats de l'identification moléculaire des souches de l'ordre des Hypocreales**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
B8	TEF-1 $\alpha$	740	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	MK361174
D3	TEF-1 $\alpha$	742	<i>Fusarium equiseti</i>	100	MK361175
R38	TEF-1 $\alpha$	751	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	99	MK361176
S8	TEF-1 $\alpha$	746	<i>Fusarium acuminatum</i>	99	MK361177
S7	TEF-1 $\alpha$	755	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	97	MK361178
R1	ITS	573	<i>Fusarium penzigii</i>	98	MK361179
			<i>Fusarium delphinoides</i>	98	
	LSU	843	<i>Fusarium dimerum</i>	99	
	TEF-1 $\alpha$	726	<i>Fusarium dimerum</i>	89	
	$\beta$ -tub	317	<i>Fusarium dimerum</i>	94	
	RPB1	1785	<i>Fusarium penzigii</i>	92	
	RPB2	943	<i>Fusarium dimerum</i>	92	
R8	ITS	578	<i>Sarocladium strictum</i>	100	MK361137
S2	ITS	601	<i>Trichoderma gamsii</i>	100	MK361138
	TEF-1 $\alpha$	943	<i>Trichoderma gamsii</i>	98	
G15	ITS	574	<i>Trichoderma Koningii</i>	99	MK361139
			<i>Trichoderma Koningiopsis</i>	99	
B2	ITS	587	<i>Parengyodontium album</i>	100	MK361140
			<i>Engyodontium sp.</i>	100	
			<i>Tritirachium sp.</i>	100	
	SSU	1645	<i>Parengyodontium album</i>	100	
<i>Tritirachium sp.</i>			100		
			<i>Lecanicillium sp.</i>	99	
	$\beta$ -tub	338	<i>Parengyodontium album</i>	100	
	RPB2	1057	<i>Lecanicillium coprophilum</i>	88	
C3	ITS	552	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	100	MK361141
R13	ITS	564	<i>Beauveria bassiana</i>	100	MK361142
R29	ITS	553	<i>Lecanicillium sp.</i>	100	MK361143
B1	ITS	594	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100	MK361144
R5	ITS	593	<i>Albifimbria verrucaria</i>	99	MK361145
S3	ITS	581	<i>Clonostachy rosea</i>	100	MK361146

Les souches S2, R8, C3, R13, R5, S3, B1 et R29 ont été identifiées comme *Trichoderma gamsii*, *Sarocladium strictum*, *Gibellulopsis nigrescens*, *Beauveria bassiana*, *Albifimbria verrucaria*, *Clonostachy rosea*, *Purpureocillium lilacinum* et *Lecanicillium sp.* respectivement avec un pourcentage de similarité entre 99% et 100% avec les séquences homologues. L'isolat G15 a présenté une similarité de 99% avec les deux espèces *Trichoderma koningii* et *Trichoderma koningiopsis*. La séquence de TEF-1 $\alpha$  des deux souches de *Trichoderma* S2 et G15 a été ensuite analysée mais nous avons pu amplifier et séquencer que la séquence de la souche S2 qui a été similaire à 98% avec l'espèce *Trichoderma gamsii* et l'étude phylogénétique présentée dans la figure 39 confirme cette identification.

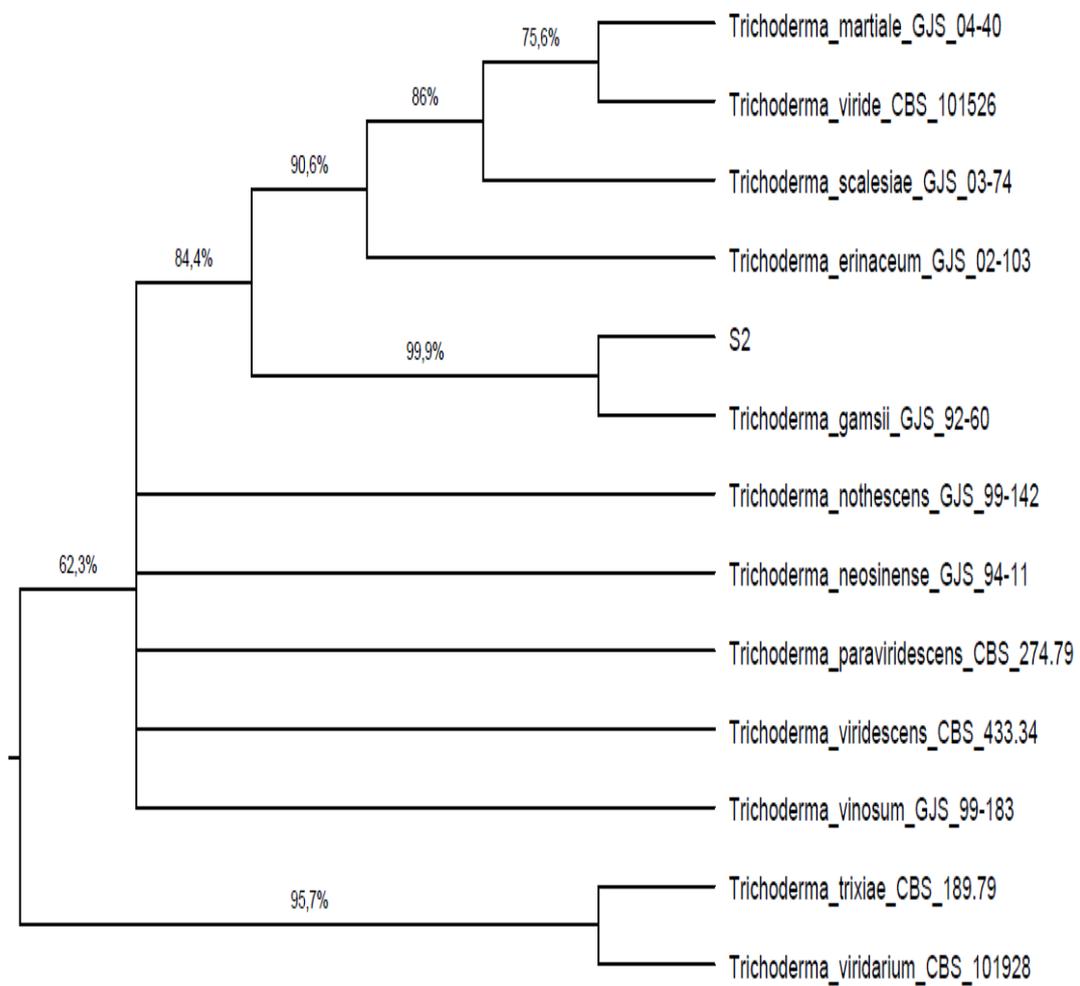


Figure 39 : Arbre phylogénétique basé sur TEF-1 $\alpha$  de la souche S2.

La souche B2 a présenté une similitude de 100% d'ITS avec *Parengyodontium album*, *Engyodontium sp.* et *Tritirachium sp.*, de 99 à 100% de SSU avec *Parengyodontium album*, *Tritirachium sp.* et *Lecanicillium sp.*, de 100% de  $\beta$ -tub avec *Parengyodontium album* et 88% de RPB2 avec *Lecanicillium coprophilum*. L'indisponibilité des séquences de  $\beta$ -tub pour *Tritirachium* et de RPB2 pour *Tritirachium*, *Engyodontium* et *Parengyodontium* dans la base de données GenBank n'a pas permis d'effectuer une étude phylogénétique à base de ces deux marqueurs génétiques.

Les figures 40 et 41 représentent les deux arbres phylogénétiques à base d'ITS et de SSU de la souche B2. Le SSU n'a pas permis de construire un arbre phylogénétique robuste et a affilié la souche B2 à *Parengyodontium album* avec une faible valeur de bootstrap (67%) et l'ITS a affilié cette souche aux genres *Parengyodontium*, *Engyodontium* et *Tritirachium* avec une valeur de bootstrap de 100%. Puisque les deux genres *Parengyodontium* et *Engyodontium* sont synonymes de *Tritirachium*, la souche B2 est identifiée comme *Tritirachium sp.*

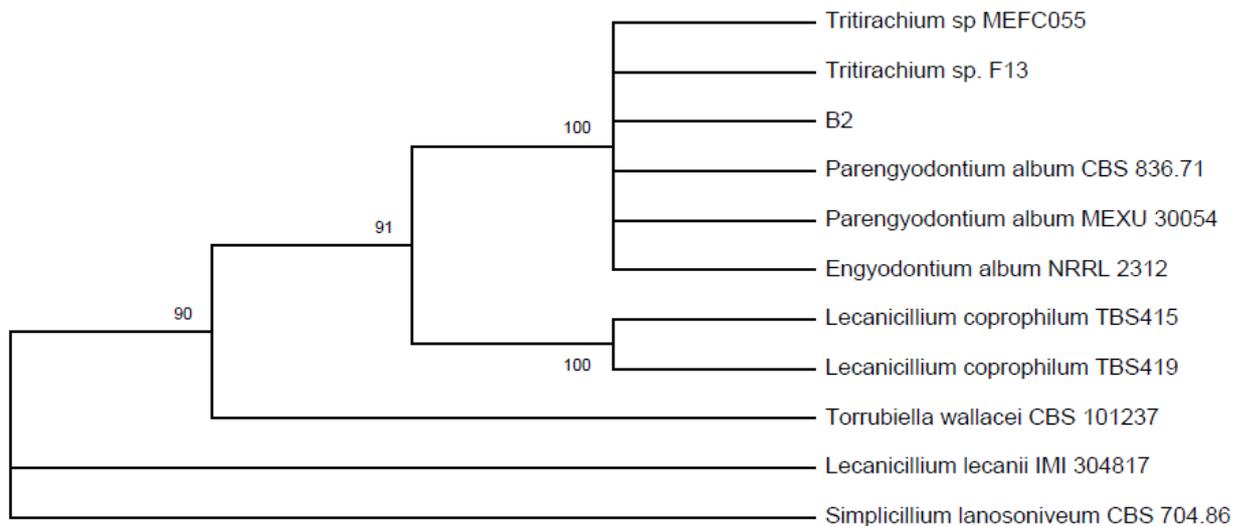


Figure 40 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche B2.

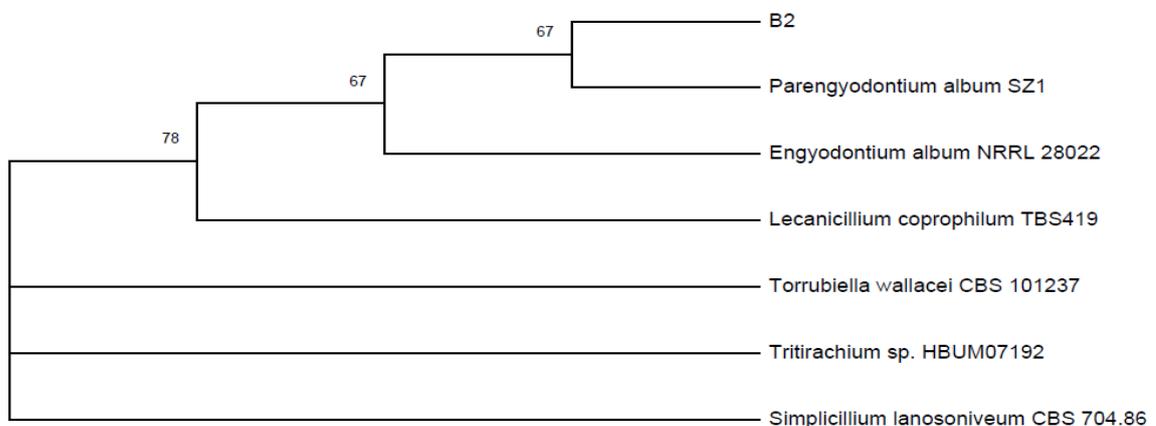


Figure 41 : Arbre phylogénétique basé sur SSU de la souche B2.

Les séquences de TEF-1 $\alpha$  des souches de *Fusarium* ont montré une similitude  $\geq 97\%$  avec les espèces homologues à l'exception de la souche R1. Les souches B7, D3 et S8 ont été identifiées comme *F. oxysporum*, *F. equiseti* et *F. acuminatum* respectivement et les deux souches R38 et S7 comme *F. brachygibbosum*. La séquence de TEF-1 $\alpha$  de la souche R1 a présenté un faible pourcentage de similarité avec les séquences disponibles au niveau de la base de données GenBank. Cette souche est similaire à 90% seulement avec l'espèce *F. dimerum*. Cinq autres séquences, ITS, LSU, RPB1, RPB2 et  $\beta$ -tub, ont été analysées pour confirmer l'identification de la souche R1.

Dans les cinq arbres phylogénétiques des gènes individuels (fig. 42, 43, 44, 45, 46) et l'arbre concaténé des cinq gènes (ITS, LSU, TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, RPB2) (fig. 47), la souche R1 forme une branche appart supportée par une valeur de bootstrap entre 85% et 100% sauf pour le RPB1 où la valeur est de 66% ce qui indique que cette souche peut être une nouvelle espèce dans le clade de *Fusarium dimerum*.

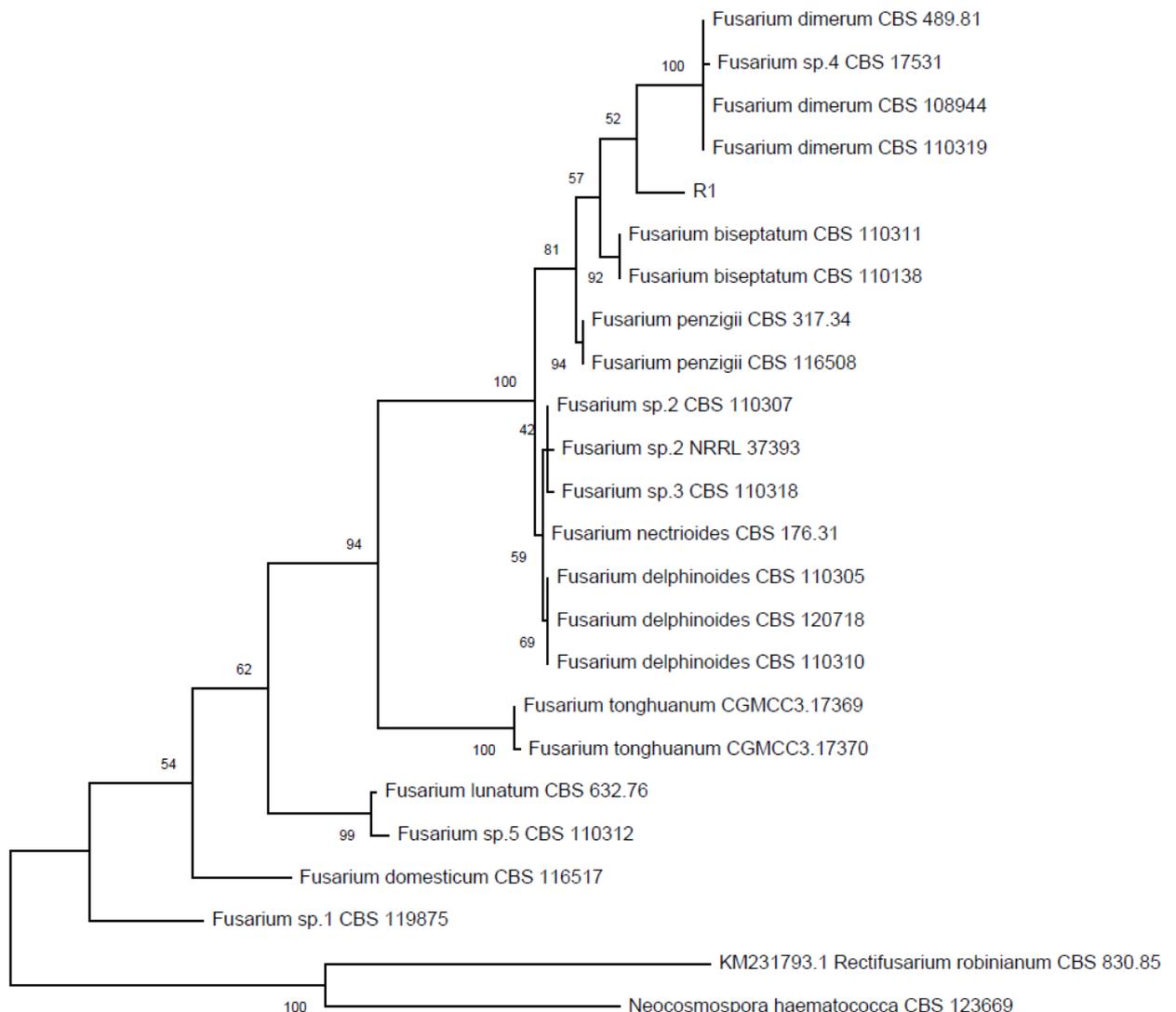


Figure 42 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS de la souche R1.

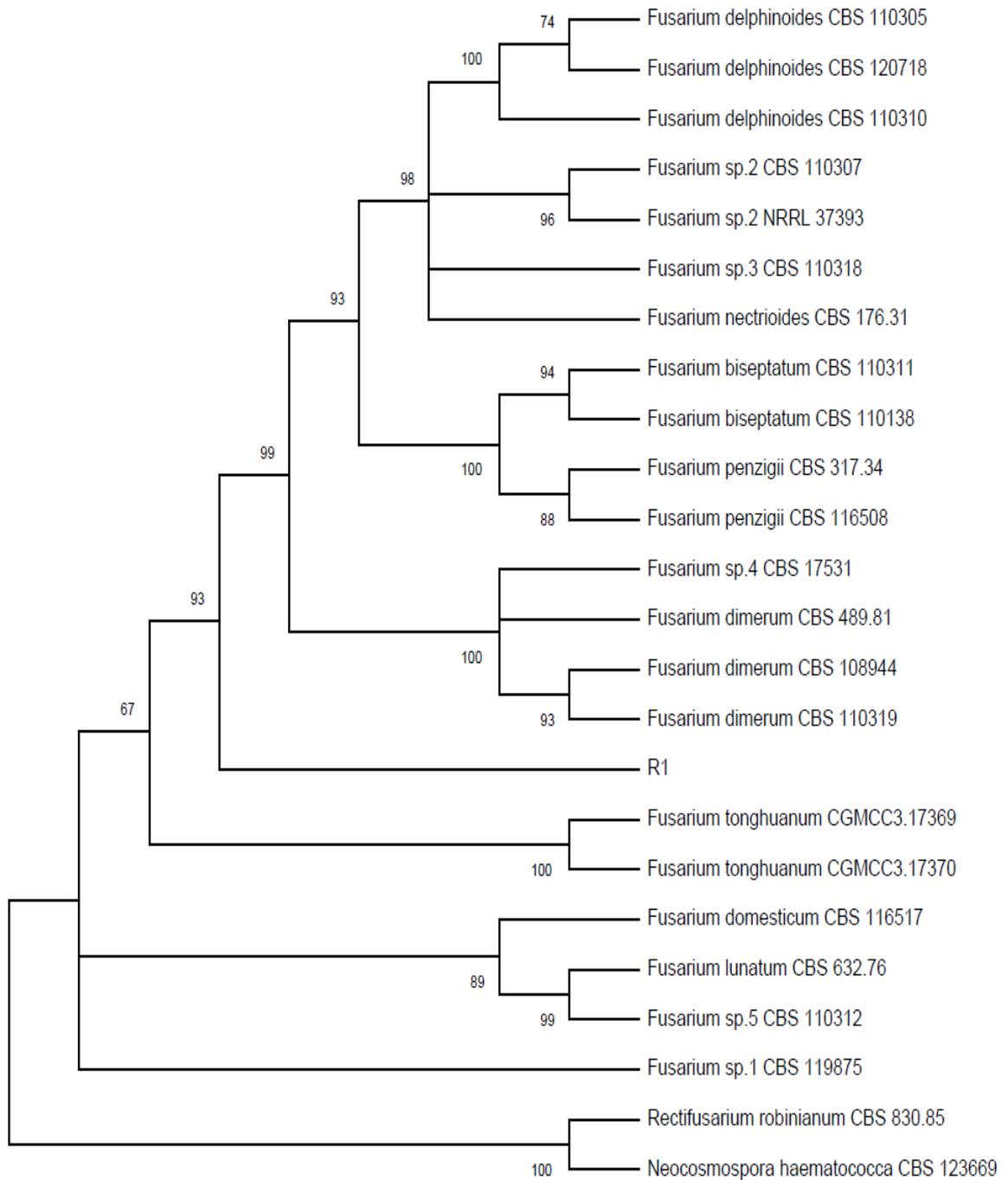


Figure 43 : Arbre phylogénétique basé sur TEF-1α de la souche R1.

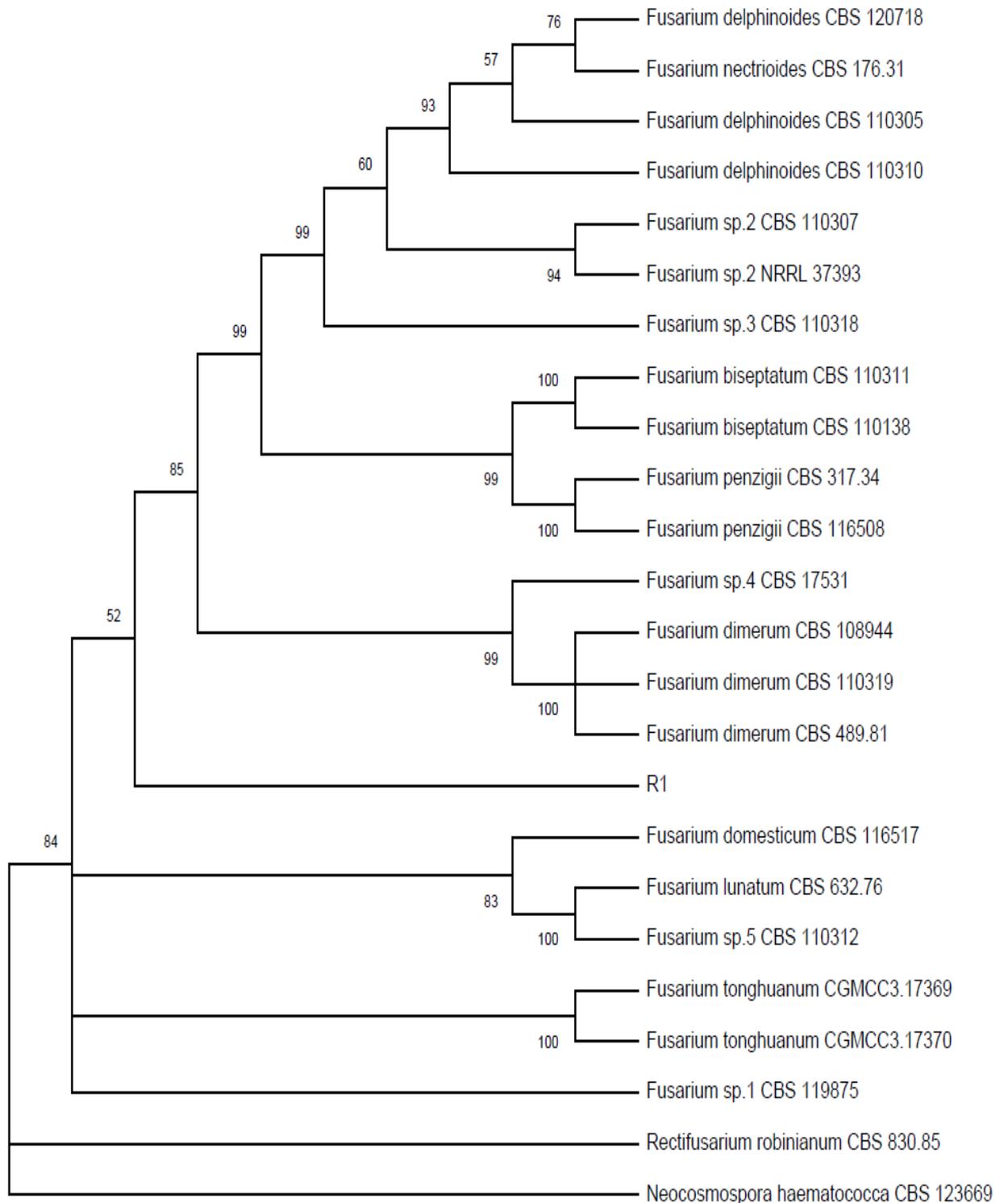


Figure 44 : Arbre phylogénétique basé sur  $\beta$ -tub de la souche R1.

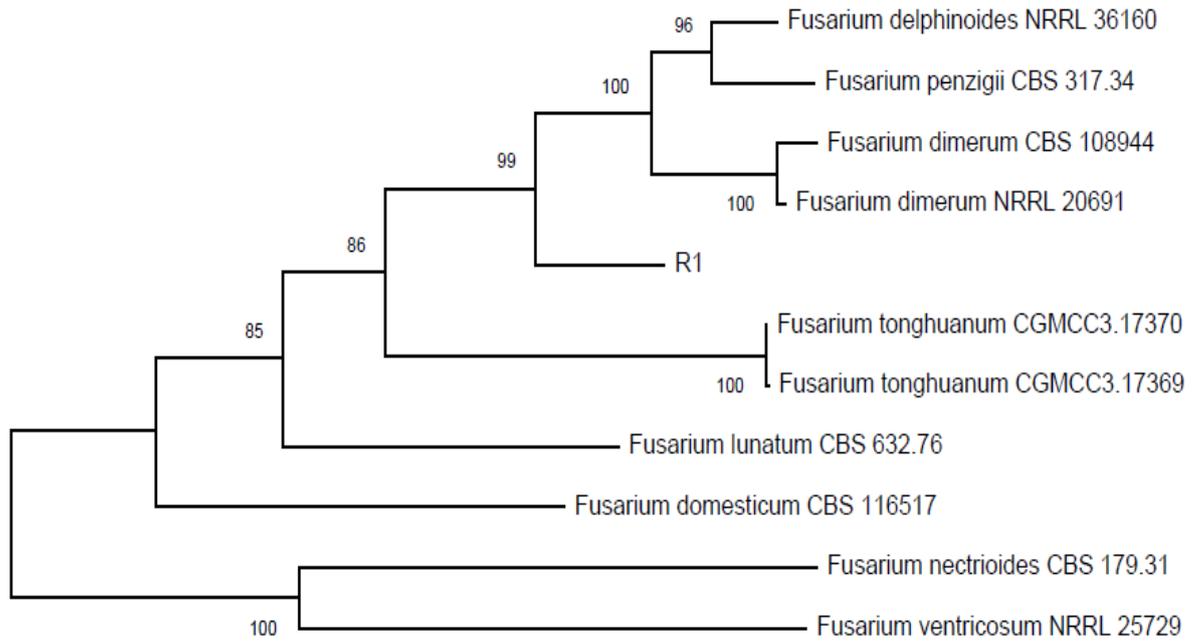


Figure 45 : Arbre phylogénétique basé sur RPB2 de la souche R1.

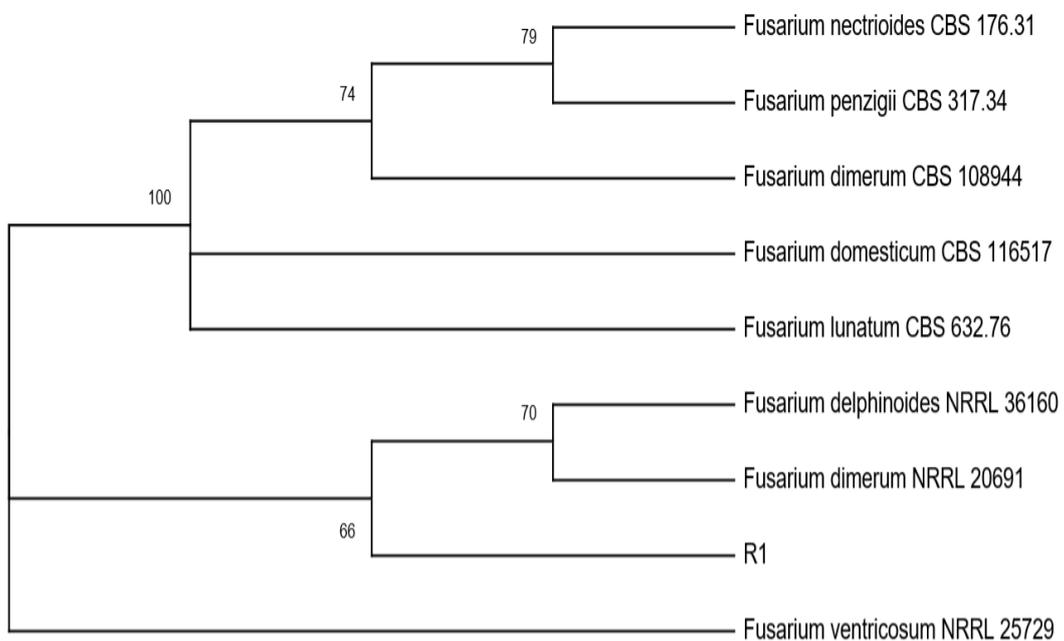


Figure 46: Arbre phylogénétique basé sur RPB1 de la souche R1.

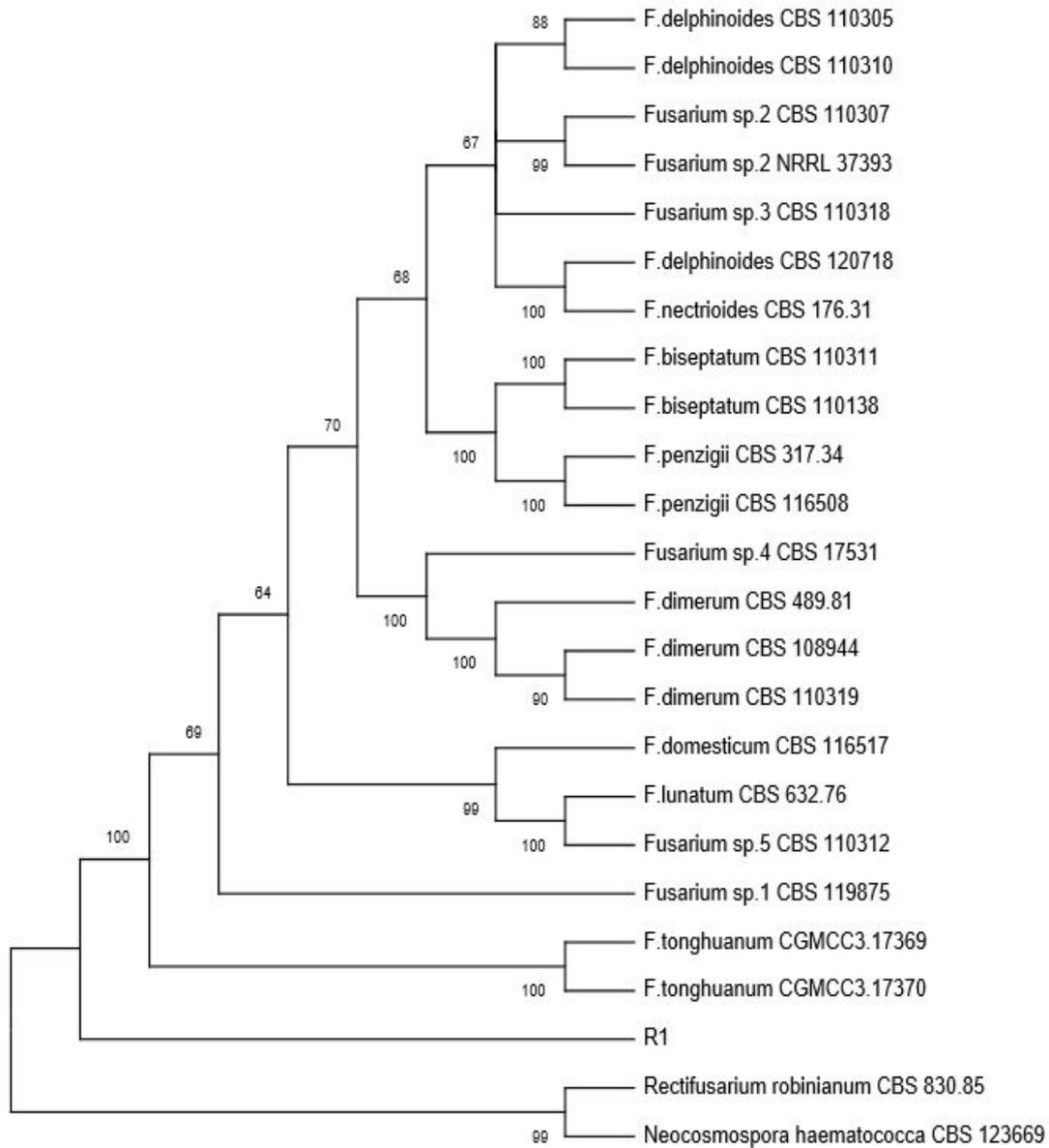


Figure 47 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, ITS, LSU, RPB2 de la souche R1.

### 2.2.4 Ordre des Pleosporales

La comparaison des séquences d'ITS des trois isolats, G5, H43 et R20 a montré que l'isolat G5, identifié morphologiquement comme *Alternaria sp.*, a une similitude de 100% avec *Alternaria sp.*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissema* et *Alternaria infectoria*.

L'isolat H43, identifié morphologiquement comme *Stemphylium sp.*, présente une similitude de 100% avec *Stemphylium lucomagnoense*, *Stemphylium vesicarium* et *pleospora sp.*. l'isolat R20, identifié morphologiquement comme *Helminthosporium sp.*, présente une similarité de 100% d'ITS avec *Bipolaris* et *Curvularia*. La séquence de TEF-1 $\alpha$  a été utilisée pour confirmer l'identification de l'isolat R20 comme *Curvularia spicifera* à 100% de similarité (tableau 11).

**Tableau 11 : Résultats de l'identification moléculaire des souches de l'ordre des Pleosporales**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
G5	ITS	561	<i>Alternaria sp.</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissema</i> <i>Alternaria infectoria</i>	100	MK361151
H43	ITS	569	<i>Stemphylium lucomagnoense</i> <i>Stemphylium vesicarium</i> <i>Pleospora sp.</i>	100 100	MK361152
R20	ITS	562	<i>Curvularia / Bipolaris</i>	100	
	TEF-1 $\alpha$	944	<i>Curvularia spicifera</i>	100	MK361180

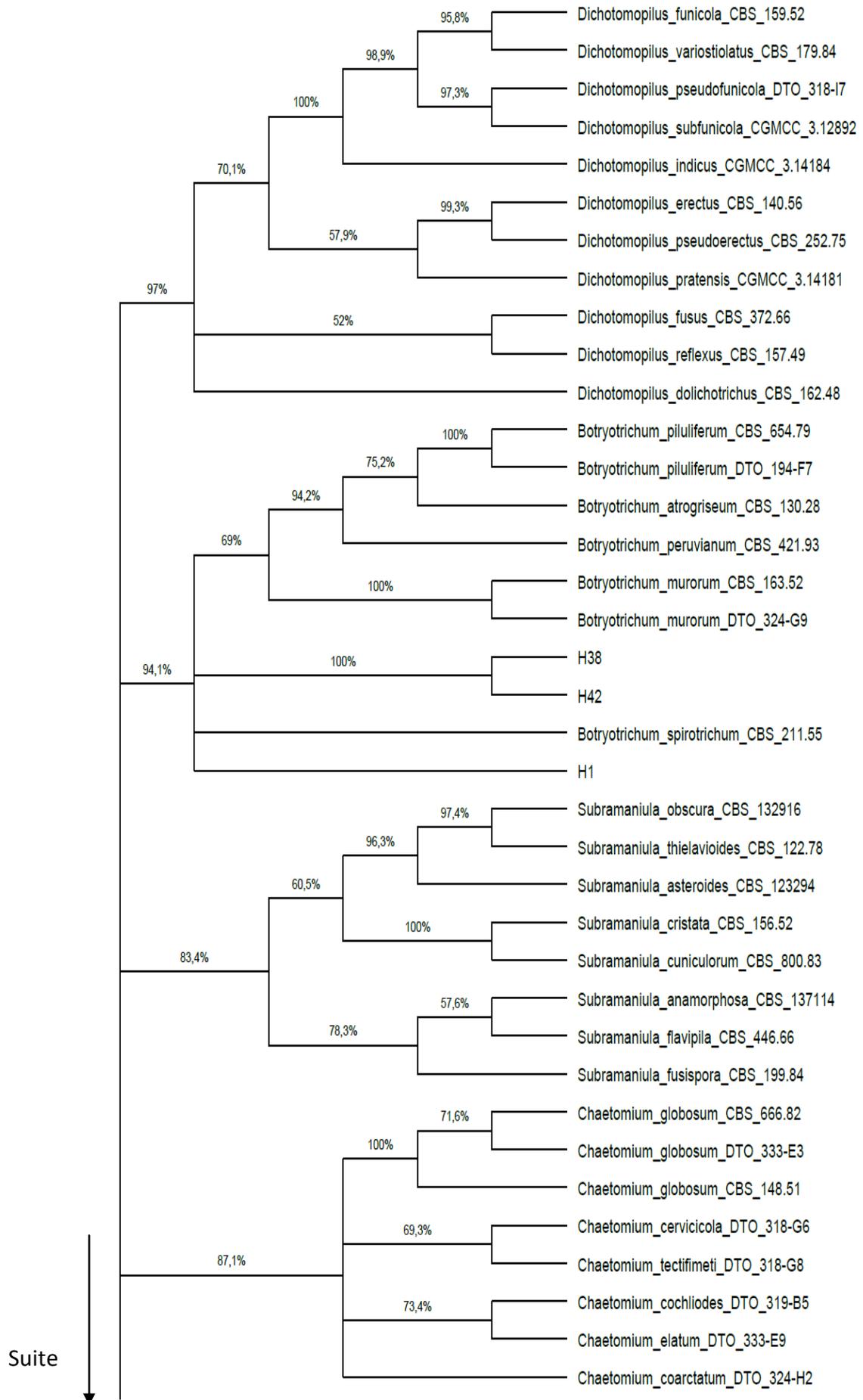
### 2.2.5 Ordre des Sordariales

L'analyse des séquences d'ITS a permis de classer les trois souches H1, H38 et H42 parmi la famille des Chaetomiaceae. Les marqueurs RPB2,  $\beta$ -tubuline et LSU ont ensuite été séquencés et analysés. Les séquences des quatre gènes ont été similaires à des espèces appartenant aux genres *Thielavia*, *Chaetomium*, *Botryotrichum* et *Chaetomidium* avec un pourcentage de similarité entre 86% et 99% (tableau 12).

Tableau 12 : Résultats de l'identification moléculaire des souches de l'Ordre des Sordariales

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
H1	ITS	578	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	97	MK361147
			<i>Chaetomium piluliferum</i>	97	
			<i>Chaetomium murorum</i>	97	
	LSU	845	<i>Botryotrichum sp.</i>	99	
β-tub	457	<i>Botryotrichum atrogriseum</i>	89		
		<i>Botryotrichum spirotrichum</i>	90		
RPB2	883	<i>Chaetomidium trichorobustum</i>	93		
		<i>Thielavia hyalocarpa</i>	92		
H38	ITS	569	<i>Chaetomium piluliferum</i>	93	MK361148
			<i>Chaetomium murorum</i>	93	
	LSU	849	<i>Chaetomium piluliferum</i>	98	
	β-tub	472	<i>Botryotrichum atrogriseum</i>	87	
<i>Botryotrichum spirotrichum</i>			87		
RPB2	893	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	89		
H42	ITS	570	<i>Chaetomium piluliferum</i>	93	MK361149
			<i>Chaetomium murorum</i>	93	
	LSU	838	<i>Chaetomium piluliferum</i>	98	
	β-tub	439	<i>Botryotrichum atrogriseum</i>	86	
<i>Botryotrichum spirotrichum</i>			87		
RPB2	910	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	89		

Une étude phylogénétique de chaque gène et une étude concaténée des quatre gènes ont été effectuées. Le RPB2 a été utilisé pour positionner les trois souches H1, H38 et H42 parmi les différents genres de la famille Chaetomiaceae. La figure 48 présente l'arbre phylogénétique à base de RPB2 qui montre que les trois souches appartiennent au genre *Botryotrichum* en formant deux branches séparées, une regroupant les deux souches H38 et H42 et une branche formée par la souche H1 ce qui indique probablement que les deux souches H38 et H42 et la souche H1 sont deux espèces différentes et qui peuvent être deux nouvelles espèces dans ce genre. Les résultats obtenus par l'étude phylogénétique d'ITS, LSU, β-tub (fig. 49, 50, 51) et l'étude concaténée des quatre gènes (fig. 52) montrent que les trois souches forment deux branches appart. Ces trois souches H1, H38 et H42 peuvent représenter deux nouvelles espèces dans la famille des Chaetomiaceae. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce résultat.



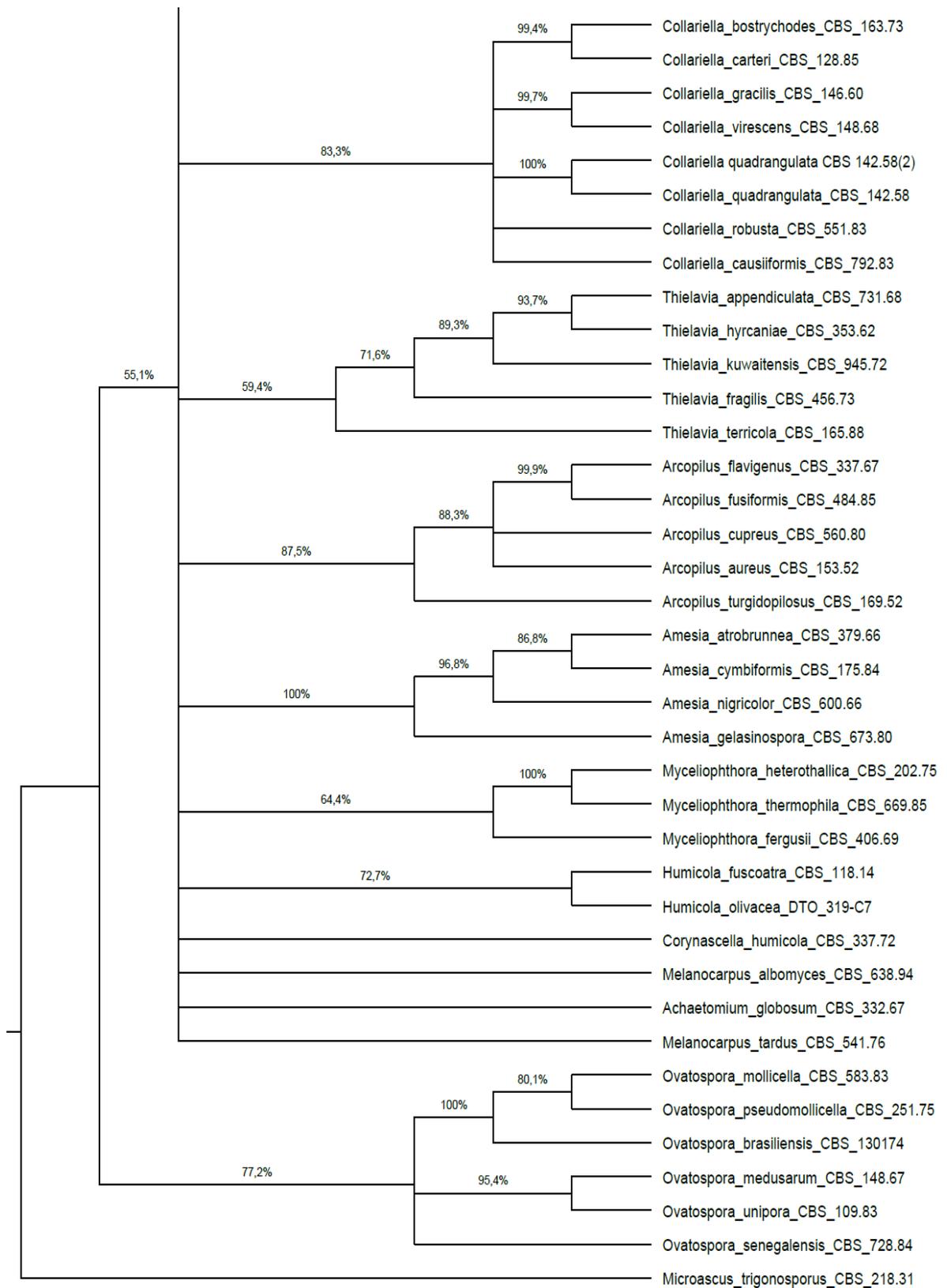


Figure 48 : Arbre phylogénétique basé sur RPB2 des souches H1, H38 et H42.

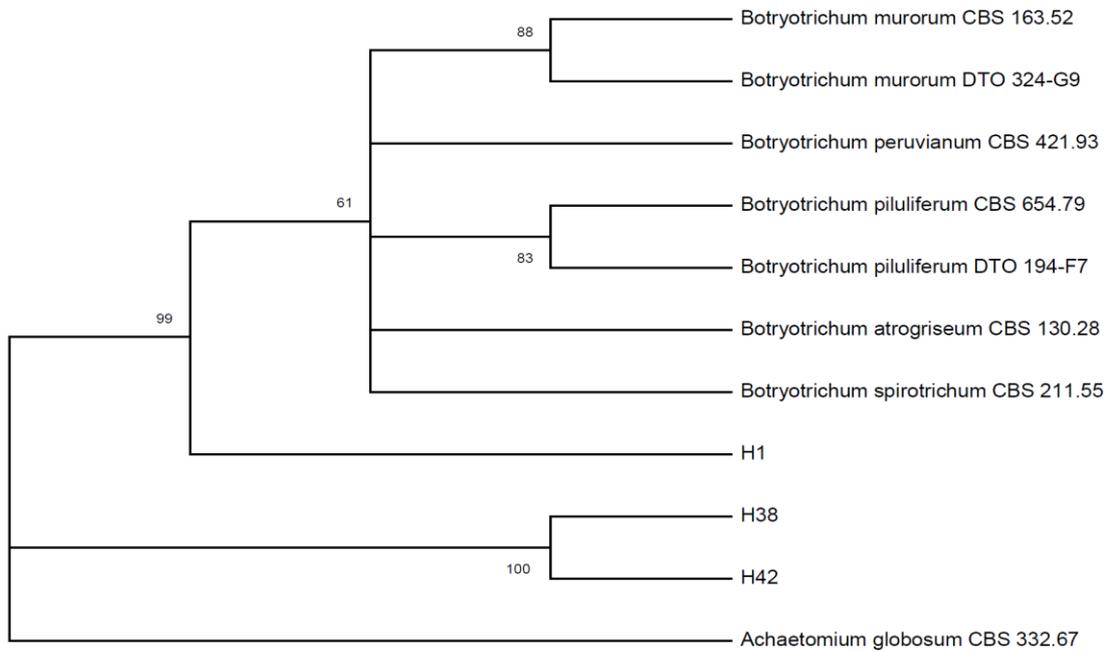


Figure 49 : Arbre phylogénétique basé sur l'ITS des souches H1, H38 et H42.

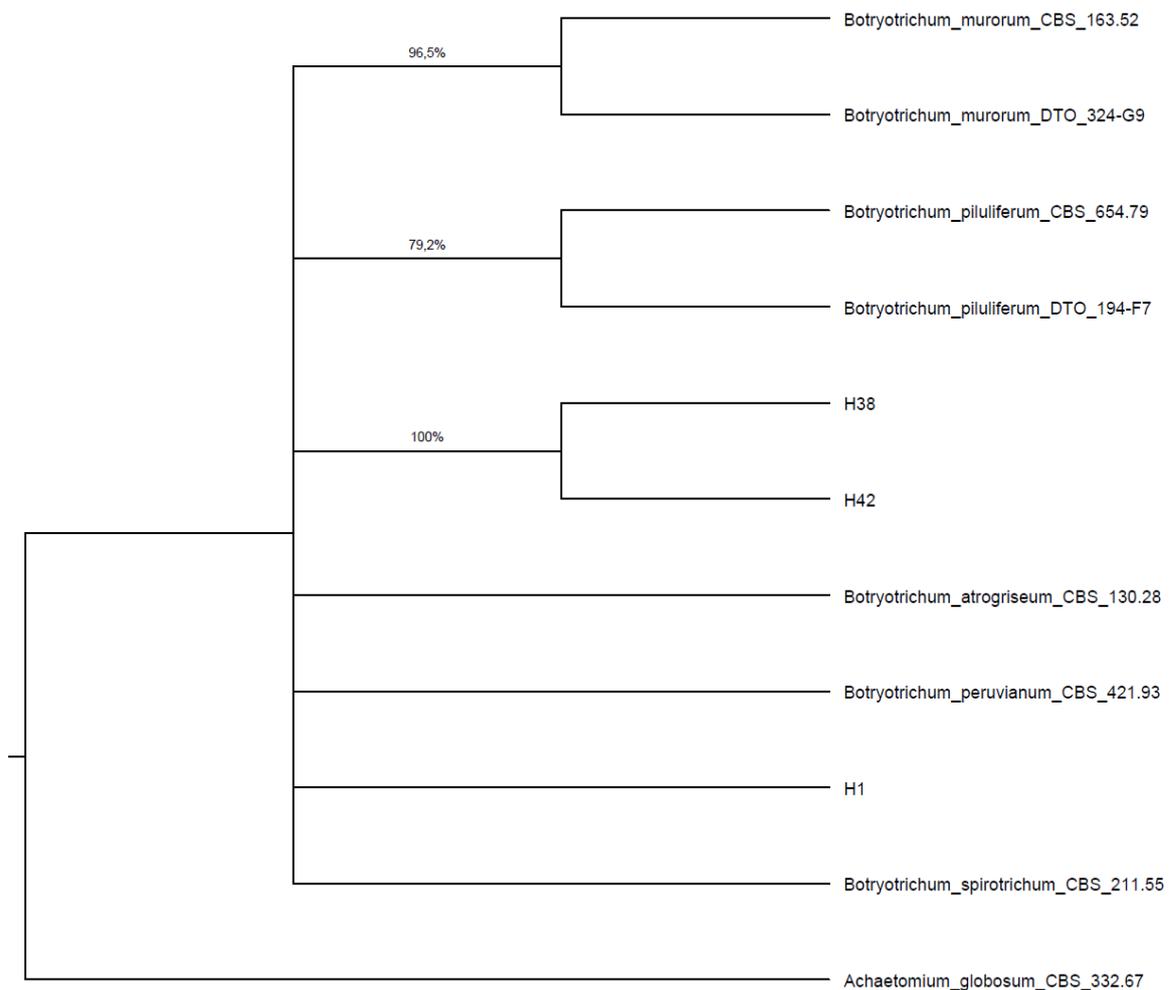


Figure 50 : Arbre phylogénétique basé sur LSU des souches H1, H38 et H42.

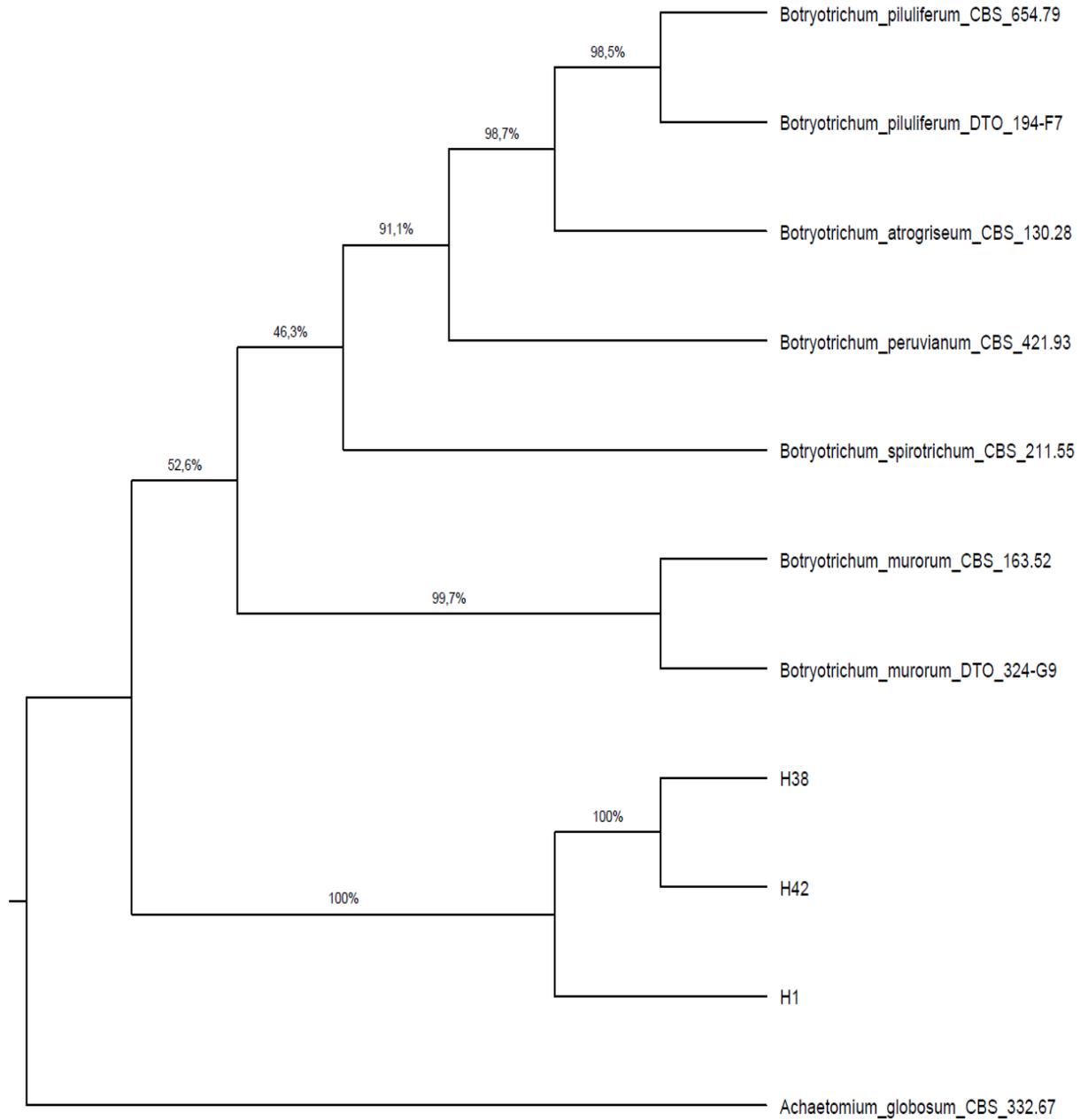


Figure 51 : Arbre phylogénétique basé sur  $\beta$ -tub des souches H1, H38 et H42.

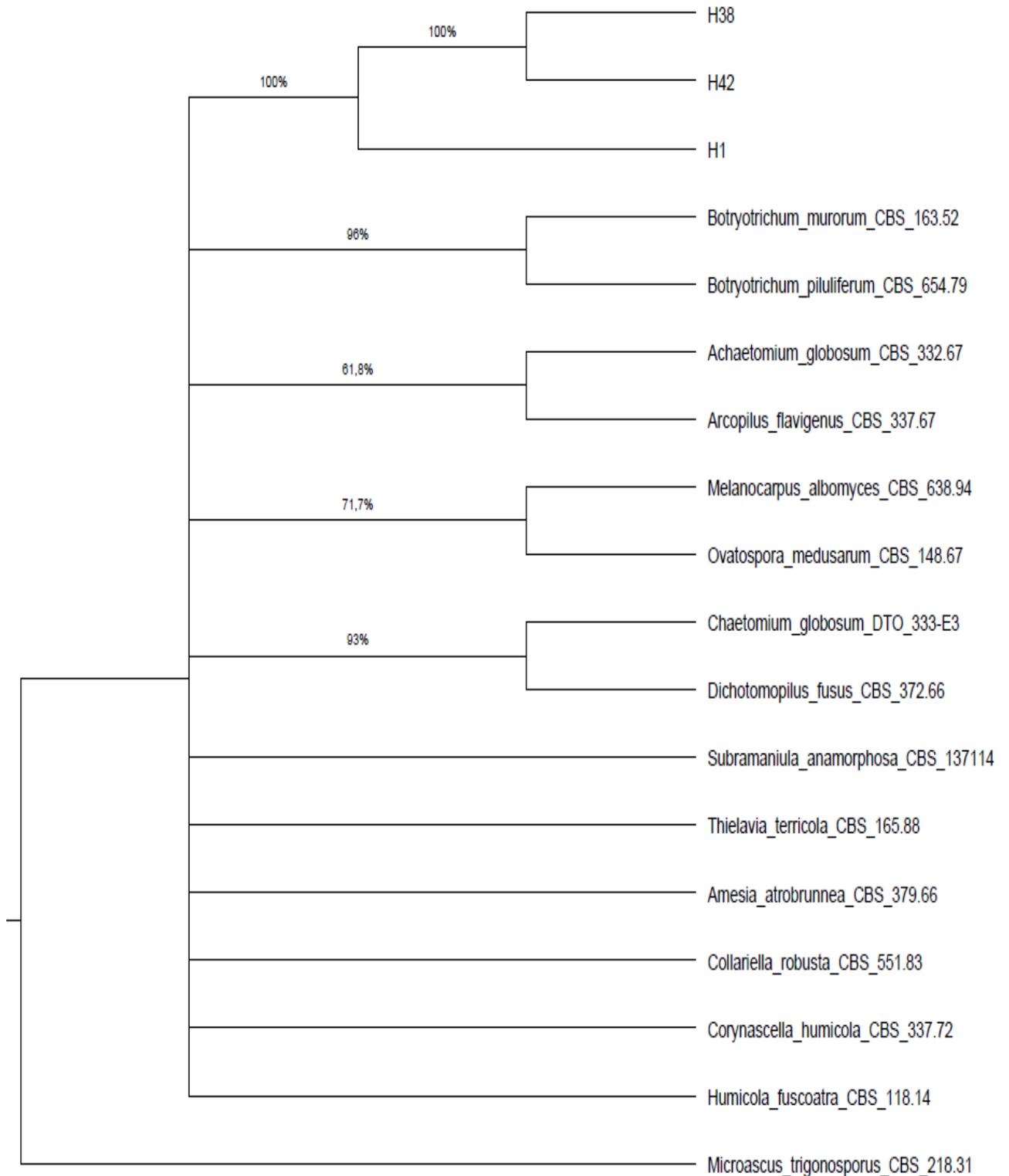


Figure 52 : Arbre phylogénétique concaténé basé sur ITS, LSU,  $\beta$ -tub, RPB2 des souches H1, H38 et H42.

### 2.2.6 Ordre des Microascales et Capnodiales

Deux isolats ont été identifiés morphologiquement comme *Microascus sp.* (isolat B5) et *Cladosporium sp.* (isolat R36). L'ITS a été analysé pour identifier l'isolat B5 comme *Scopulariopsis candida* à 99% de similarité. Pour l'isolat R36, le gène actine a été analysé pour l'identifier à 100% de similarité comme *Cladosporium ramotenellum* (tableau 13).

**Tableau 13 : Identification moléculaire des souches B5 et R36**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
B5	ITS	443	<i>Scopulariopsis candida</i>	99	MK361150
R36	ACT	210	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	100	MK361181

### 2.2.7 Division Basidiomycota

Les séquences d'ITS ont été utilisées pour identifier les souches appartenant à la division Basidiomycota. L'a souche H14, identifié morphologiquement comme *Ustilago sp.*, a présenté une similitude de 99% avec l'espèce *Ustilago cynodontis*. La souche H15, identifié morphologiquement comme *Wallemia sp.*, a présenté une similitude de 98% avec *Wallemia sp.*, *Wallemia canadensis* et *Wallemia mellicola* (tableau 14).

**Tableau 14 : Identification moléculaire des souches H14 et H15**

Souches	Marqueur génétique	Taille (pb)	Résultats de BLASTn	% de similarité	Numéro d'accèsion
H14	ITS	731	<i>Ustilago cynodontis</i>	99	MK361153
H15	ITS	585	<i>Wallemia sp.</i>	98	MK361154
			<i>Wallemia canadensis</i>	98	
			<i>Wallemia mellicola</i>	98	

### **3- Discussion**

Une Sebkhah est un mot arabe qui désigne une dépression fermée, occupée temporairement par un lac salé. La grande sebkha d'Oran est localisée au sud-ouest d'Oran, elle est occupée temporairement par un lac salé de forme elliptique d'une superficie de 300 Km<sup>2</sup> et dont la teneur moyenne en sel est estimée à plus de 100 g/l de sels dissous. Parmi ces sels, le chlorure de sodium (NaCl) est le sel le plus dominant dans les eaux et le sol de la sebkha. Plus on s'éloigne du centre du lac, la teneur en sel diminue permettant à une végétation halophiles et des cultures des céréales à se développer au tour de la sebkha (Benziane et *al.*, 2012 ; Boualla et *al.*, 2011).

Dans notre étude, l'échantillonnage a été effectué au niveau de 9 sites répartis en deux zones seulement plus ou moins proches de la marge de la sebkha à cause de la difficulté d'accès au centre du lac. Ces sites se caractérisent par une différence concernant la teneur en sel et le pH.

Les sites qui sont plus ou moins proches du lac (sites A, E, H, B, C, D, R) sont alcalin et ont une teneur en NaCl élevée (entre 37 et 46 g/l) par rapport aux sites qui sont plus loin du lac et plus proche des terres agricoles (sites S et G) où le sol est neutre et la salinité est de 3.8 g/l. Cette différence de concentration en sel entre le centre de la sebkha et ses extrémités peut être expliquée par le fait que les écoulements dans le sous-sol ont tendance à se diriger vers la partie centrale de la sebkha qui correspond à la partie la plus basse. C'est la partie qui connaît une forte concentration des eaux des précipitations et comme conséquence se dessèche en dernier en été. La partie marginale est plus ou moins haute et qui s'assèche plus rapidement. Les sels précipités, sont rapidement lessivés par les premières pluies, et s'écoulent par la suite vers le centre de la Sebkha en créant un gradient de concentration salin croissant au fur et à mesure qu'on s'approche du centre de la sebkha (Benziane, 2013 ; Boualla et *al.*, 2011 ).

Nos résultats sont en parfaite concordances avec l'étude de Boualla et *al.* (2011) qui ont résumé dans leur travail plusieurs études physico-chimiques de l'eau et le sol de la sebkha d'Oran réalisées entre l'année 1848 et 1987 et l'étude de Benziane (2013) qui ont montré que le pH du sol se situ entre 6.5 et 8.4 et la salinité varie entre 2.18 et 200 g/L et que les valeurs du pH et de la salinité varie selon le site et la période du prélèvement.

Dans notre étude sur la mycoflore de la grande sebkha d'Oran, nous avons isolé 136 isolats. Parmi ces isolats, l'identification morphologique nous a permis d'identifier la majorité des isolats sporulés jusqu'au genre. Les isolats non sporulés ainsi que quelques isolats sporulés n'ont pas été identifiés. Afin de pouvoir identifier nos isolats jusqu'à l'espèce, nous avons eu recours à l'identification moléculaire et phylogénétique en utilisant plusieurs marqueurs moléculaires.

L'ITS est le marqueur moléculaire le plus séquencé chez les champignons ; Il est considéré comme le marqueur officiel pour l'identification des champignons (Schoch et al., 2012). Dans notre étude, les séquences d'ITS ont permis d'identifier 12 isolats jusqu'à l'espèce, mais ce marqueur n'était pas discriminant pour d'autres isolats.

Malgré l'utilisation universelle de l'ITS, la variabilité de ce marqueur n'est pas toujours assez suffisante pour distinguer toutes les espèces et plus précisément les espèces étroitement apparentées. A cause des limites du marqueur officiel ITS, d'autres marqueurs moléculaires secondaires sont nécessaires pour identifier les isolats au niveau de l'espèce. Ces marqueurs secondaires doivent être, de manière similaire à l'ITS, facile à amplifier, utilisant des amorces universelles et il doit y avoir des séquences représentatives pour toutes les espèces. Contrairement à l'ITS, ils doivent faire la distinction entre toutes les espèces (Schoch et al., 2012 ; Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014).

Dans notre étude et en se basant sur ces critères, plusieurs marqueurs moléculaires secondaires ont été choisis selon le genre à identifier.

La  $\beta$ -tubuline a été utilisée pour l'identification des souches appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Ces séquences ont permis d'identifier 8 espèces de *Penicillium* et 5 espèces d'*Aspergillus* mais ils n'ont pas permis l'identification de 5 souches ce qui a exigé l'utilisation de deux autres marqueurs, CaM et RPB2, pour ces souches non identifiées.

Visagie et al. (2014) ont proposé les trois marqueurs secondaires  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 pour l'identification de *Penicillium*. La  $\beta$ -tubuline est considérée comme meilleure marqueur d'identification par rapport au CaM et RPB2. Le RPB2 a l'avantage de permettre des alignements robustes et faciles lorsqu'il est utilisé pour des phylogénies, mais il est parfois difficile à amplifier et la base de données est incomplète. Pour le CaM, La base de données est aussi incomplète.

Bien que  $\beta$ -tub puisse être utilisé avec succès pour identifier les espèces de *Penicillium*, l'identification moléculaire doit être faite avec précaution dans la section *Chrysogena*. Dans cette section,  $\beta$ -tub ne permet pas la distinction entre *P. chrysogenum* et *P. alii-sativi*, CaM distingue entre ces deux espèces mais pas entre *P. chrysogenum* et *P. rubens*, en plus, pour distinguer entre *P. desertorum* et *P. glycyrrhizicola* une étude phylogénétique multi-gène est recommandée (Chen et al., 2013 ; Visagie et al., 2014).

Samson et al. (2014) ont choisi aussi ces trois marqueurs secondaires pour l'identification d'*Aspergillus* mais ils ont considéré le CaM comme meilleur marqueur d'identification puisqu'il est facile à amplifier, permet de distinguer toutes les espèces d'*Aspergillus* (à l'exception de *A. elegans* et *A. steynii*) et les séquences sont disponibles dans la base de données pour toutes les espèces. Le  $\beta$ -tub est facile à amplifier mais il a été rapporté que le nombre d'introns varie et que la PCR entraîne parfois l'amplification de gènes paralogues (Samson et al., 2014; Peterson, 2008; Hubka et Kolarik, 2012). La difficulté à réussir l'amplification du RPB2 et l'indisponibilité des séquences rend son utilisation comme marqueur d'identification un peu difficile (Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014).

Selon O'Donnell et *al.* (2010), les 3 gènes TEF-1 $\alpha$ , RPB1 et RPB2 sont utilisés pour l'identification du genre *Fusarium*. L'identification de nos souches de *Fusarium* a été basée uniquement sur les séquences de TEF-1 $\alpha$  qui ont été suffisante pour identifier toutes les souches jusqu'à l'espèce à l'exception de la souche R1. Le TEF-1 $\alpha$  a permis de classer cette souche dans le complexe d'espèces de *F. dimerum*.

Nous avons aussi utilisé le TEF-1 $\alpha$  pour l'identification des souches de *Trichoderma*. Ce gène est fréquemment utilisé pour l'identification des espèces appartenant à ce genre et il est généralement utilisé en combinaison avec les séquences de l'ITS et RPB2 (Qin et Zhuang, 2016 ; Qiao et *al.*, 2018 ; Zeng et Zhuang, 2019).

Le gène actine a été utilisé pour identifier une souche de *Cladosporium*. L'utilisation de ce gène a été mentionnée dans plusieurs travaux sur l'identification du genre *Cladosporium* mais puisque ce genre est très hétérogène, l'étude phylogénétique est généralement basé sur plusieurs gènes (ITS, TEF-1 $\alpha$ , actine,  $\beta$ -tub, SSU) (Zalar et *al.*, 2007 ; Torres et *al.*, 2017 Halo et *al.*, 2019)

Les souches qui n'ont pas été identifiées en se basant sur les séquences d'un seul gène appartenant au genre *Penicillium* (souches R32 et R33), *Aspergillus* (souches A4, E2, E7), *Fusarium* (souche R1) et *Chaetomium* (souches H1, H38, H42) ont nécessité une étude phylogénétique multi-gènes.

La combinaison ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 que nous avons utilisé pour identifier les deux souches R32 et R33 a été proposé par Visagie et *al.* (2014) pour la description de nouvelles espèces de *Penicillium*. La taxonomie du genre *Penicillium* a subi plusieurs révisions ce qui a aboutit à des changements dans la liste des espèces acceptées dans ce genre. Parmi ces changements, l'incorporation du genre *Eupenicillium* et des espèces *Aspergillus paradoxus*, *A. cristalinus* et *A. malodoratus* au genre *Penicillium*, le transfert des espèces de l'ancien sous-genre *Penicillium Biverticillium* au genre *Talaromyces* (Houbraken et Samson, 2011 ; Samson et *al.*, 2011) et la description de plusieurs nouvelles espèces en utilisant une analyse phylogénétique multi-gènes de différents combinaisons : ITS,  $\beta$ -tub, CaM, RPB2 (Houbraken et *al.*, 2014 ; Wang et *al.*, 2017 ; Barbosa et *al.*, 2018 ; Guevara-Suarez et *al.*, 2020),  $\beta$ -tub, CaM, RPB2 (Houbraken et *al.*, 2016), ITS,  $\beta$ -tub, CaM (Visagie et *al.*, 2014 ; Visagie et *al.*, 2016), CaM,  $\beta$ -tub, RPB1, RPB2 (Houbraken et *al.*, 2012) et RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8 (Houbraken et Samson, 2011).

Notre étude phylogénétique des gènes concaténée a montré que les deux souches R32 et R33 forment une branche séparée de toutes les espèces de *Penicillium* section *Chrysogena*. Cette section qui a été introduite par Frisvad et Samson (2004) renfermait huit espèces. Jusqu'à présent, cette section renferme 19 espèces après la description de nouvelles espèces et l'incorporation de *P. egyptiacum*, *P. kewense* et *P. sinaicum* qui forment un clade qui se caractérise par la reproduction sexuée. Les deux souches R32 et R33 peuvent représenter une nouvelle espèce dans ce clade.

Nous avons réalisé aussi cette étude phylogénétique multi-gènes d'ITS,  $\beta$ -tub, CaM, RPB2 pour l'identification des trois souches d'*Aspergillus* A4, E2 et E7. Les arbres phylogénétiques des gènes individuels  $\beta$ -tub, CaM et RPB2 et l'arbre concaténé des 4 gènes ont montré que les trois souches forment une nouvelle branche séparée de toutes les espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavipedes* avec une valeur de bootstraps de 100% ce qui nous permet de classer ces trois souches comme une nouvelle espèce d'*Aspergillus* de la section *Flavipedes*.

Plusieurs chercheurs ont décrit des nouvelles espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavipedes* en se basant sur les séquences d'ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2. Selon Peterson (2008), la section *Flavipedes* renfermait 3 espèces *A. flavipes*, *A. aureofulgens* et *A. iizukae*. En 2014, Visagie et al. ont décrit 3 nouvelles espèces *A. capensis*, *A. templicola* et *A. micronesiensis* en utilisant une étude phylogénétique multi-gènes d'ITS,  $\beta$ -tub et CaM. En se basant sur l'étude phylogénétique multi-gènes des 4 gènes ITS,  $\beta$ -tub, CaM et RPB2, Hubka et al. (2015) ont révisé la taxonomie de la section *Flavipedes* et ils ont introduit 7 nouvelles espèces *A. ardalansis*, *A. spelaeus*, *A. polyporicola*, *A. movilensis*, *A. mangaliensis*, *A. frequens* et *A. lupii* dont les 3 dernières espèces sont synonymes de *A. templicola*, *A. micronesiensis* et *A. aureofulgens* respectivement. Deux autres nouvelles espèces *A. iranicus* et *A. suttoniae* ont ensuite été décrites par Arzanlou et al. (2016) et Siqueira et al. (2018) en utilisant la même combinaison de gènes.

Le genre *Fusarium* est subdivisé en complexes d'espèces. L'identification phylogénétique de chaque complexe d'espèces est basée sur une combinaison de gènes : TEF-1 $\alpha$  et IGS rDNA pour le complexe *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 2009a), ITS+LSU, TEF-1 $\alpha$ , RPB2 pour les trois complexes *F. solani* (O'Donnell et al., 2008 ; Zhang et al., 2006), *F. incarnatum-equiseti* et *F. chlamydosporum* (O'Donnell et al., 2009b), TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, CaM, IGS rDNA pour le complexe *F. fujikuroi* (O'Donnell et al., 1998) et TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, ITS+LSU, RPB2 pour le complexe *F. dimerum* (Schroers et al., 2009).

Notre souche de *Fusarium* R1 a été identifiée comme *Fusarium* sp. appartenant au complexe de *F. dimerum*. Suivant Schroers et al. (2009), TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, ITS+LSU et RPB2 ont été séquencés et l'étude phylogénétique de chaque gène et l'étude multi-gènes TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub, ITS+LSU, RPB2 ont montré que la souche R1 peut être une nouvelle espèce dans ce complexe.

Selon Lombard et al. (2015), le complexe d'espèces *Fusarium dimerum* n'appartient plus au genre *Fusarium*. Ces auteurs ont réalisé une étude phylogénétique multi-gènes en utilisant 10 gènes (LSU, ITS, *acl1*, RPB1, RPB2, actine,  $\beta$ -tub, CaM, histone H3 (*his3*), TEF-1 $\alpha$ ) plus une étude morphologique pour réviser la taxonomie de la famille Nectriaceae. Ils ont réévalué le statut de plusieurs genres, ce qui a abouti à l'introduction d'une nouvelle famille et de six nouveaux genres. Parmi ces nouveaux genres, le genre *Bisifusarium* qui renferme les 6 espèces précédemment classées dans le complexe d'espèces de *Fusarium dimerum*. En 2017, une nouvelle espèce *Bisifusarium tonghuanum* a été introduite dans ce genre en se basant sur la même combinaison de gènes utilisée dans notre étude (Sun et al., 2017).

Notre dernière étude phylogénétique multi-gène a été réalisée pour les trois souches de *Chaetomium* H1, H38 et H42. La combinaison de gènes utilisée était ITS, LSU,  $\beta$ -tub et RPB2.

Le choix de ces gènes a été basé sur les études de Wang et al. (2016a), Wang et al. (2016b), Zhang et al. (2016) et Wang et al. (2019) qui ont utilisé cette combinaison de gènes pour réviser la taxonomie de la famille Chaetomiacea et du genre *Chaetomium* et *Humicola*. Ces auteurs ont décrit plusieurs nouvelles espèces du genre *Chaetomium* et ils ont proposé de nouveaux genres dans cette famille.

L'identification moléculaire des trois souches H1, H38 et H42 a montré que les séquences des quatre gènes ont été similaires à des espèces appartenant aux genres *Thielavia*, *Chaetomium*, *Chaetomidium* et *Botryotrichum*. Des études phylogénétiques ont montré que la distinction entre *Chaetomidium*, *Chaetomium* et *Thielavia* est ambiguë ; en plus, le genre *Chaetomidium* a été rejeté et est considéré comme synonyme de *Chaetomium*. L'étude phylogénétique du RPB2 a classé les trois souches parmi les espèces du genre *Botryotrichum*. Ce genre est un des formes anamorphes associées au *Chaetomium* mais le nom générique *Botryotrichum* est beaucoup moins fréquemment utilisé que *Chaetomium* (Zhang et al., 2016 ; Wang et al., 2016b).

Selon notre étude phylogénétique multi-gène, les trois souches H1, H38 et H42 ont formé deux branches séparées des autres espèces du *Chaetomium* ce qui indique qu'elles peuvent être deux nouvelles espèces, une présentée par la souche H1 et une autre par les deux souches H38 et H42. Des études complémentaires doivent être effectuées pour confirmer ce résultat.

L'étape du choix d'une séquence en tant que code-barres d'ADN utilisé pour identifier un taxon fongique spécifique est très importante. Les codes-barres d'ADN varient selon les genres et les espèces. De nombreuses études ont indiqué que l'ITS était le code à barres potentiel pour la plupart des champignons mais il n'est pas toujours suffisamment variable pour distinguer toutes les espèces. Plusieurs régions codant pour des protéines telles que les gènes TEF1- $\alpha$ , RPB1, RPB2,  $\beta$ -tub et CaM sont acceptées comme codes à barres secondaires, cependant, un seul gène pourrait ne pas être suffisant pour la phylogénie fongique. Par conséquent, l'alignement concaténé de la région ITS avec un ou plusieurs marqueurs secondaires peut être efficace pour l'identification d'un champignon au niveau de l'espèce (Tekpinar et Kalmer, 2019).

Les résultats de l'identification moléculaire ont été généralement en parfaite concordance avec les résultats de l'identification morphologique ; cependant, des différences ont été obtenues pour quelques souches.

La souche H2 identifiée morphologiquement comme *Talaromyces* sp. a été identifiée sur la base de la séquence d'ITS comme *Gymnoascus dankaliensis*. *Talaromyces* et *Eupenicillium* sont les formes téléomorphes du *Penicillium* mais la différence entre ces deux genres est que *Talaromyces* se caractérise par la formation de gymnothèces alors que le genre

*Eupenicillium* forme des cleistothèces sclérotioides dures et macroscopiques (Samson et al., 2002).

Des genres appartenant à la famille Gymnoascaceae comme *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Narasimhella* et *Gymnoascus* produisent des gymnothèces qui ressemblent à ceux des *Talaromyces*. La principale caractéristique qui permet de distinguer entre *Talaromyces* et ces genres est la forme imparfaite (Kuehn, 1958; Amelia et al., 1972). Chez les genres des Gymnoascaceae, la forme imparfaite est absente ou représentée par des arthrospores ou aleuriospores alors que chez les *Talaromyces*, des phialoconidies caractéristiques du *Penicillium* sont produites (Kuehn, 1958 ; Apinis, 1964; Amelia et al., 1972). En raison de la similitude de leurs gymnothèces et du fait que chez certaines souches de *Talaromyces* la forme imparfaite ne se produise que faiblement, les espèces de *Talaromyces* ont souvent été confondues avec *Arachniotus* et *Gymnoascus* (Ghosh et al., 1961 ; Orr et al., 1963). En 2002, les genres *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Gymnoascoideus* et *Narasimhella* ont été synonymisés avec *Gymnoascus* sur la base des études morphologiques et moléculaires de Solé et al. (2002), faisant de *Gymnoascus* l'un des plus grands genres de l'ordre des Onygenales.

Les différences entre le résultat de l'identification morphologique et l'identification moléculaire obtenues pour 7 autres souches sont dues aux études phylogénétiques effectuées par plusieurs chercheurs qui ont révisé la taxonomie de différents champignons.

La souche S15 identifiée morphologiquement comme *Aspergillus ustus* a été identifié sur la base de la séquence de  $\beta$ -tubuline comme *Aspergillus calidoustus*. Les souches appartenant à *Aspergillus calidoustus* ont été auparavant identifié comme *Aspergillus ustus* en se basant sur les caractères morphologiques jusqu'au 2008 où Varga et al. ont décrit *A. calidoustus* comme une nouvelle espèce dans la section *Usti* sur la base d'une étude phylogénétique des séquences de  $\beta$ -tubuline, calmoduline et actine, la capacité de cette espèce à croître à 37°C ou plus et à produire l'acide cyclopiazonique.

Les caractères morphologiques de la souche R8 ont permis de classer cette souche dans le genre *Acremonium* alors que l'étude moléculaire a identifié cette souche comme *Sarocladium strictum*. *Acremonium* est un genre large et complexe d'Ascomycota, sa taxonomie a été révisée sur la base d'une étude moléculaire et phylogénétique de Summerbell et al. (2011) et de Giraldo et al. (2015) et certaines espèces ont été transférées au genre *Sarocladium* qui est phylogénétiquement distinct de l'*Acremonium*.

Le *Sarocladium* peut être morphologiquement différencié d'*Acremonium* par ses phialides allongés solitaires sur des conidiophores à ramification répétée et la production de conidies allongées ; chez les *Acremonium*, les conidiophores sont principalement non ou faiblement ramifiés et les conidies sont de forme plus variable (Summerbell et al., 2011).

Selon Giraldo et al. (2015), beaucoup d'espèces d'*Acremonium* n'ont toujours pas de taxonomie claire. Beaucoup de recherches doivent encore être menées sur ces espèces qui

partagent tous des structures morphologiques simples, mais présentent une grande diversité génétique.

Deux souches (C3 et R29) ont été morphologiquement identifiées comme *Verticillium sp.*. Le résultat de l'identification moléculaire a montré que la souche C3 est un *Gibellulopsis nigrescens* et la souche R29 est un *Lecanicillium sp.*.

L'espèce *Gibellulopsis nigrescens* appartenait auparavant au genre *Verticillium* section Nigrescentia espèce *Verticillium nigrescens*. Des études phylogénétiques ont montré que l'espèce *V. nigrescens* n'appartient plus au genre *Verticillium* et elle est étroitement liée à *Gibellulopsis piscis*. Depuis 2007, la nouvelle nomination *Gibellulopsis nigrescens* a été attribué à cette espèce (Zare et al., 2007). Une autre révision de la taxonomie du genre *Verticillium* a conduit au transfert des espèces du *Verticillium* section Prostrata au genre *Lecanicillium* (Zare et Gams, 2001). Puisque des espèces des genres *Gibellulopsis* et *Lecanicillium* appartenait auparavant au genre *Verticillium*, ces espèces sont souvent identifiées comme *Verticillium* en se basant sur les caractères morphologiques.

La souche B1 a été morphologiquement identifiée comme *Paecilomyces sp.* et comme *Purpureocillium lilacinum* sur la base de la séquence d'ITS. Le genre *Paecilomyces* comprend de nombreuses espèces saprophytes, qui sont régulièrement isolées du sol, des végétaux en décomposition, insectes, nématodes et sont des opportunistes occasionnels chez les humains et les animaux (Luangsa-ard et al., 2011).

Les espèces précédemment attribuées aux *Paecilomyces* causant des mycoses humaines comprennent les espèces *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces javanicus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii*, *Paecilomyces taitungiacus*, *Paecilomyces variotii* et *Paecilomyces viridis*. La classification de *Paecilomyces* a été révisée par plusieurs auteurs et sur la base des études phylogénétiques les espèces *P. javanicus* et *P. farinosus* ont été affiliées au genre *Isaria* (Luangsa-ard et al., 2004), *P. viridis* à *Chamaeleomyces* (Sigler et al., 2010), *P. variotii* et *P. marquandii* sont retenues dans *Paecilomyces* et *P. lilacinus* a été transféré au genre *Purpureocillium*, espèce *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-ard et al., 2011).

La souche R5 identifié morphologiquement comme *Myrothecium* a été identifié comme *Albifimbria verrucaria* sur la base des séquences d'ITS. Le genre *Albifimbria* a été introduit avec 12 autres genres dans la famille *Stachybotriaceae* qui renfermait les trois genres *Myrothecium*, *Peethambara* et *Stachybotrys* après révision de sa taxonomie par Lombard et al. (2016). Le genre *Albifimbria* inclue des espèces qui été précédemment considéré comme *Myrothecium*.

La souche R20 a été identifiée comme *Helminthosporium sp.*. L'analyse des séquences d'ITS a montré que cette souche appartienne au genre *Bipolaris* ou *Curvularia*, la séquence d'EF1 a permis d'identifier la souche comme *Curvularia spicifera*.

Le genre *Helminthosporium* était initialement divisé en deux sous-genres *Cylindro-Helminthosporium* et *Eu-Helminthosporium*. Après plusieurs études taxonomiques,

*Helminthosporium* a été séparé en plusieurs genres y compris *Bipolaris*, *Curvularia* et *Drechslera* (Manamgoda et al. 2014).

Le genre *Drechslera* a été caractérisé par des conidies cylindriques droites qui germent avec un ou plusieurs tubes germinatifs de n'importe quelle cellule. Le genre *Bipolaris* a été caractérisé par des conidies fusoides, droites ou courbes, avec une courbure qui n'est pas seulement évidente dans les cellules médianes mais dans toute la conidie, et germant à partir d'un tube germinatif à chaque extrémité. Les conidies de *Curvularia* peuvent être droites ou courbes et, lorsqu'elles sont courbées, les conidies ont des cellules intermédiaires élargies et cela contribue à leur courbure (Shoemaker 1959 ; Manamgoda et al. 2012). *Bipolaris* et *Curvularia* partagent de nombreuses similitudes morphologiques et plusieurs espèces de *Bipolaris* sont désormais placées dans le genre *Curvularia* sur la base d'analyses phylogénétiques (Sivanesan 1987 ; Tan et al., 2014). L'analyse moléculaire et phylogénétique des séquences d'ITS en combinaison avec LSU, GPDH et TEF sont capables de séparer de manière fiable ces deux genres (Manamgoda et al., 2014).

La taxonomie fongique est une discipline dynamique et progressive qui nécessite par conséquent des changements de nomenclature. Les champignons sont principalement classés sur la base de leur morphologie plutôt que sur les différences nutritionnelles et biochimiques qui sont d'une grande importance dans la classification bactérienne (Guarro et al., 1999).

Sur cette base morphologique, différents chercheurs ont décrit la même espèce fongique en lui donnant plusieurs noms. En plus, la forme anamorphe et la forme téléomorphe d'un même champignon se développent généralement à des moments différents et sur des substrats différents, pour cela les mycologues ont attribué des noms séparés pour les différentes formes anamorphes et téléomorphes (Hennebert et Weresub, 1977).

L'avènement de la biologie moléculaire a influencé le concept traditionnel de la systématique et a créé des changements significatifs dans la taxonomie fongique. Plusieurs chercheurs mycologues ont révisé la taxonomie des champignons en utilisant des techniques de la biologie moléculaire et des approches phylogénétiques et ils ont introduit plusieurs nouveaux taxons ce qui a abouti à une nouvelle nomination de plusieurs espèces fongiques.

La possession de plusieurs noms synonymes pour une même espèce peut créer une certaine confusion parmi les utilisateurs de la systématique fongique. Afin de clarifier cette confusion et de faciliter la communication scientifique et les travaux de recherches, les champignons ne peuvent plus avoir plus d'un nom scientifique selon le nouveau concept «One Fungus, One Name» (un champignon, un nom) du Code International de Nomenclature (ICN) des algues, champignons et plantes. Bien que la détermination du nom scientifique à utiliser repose sur le principe de priorité, il existe des situations dans lesquelles l'application d'un principe strict de priorité ne contribue pas à la stabilité de la nomenclature des champignons. Ce concept a bien été expliqué par Rossman (2014).

## ***Chapitre 3***

# ***Répartition et caractérisation des souches***

### 1- Répartition des souches

Un total de 83 isolats appartenant à 32 espèces, 17 genres et 5 ordres : Hypocreales, Eurotiales, Pleosporales, Capnodiales et Microascales de la division Ascomycota ont été isolés de la zone 1 où dominent les plantes halophiles et les cultures céréalières (fig. 53). L'ordre des Hypocreales est le plus dominant (48% des souches) suivi par l'ordre des Eurotiales (40% des souches). Aucune espèce de la division Basidiomycota ou de l'ordre des Onygenales ou Sordariales n'a été isolée de cette zone (fig. 54).

Un total de 53 isolats appartenant à 21 espèces, 14 genres et 6 ordres de la division Ascomycota : Eurotiales, Onygenales, Hypocreales, Pleosporales, Capnodiales et Sordariales et deux ordres de la division Basidiomycota ont été isolés de la zone 2 caractérisée par une absence totale de végétation (fig. 53). Aucune espèce de l'ordre des Microascales n'a été isolée de cette zone, l'ordre des Hypocreales n'est pas dominant et seulement 4% des souches appartiennent à cet ordre. L'ordre le plus dominant est celui des Eurotiales (47%) suivi par l'ordre des Onygenales (19%) et Pleosporales (13%) (fig. 55) (tableau 15).

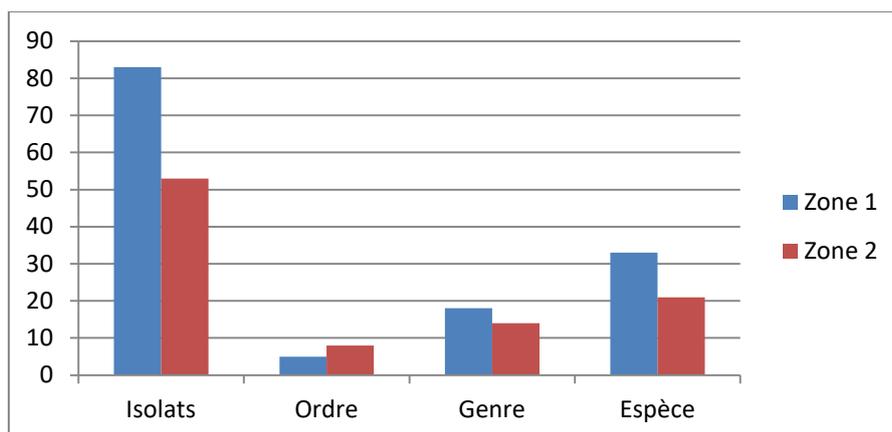


Figure 53 : Répartition des isolats dans les deux zones.

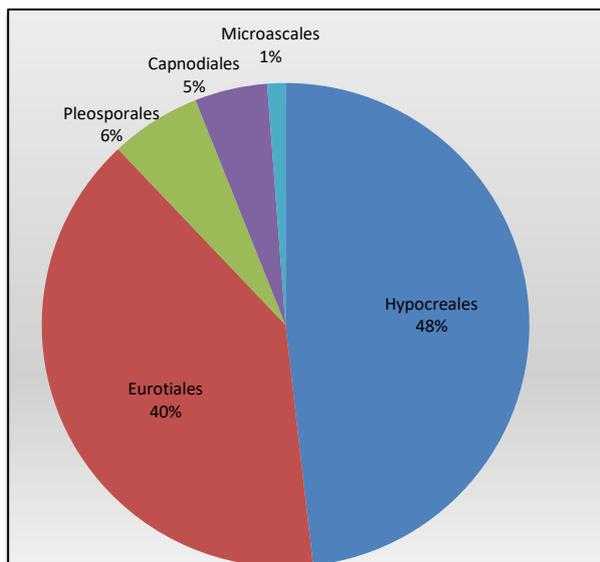


Figure 54: Ordres fongiques isolés de la zon1

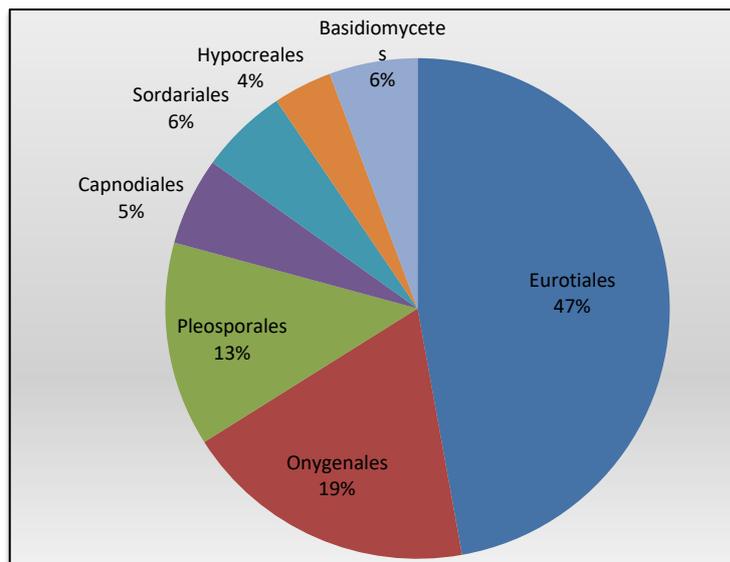


Figure 55 : Ordres fongiques isolés de la zon2

### 1.1. Souches isolées de la zone 1

Le genre *Fusarium* est le genre le plus dominant représentant 31% de la flore totale isolée dans cette zone (fig. 56). Les espèces isolées sont *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. brachygibbosum*, et *Fusarium sp.* souche R1. L'espèce *F. equiseti* est la plus fréquemment isolée, représentant 58% des espèces de *Fusarium spp.* et 18% des souches isolés dans cette zone (fig. 57). Le deuxième genre dominant est le *Penicillium* avec une fréquence de 27% suivi par *Aspergillus* (13%). Le genre *Penicillium* est représenté par 8 espèces : *P. flavigenum*, *P. griseofulvum*, *P. canescens*, *P. mariae-crucis*, *P. vinaceum*, *P. longicatenatum* et les deux formes téléomorphe *P. egyptiacum* et *Penicillium sp.* souches R32 et R33. Le genre *Aspergillus* est représenté par 4 espèces: *A. terreus*, *A. calidoustus*, *A. europaeus* et la forme téléomorphe *A. amstelodami*. Les deux formes téléomorphes *A. amstelodami* et *P. egyptiacum* sont les plus dominantes par rapport aux espèces de *Penicillium* et *Aspergillus* isolées dans cette zone (fig. 58).

Deux souches de *Trichoderma* identifiées comme *T. gamsii* et *Trichoderma sp.* ont été isolées du sol des cultures céréalières. Ces deux souches ainsi que le reste des souches appartenant aux ordres des Hypocréales, Pleosporales, Microascales et Capnodiales sont les moins fréquemment isolés.

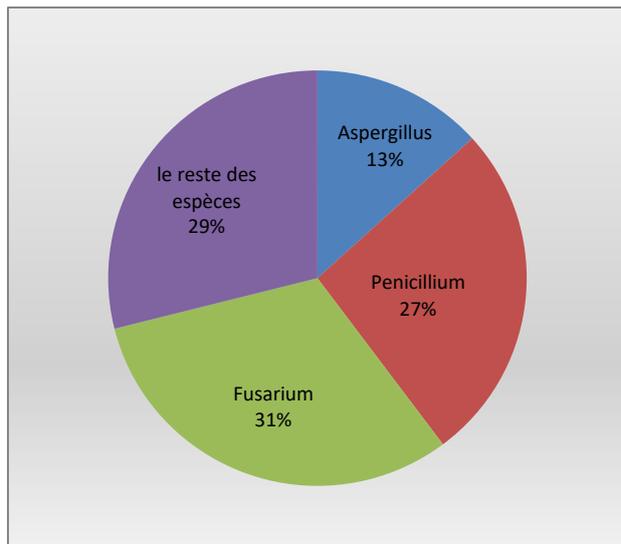


Figure 56: Pourcentage d'isolement des espèces dans la zone 1

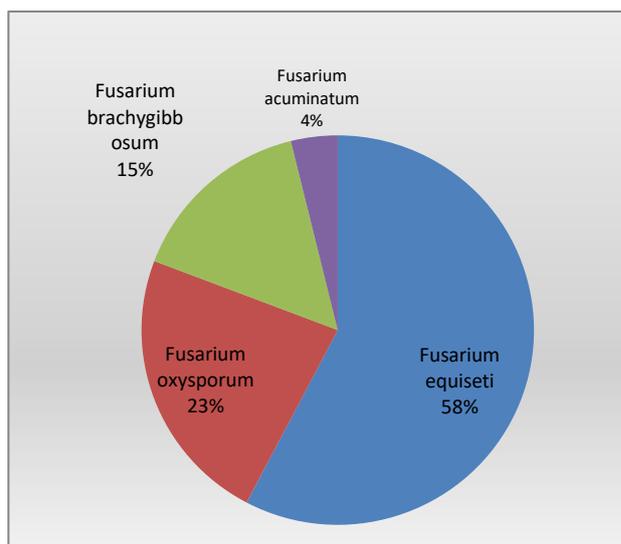


Figure 57 : Pourcentage d'isolement des espèces de *Fusarium* dans la zone 1

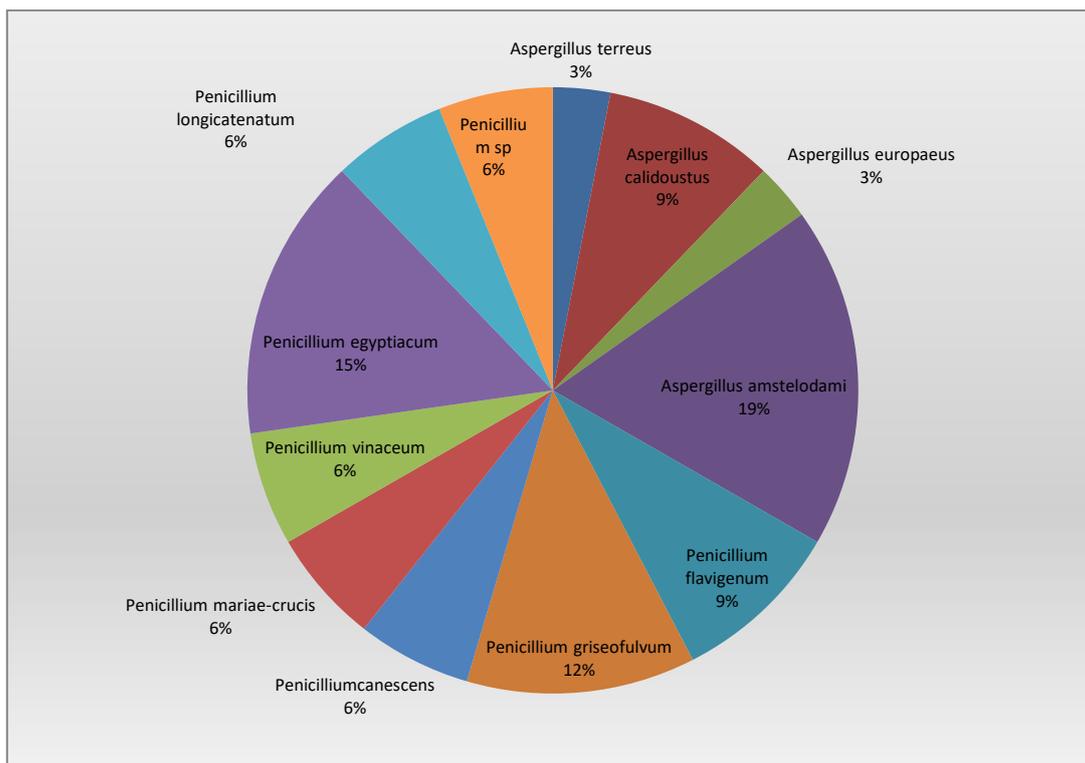


Figure 58 : Pourcentage d'isolement des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans la zone 1

## 1.2. Souches isolées de la zone 2

Contrairement à la zone 1 où le genre *Fusarium* était dominant, ce genre ainsi que tous les genres de l'ordre des Hypocreales isolés de la zone 1, n'ont pas été isolés de la zone 2 à l'exception de l'espèce *S. strictum* qui a été isolée des deux zones. Les deux genres les plus dominants dans la zone 2 sont *Aspergillus* et *Penicillium* qui regroupent ensemble 47% des souches (fig. 59). Ces deux genres sont représentés par les espèces *A. subramaniani*, *A. calidoustus*, *Aspergillus sp. A. amstelodami*, *P. flavigenum*, *P. griseofulvum*, *P. allii* et *P. egyptiacum*. Parmi ces espèces, *A. amstelodami* et *P. egyptiacum* sont les plus fréquemment isolées (fig. 60).

Par rapport à l'ensemble des espèces isolées de cette zone, *Gymnoascus denkaiensis*, *A. amstelodami*, *P. egyptiacum* et *Alternaria sp.* sont les plus dominantes.

Le reste des souches isolées de cette zone appartiennent à des espèces de la division Ascomycota : *Gymnoascus halophilus*, *Chrysosporium sp.*, *Arachnomyces sp.*, *Chaetomium sp.*, *Alternaria sp.*, *Pleospora sp.*, *Curvularia spicifera* et *Cladosporium ramotenellum*, et deux espèces de la division Basidiomycota : *Ustilago cynodontis* et *Wallemia sp.*. Ces espèces sont moins fréquemment isolées (fig. 61).

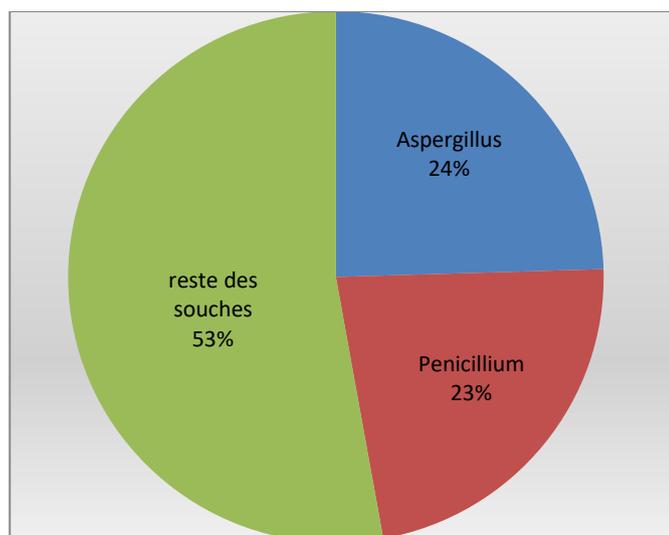


Figure 59 : Pourcentage d'isolement d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans la zone 2

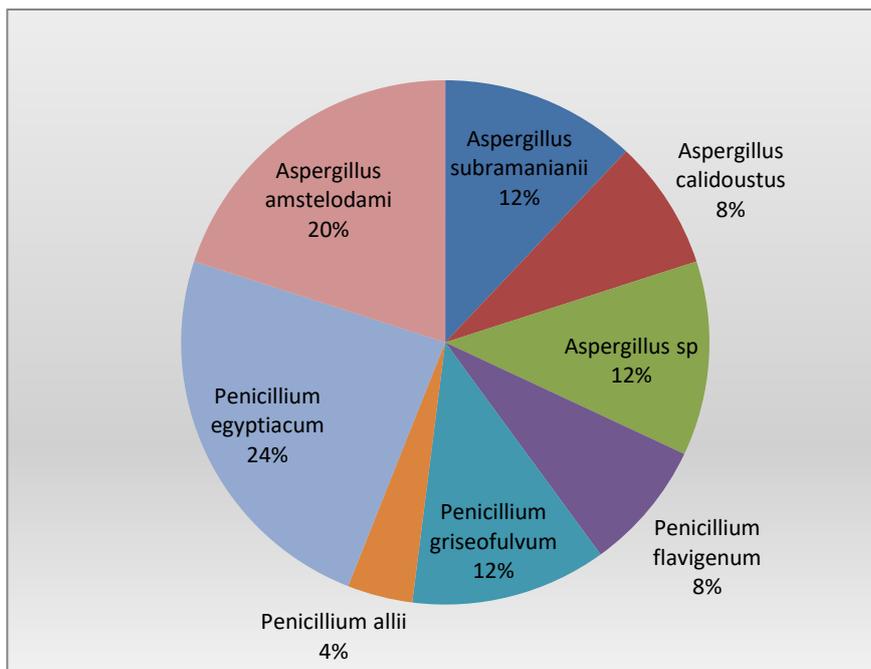


Figure 60 : Pourcentage d'isolement des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans la zone 2

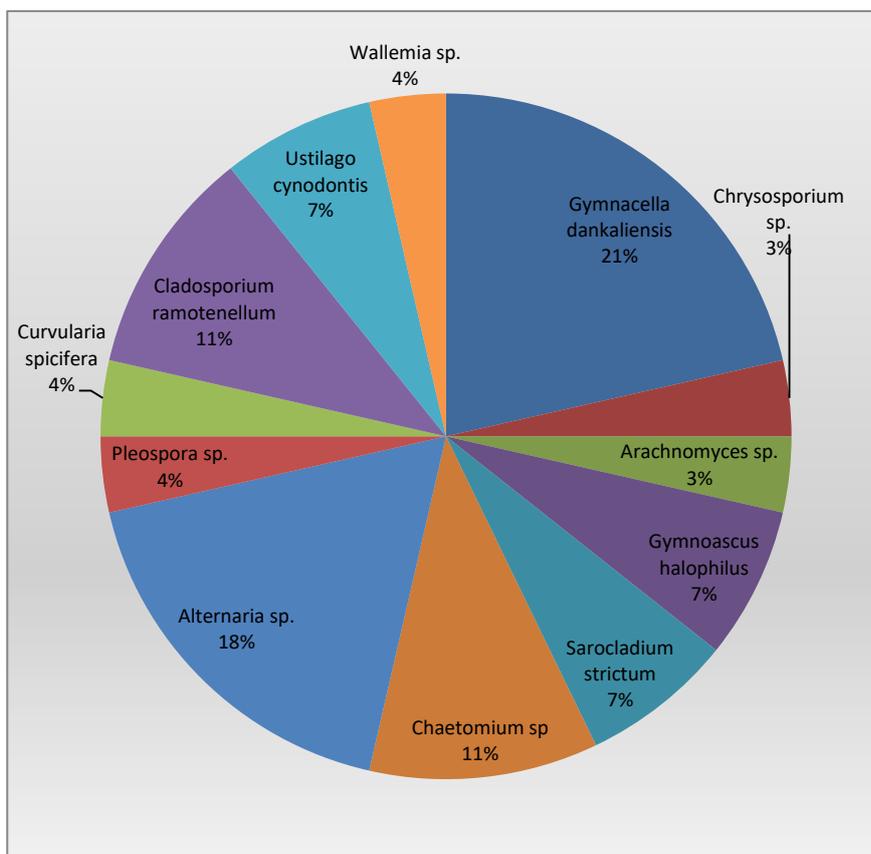


Figure 61 : Pourcentage d'isolement des espèces de la zone 2 à l'exception des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*

Tableau 15 : Répartition des souches dans les deux zones

Souches	Code des souches	Nombre d'isolats	
		Zone 1	Zone 2
<b>Eurotiales</b>			
<i>Aspergillus subramanianii</i>	A1	-	1
<i>Aspergillus subramanianii</i>	A2	-	2
<i>Aspergillus terreus</i>	S11	1	-
<i>Aspergillus calidoustus</i>	S15	3	2
<i>Aspergillus europaeus</i>	S20	1	-
<i>Aspergillus sp</i>	A4	-	1
<i>Aspergillus sp</i>	E2	-	1
<i>Aspergillus sp</i>	E7	-	1
<i>Aspergillus amstelodami</i>	H12	6	5
<i>Penicillium flavigenum</i>	S16	3	2
<i>Penicillium griseofulvum</i>	S17	4	3
<i>Penicillium canescens</i>	S18	2	-
<i>Penicillium mariae-crucis</i>	S19	2	-
<i>Penicillium allii</i>	H22	-	1
<i>Penicillium vinaceum</i>	R7	2	-
<i>Penicillium egyptiacum</i>	E9	5	6
<i>Penicillium longicatenatum</i>	S12	2	-
<i>Penicillium sp</i>	R32	1	-
<i>Penicillium sp</i>	R33	1	-
<b>Onygenales</b>			
<i>Gymnoascus dankaliensis</i>	H2	-	6
<i>Chrysosporium sp.</i>	H18	-	1
<i>Arachnomyces sp.</i>	H10	-	1
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H19	-	1
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H20	-	1
<b>Hypocreales</b>			
<i>Fusarium oxysporum</i>	B8	6	-
<i>Fusarium equiseti</i>	D3	15	-
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	R38	2	-
<i>Fusarium acuminatum</i>	S8	1	-
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	S7	2	-
<i>Fusarium sp</i>	R1	1	-
<i>Sarocladium strictum</i>	R8	2	2
<i>Trichoderma gamsii</i>	S2	1	-
<i>Trichoderma sp.</i>	G15	1	-
<i>Tritirachium sp</i>	B2	1	-
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	C3	2	-
<i>Beauveria bassiana</i>	R13	1	-
<i>Lecanicillium sp.</i>	R29	1	-
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	B1	2	-
<i>Albifimbria verrucaria</i>	R5	1	-
<i>Clonostachys rosea</i>	S3	1	-
<b>Sordariales</b>			
<i>Chaetomium sp</i>	H1	-	1

<i>Chaetomium sp</i>	H38	-	1
<i>Chaetomium sp</i>	H42	-	1
<b>Microascales</b>			
<i>Scopulariopsis candida</i>	B5	1	-
<b>Pleosporales</b>			
<i>Alternaria sp.</i>	G5	3	5
<i>Pleospora sp.</i>	H43	1	1
<i>Curvularia spicifera</i>	R20	1	1
<b>Capnodiales</b>			
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	R36	4	3
<b>Basidiomycètes</b>			
<i>Ustilago cynodontis</i>	H14	-	2
<i>Wallemia sp.</i>	H15	-	1
Nombre total des isolats	136	83	53
Nombre totale des genres	24	17	14
Nombre total des espèces identifiées	30	25	13
Nombre total des espèces non identifiées	13	7	8

## 2- Test d'halotolérance

Le résultat du test de la tolérance des souches au sel représenté dans le tableau 16 montre que toutes les souches peuvent se développer sur milieu PDA sans NaCl à l'exception de *Wallemia sp.* et des deux souches de *Gymnoascus halophilus* H19 et H20 qui sont halophiles obligatoires.

Toutes les souches appartenant à l'ordre des Eurotiales, Onygenales et Microascales peuvent croître à 12.5% de NaCl à l'exception de *Chrysosporium sp.* qui a un maximum de croissance à 7.5%. Huit souches peuvent croître à 15% et seulement 5 souches à 17.5%. Toutes les souches préfèrent un milieu de culture additionné de NaCl. L'optimum de croissance est à une concentration saline qui varie entre 2.5% et 5% selon l'espèce et est de 7.5% pour *A. amstelodami* et de 10% pour les deux souches halophiles obligatoires *Gymnoascus halophilus*.

Une différence de tolérance au sel est observée chez les trois souches d'*Aspergillus sp.* A4 E2 et E7. La souche A4 est plus tolérante au sel par rapport aux souches E2 et E7. Cette souche peut croître à 17.5% de NaCl alors que le maximum de croissance des deux souches E2 et A7 est à 15%. Cette différence de tolérance au sel est aussi observée chez les deux souches R32 et R33 où la souche R32 est plus tolérante pouvant croître à 15% de NaCl alors que la souche R33 peut croître au maximum à 12.5% (fig. 62, 63).

L'optimum de croissance des souches appartenant aux restes des ordres de la division Ascomycota est à une concentration saline qui varie entre 0% et 5%. Aucune de ces souches ne peut croître à une concentration de plus de 12.5%. Cette concentration est maximale pour *Tritirachium sp.*, *Lecanicillium sp.*, *Alternaria sp.*, *Pleospora sp.*, *Curvularia spicifera*,

*Cladosporium* et *Chaetomium sp.* souche H42. et toutes les souches de *Fusarium* à l'exception de *F. acuminatum* qui a un maximum de croissance à 10%. La souche H42 de *Chaetomium sp.* est plus tolérante au sel par rapport à *Chaetomium sp.* souche H38 qui peut croître au maximum à 10%. Les deux souches de *Trichoderma* et la souche *Ustilago cynodontis* sont les moins tolérantes au sel avec un maximum de croissance à 5% de NaCl. La souche halophile obligatoire *Wallemia sp.* est la plus tolérante au sel pouvant croître à 20% de NaCl (fig. 64, 65).

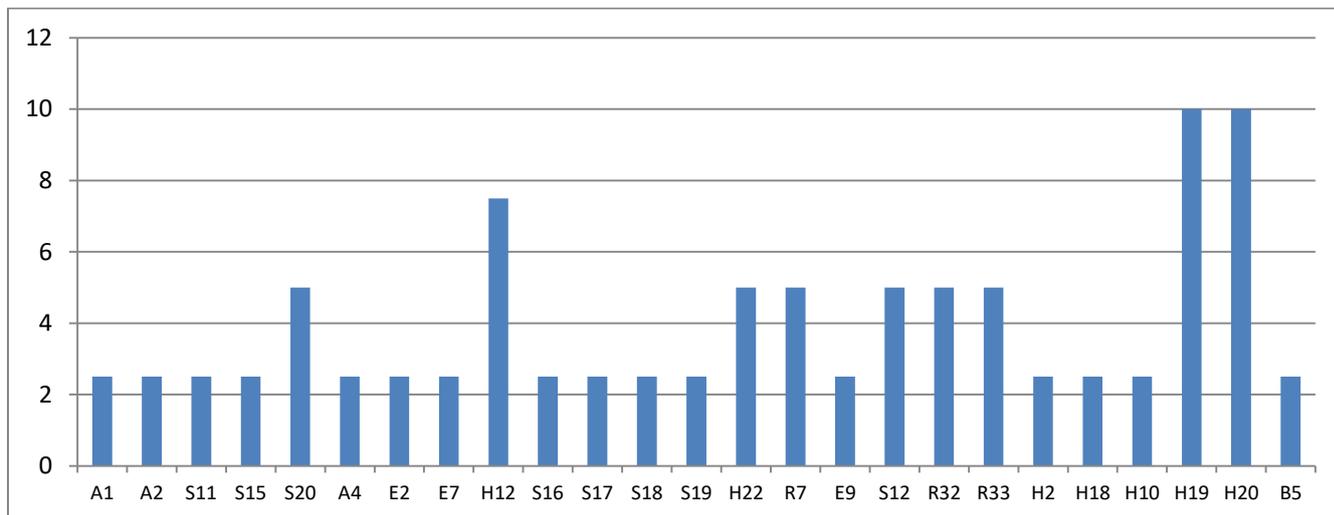


Figure 62 : Concentration saline optimale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Eurotiales, Onygenales et Microascales.

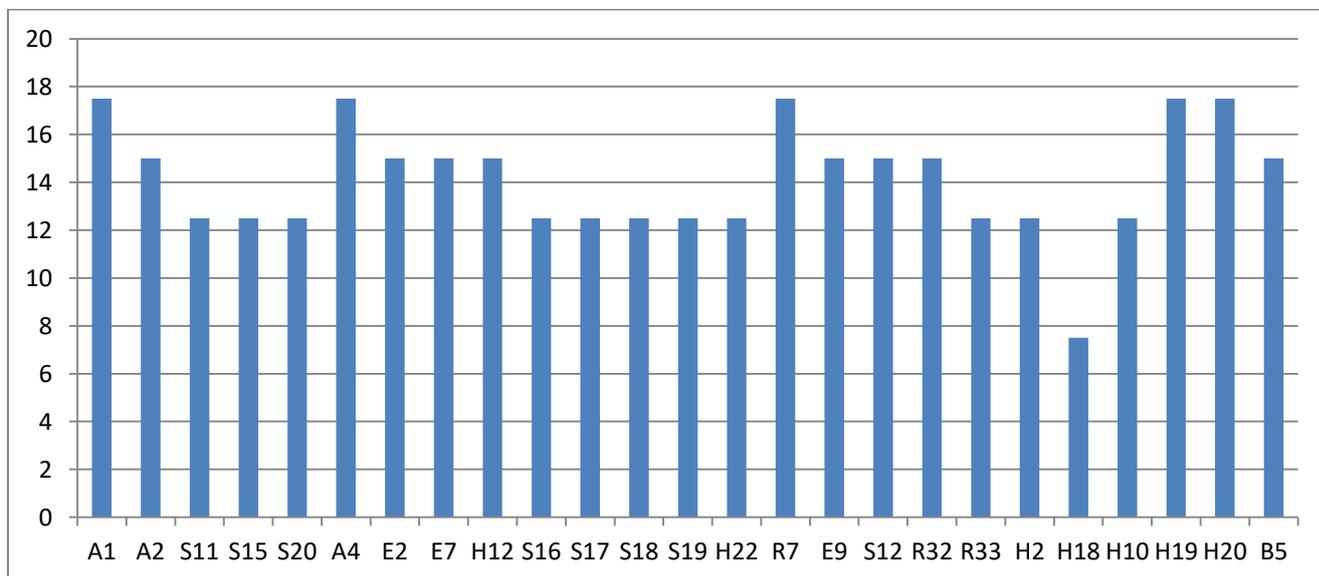


Figure 63 : Concentration saline maximale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Eurotiales, Onygenales et Microascales.

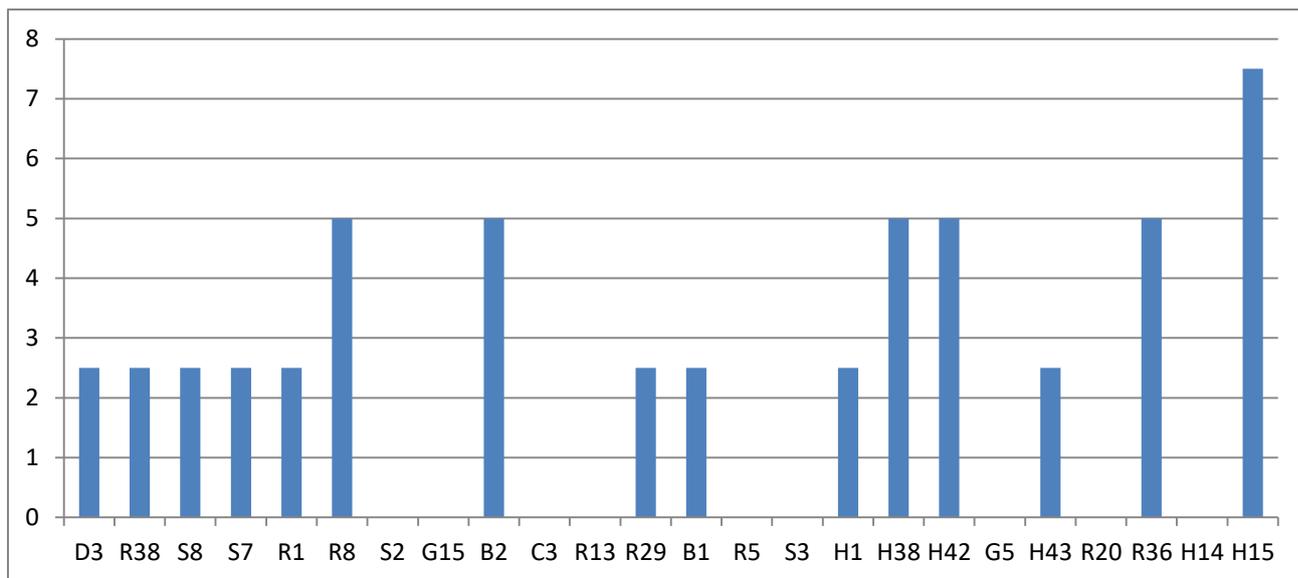


Figure 64 : Concentration saline optimale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Hypocreales, Sordariales, pleosporales, Capnodiales et les espèces Basidiomycètes

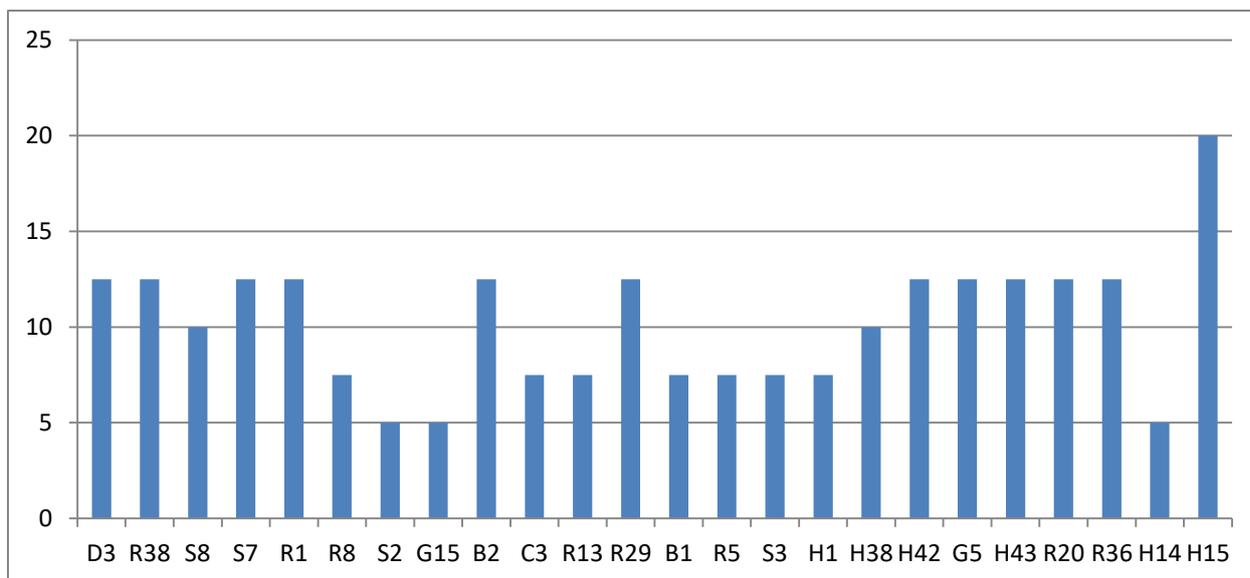


Figure 65 : Concentration saline maximale pour la croissance radiale des espèces de l'Ordre Hypocreales, Sordariales, pleosporales, Capnodiales et les espèces Basidiomycètes

Tableau 16 : la tolérance des souches au sel

Souches	Code	Halotolérance (NaCl %)	
		Intervalle de croissance	Optimum
<b>Eurotiales</b>			
<i>Aspergillus subramanianii</i>	A1	0 – 17.5	2.5
<i>Aspergillus subramanianii</i>	A2	0 – 15.0	2.5
<i>Aspergillus terreus</i>	S11	0 – 12.5	2.5
<i>Aspergillus calidoustus</i>	S15	0 – 12.5	2.5
<i>Aspergillus europaeus</i>	S20	0 – 12.5	5
<i>Aspergillus sp</i>	A4	0 – 17.5	2.5
<i>Aspergillus sp</i>	E2	0 – 15.0	2.5
<i>Aspergillus sp</i>	E7	0 – 15.0	[2.5-7.5]
<i>Aspergillus amstelodami</i>	H12	0 – 15.0	7.5
<i>Penicillium flavigenum</i>	S16	0 – 12.5	2.5
<i>Penicillium griseofulvum</i>	S17	0 – 12.5	2.5
<i>Penicillium canescens</i>	S18	0 – 12.5	2.5
<i>Penicillium mariae-crucis</i>	S19	0 – 12.5	2.5
<i>Penicillium allii</i>	H22	0 – 12.5	5
<i>Penicillium vinaceum</i>	R7	0 – 17.5	5
<i>Penicillium egyptiacum</i>	E9	0 – 15.0	2.5
<i>Penicillium longicatenatum</i>	S12	0 – 15.0	5
<i>Penicillium sp</i>	R32	0 – 15.0	5
<i>Penicillium sp</i>	R33	0 – 12.5	5
<b>Onygenales</b>			
<i>Gymnacella dankaliensis</i>	H2	0 – 12.5	2.5
<i>Chrysosporium sp.</i>	H18	0 – 7.50	2.5
<i>Arachnomyces sp.</i>	H10	0 – 12.5	2.5
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H19	2.5 – 17.5	10
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H20	2.5 – 17.5	10
<b>Hypocreales</b>			
<i>Fusarium oxysporum</i>	B8	0 – 12.5	2.5
<i>Fusarium equiseti</i>	D3	0 – 12.5	2.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	R38	0 – 12.5	2.5
<i>Fusarium acuminatum</i>	S8	0 – 10.0	2.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	S7	0 – 12.5	2.5
<i>Fusarium sp</i>	R1	0 – 12.5	2.5
<i>Sarocladium strictum</i>	R8	0 – 7.50	5
<i>Trichoderma gamsii</i>	S2	0 – 5.0	0
<i>Trichoderma sp.</i>	G15	0 – 5.0	0
<i>Tritirachium sp</i>	B2	0 – 12.5	[2.5-5.0]
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	C3	0 – 7.50	0
<i>Beauveria bassiana</i>	R13	0 – 7.50	0
<i>Lecanicillium sp.</i>	R29	0 – 12.5	2.5
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	B1	0 – 7.50	2.5
<i>Myrothecium verrucaria</i>	R5	0 – 7.50	0
<i>Clonostachys rosea</i>	S3	0 – 7.50	0

<b>Sordariales</b>			
<i>Chaetomium sp</i>	H1	0 – 7.50	2.5
<i>Chaetomium sp</i>	H38	0 – 10.0	[2.5-5.0]
<i>Chaetomium sp</i>	H42	0 – 12.5	5
<b>Microascales</b>			
<i>Microascus manginii</i>	B5	0 – 15.0	2.5
<b>Pleosporales</b>			
<i>Alternaria sp.</i>	G5	0 – 12.5	0
<i>Pleospora sp.</i>	H43	0 – 12.5	2.5
<i>Curvularia spicifera</i>	R20	0 – 12.5	0
<b>Capnodiales</b>			
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	R36	0 – 12.5	5
<b>Basidiomycètes</b>			
<i>Ustilago cynodontis</i>	H14	0 – 5.0	0
<i>Wallemia sp.</i>	H15	2.5 - 20	[2.5-7.0]

### 3- Production d'enzymes hydrolytiques

La sécrétion des enzymes extracellulaires (lipase, amylase, protéase et cellulase) par les 50 souches sélectionnées pour l'analyse moléculaire a été détectée sur milieux de culture solides contenant le substrat spécifique de chaque enzyme. Les souches qui présentent un indice enzymatique (IE) égal ou supérieur à 2 sont considérées comme des bons producteurs de l'enzyme étudié.

L'indice enzymatique des souches représenté dans le tableau 17 montre que toutes les souches ont la capacité de sécréter au moins une enzyme ; l'enzyme cellulase est sécrétée par 94% des souches, 68% des souches sécrètent l'enzyme protéase et 48% sécrètent l'enzyme amylase et 46% sécrètent l'enzyme lipase (fig.66). Cependant, un résultat négatif ne permet pas de confirmer l'incapacité d'une souche à produire l'enzyme. Cela peut signifier que le milieu est inadéquat pour la détection de l'enzyme ou que l'enzyme n'a pas été libérée du mycélium ou bien l'enzyme a été sécrétée dans le milieu mais le mycélium a prédominé et couvert la zone de visualisation de l'activité enzymatique.

**Tableau 17 : Activité enzymatique des souches**

Souches	Code	Index enzymatique (IE)			
		lipase	amylase	protéase	cellulase
<i>Aspergillus subramaninii</i>	A1	-	-	0.21	1
<i>Aspergillus subramaninii</i>	A2	0.5	0.57	0.2	1.6
<i>Aspergillus terreus</i>	S11	0.2	-	0.2	1.8
<i>Aspergillus calidoustus</i>	S15	0.33	0.21	-	3
<i>Aspergillus europaeus</i>	S20	-	0.3	1	2
<i>Aspergillus sp</i>	A4	0.5	2.0	2.4	4.66

<i>Aspergillus sp</i>	E2	-	0.5	1	3
<i>Aspergillus sp</i>	E7	-	-	0.3	1.2
<i>Aspergillus amstelodami</i>	H12	0.8	-	-	2.5
<i>Penicillium flavigenum</i>	S16	0.2	0.28	0.3	0.8
<i>Penicillium griseofulvum</i>	S17	1.4	0.8	-	1.42
<i>Penicillium canescens</i>	S18	1	0.15	1	2
<i>Penicillium mariae-crucis</i>	S19	-	0.5	0.08	0.87
<i>Penicillium allii</i>	H22	0.28	0.6	0.23	2
<i>Penicillium vinaceum</i>	R7	5	1.8	0.8	4.33
<i>Penicillium egyptiacum</i>	E9	0.5	0.5	1.42	2
<i>Penicillium longicatenatum</i>	S12	0.3	1.14	0.75	1
<i>Penicillium sp</i>	R32	0.25	0.55	1.28	1.6
<i>Penicillium sp</i>	R33	0.5	0.4	1.16	1.16
<i>Gymnoascus dankaliensis</i>	H2	0.25	0.5	0.2	-
<i>Chrysosporium sp.</i>	H18	3	-	1	3
<i>Arachnomyces sp.</i>	H10	-	-	0.8	3.33
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H19	-	2	4	5
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H20	-	1.6	4.33	6
<i>Fusarium oxysporum</i>	B8	-	-	-	2.66
<i>Fusarium equiseti</i>	D3	-	-	-	3.33
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	R38	-	-	-	3.33
<i>Fusarium acuminatum</i>	S8	-	0.33	-	1.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	S7	-	-	-	3.66
<i>Fusarium sp</i>	R1	0.33	0.3	0.1	3.33
<i>Sarocladium strictum</i>	R8	0.8	0.5	0.83	3
<i>Trichoderma gamsii</i>	S2	-	-	-	0.75
<i>Trichoderma sp.</i>	G15	0.5	-	-	-
<i>Tritirachium sp</i>	B2	-	-	1	2.5
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	C3	0.83	0.37	-	1.4
<i>Beauveria bassiana</i>	R13	-	0.2	0.36	2.5
<i>Lecanicillium sp.</i>	R29	-	-	0.41	1.66
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	B1	-	-	0.2	1.6
<i>Myrothecium verrucaria</i>	R5	-	-	0.2	0.71
<i>Clonostachys rosea</i>	S3	-	0.3	0.06	0.8
<i>Chaetomium sp</i>	H1	-	-	-	4
<i>Chaetomium sp</i>	H38	-	-	2	1.66
<i>Chaetomium sp</i>	H42	-	-	0.5	3.5
<i>Microascus manginii</i>	B5	-	-	0.3	1.5
<i>Alternaria sp.</i>	G5	-	-	-	1
<i>Pleospora sp.</i>	H43	-	-	-	1.8
<i>Curvularia spicifera</i>	R20	-	-	-	0.46
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	R36	1.2	-	1.4	1.66
<i>Ustilago cynodontis</i>	H14	5	-	4	4.66
<i>Wallemia sp</i>	H15	5	-	-	-

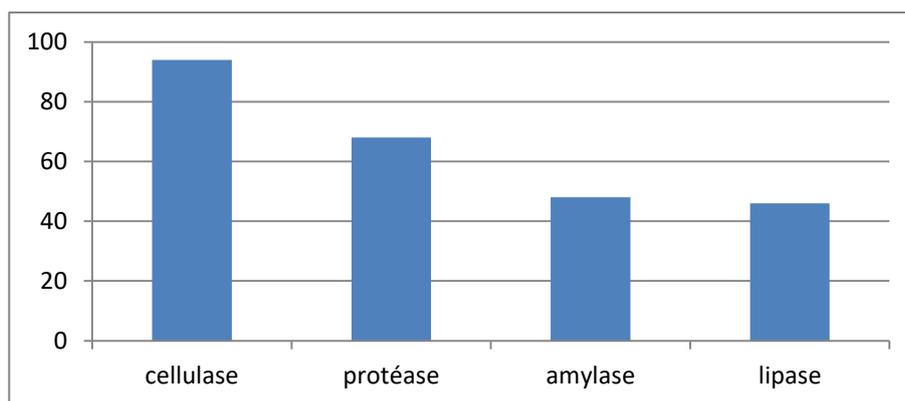


Figure 66 : pourcentage des souches sécrétant chaque enzyme

### 3.1. Enzyme cellulase

La production de l'enzyme cellulase a été révélée par la formation d'une zone d'hydrolyse autour des colonies après inondation des cultures par 5ml d'iode puis rinçage à l'eau distillée. Cette activité enzymatique a été observée chez toutes les souches à l'exception des trois espèces *Gymnascella denkaliensis*, *Trichoderma sp.* et *Wallemia sp.* (fig. 67).

Les espèces de l'ordre des Eurotiales produisent l'enzyme cellulase avec un IE compris entre 0.8 et 4.66. Les bons producteurs de l'enzyme sont : *P. egyptiacum*, *P. allii*, *P. canescens*, *A. amstelodami* et *A. europaeus* avec un IE autour de 2. Une activité cellulasique plus importante a été enregistrée pour les deux espèces *Aspergillus sp.* souche E2 et *A. calidoustus*. Une meilleure production de cellulase a été observée chez les deux espèces *P. vinaceum* et *Aspergillus sp.* souche A4 avec un IE de 4.33 et 4.66 respectivement.

A l'exception de *Gymnoascus dankaliensis*, toutes les espèces de l'ordre des Onygenales sont de bons producteurs de cellulase avec un IE autour de 3 pour les deux espèces *Chrysosporium sp.* et *Arachnomyces sp.* et de 5 et 6 respectivement pour les deux souches H19 et H20 de *Gymnoascus halophilus*. Ces deux souches (H19 et H20) ont l'activité cellulasique la plus élevée par rapport à toutes les souches étudiées.

Les espèces de l'ordre des Hypocreales produisent l'enzyme cellulase avec un IE compris entre 0.71 et 3.66 à l'exception de *Trichoderma sp.* où aucune activité n'a été observée sur le milieu utilisé. Une bonne activité cellulasique a été observée chez les espèces du genre *Fusarium* avec un IE entre 2.66 et 3.66 à l'exception de *F. acuminatum* qui a un IE inférieur à 2 (IE = 1.5). Une bonne production de cellulase a été aussi enregistrée par les trois espèces *Sarocladium strictum* (IE = 3), *Tritirachium sp.* et *Beauveria Bassiana* (IE = 2.5).

L'ordre des Sordariales est représenté par trois souches de *Chaetomium*. Les deux souches H1 et H42 ont une bonne activité cellulasique avec un IE de 4 et 3.5 respectivement alors que la souche H38 a une faible activité avec un IE de 1.66.

Les souches appartenant aux ordres des Microascales, Pleosporales et Capnodiales ont toutes une faible activité cellulasique.

Concernant les deux souches basidiomycètes, une très bonne activité cellulasique a été observé chez *Ustilago cynodontis* avec un IE de 4 alors que *Wallemia sp.* ne produit pas cette enzyme.

En résumé, les souches qui ont l'activité cellulasique la plus élevée sont les deux souches de *Gymnoascus halophilus* H19 et H20 avec un IE de 5 et 6 respectivement suivi par *P. vinaceum*, *Aspergillus sp. souche A4*, *Chaetomium sp. souche H1* et *Ustilago cynodontis* avec un IE compris entre 4 et 4,66 (fig. 68). Une activité moins importante a été observée chez les espèces de *Fusarium*, *Chrysosporium sp.*, *Arachnomyces sp.*, *Sarocladium strictum*, *A. calidoustus*, *Aspergillus sp. souche E2* et *Chaetomium sp. souche H42* avec un IE autour de 3.

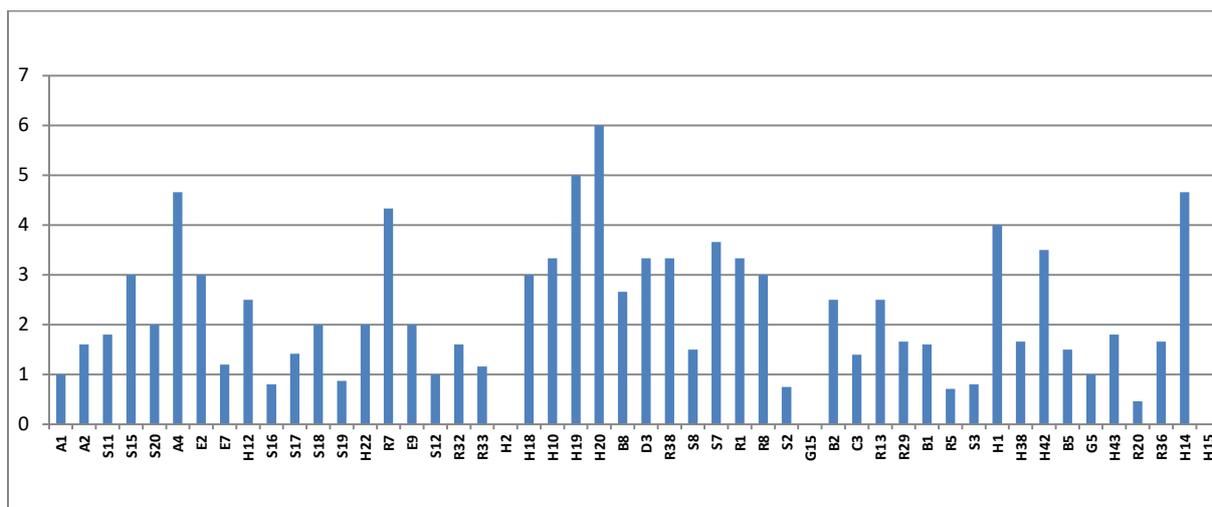


Figure 67 : Activité cellulasique des souches

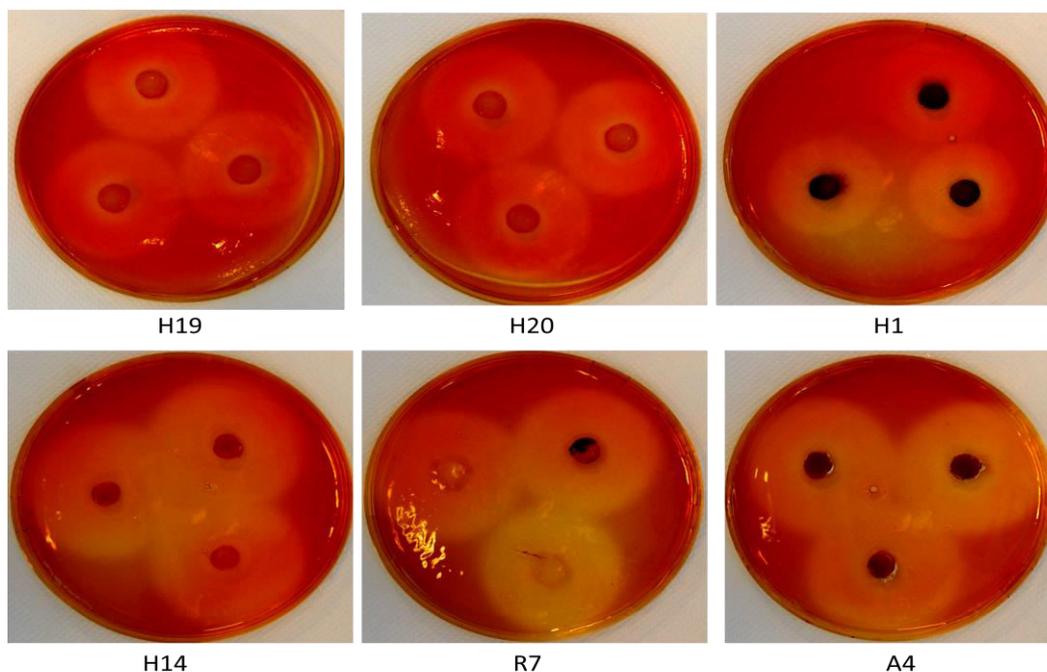


Figure 68 : Souches présentant la plus forte activité cellulasique

### 3.2. Enzyme protéase

La sécrétion de l'enzyme protéase par les souches sur milieu gélose au lait a été observée chez 68% des souches. Cette activité enzymatique, visualisée par la formation d'un halo clair autour des colonies, n'a pas été détectée chez deux espèces d'*Aspergillus* (*A. calidoustus* et *A. amstelodami*), *P. griseofulvum*, les souches de *Fusarium* à l'exception de la souche R1, les deux souches de *Trichoderma*, *G. nigrescens*, la souche H1 de *Chaetomium*, les souches appartenant à l'ordre des Pleosporales et *Wallemia sp.* (fig. 69).

Les deux souches de *Gymnoascus halophilus* et *Ustilago cynodontis*, qui ont la plus forte activité cellulosique, ont l'activité protéolytique la plus élevée avec un IE de 4 (fig. 70). Les deux souches *Aspergillus sp.* souche A4 et *Chaetomium sp.* souche H38 sont aussi considérées comme de bons producteurs de protéase avec un IE de 2.4 et 2 respectivement.

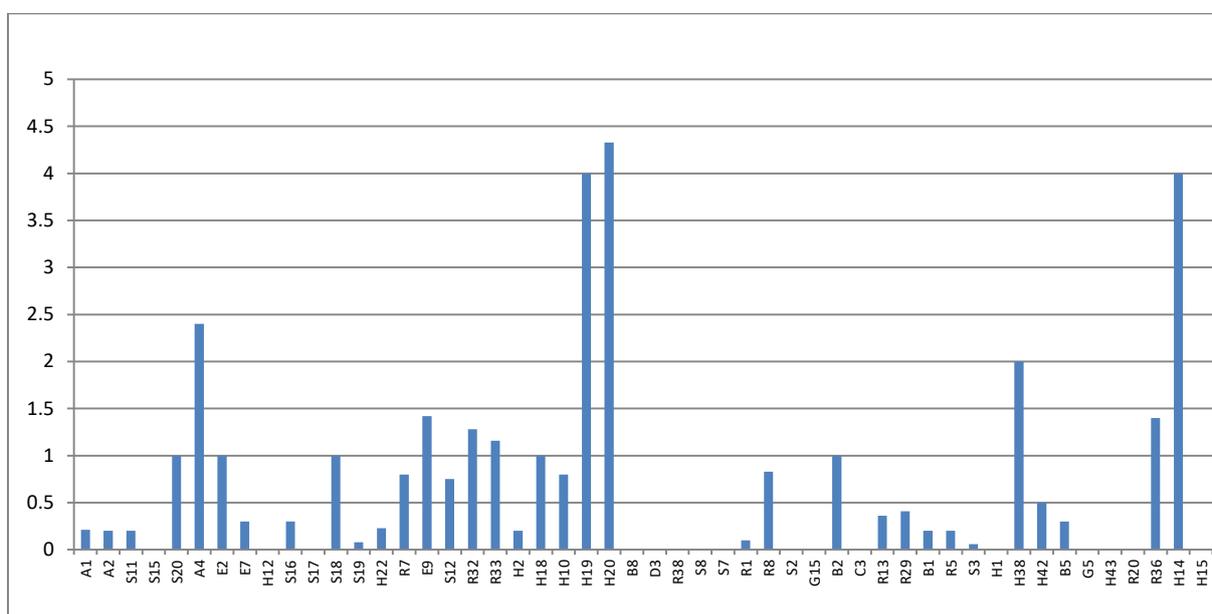


Figure 69 : Activité protéolytique des souches

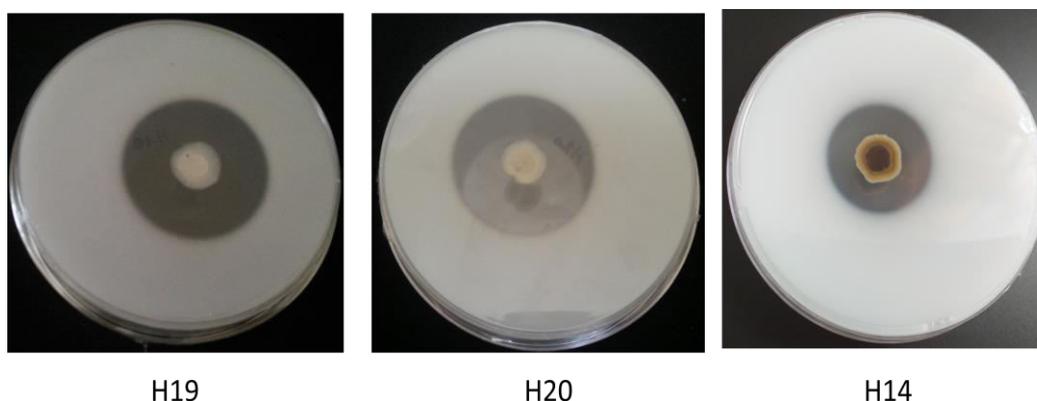


Figure 70 : Souches présentant la plus forte activité protéolytique

### 3.3. Enzyme lipase

La formation d'un précipité opaque autour des colonies traduisant la sécrétion de l'enzyme lipase a été observée chez 23 souches seulement. La majorité des souches productrices de lipase ont une activité enzymatique faible (IE < 1.5) (fig. 71). L'activité lipolytique la plus élevée a été observée chez *P. vinaceum*, *Ustilago cynodontis* et *Wallemia sp.* avec un IE de 5. Une bonne production de lipase a été aussi observée chez *Chrysosporium sp.* avec un IE de 3 (fig. 72).

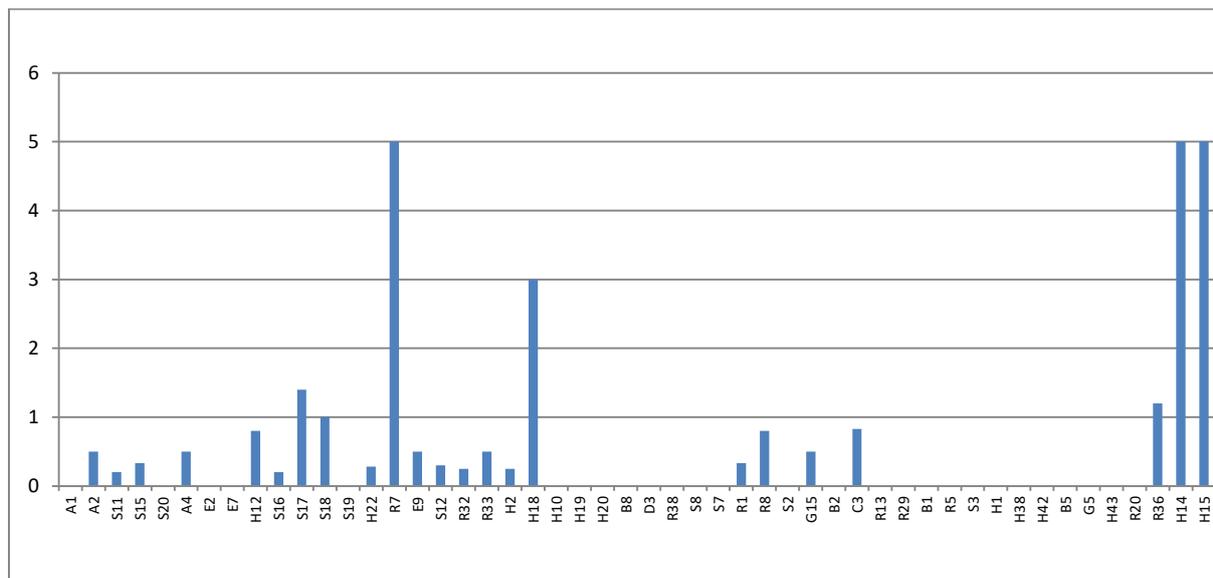


Figure 71 : Activité lipolytique des souches

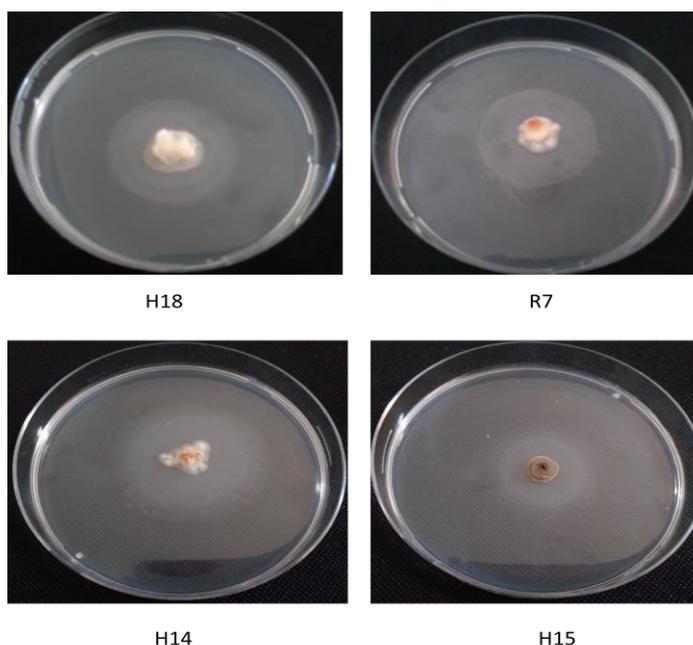


Figure 72 : Souches présentant la plus forte activité lipolytique

### 3.4. Enzyme amylase

L'apparition d'une zone claire autour des colonies après inondation par une solution d'iode révélant la présence d'amylase a été observée chez presque la moitié des souches (48,07%). Toutes les souches produisant l'enzyme amylase présentaient une faible activité ( $IE \leq 2$ ) (fig. 73). La production la plus élevée a été obtenue par *G. halophilus* souche H19 et *Aspergillus sp.* souche A4 avec un IE de 2 (fig. 74).

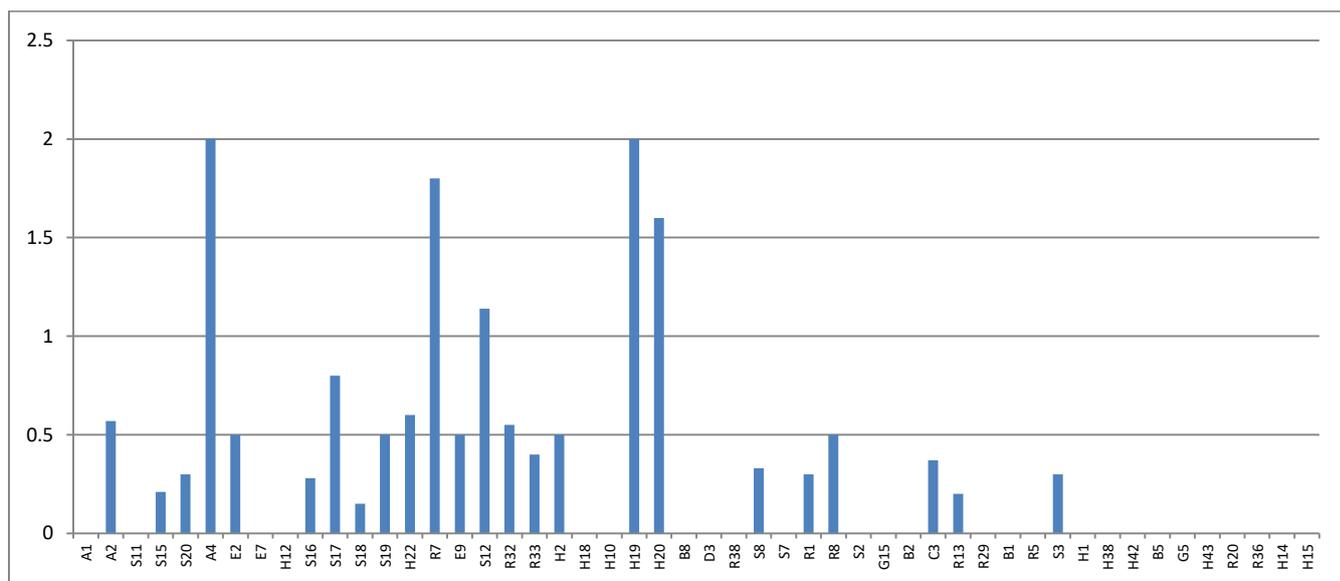
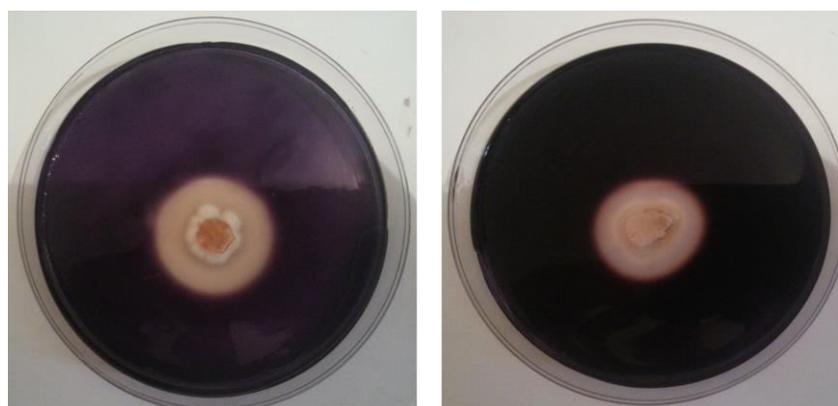


Figure 73 : Activité amylolytique des souches



A4

H19

Figure 74 : Souches présentant la plus forte activité amylolytique

#### 4- Discussion

La forte teneur en sel des sols des sebkhas a permis de les classer parmi les écosystèmes extrêmes. Ces écosystèmes hypersalins ont longtemps été considérés comme peuplés presque exclusivement par des microorganismes procaryotes (Oren 2002) et les champignons qui pouvaient survivre à forte concentration saline n'étaient connus que comme contaminants des aliments. En 2000, le premier rapport est apparu montrant que les champignons sont des habitants actifs des milieux hypersalins (Gunde-Cimerman et al., 2000). De nombreuses nouvelles espèces, et même des espèces connues auparavant comme contaminants des aliments, ont été ensuite découvertes dans des environnements hypersalins à travers le monde (Grishkan et al., 2003 ; Butinar et al., 2005b; Zalar et al., 2005 ; Cantrell et al., 2006) ce qui a conduit à considérer les champignons halotolérants et halophiles comme faisant partie intégrante des communautés microbiennes indigènes (Gunde-Cimerman et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons isolé et identifié 136 isolats appartenant à 7 ordres et 22 genres de la division Ascomycota et à 2 genres de 2 ordres de la division Basidiomycota. Les genres les plus fréquemment isolés de la sebkha sont *Penicillium*, *Aspergillus*, leurs formes téléomorphe et *Fusarium*. Plusieurs espèces du genre *Aspergillus*, y compris l'espèce téléomorphe *A. amstelodami*, et *Penicillium* ont été rapporté comme des espèces les plus dominante des milieux hypersalins (Gunde-Cimmerman et al., 2014 ; Al-Musallam et al., 2011 ; El-Said et Saleem, 2008 ; Jaouani et al., 2014 ; Ismail et al., 2017 ; Moubasher et al., 2018).

*Penicillium egyptiacum* trouvé parmi les espèces dominantes dans la zone 2 a été aussi isolée du sol de la rive ouest de la Mer Morte (Grishkan et al., 2003 ; Steiman et al., 1995), *Penicillium vinaceum* est généralement isolé des milieux marins (Asiry et al., 2015; Liu et al., 2017) alors que les espèces *A. subramanianii*, *A. europaeus*, *P. longicatenatum* et *P. mariea-crucis* n'ont jamais été cité parmi la mycoflore des milieux hypersalins.

L'espèce *Penicillium allii*, précédemment isolée des environnements hypersalins (Hujsova et al., 2010 ; Park et al., 2014), a également été isolée des champs d'ail comme champignon phytopathogène (Vincent et Pitt, 1989 ; Overy et al., 2005 ; Valdez et al., 2006). Bien que l'Algérie soit un pays producteur d'ail, *P. allii* n'a jamais été isolé ni signalé comme pathogène de l'ail en Algérie. De plus, c'est le premier isolement de cette espèce en Algérie.

Le genre *Fusarium* a été isolé uniquement de la zone 1. Les deux espèces *F. oxysporum* et *F. equiseti* ont déjà été trouvées dans plusieurs sols hypersalins (Moustafa et Al-Musallam, 1975 ; Abdel-Hafez, 1982 ; Guiraud et al., 1995 ; Ismail et al., 2017). Dans les études de Mandeel (2006) sur la biodiversité du genre *Fusarium* dans le sol salin de Bahreïn et celle de Macià-Vicente et al. (2008) sur les endophytes racinaires fongiques des environnements méditerranéens, les espèces *F. oxysporum* et *F. solani* se sont révélées être les plus dominantes et la fréquence d'isolement de *F. equiseti* était plus faible. Ces résultats ne

concordent pas avec nos résultats où l'espèce *F. equiseti* s'est avérée la plus dominante et où aucune espèce de *F. solani* n'a été isolée.

*Fusarium equiseti* a été isolé pour la première fois en Algérie par Lazreg et al. (2014) comme agent de la fonte de semis du pin d'Alep. Cette espèce est généralement considérée comme une espèce phytopathogène, mais certaines études comme celles de Horinouchi et al., (2007, 2010) ont montré que certaines souches de *F. equiseti* peuvent être utilisées comme agent de lutte biologique.

*Fusarium acuminatum* et les espèces du clade *fusarium dimerum* sont rarement isolées des sols hypersalins (Moustafa et Al-Musallam, 1975 ; Lebogang et al., 2009). *F. acuminatum* n'est pas une espèce fréquemment isolée en Algérie. Cette espèce n'a été isolée qu'une seule fois et pour la première fois en Algérie par Lazreg et al. (2014). Ces auteurs ont montré que cette espèce est phytopathogène, provoquant la fonte des semis du pin d'Alep.

*Fusarium brachygibbosum* a été isolé des sols salins tels que les marais salés (Gashgari et al., 2016) et de la flore indigène du désert d'Oman (Al-Mahmooli et al., 2013). Cette espèce a également été signalée comme agent pathogène des palmiers à Oman (Al-Sadi et al., 2012) et des oliviers en Tunisie (Trabelsi et al., 2018). En Algérie, cette espèce n'a jamais été signalée et il s'agit de la première souche de *F. brachygibbosum* isolée en Algérie. L'Algérie étant le 7<sup>ème</sup> producteur mondial d'olives, cette espèce doit être surveillée.

Deux souches de *Trichoderma*, *T. gamsii* et *Trichoderma sp.*, ont été isolées des sols de cultures céréalières où la salinité est plus basse et le pH est neutre. Les deux souches sont halotolérantes et peuvent croître à une salinité de 5% de NaCl. L'espèce *T. gamsii*, généralement isolée en tant que champignons endophytes très aptes à être utilisées comme agent de lutte biologique et comme promoteur de la croissance des plantes (Anonyme, 2010 ; Chen et al., 2015), a également été isolée des sédiments marins (Anand et al., 2016). Aucune étude n'a montré que cette espèce a été isolée de sols salins terrestres ; En plus, c'est le premier isolement de *T. gamsii* en Algérie.

Trois souches halophiles obligatoires (H15, H19 et H20) ont été isolées de la zone2. Les deux souches, H19 et H20, ont été identifiées comme *Gymnoascus halophilus*, la nouvelle espèce halophile obligatoire isolée pour la première fois des sédiments du lac salé de Chaka en Chine par Zhou et al. (2016). C'est le deuxième isolement de cette espèce dans le monde.

La deuxième souche halophile H15 appartient au genre *Wallemia*. Ce genre basidiomycète qui est isolé de manière répétée des environnements hypersalins, comprend les espèces les plus osmophiles, xérophiles, chaophiles et halophiles du monde ; ces caractéristiques sont rarement observées chez les basidiomycètes (Zalar et al., 2005 ; Zajc et Gunde-Cimerman, 2018) . *Wallemia ichthyophaga* est l'espèce la plus halophile décrite jusqu'à présent, nécessitant au moins 10% de NaCl pour sa croissance avec un optimum de croissance entre 15 et 20%. Cette espèce peut croître à 30% de NaCl (Zajc et al., 2013a).

La levure *Ustilago cynodontis*, un autre champignon basidiomycète, a également été isolée de la zone2. C'est un champignon phytopathogène de la famille Ustilaginaceae

responsable de la maladie du Charbon. Ce champignon dimorphique n'a jamais été signalé dans les environnements hypersalins.

Les champignons habituellement isolés des environnements hypersalins ont différents niveaux de tolérance à la salinité, allant des faibles halotolérants aux extrêmement halotolérants poussant à 25% de NaCl ou plus (Cantrell et al., 2006). Malgré le grand nombre de sebkhas en Algérie, aucune étude n'a été publiée sur la mycoflore de ces écosystèmes ou leur taux d'halotolérance.

Notre test d'halotolérance a révélé que la majorité des souches isolées dans notre étude sont halotolérantes car elles peuvent croître en absence de NaCl et tolèrent une concentration en sel de 12,5% avec une croissance maximale à 17,5% pour seulement quatre espèces et une espèce, *Wallemia sp.* qui peut croître à 20% de NaCl.

*Wallemia sp.* et les deux souches de *G. halophilus* sont les seules souches halophiles obligatoires isolées au cours de notre étude. Ces trois souches ont été isolées du site H de la zone2 caractérisée par l'absence de toute végétation. Par rapport aux deux autres sites de la zone 2 (A et E), le site H est le plus éloigné de la zone 1 (où se trouve une végétation halophile) et c'est aussi celui où la salinité la plus élevée a été mesurée.

Nos deux souches de *G. halophilus* sont moins tolérantes au sel que celle isolée en Chine par Zhou et al. (2016) qui a une croissance maximale à 22,5% NaCl tandis que nos deux souches ont une croissance maximale à seulement 17,5%.

La deuxième espèce halophile obligatoire est *Wallemia sp.*. Jusqu'à quelques années, ce genre comprenait trois espèces *W. sebi*, *W. ichthyophaga* et *W. muriae* (Zalar et al., 2005) mais sa classification a été récemment révisée. Selon Jančíč et al. (2015), l'espèce *W. sebi* présente un complexe de quatre espèces: *W. sebi sensu-stricto*, *W. mellicola*, *W. canadensis* et *W. tropicalis*. De plus, en 2016, Jančíč et al. (2016a) ont ajouté une nouvelle espèce, *W. hederæ*, et récemment, une autre nouvelle espèce a été décrite: *W. peruviensis* qui est étroitement apparentée à *W. hederæ* (Díaz-Valderrama et al., 2017).

Les deux espèces *W. ichthyophaga* et *W. muriae* sont halophiles obligatoires tandis que le complexe d'espèces *W. sebi*, *W. hederæ* et *W. peruviensis* sont des espèces halotolérantes. Malgré le fait que notre souche H15 soit un halophile obligatoire, elle appartient au complexe d'espèces *W. sebi*. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'espèce exacte de cette souche.

Quelques champignons halophiles obligatoires ont déjà été signalés dans des environnements salins extrêmes comme *Gymnascella marismortui* (Buchalo et al., 1998), deux espèces de *Wallemia* (*W. muriae* et *W. ichthyophaga*) (Zalar et al., 2005), quatre espèces d'*Aspergillus* (*A. gracilis*, *A. penicillioides*, *A. restrictus*, *A. unguis*) (Nazareth et al., 2012 ; Ali et al., 2013 ; Gonsalves et al., 2012) et la levure *Sterigmatomyces halophilus* (Ali et al., 2013).

Les champignons halophiles et halotolérants ont adopté plusieurs mécanismes d'adaptation pour pouvoir vivre dans des environnements hypersalins. Pour s'adapter, la cellule fongique doit d'abord pouvoir détecter les changements de concentration en sel dans l'environnement; le principal mécanisme impliqué dans cette détection est la voie du glycérol à haute osmolarité (high-osmolarity glycerol HOG). Cette voie est également impliquée dans la réponse à la salinité et à l'osmoadaptation des cellules fongiques (Hohmann, 2002).

Sous le stress salin, la plupart des champignons accumulent des solutés tels que les polyols et les acides aminés libres pour augmenter leur osmolarité interne et permettre à l'eau de pénétrer dans leurs cellules. D'autres stratégies sont utilisées par les champignons comme les changements dans le transport ionique ou la fluidité de la membrane plasmique qui jouent un rôle important dans l'adaptation à la concentration élevée en sel (Hohmann, 2002 ; Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

De plus, l'un des résultats obtenus dans les études moléculaires de la tolérance au sel de l'halophile obligatoire *Wallemia ichthyophaga* est l'augmentation significative des gènes sensibles au sel codant pour les hydrophobines. Par rapport à d'autres champignons, la principale différence dans la composition en acides aminés des hydrophobines de *W. ichthyophaga* est le nombre élevé d'acides aminés acides (Zajc et *al.*, 2013b). Cette propriété, considérée comme une caractéristique des protéines exposées à une forte salinité, pourra multiplier les domaines d'application biotechnologique des hydrophobines notamment sous forte concentration en sel.

Toutes les stratégies d'adaptation à la salinité adoptées par les champignons sont d'une grande importance et il sera intéressant d'étudier plus en détail les mécanismes d'adaptation de nos souches halophiles.

Les champignons halophiles et halotolérants sont une source importante de métabolites polyextrémophiles (stabilité et activité dans plusieurs conditions extrêmes). Leurs propriétés thermotolérantes et halophiles leur permettent d'être stables et applicables dans une large gamme de pH et de température des processus industriels (Setati, 2010; Dalboge, 1997).

L'intérêt biotechnologique de nos souches a été évalué en testant leur capacité à produire des enzymes extracellulaires (Lipase, amylase, protéase et cellulase) sur milieu solide.

Dans notre étude, les espèces les plus intéressantes présentant l'indice enzymatique le plus élevé sont *Aspergillus sp.* souche A4, *Chaetomium sp.* souche H1, *Penicillium vinaceum*, *Gymnoascus halophilus* et les deux basidiomycètes *Wallemia sp.* et *Ustilago cynodontis*.

Les deux souches d'*Aspergillus sp.* souche A4 et de *Chaetomium sp.* souche H1 sont des bons producteurs de cellulase. Cette enzyme a été produite et caractérisée à partir de différentes espèces du genre *Aspergillus* tels que *A. ornatus* (Toor et Ilyas, 2014), *A. terreus MS105* (Sohail et *al.*, 2016), *Aspergillus niger* (Baig et Saleem 2012) et du genre *Cheatomium*

comme *C. cellulolyticum* (Chahal et Hawksworth, 1976), *C. erraticum* (Soni et Soni, 2010) et *C. globosum* (Wanmolee et al., 2016).

L'utilisation de cellulases nécessite une étape de prétraitement pour rendre la cellulose qui est protégée par la lignine et des matériaux cireux plus accessible à l'enzyme et pouvoir hydrolyser la lignocellulose. Une conversion efficace des lignocelluloses en sucre simple nécessite des enzymes compatibles avec l'étape de prétraitement durant laquelle les liquides ioniques utilisés forment une solution saline ce qui pourrait ne pas être compatibles avec l'enzyme utilisée dans le processus d'hydrolyse (de Diego et al., 2014). Par conséquent, il est nécessaire de produire des enzymes cellulases qui sont tolérantes à la présence du sel.

*Wallemia sp.* a une activité lipasique élevée avec un IE de 5 et aucune activité cellulolytique, amylolytique ou protéolytique n'a été détectée. Ce résultat a également été obtenu par Jančić et al. (2016a) qui ont étudié le profil enzymatique des quatre espèces de *Wallemia* (*W. sebi*, *W. ichthyophaga*, *W. muria* et *W. hederæ*). Ils ont trouvé que *Wallemia spp.* sécrètent plusieurs enzymes dont la lipase et l'estérase mais aucune activité cellulolytique, amylolytique et protéolytique n'a été observée.

*Penicillium vinaceum* sécrète les quatre enzymes testées mais n'a qu'une activité élevée de lipase et cellulase avec un IE de 5 et 4,33 respectivement. Cette espèce est la plus étudiée en tant que champignon d'origine marine et a rarement été isolé du sol. Plusieurs études ont indiqué que cette espèce est une source importante de molécules bioactives (Asiry et al., 2015 ; Liu et al., 2017) mais aucune étude n'a montré que cette espèce sécrète des enzymes hydrolytiques.

La levure *Ustilago cynodontis* sécrète les trois enzymes cellulase, protéase et lipase avec un IE de 4.66, 4 et 5 respectivement. Plusieurs études menées sur des levures de la famille des Ustilaginacées ont montré que ces levures sont une source prometteuse de molécules d'intérêt industriel dont les enzymes (Bussamara et al., 2010 ; Alex et al., 2014 ; Isshiki et al., 2017), les acides organiques (Guevarra et Tabuchi, 1990) et les biosurfactants (Morita et al., 2011).

Les deux souches de *Gymnoascus halophilus* H19 et H20 sécrètent l'amylase (EI proche de 2), la protéase (EI de 4) et de la cellulase (EI de 5 et 6). Aucune étude n'a été réalisée sur le profil enzymatique de cette espèce jusqu'à présent. Notre étude est la première caractérisation enzymatique de *G. halophilus* dans laquelle les deux souches H19 et H20 se sont révélées avoir une activité amylolytique, cellulolytique et protéolytique élevée. Cette espèce pourrait s'avérer être une source intéressante d'enzymes.

Les organismes extrémophiles, sont d'importantes sources d'enzymes. Ces enzymes définies comme «extremozymes», peuvent remplir les mêmes fonctions enzymatiques que leurs homologues non extrêmes, mais elles peuvent catalyser de telles réactions dans des conditions qui inhibent ou dénaturent les formes non extrêmes.

Généralement, une salinité élevée a tendance à inactiver les enzymes en modifiant les structures protéiques. Par conséquent, les caractéristiques particulières des souches

fongiques vivant dans des conditions hypersalines pourraient représenter une nouvelle source d'enzymes exploitables capables de fonctionner à un pH extrême et à des concentrations salines élevées (Stigter et *al.*, 1991 ; Barone et *al.*, 2019).

Les enzymes halophiles se sont adaptées à cette pression environnementale en acquérant un nombre relativement important de résidus d'acides aminés acides chargés négativement sur leurs surfaces. Ces charges négatives attirent les molécules d'eau et maintiennent ainsi les protéines hydratées ce qui empêche leur précipitation (DasSarma et DasSarma, 2015).

## ***Chapitre 4***

# ***Sélection des souches à pouvoir antagoniste***

## 1- Sélection *in vitro* des souches à activité antifongique

### 1.1. Sur milieu sans NaCl

L'activité antifongique des souches a été évaluée vis-à-vis d'une souche de *F. oxysporum* par la technique de confrontation directe sur milieu PDA sans NaCl. Selon les résultats obtenus (fig. 75, 76, tableau 18), 88% des souches ont montré une activité antifongique et seulement 13 souches, ce qui représente 26% des souches, ont présenté une activité inhibitrice supérieure à 30%.

La plus forte activité a été enregistrée pour les deux espèces de *Trichoderma*, *T. gamsii* (S2) et *Trichoderma sp.* (G15) avec un pourcentage d'inhibition de 74.55% et 81.18% respectivement.

Toutes les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont sécrété des substances antifongiques. Parmi ces espèces, les deux souches A1 et A2 d'*Aspergillus subramaninii* ont enregistré la plus forte activité avec un pourcentage d'inhibition de 36.66% pour la souche A1 et 40% pour la souche A2. Une activité moins importante a été observée chez les espèces *Aspergillus sp.* souche A4, *P. allii* (H22), *P. griseofulvum* (S17), *P. canescens* (S18) et *P. mariae-crucis* (S19) avec un taux d'inhibition compris entre 21% et 26%. Un taux inférieur à 20% a été enregistré pour le reste des espèces de l'ordre des Eurotiales; la plus faible activité antifongique a été observée chez l'espèce *A. amstelodami* (H12) avec un taux d'inhibition de 4%.

Parmi les souches appartenant à l'ordre des Onygenales, les deux espèces *Chrysosporium sp.* (H18) et *Gymnoascus halophilus* (H19 et H20) n'ont montré aucune activité antifongique alors que les deux espèces *Gymnoascus dankaliensis* (H2) et *Arachnomyces sp.* (H10) avaient une faible activité avec un pourcentage d'inhibition autour de 10%.

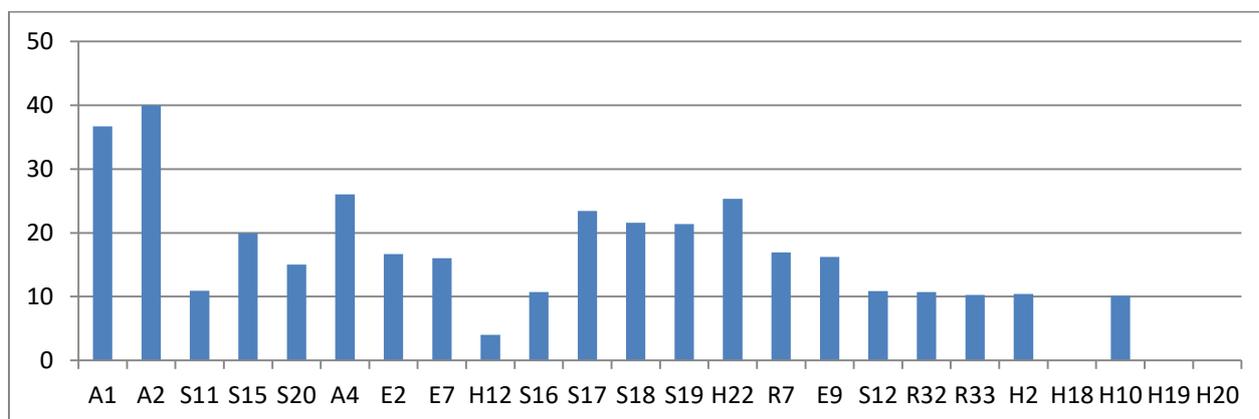
Le taux d'inhibition des souches appartenant au genre *Fusarium* a varié entre 50,25% enregistré pour l'espèce *F. equiseti* (D3) et 28,03% pour *F. acuminatum* (S8). Le taux d'inhibition enregistré pour *Fusarium sp.* souche R1 était de 30,27%. A l'exception des deux souches de *Trichoderma*, le reste des souches appartenant à l'ordre des Hypocreales ont inhibé la croissance de *F. oxysporum* à un taux compris entre 6,57% et 36,77%.

Une activité antifongique a aussi été observée chez toutes les espèces des ordres des Sordariales, Microascales et Pleosporales. Une faible activité antifongique a été observée chez les trois souches H1, H38 et H42 de *Chaetomium sp.* de l'ordre des Sordariales. Le taux d'inhibition des espèces de l'ordre des Microascales et Pleosporales a varié entre 16% enregistrée pour les deux espèces *Scopulariopsis candida* (B5) et *Curvularia spicifera* (R20) et 40,66% pour l'espèce *Alternaria sp.* (G5). Aucune activité antifongique n'a été observée chez *Cladosporium ramotenellum* (R36) et les deux espèces basidiomycètes *Ustilago cynodontis* (H14) et *Wallemia sp.* (H15).

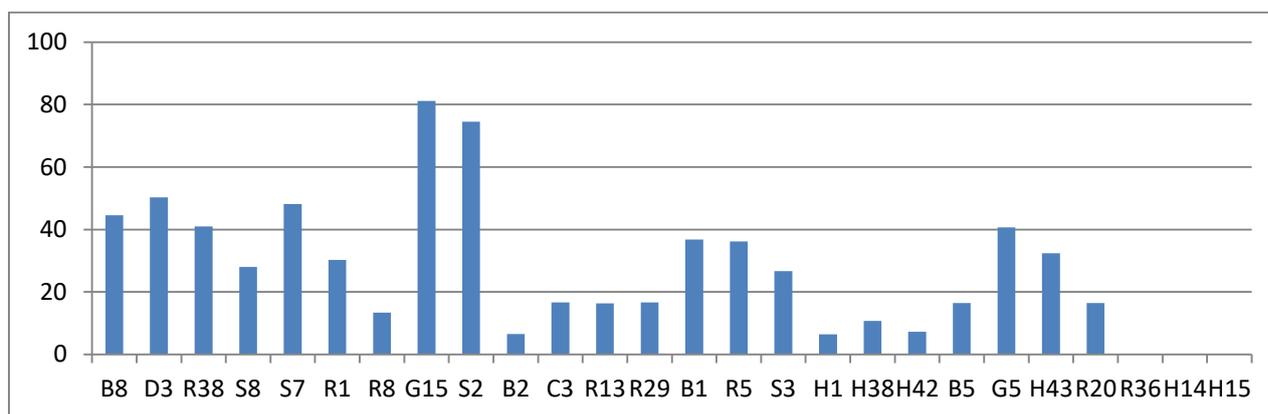
Le test de Newman Keuls de l'activité antifongique représenté dans le tableau 18 montre une différence significative entre les 50 souches étudiées en les classant en 22 groupes. Cette

analyse nous a permis de classer la souche *Trichoderma sp.* (G15) comme meilleure souche possédant une activité antifongique avec un taux d'inhibition significativement plus élevé que celui de *Trichoderma gamsii* (S2). la souche D3 *F. equiseti* est la troisième souche possédant une bonne activité antifongique ; ces trois souches *Trichoderma sp.*, *T. gamsii* et *F. equiseti* forment les trois groupes 22, 21 et 20 respectivement.

Le test de Newman Keuls nous a également permis de constater une différence significative entre des souches appartenant à la même espèce comme les deux souches A1 et A2 d'*Aspergillus sp.*, les deux souches H38 et H42 de *Chaetomium sp.*, les deux souches R38 et S7 de *Fusarium brachygibbosum* et les trois souches E2, E7 et A4 d'*Aspergillus sp.* mais aucune différence significative n'a été notée entre les deux souches de *Penicillium sp.* R32 et R33.



**Figure 75: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* par confrontation direct sur milieu sans NaCl avec les souches appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales**



**Figure 76: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum* par confrontation direct sur milieu sans NaCl avec les souches à l'exception de celles appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales**

**Tableau 18 : Test de Newman Keuls du taux d'inhibition des souches par confrontation directe vis-à-vis d'une souche de *F. oxysporum* sur milieu PDA sans NaCl.**

Souche	% d'inhib	Groupes																	
H14	0,0	1																	
R36	0,0	1																	
H20	0,0	1																	
H19	0,0	1																	
H18	0,0	1																	
H15	0,0	1																	
H12	4,0		2																
H1	6,44			3															
B2	6,57			3															
H42	7,31			3															
H10	10,11				4														
R33	10,28				4														
H2	10,42				4														
H38	10,71				4														
S16	10,71				4														
R32	10,73				4														
S12	10,89				4														
S11	10,90				4														
R8	13,41					5													
S20	15,02						6												
E7	16,03							7											
E9	16,23							7											
R13	16,40							7											
B5	16,44							7											
R20	16,48							7											
C3	16,63							7											
E2	16,66							7											
R29	16,66							7											
R7	16,91							7											
S15	19,94								8										
S19	21,38									9									
S18	21,59									9									
S17	23,44										10								
H22	25,33											11							
A4	26,03											11	12						
S3	26,66												12						
S8	28,03													13					
R1	30,27														14				
H43	32,44															15			
R5	36,19																16		
A1	36,66																16		
B1	36,77																16		
A2	40,00																	17	
G5	40,66																	17	
R38	40,98																	17	
B8	44,55																	18	
S7	48,10																	19	
D3	50,25																	20	
S2	74,55																	21	
G15	81,18																	22	

Les moyennes ne partageant aucun numéro sont significativement différentes.

## 1.2. Effet du NaCl sur l'activité antifongique

L'ajout du NaCl à une concentration de 2% au milieu de confrontation a augmenté significativement la moyenne du taux d'inhibition de l'ensemble des souches de 21,41% sur milieu sans NaCl à 30,19% sur milieu à 2% NaCl (fig. 77). Sur ce milieu salin, le taux d'inhibition a été supérieur à 30% pour 52% des souches alors que ce résultat a été obtenu par seulement 26% des souches sur milieu sans NaCl (tableau 19).

Selon les résultats présentés dans les deux figures 78 et 79, on remarque une augmentation du taux d'inhibition chez toutes les souches d'*Aspergillus* (A1, A2, S11, S15, S20, A4, E2, E7), les deux espèces de *Penicillium*, *P. vinaceum* (R7) et *P. egyptiacum* (E9), ainsi que les espèces *Gymnoascus dankaliensis* (H2), *Fusarium sp.* souche R1, *Sarocladium strictum* (R8), *Tritirachium sp* (B2), *Beauveria bassiana* (R13), *Gibellulopsis nigrescens* (C3), *Lecanicillium sp.* (R29), *Scopulariopsis candida* (B5) et *Chaetomium sp.* souche H1. Une augmentation moins importante a été observée chez *Arachnomyces sp.* (H10), *Purpureocillium lilacinum* (B1), *Albifimbria verrucaria* (R5), *Clonostachys rosea* (S3), *Penicillium canescens* (S18), *Penicillium sp.* souche R32 et R33 et les souches de *Fusarium* B8, D3, R38, S7 et S8.

La concentration saline de 2% a influencé négativement l'activité antifongique de certaines souches comme *P. flavigenum* (S16), *P. griseofulvum* (S17), *P. mariae-crucis* (S19), *P. allii* (H22), *P. longicatenatum* (S12), *Alternaria sp.* (G5), *Curvularia spicifera* (R20), les deux souches de *Trichoderma* (G15, S2) et les deux souches de *Chaetomium sp.* H38 et H42 où cette activité a diminué sans être nul à l'exception de l'espèce *Curvularia spicifera* où aucune activité n'a été observée sur le milieu salin. Malgré la diminution du taux d'inhibition des deux souches de *Trichoderma*, ces dernières ont gardé un taux élevé de 71.42% (G15) et 64.28% (S2).

Les trois souches halophiles obligatoires ont montré une activité antifongique sur le milieu salin. Une bonne activité a été observée chez *Wallemia sp.* (H15) qui a enregistré un taux d'inhibition de 40,64% ; les deux souches de *Gymnoascus halophilus* H19 et H20 ont montré une faible activité antifongique de 08.68% et 16.79% respectivement.

Les trois espèces *Cladosporium ramotenellum* (R36), *Ustilago cynodontis* (H14) et *Chrysosporium sp.* (H18) n'ont montré aucune activité antifongique.

Le test de Newman Keuls représenté dans le tableau 19 a permis de classer les souches étudiées en 29 groupes. Cette étude a montré que le classement de l'activité antifongique des trois souches *Trichoderma sp.* (G15), *T. gamsii* (S2) et *F. equiseti* (D3) comme meilleure activité sur milieu sans NaCl n'a pas changé sur le milieu à 2% de NaCl. Sur ce milieu, Le taux d'inhibition de *Trichoderma sp.* est significativement le plus élevé par rapport à *T. gamsii* ; cette souche possédant la meilleure activité antifongique forme le groupe 29. Contrairement au résultat obtenu sur milieu sans NaCl, aucune différence significative n'a été observée entre le taux d'inhibition de *T. gamsii* et *F. equiseti* sur milieu à 2% NaCl; ces deux souches forment le groupe 28.

Une différence significative entre l'activité antifongique des souches appartenant à la même espèce a également été obtenue sur milieu à 2% NaCl. Cette différence a été observée chez les deux souches A1 et A2 d'*Aspergillus sp.*, les deux souches H19 et H20 de *Gymnoascus halophilus*, les deux souches R38 et S7 de *Fusarium brachygibbosum* et les trois souches E2, E7 et A4 d'*Aspergillus sp.* Aucune différence significative n'a été notée entre les deux souches de *Penicillium sp.* R32 et R33 et les deux souches H38 et H42 de *Chaetomium sp.*.

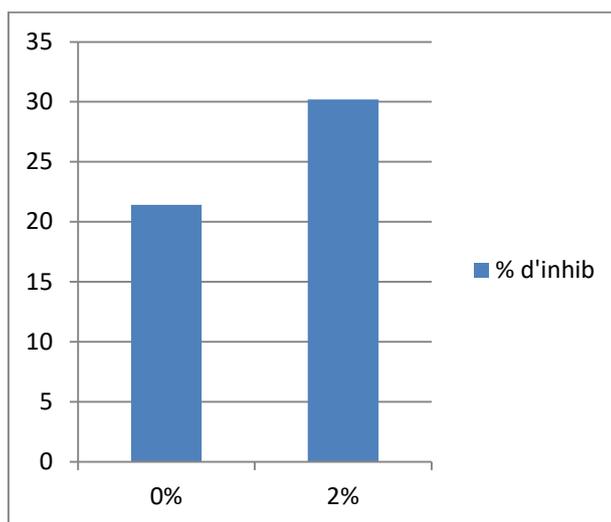


Figure 77 : Effet du NaCl sur la moyenne du taux d'inhibition de l'ensemble des souches (La différences entre les deux tests était significative  $p \leq 0.05$ )

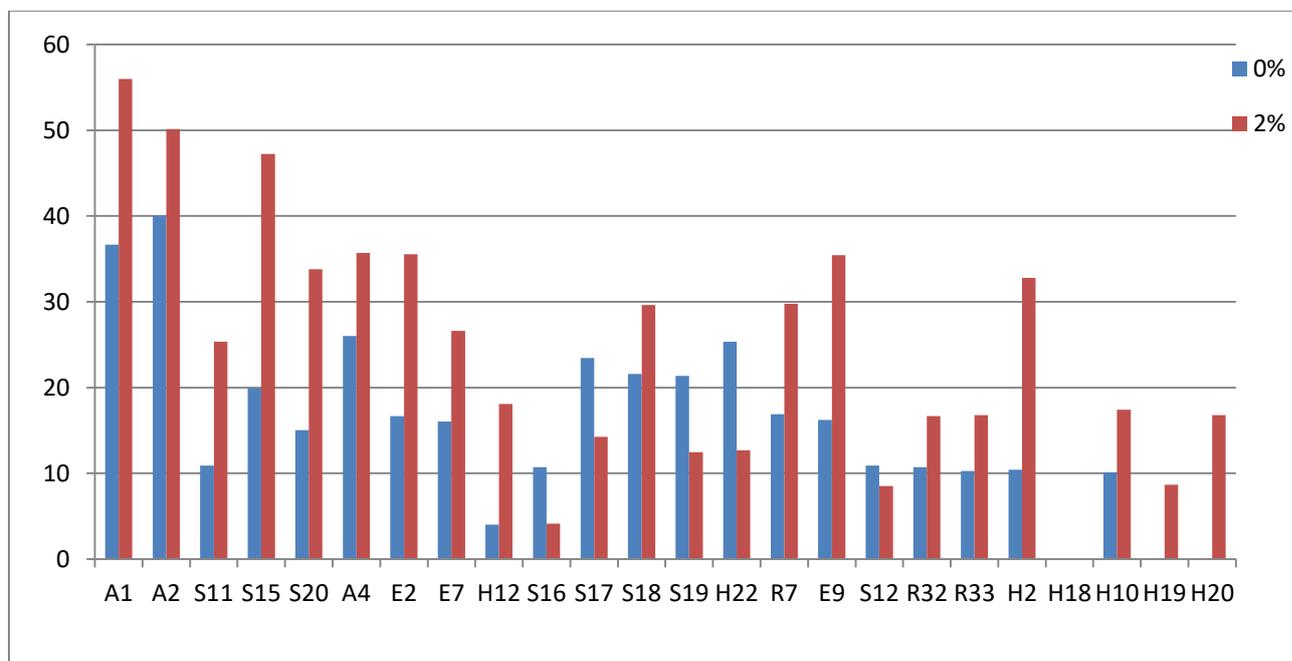


Figure 78: Effet du NaCl sur l'activité antifongique des souches appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales

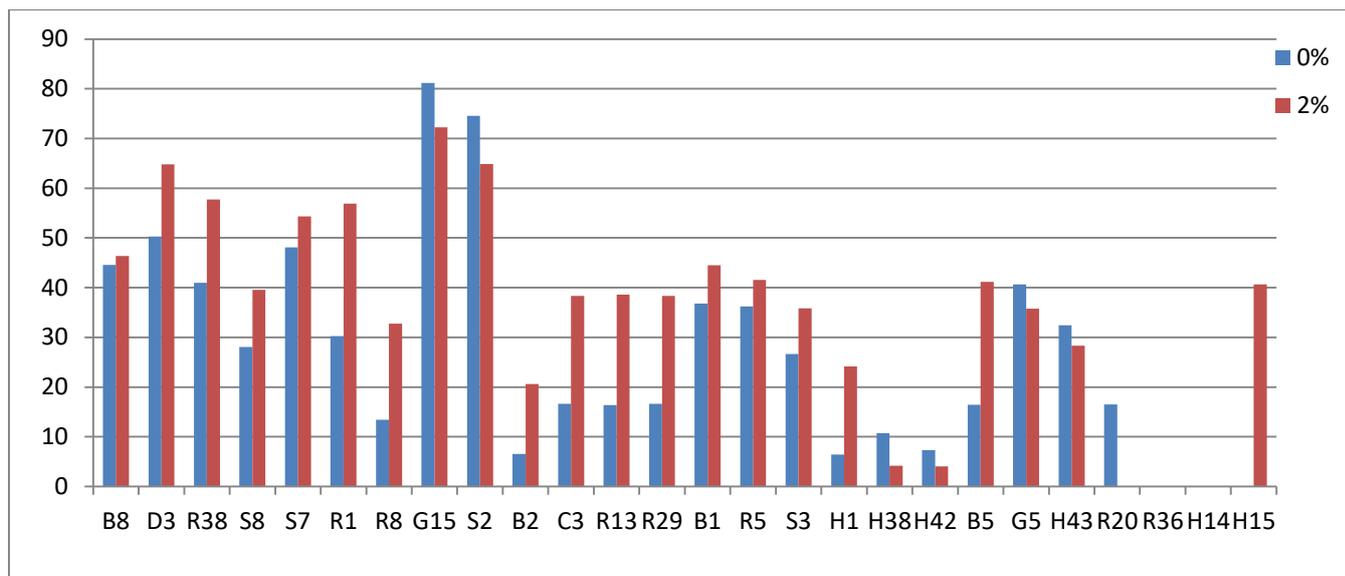


Figure 79: Effet du NaCl sur l'activité antifongique des souches à l'exception de celles appartenant à l'ordre des Eurotiales et Onygenales

Tableau 19 : Test de Newman Keuls du taux d'inhibition des souches par confrontation directe vis-à-vis d'une souche de *F. oxysporum* sur milieu PDA à 2% NaCl.

Souche	% d'inhibition	Groupes														
R36	0,00	1														
H18	0,00	1														
R20	0,00	1														
H14	0,00	1														
H42	4,06		2													
S16	4,11		2													
H38	4,20		2													
S12	8,52			3												
H19	8,68			3												
S19	12,46				4											
H22	12,69				4											
S17	14,27					5										
R32	16,66						6									
R33	16,77						6									
H20	16,79						6									
H10	17,40						6	7								
H12	18,07							7								
B2	20,63								8							
H1	24,14									9						
S11	25,33										10					
E7	26,63											11				
H43	28,35												12			
S18	29,63													13		
R7	29,76													13		
R8	32,72														14	
H2	32,78														14	
S20	33,79															15

Souche	% d'inhibition	Groupes													
E9	35,42	16													
E2	35,54	16													
A4	35,70	16													
G5	35,74	16													
S3	35,82	16													
C3	38,32		17												
R29	38,33		17												
R13	38,59		17												
S8	39,58			18											
H15	40,64				19										
B5	41,17				19										
R5	41,55				19										
B1	44,51					20									
B8	46,36						21								
S15	47,23							22							
A2	50,16								23						
S7	54,33									24					
A1	55,98										25				
R1	56,89											26			
R38	57,72												27		
D3	64,81													28	
S2	64,86													28	
G15	72,25													29	

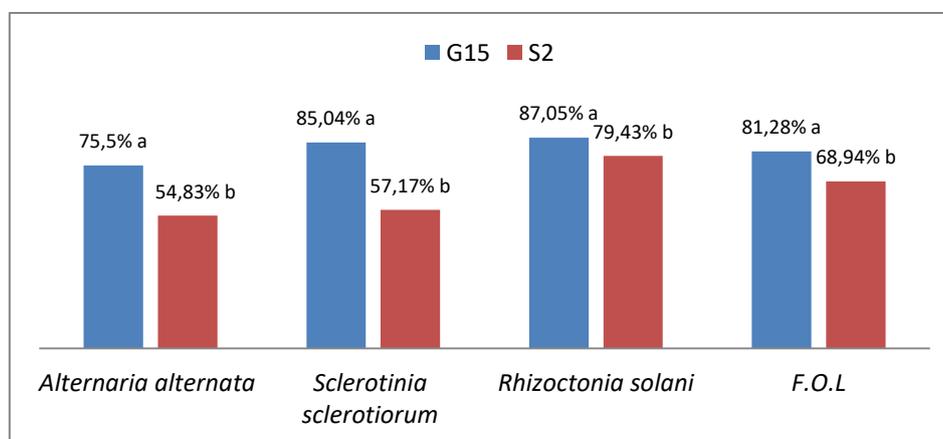
Les moyennes ne partageant aucun numéro sont significativement différentes.

## 2- Pouvoir antagoniste, *in vitro*, de deux souches de *Trichoderma*

### 2.1. Test d'antagonisme par confrontation directe

Les deux souches, *Trichoderma gamsii* (S2) et *Trichoderma sp.* (G15), ont été sélectionnées pour un essai préliminaire comme agent de lutte biologique. Cette sélection a été basée sur le taux d'inhibition élevé de ces deux souches vis-à-vis de *F. oxysporum*. Leur pouvoir antagoniste a été ensuite testé vis-à-vis de quatre champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (F.O.L), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata*.

Les résultats de la confrontation directe représentés dans les figures 80 et 81 montrent que la croissance de *Trichoderma sp.* est plus rapide que celle des pathogènes montrant ainsi un fort pouvoir de colonisation de l'espace et une importante capacité à envahir le thalle des pathogènes. Cette souche a inhibé la croissance radiale de *F. oxysporum f. sp. Lycopersici*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* et *A. alternata* à 81,28%, 85,04%, 87,05% et 75,5% respectivement. La croissance rapide et le fort pouvoir de colonisation de l'espace a aussi été observé chez *Trichoderma gamsii* confronté avec les champignons phytopathogènes à l'exception de *S. sclerotiorum* où une baisse de son pouvoir de colonisation a été notée. Le taux d'inhibition de *T. gamsii* a varié entre 54.83% et 79.43% ; selon l'étude statistique, l'activité antifongique de *Trichoderma sp.* est significativement plus élevée que celle de *T. gamsii*.



**Figure 80 : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des champignons phytopathogènes par confrontation direct avec les deux souches de *Trichoderma***

(au niveau de chaque champignons phytopathogènes , les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil P < 0.05 selon le test de Newman et Keuls).

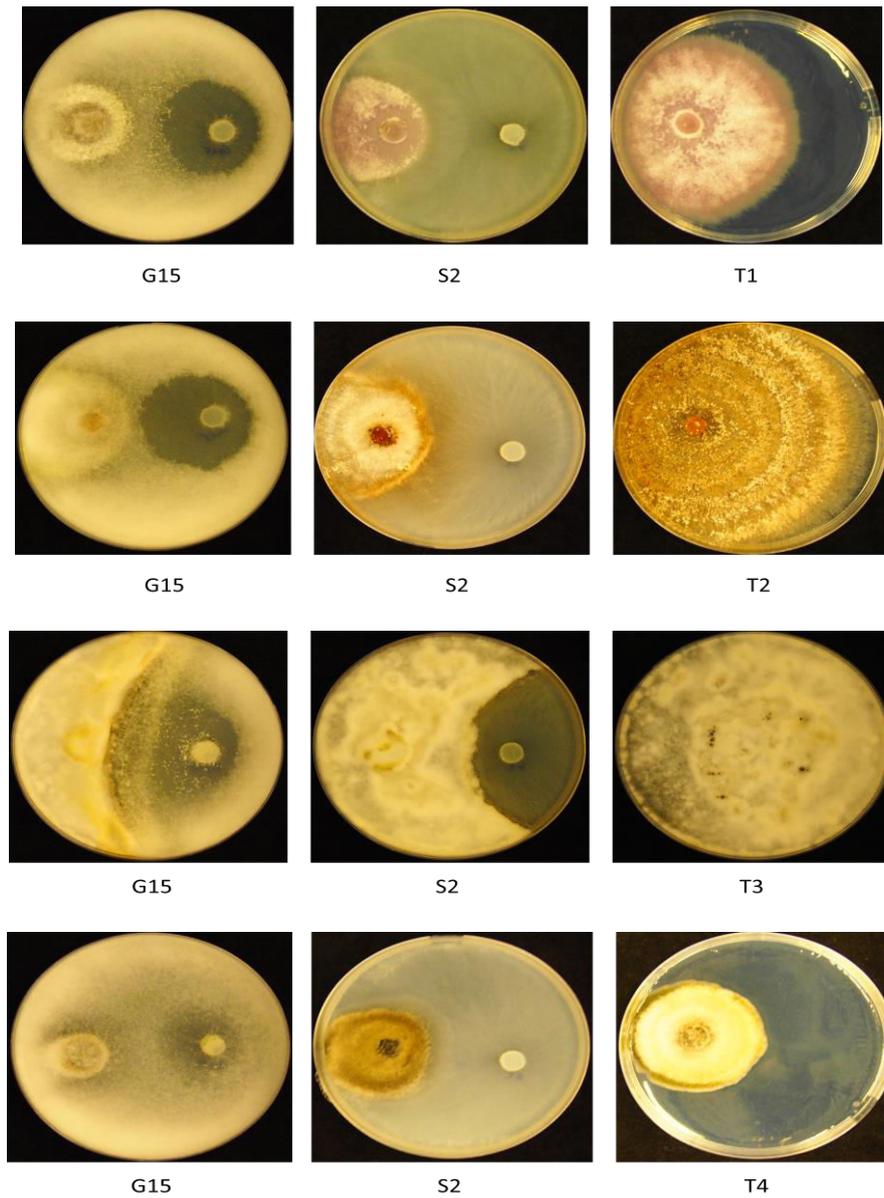


Figure 81 : confrontation directe entre les deux souches de *Trichoderma* et les champignons phytopathogènes (T1 : F.O.L; T2 : *R. solani*, T3 : *S. sclerotiorum*, T4 : *A. alternata*)

## 2.2 Test d'antagonisme par antibiose

Afin de préciser la nature des substances inhibitrices, les deux techniques de Dennis et Webster (1971a,b) ont été effectuées vis-à-vis de la souche *A. alternata*. Ces tests ont révélé que les deux souches *T. gamsii* et *Trichoderma sp.* secrètent des substances antifongiques volatiles et qui ont inhibé la croissance d'*A. alternata* à 62.85% et 71.42% respectivement (fig 82, 83). Aucune activité antifongique par la sécrétion de substances diffusibles n'a été détectée par la technique utilisée.

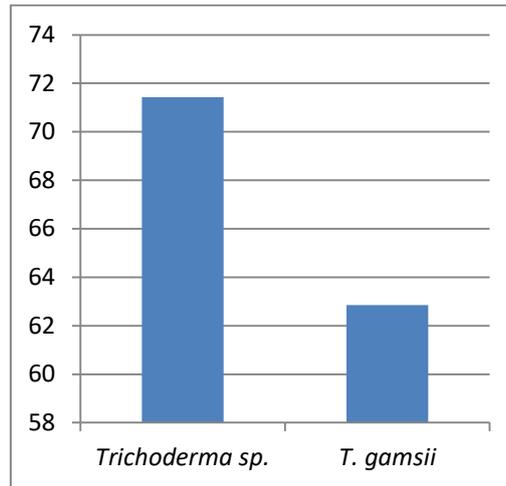


Figure 82 : Taux d'inhibition de la croissance radiale d'*A. alternata* par les substances volatiles secrétées par les deux souches de *Trichoderma*.

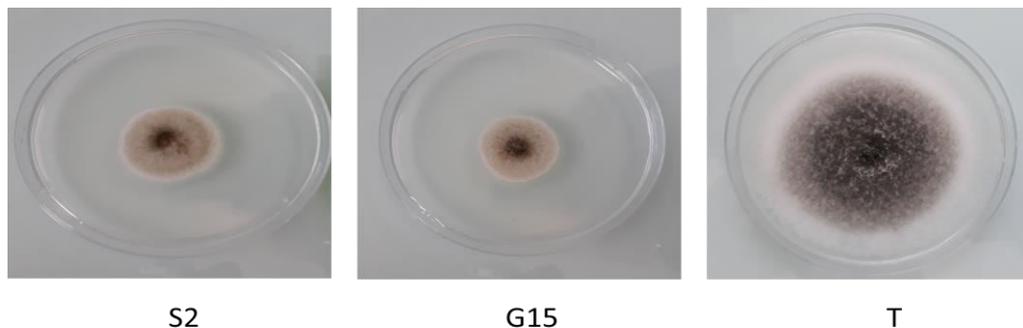


Figure 83 : Action des substances volatiles des deux souches de *Trichoderma* sur la croissance radiale d'*A. alternata*.

### 3- Test de bio-protection des fruits de tomate (cas d'*A. alternata*)

L'activité antagoniste de *T. gamsii* et *Trichoderma sp.* qui ont montré *in vitro* un pouvoir antifongique en sécrétant des substances volatiles, a été testée *in vivo* en appliquant les deux souches comme agent de bioconservation de fruits de tomate contre l'alternariose causée par *A. alternata*.

L'inoculation des deux souches de *Trichoderma* a été faite en même temps que l'agent pathogène (traitement préventif) ou après 24h (traitement curatif). Selon les résultats obtenus (tableau 20, fig. 84, 85), l'inoculation des témoins par *A. alternata* seul a causé la formation de lésions concave qui, par la suite, se sont étendues progressivement devenant circulaires d'un diamètre d'une moyenne de 3.63 cm, noires, molles et pénètrent dans l'épiderme. A la fin de la période d'incubation, une croissance fongique noire, d'aspect velouté a apparu sur les lésions.

L'inoculation de *Trichoderma sp.* a réduit significativement le diamètre des lésions noires à 1.36 cm (traitement préventif) et 1.56 cm (traitement curatif). Cette souche a réduit aussi de façon remarquable le pouvoir du pathogène à altérer l'épiderme de la tomate et de former des lésions molles.

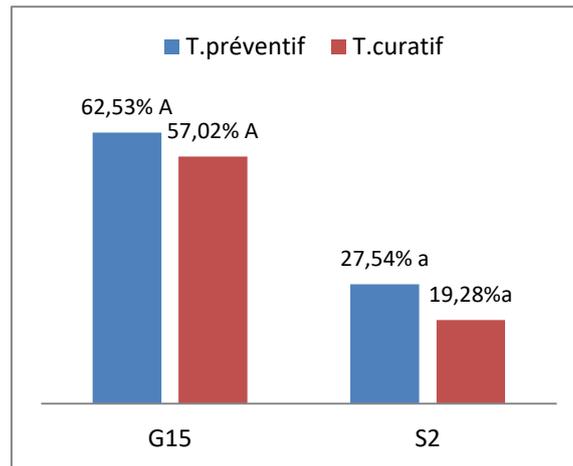
L'inoculation de *T. gamsii* a aussi réduit significativement le diamètre des lésions à 2.63 cm (traitement préventif) et 2.93 cm (traitement curatif) mais cette souche était moins efficace par rapport à la souche *Trichoderma sp.* contre la croissance mycélienne du pathogène à la surface des lésions et l'altération de l'épiderme.

Selon l'étude statistique, l'application de *Trichoderma sp.* comme agent de biocontrol qui a réduit le diamètre des lésions à 62.53% comme traitement préventif et à 57.02% comme traitement curatif est significativement plus efficace que l'application de *T. gamsii* qui a réduit le diamètre à moins de 30% pour les deux traitements. Cependant, aucune différence significative n'a été révélée entre le traitement préventif et curatif pour les deux souches.

**Tableau 20: Effet des souches de *Trichoderma* sur le diamètre des lésions causées par *A. alternata* après une semaine d'incubation**

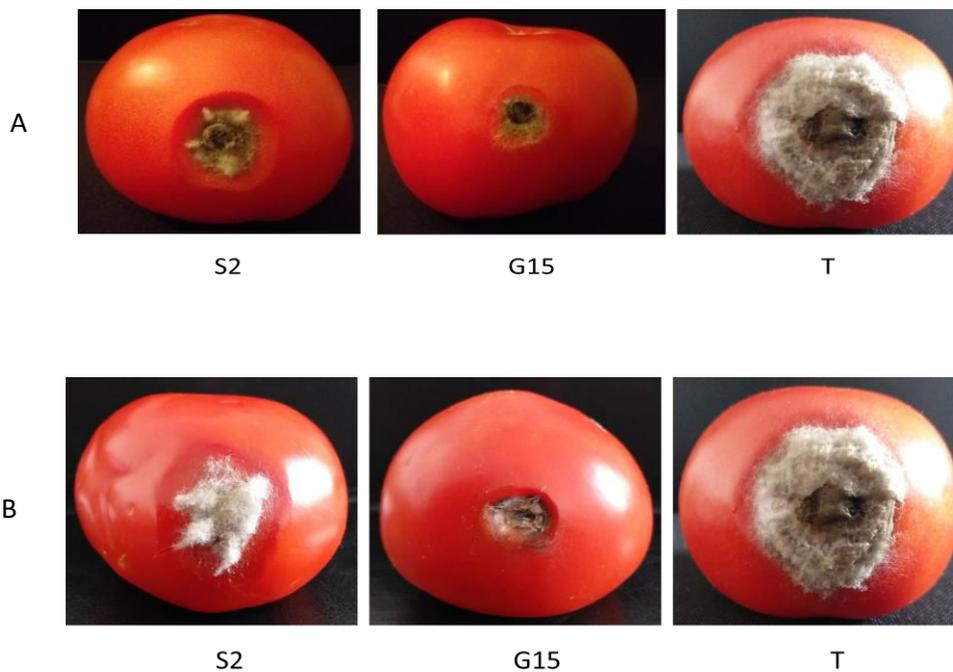
	Diamètre des lésions (cm)	
	Test préventif	Test curatif
Témoin	3.63C	3.63c
G15	1.36A	1.56a
S2	2.63B	2.93b

\* au niveau de chaque colonne, les valeurs suivies de différente lettre sont significativement différentes au seuil  $P < 0.05$  selon le test de Newman et Keuls.



**Figure 84: Effet du traitement préventif et curatif par les deux souches de *Trichoderma* sur le développement de l'alternariose sur les fruits de tomate**

(au niveau de chaque souche, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil  $P < 0.05$  selon le test de Newman et Keuls.)



**Figure 85 : biocontrol d'*A. alternata* en utilisant les deux souches de *Trichoderma* comme traitement préventif (A) et curatif (B)**

#### 4- Discussion

Les champignons sont considérés comme une source précieuse de métabolites secondaires avec des activités biologiques intéressantes. Le nombre total de produits fongiques bioactifs représente 38% de l'ensemble des produits microbiens (Bérdy, 2005).

Récemment, l'intérêt pour les champignons halophiles en tant que sources possibles de nouveaux composés bioactifs est en forte augmentation. De nombreux nouveaux produits bioactifs possédant des activités cytotoxiques, anticancéreuses, antivirales, antibactériennes ou antifongiques issus de champignons halophiles ont été découverts. Ces champignons représentent aujourd'hui une source importante de nouveaux composés antimicrobiens (Rateb et Ebel, 2011 ; Xu et al., 2015) et les producteurs les plus fréquents sont les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Plusieurs autres espèces comme celles appartenant aux genres *Fusarium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria* et *Acremonium* sont également de bons producteurs (Bérdy, 2005 ; Huu Phong et al., 2016).

L'étude *in vitro* de l'activité antifongique de nos souches vis-à-vis d'une souche de *Fusarium oxysporum* a été effectuée sur un milieu PDA sans NaCl et PDA à 2% NaCl. Sur ces deux milieux, toutes les souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* testées ont secrété des substances antifongiques. Leur pourcentage d'inhibition n'a pas dépassé 40% sur milieu sans NaCl mais une augmentation significative de ce pourcentage a été observée chez la majorité des souches sur milieu à 2% NaCl. La meilleure activité antifongique a été observée chez les deux souches d'*Aspergillus subramaniani* A1 et A2 sur les deux milieux. Selon Xu et al. (2015), le genre *Aspergillus* est l'un des genres fongiques dominants des milieux hypersalins et les souches appartenant à ce genre produisent plus de nouveaux composés antimicrobiens par rapport aux autres genres.

La sécrétion des substances antimicrobiennes par des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* isolées des milieux hypersalins a été rapportée par plusieurs études et diverses nouvelles molécules à activité antimicrobienne ont été décrites (Meng et al., 2015 ; Gao et al., 2011 ; Koch et al., 2014 ; Shang et al., 2012 ; Corral et al., 2018 ; Zheng et al., 2013 ; Wang et al., 2011a ; Ali et al., 2014 ; Lebogang et al., 2009), mais aucune étude n'a rapportée que l'espèce *Aspergillus subramaniani* secrète des substances antifongiques.

Aucune activité antifongique n'a été observée chez l'espèce *Chrysosporium sp.* bien que plusieurs études menées sur les métabolites secondaires des espèces de *Chrysosporium* ont décrit plusieurs molécules bioactives à activité antifongique (Yamashita et al., 1984 ; Hoshino et al., 2002 ; Yang et al., 2003 ; Fairlamb et al., 2004). Sur milieu sans NaCl, les deux souches halophiles obligatoires H19 et H20 de *Gymnoascus halophilus* n'ont montrées aucune activité antifongique mais une faible activité a été observée chez les deux espèces *Gymnoascus dankaliensis* et *Arachnomyces sp.*. La concentration de 2% de NaCl a significativement augmenté l'activité antifongique de ces quatre souches. Aucune étude n'a été effectuée sur l'activité antimicrobienne de l'espèce *Gymnoascus halophilus*. Plusieurs études effectuées sur les métabolites secondaires de *Gymnoascus dankaliensis* ont montré

que cette espèce secrète différentes molécules bioactives à activité cytotoxique et anticancéreuse mais aucune activité antimicrobienne n'a été mentionnée (Amagata et al., 2006, 2007 ; Wang et al., 2016c). Très peu d'études ont été effectuées sur les métabolites secondaires du genre *Arachnomyces* et la seule molécule à activité antimicrobienne détectée chez ce genre est l'antibiotique céphalosporine (Kitano et al., 1974).

La deuxième espèce halophile obligatoire, *Wallemia sp.*, a enregistré un taux d'inhibition de 41.17% sur milieu à 2% NaCl et aucune activité n'a été observé en absence du NaCl. L'habilité des espèces de *Wallemia* à produire des métabolites secondaires a été étudiée par plusieurs auteurs (Frank et al., 1999 ; Peng et al., 2011 ; Desroches et al., 2014 ; Jančić et al., 2016b). Une centaine de composés bioactifs différents ont été détectés chez les espèces de *Wallemia*. Certains composé ont montré une bonne activité antimicrobienne comme les composés Walleminol A, Wallimidione, UCA 1064-A et UCA 1064-B alors que d'autres avaient une faible activité (Peng et al., 2011 ; Jančić et al., 2016b).

Toutes les souches de *Fusarium* testées ont secrété des substances antifongiques en absence et en présence de 2% NaCl. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont travaillé sur les métabolites secondaires à activité antimicrobienne du *Fusarium* (Kobayashi et al., 1995 ; Mandeel et al., 1999 ; Tayung et al., 2011 ; Sørensen et al., 2013 ; Hemphill et al., 2017). Le genre *Fusarium* produit une large gamme de métabolites secondaires bioactifs et certains de ces composés comme les fusarielin (A–E) possèdent un effet antifongique (Tchoukoua et al., 2017). Les informations génétiques montrent que seulement un quart des composés bioactifs produits par le *Fusarium* ont été identifiés ce qui indique qu'il existe un énorme potentiel pour découvrir de nouveaux métabolites secondaires dans ce genre (Sondergaard et al., 2016)

Une bonne activité antifongique a aussi été observée chez l'espèce *Alternaria sp.*. Ce résultat est en parfaite concordance avec plusieurs études qui ont indiqué que plusieurs espèces du genre *Alternaria* secrètent différentes molécules bioactives à activité antifongique comme le diketopiperazine dipeptide, acide tenuazonique, altersetine, pyrophene et brassicoline A (Musetti et al., 2007 ; Davis et al., 1977 ; Hellwig et al., 2002 ; Shaaban et al., 2012; Gloer et al., 1988).

Les deux souches de *Trichoderma*, *Trichoderma gamsii* et *Trichoderma sp.*, avaient la meilleure activité antifongique en présence et en absence du NaCl. *Trichoderma* est un champignon qui utilise différents mécanismes d'antagonisme comme le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition. Il produit de nombreux métabolites secondaires antifongiques pour éliminer la compétition microbienne et, par conséquent, conduire à une plus grande disponibilité de sources alimentaires. Récemment, les espèces du genre *Trichoderma* dérivées des milieux marins sont considérées comme une source importante pour des nouveaux produits naturels avec diverses bioactivités (Benítez et al., 2004, Su et al., 2018).

Les micro-organismes vivant dans des conditions extrêmes ont acquis une attention croissante en tant que ressources prometteuses pour de nouveaux composés bioactifs. Ces

environnements extrêmes pourraient activer certains gènes silencieux et induire des voies de biosynthèse uniques dans lesquelles des composés structurellement uniques peuvent être produits (Kogej et al., 2006)

La faible activité antifongique observée chez certaines de nos souches sur milieu sans NaCl et l'augmentation significative de cette activité à une concentration saline de 2% de NaCl peuvent être expliquées par le fait que dans les conditions de culture standard, les gènes de biosynthèse des métabolites secondaires peuvent ne pas s'exprimer. La variation des conditions de culture a été considérée comme la stratégie la plus simple et la plus efficace pour stimuler l'expression de ces gènes et la biosynthèse de nouveaux métabolites secondaires, cette stratégie est appelée «une souche, plusieurs composés» (Bode et al., 2002).

Parmi ces conditions de culture, la salinité a un grand effet sur la production de métabolites secondaires. Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration de NaCl de 5% à 15% dans les milieux de croissance augmentait la production des molécules bioactives chez des espèces de *Wallemia*. En plus, la souche *Wallemia sebi* PXP-89 cultivé dans un milieu à 10% de NaCl a produit un nouvel alcaloïde cyclopentanol pyridine, qui n'a pas été détecté dans un milieu sans NaCl (Peng et al., 2011 ; Jančič et al., 2016b). L'étude de Wang et al. (2011b) a également indiqué que la souche *Spicaria elegans* KLA-03 s'est avérée biosynthétiser un nouvel acide diacrylique à activité antimicrobienne lorsqu'elle est cultivée dans un milieu à une concentration saline de 10%.

La composition du milieu de culture affecte aussi la production de métabolites secondaires. La source de carbone et d'azote utilisée a une influence significative sur le métabolisme secondaire microbien. Ainsi, les micro-organismes cultivés dans des milieux contenant différents composants peuvent présenter un métabolisme secondaire différent. Par exemple le champignon halophile *Aspergillus niger* BRF-074 produit un nouveau dérivé d'ester de furanne quand il est cultivé dans le milieu MPDB (malt peptone dextrose broth) mais ce métabolite n'est pas produit dans le milieu PDB (potato dextrose broth) ou PDYB (potato dextrose yeast broth) (Uchoa et al., 2017).

Les champignons pouvant survivre sous divers environnements extrêmes ont non seulement une importance écologique, mais prennent également de l'importance dans la recherche biotechnologique et les utilisations industrielles. Dans le domaine agroalimentaire, ces champignons extrémophiles sont considérés comme des candidats plus appropriés pour une application comme agent de biocontrôle. Leur tolérance aux différents facteurs de stress est une caractéristique hautement souhaitable pour les agents de lutte biologique robustes et efficaces utilisés contre les champignons phytopathogènes lorsque ces agents sont administrés à la fois pré et post récolte (Zajc et al., 2019).

Notre étude préliminaire sur l'utilisation des deux souches de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique a montré que les deux souches ont un taux d'inhibition *in vitro* élevé vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*

et *Rhizoctonia solani*. Plusieurs études ont été effectuées sur l'utilisation de *Trichoderma* comme biofongicide appliqué au champ contre ces champignons phytopathogènes (Marzano et al., 2013 ; Gnancadja et al., 2015 ; Shaw et al., 2016 ; Mwangi et al., 2018 ; Manganiello et al., 2018 ; Macena et al., 2019). Récemment, la recherche de souches de *Trichoderma* halotolérantes comme agent de biocontrôle est devenue indispensable pour lutter contre les champignons phytopathogènes dans les zones semis arides où l'irrigation par les eaux salines est fréquente. Ces champignons antagonistes halotolerants sont également des candidats prometteurs pour le développement d'agents de biocontrôle pour l'amélioration de la croissance des plantes dans les sols salins (Mohamed et Haggag, 2006 ; Gal-Hemed et al., 2011 ; Poveda, 2020).

Les mécanismes d'antagonisme observé chez nos deux souches *Trichoderma sp.* et *T. gamsii* étaient le fort pouvoir de colonisation et la sécrétion de substances antifongiques volatiles. Les composés organiques volatils produits par les champignons endophytes sont une classe connue de biopesticides. Plus de 370 composés organiques volatils synthétisés par *Trichoderma* ont été identifiés avec une importance dans les domaines pharmaceutique, agronomiques et écologiques (Morath et al., 2012 ; Salwan et al., 2019).

La sécrétion des substances antifongique volatiles par *T. gamsii* est en concordance avec le résultat obtenu par Chen et al. (2016) qui ont trouvé que les substances antifongiques secrétées par les souches de *T. gamsii* sont des substances volatiles ; mais ces résultats ne rejoignent pas ceux obtenu par Rinu et al., 2013 où les souches de *T. gamsii* ont sécrété des substances antifongiques volatiles et diffusibles. Selon Li et al. (2019) qui ont résumé les métabolites secondaires non volatiles des espèces de *Trichoderma* n'ont cité aucun métabolite diffusible à activité antimicrobienne synthétisé par *T. gamsii*.

Les composés volatiles à activité antimicrobienne peuvent se diffuser dans l'air, atteignant des habitats difficiles d'accès dans des environnements fermés ; cette particularité fait de ces composée une stratégie de lutte biologique utile pour le contrôle biologique des maladies post-récolte ; en plus, la compétition pour les nutriments et l'espace est considéré comme le principal mode d'action par lequel les antagonistes microbiens suppriment les agents pathogènes post récolte. *Trichoderma* se caractérise par une croissance rapide et une capacité supérieure à mobiliser et à absorber les nutriments par rapport aux autres microorganismes ce qui lui permet de coloniser rapidement les fruits blessés et de contrôler la pourriture causée par les pathogènes (Mercier et Wilson, 1994 ; Benítez et al., 2004).

Lors de la conservation post-récolte des fruits et légumes, les pertes varient de 25 à 60% de la production totale où les maladies causées par des agents pathogènes jouent un rôle important. La tomate est un fruit populaire et la perte de ce fruit est importante après la récolte en raison de plusieurs maladies. L'alternariose causée par *Alternaria alternata* est une des principales maladies fongiques post-récolte du fruit de la tomate (Feng et Zheng, 2007). En plus, *Alternaria alternata* est un champignon qui a été lié aux intoxications

alimentaires due à la production de mycotoxines qui comprennent l'alternariol, l'altenuène, l'alternariol monométhyléther, les altertoxines et l'acide L-tenuazonique (Scott, 2001).

Dans notre essai de bio-protection des fruits de tomate contre l'alternariose, les témoins infectés par *A. alternaria* ont présenté les symptômes de la pourriture. Au cours du processus d'infection, *A. alternata* sécrète des substances telles que les enzymes, les polysaccharides et les toxines qui semblent être impliquées dans le développement de la maladie. *Alternaria alternata* est connu pour produire un large spectre d'enzymes dégradant la paroi cellulaire comme les endoglucanases, cutinases et pectinases. En plus des enzymes, ce champignon produit un groupe de mycotoxines, des toxines spécifiques à l'hôte (HST), qui se sont avérées être des déterminants critiques de la pathogénicité ou de la virulence dans plusieurs interactions plantes-pathogènes. Ces toxines induisent une sensibilité de l'hôte à l'agent pathogène en supprimant le mécanisme de défense de l'hôte (Eshel et al., 2002 ; Suzuki et al., 2003 ; Troncoso-Rojas et Tiznado-Hernández, 2014).

Plusieurs types de fongicides synthétiques ont été utilisés pour contrôler les maladies post-récolte des fruits de tomate, cependant, l'acceptabilité de ces traitements qui présentent des risques importants pour la santé humaine et pour l'environnement devient de plus en plus limitée. Actuellement, le contrôle biologique est considéré comme une alternative potentielle aux fongicides synthétiques pour contrôler les agents pathogènes post-récolte (Janisiewicz et Korsten, 2002).

Nos deux souches de *Trichoderma* ont montré un fort pouvoir antagoniste *in vivo* contre *A. alternata*. Les deux souches avaient un effet préventif et curatif significatif contre l'alternariose de la tomate en inhibant la croissance mycélienne du pathogène et réduisant le diamètre des lésions.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Batta (2001) qui a montré que le traitement préventif et curatif par *Trichoderma* contre *A. alternata* sur les fruits de Kaki ont réduit significativement le développement de la maladie. Plusieurs autres études ont indiqué que des espèces de *Trichoderma* comme *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. reesei* et *T. longibrachiatum* peuvent être appliqués comme agent de lutte biologique post-récolte dans différentes cultures telles que les papayes (Valenzuela et al., 2015), les tomates (Dal Bello et al., 2015), les pommes (Batta, 2015), les poires (Batta, 2007 ; 2015), mangue (Prabakar et al., 2008) et les bananes (Mortuza et Ilag, 1999) où le pourcentage d'inhibition de l'agent pathogène a varié entre 28.7% et 96.9%.

Aucune étude n'a été effectuée sur l'utilisation de *T. gamsii* comme agent de lutte biologique post-récolte. Toutes les études menées sur cette espèce ont montré que *T. gamsii* peut être utilisé comme un agent de biocontrôle au champ et plusieurs souches ont été approuvées comme des biofongicides non toxiques (Rinu et al., 2013 ; Chen et al., 2016) et pouvant réduire la sécrétion de trichothécène désoxynivalénol par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (Zeilinger et al., 2016).

Nos deux souches *Trichoderma sp.* et *T. gamsii* ont été isolées d'un milieu hypersalin et sont considérées comme halotolérantes pouvant croître à 5% de NaCl. Ces deux souches ont montré une bonne activité antifongique et un potentiel d'utilisation comme agent de biocontrôle post récolte. Cependant, Zajc et *al.* (2019), en testant l'utilisation de plusieurs souches fongiques extrêmophiles comme agent de biocontrôle post récolte, ont suggéré que les mécanismes de tolérance au stress comme la croissance dans des conditions oligotrophes, la thermotolérance avec production de sidérophore à 37°C, certaines activités enzymatiques, la mélanisation et la production de biofilm pourraient également jouer un rôle important dans la pathogénèse chez l'homme. Ces caractéristiques doivent être soigneusement examinées lors de l'évaluation de la sécurité des agents de lutte biologique potentiels.

## ***Conclusion***

## Conclusion

L'Algérie comprend un grand nombre d'immenses lacs salés continentales appelés sebkha ou chott qui s'étalent de la côte nord algérienne jusqu'au Sahara ; ces lacs sont considérés comme des milieux extrêmes hypersalins qui se caractérisent par une grande diversité floristique et faunistique.

La communauté fongique est peu étudiée dans les milieux hypersalins algériens et comme aucune étude mycologique n'a été effectuée au niveau de la grande sebkha d'Oran, nous l'avons choisi pour évaluer la biodiversité fongique de ce milieu extrême hypersalin.

Les résultats de notre étude sont en cohérence avec les études déjà réalisées sur les milieux hypersalins dans le monde et confirment encore une fois que la flore fongique de ces milieux extrêmes est d'une diversité remarquable.

Au total, 24 genres et 30 espèces identifiées ont été isolés dont quatre espèces isolées pour la première fois en Algérie: *Fusarium brachygibbosum*, *Penicillium allii* *Trichoderma gamsii* et *Gymnoascus halophilus*. Les deux espèces *F. brachygibbosum* et *P. allii* sont phytopathogènes de l'olivier et de l'ail respectivement et puisque l'Algérie est un pays producteur de ces deux cultures, ces deux champignons doivent être surveillés et des études supplémentaires sur leur pouvoir pathogène doivent être effectuées.

Nous avons également isolé 13 souches qui n'ont pas été identifiées au niveau de l'espèce par les études morphologique, moléculaire et phylogénétique. D'autres études sont nécessaires pour clarifier leur identification au niveau de l'espèce et pour savoir s'il s'agit de nouvelles espèces ou non.

Le test d'halotolérance a révélé que *Wallemia sp.* et les deux souches de *Gymnoascus halophilus* sont les seules souches halophiles obligatoires isolées dans notre étude alors que la majorité des souches sont halotolérantes pouvant croître en absence de NaCl et tolérant une concentration saline de 12,5%.

L'étude de l'aptitude des souches à produire des enzymes hydrolytiques (cellulase, lipase, amylase, protéase) sur milieu solide a montré que les six espèces *Aspergillus sp.* souche A4, *Chaetomium sp.* souche H1, *P. vinaceum*, *G. halophilus* et les deux basidiomycètes *Wallemia sp.* et *Ustilago cynodontis* ont une activité enzymatique importante nécessitant des études plus approfondies sur leur stabilité et activité sous plusieurs conditions extrêmes pour déterminer leur potentiel biotechnologique.

L'activité antifongique des souches a été évaluée *in vitro* vis-à-vis d'une souche de *F. oxysporum* sur milieu PDA sans NaCl et à 2% NaCl. La plus part des souches ont inhibé la croissance de *F. oxysporum* en absence de NaCl et les deux souches de *Trichoderma*, *Trichoderma sp.* et *T. gamsii* ont enregistré le meilleur taux d'inhibition. En présence de 2% NaCl, la moyenne du taux d'inhibition de l'ensemble des souches a significativement augmenté. Les champignons isolés des milieux hypersalins sont connu par leurs divers métabolites secondaires à activité cytotoxiques, anticancéreuses et antimicrobienne et le

NaCl est un des facteurs influençant la synthèse de ces composés bioactifs. Il sera très intéressant d'étudier dans nos prochains travaux les métabolites secondaires de nos souches et l'effet du NaCl sur leur synthèse.

L'étude préliminaire de l'utilisation de *Trichoderma sp.* et *T. gamsii* comme agent de lutte biologique a montré que les deux souches ont un taux d'inhibition élevé *in vitro* en sécrétant des substances antifongiques volatiles. *In vivo*, les deux souches avaient un effet préventif et curatif significatif contre l'alternariose de la tomate en réduisant le diamètre des lésions causées par *A. alternata*. Dans les deux tests, la souche *Trichoderma sp.* s'est avéré avoir un pouvoir inhibiteur significativement plus élevé que celui de *T. gamsii*.

Ces deux souches de *Trichoderma*, isolées d'un milieu hypersalin et considéré comme halotolérantes pouvant croître à 5% de NaCl, peuvent être considérées comme des candidats appropriés pour une application comme agent de biocontrol post récolte mais des études supplémentaires sont nécessaires pour étudier leurs caractères de tolérance au stress hautement souhaitables pour les agents de lutte biologique et leur implication dans la pathogénèse chez l'homme pour garantir la sécurité de ces agents. En plus, plusieurs études ont été menées sur la recherche de souches halotolérantes de *Trichoderma spp.* qui pourraient être utilisés comme agents de lutte biologique pré récolte en présence de stress salin en raison de l'utilisation d'eau salée pour l'irrigation dans l'agriculture en zone aride. C'est le premier isolement de *T. gamsii* en Algérie et cela ouvre la voie à leur utilisation ainsi que la souche *Trichoderma sp.* en tant qu'agents de lutte biologique en agriculture irriguée avec de l'eau saline.

Il faut souligner que tous nos champignons ont été isolés à partir d'une région située en marge de la sebkha ne représentant que 0,26% de la superficie totale de la grande sebkha d'Oran, ce qui ne reflète pas la véritable diversité fongique préservée au niveau du lac et qui devrait être très intéressant à découvrir dans nos futures études.

## ***Références bibliographiques***

## A

Abdel-Hafez S. (1982) Survey of the mycoflora of desert soils in Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 80:3–8.

Abe CA, Faria CB, De Castro FF, De Souza SR, Dos Santos FC, Da Silva CN, Tessmann DJ, Barbosa-Tessmann IP. (2015) Fungi isolated from maize (*Zea mays L.*) Grains and production of associated enzyme activities. *Int J Mol Sci*. 16(7):15328-15346.

Alex D, Shainu A, Pandey A, Sukumaran RK. (2014) Esterase active in polar organic solvents from the yeast *Pseudozyma sp.* NII 08165. *Enzyme Res*. 1–10

Ali I, Kanhayuwa L, Rachdawong S, Rakshit SK. (2013) Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province. *Thailand Ann Microbiol*. 63:887–895.

Ali I, Siwarungson N, Punnapayak H, Lotrakul P, Prasongsuk S, Bankeeree W, Rakshit SK. (2014) Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pak. J. Bot*. 46, 983–988.

Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC. (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions, *Int. J. Food Microbiol*. 56 191–197.

Al-Mahmooli IH, Al-Bahri YS, Al-Sadi AM, Deadman ML. (2013) First Report of *Euphorbia larica* Dieback Caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Dis*. 97: 687-687.

AL-Musallam AAS, AL-Sammar HF, AL-Sane NA. (2011) Diversity and dominance of fungi inhabiting the sabkha area in Kuwait. *Botanica Marina*. 54:83–94.

Al-Sadi AM, Al-Jabri AH, Al-Mazroui SS, Al-Mahmooli IH. (2012) Characterization and pathogenicity of fungi and oomycetes associated with root diseases of date palms in Oman. *Crop Prot*. 37:1-6.

Amagata T, Tanaka M, Yamada T, Doi M, Minoura K, Ohishi H, Yamori T, Numata A. (2007) Variation in Cytostatic Constituents of a Sponge-Derived *Gymnascella dankaliensis* by Manipulating the Carbon Source. *Journal of Natural Products*, 70(11), 1731–1740.

Amagata T, Minoura K, Numata A. (2006). Gymnastatins F–H, Cytostatic Metabolites from the Sponge-Derived Fungus *Gymnascella dankaliensis*. *Journal of Natural Products*, 69(10), 1384–1388.

Amelia, Stolk C, Samson RA. The Genus *Talaromyces* Studies on *Talaromyces* and related genera II. *Studies in Mycology*. 2 : 1972

Anand BG, Thomas CKN, Prakash S. (2016) In vitro cytotoxicity and antimicrobial activity of *Talaromyces flavus* SP5 inhabited in the marine sediment of Southern Coast of India. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 14(12): 913–921.

Andrews JH, Harris RF, Spear RN, Lau GW, Nordheim EV. (1994) Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. Can J Microbiol. 40(1):6-17.

Anonyme, US EPA. (2010) Biopesticides registration action document. *Trichoderma gamsii* strain ICC 080 PC Code: 119207. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division.

Apinis AE. (1964) Revision of British Gymnoascaceae. Mycol. Pap. 96: 1-56.

Arzanlou M, Samadi R, Frisvad JC, Houbraken J, Ghosta Y. (2016). Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. Mycological Progress, 15(10-11), 1081–1092.

Asiry IAM, Badr JM, Youssef DTA. (2015) Penicillivincine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum*. Phytochem. Lett. 13: 53-58.

Aubert G (1976). Les sols sodiques en Afrique du Nord. Annales de l'Institut National Agronomique - El Harrach, 7: 185-196.

## **B**

Bahi K. (2012) Contribution à l'étude phytoécologique des zones humides de la région d'Oran. Mémoire de Magister, université d'Oran, 153 p.

Baig S, Saleem M. (2012). Production and characterization of cellulases of *Aspergillus niger* by using rice husk and saw dust as substrates. Pakistan Journal of Botany (Pakistan), 44, 377-382.

Bakkar H, Ait Menguelet Z. (2001) Fiche descriptive Ramsar des zones humides algérienne d'importance internationale, sebkha d'Oran. Direction générale des forêts, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie.

Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A. (1992) Backbone dynamics of calmodulin studied by <sup>15</sup>N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy the central helix is flexible. Biochemistry 31, 5269–5278.

Barbosa RN, Bezerra JDP, Souza-Motta CM, Frisvad JC, Samson RA, Oliveira NT, Houbraken J. (2018). New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. Antonie van Leeuwenhoek. 111, 1883–1912 (2018).

Barnett HL, Hunter BB. (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company.

Barone G, Varrella S, Tangherlini M, Rastelli E, Dell'Anno A, Danovaro R, Corinaldesi C. (2019) Marine Fungi: Biotechnological Perspectives from Deep-Hypersaline Anoxic Basins. Diversity. 11, 113

Batta YA. (2001) Effect of Fungicides and Antagonistic Microorganisms on the Black Fruit Spot Disease on Persimmon. Dirasat, Agricultural Sciences. 28 : 165-171.

- Batta Y. (2015) Production and testing of biopesticide for control of postharvest mold infections on fresh fruits of apple and pear. *Advances in Microbiology*. 5:787.
- Batta Y. (2007) Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Postharvest Biology and Technology*. 43:143-150.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7(4):249-260.
- Benziane A, Boualla N, Derriche Z. (2012) Aptitude des eaux du bassin de la Grande Sebkhah d'Oran à l'irrigation *Journal of Applied Biosciences*. 56: 4066– 4074.
- Benziane A. (2013) The aquifer system of the Great Sebkhah of Oran: Geological and hydrogeological considerations. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Terre*. 35:77-92
- Bérdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 (1):1–26
- Blackwell M. (2011) THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES? *American Journal of Botany*. 98(3): 426–438.
- Blomberg L, Adler. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi, *Adv. Microb. Physiol.* 33 : 145–212.
- Bode HB, Bethe B, Hofs R, Zeeck A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochemistry*. 3 : 619–627.
- Boetius A, Joye S. (2009). Thriving in salt. *Science* 324, 1523–1525.
- Boualla N, Benziane A, Derrich Z. (2011) Reflet des investigations physico-chimiques dans le bassin sebkha d'Oran *ScienceLib Editions Mersenne*. 3 , N ° 111104
- Boualla N. (2018) Interaction eau - sol en milieu salin (cas du bassin de la Grande Sebkhah d'Oran). Thèse de doctorat, université d'oran. 159 p
- Bouchibi N, van Bruggen AHC, MacDonald JD (1990) Effect of ion concentration and sodium:calcium ratio of a nutrient solution on *Phytophthora* root rot of tomato and zoospore motility and viability of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 80 : 1323-1329
- Boughalem M, Moussa K, Zaagane M. (2016) The Toposequential Analysis and Cultivation of the Land Skills Misserghin Region (the Northern Margin of the Oran Great Sebkhah-Algeria) *Universal Journal of Geoscience*. 4(5): 93-101
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. (1991) Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 22:525–64.
- Brygoo Y, Gautier A. (2007) Molecular polymorphism of *Fusarium* strains isolated from wheat and corn ears in France Collects 2003 and 2004. Paper presented at the « conférence sur les progrès et perspectives de la recherche sur les mycotoxines de *Fusarium* dans les céréales ». Arcachon, France.

Buchalo AS, Nevo E, Wasser SP, Oren A, Molitoris HP. (1998) Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *Proc R Soc Lond.* 265:1461–1465.

Burg MB, Ferraris JD, Dmitreva NI. (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol. Rev.* 87 : 1441–1474.

Bussamara R, Fuentesfria AM, Oliveira ES, Broetto L, Simcikova M, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. (2010) Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilotplant scale batch fermentation. *Bioresour Technol.* 101: 268–275.

Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde-Cimerman N. (2005a) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett.* 244(2):229–234

Butinar L, Sonjak S, Zalar P, Plemenitas<sup>˘</sup> A, Gunde-Cimerman N. (2005b) Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Mar* 48(1):73–79

Butinar L, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N. (2011) Hypersaline waters – a potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. *FEMS Microbiol Ecol.* 77:186–199

## C

Calvente V, Benuzzi D, Tosetti MI. (1999) Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *Int Biodeterior Biodegradation.* 43(4):167-172.

Camporota, P. (1985) *In vitro* Antagonism of *Trichoderma spp.* against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie* 5 (7): 613-620.

Cantrell SA, Casillas-Martinez L, Molina M. (2006) Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research.* 110:962-970.

Carbone I, Kohn LM. (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91:553–556.

Chahal DS, Hawksworth DL. (1976) *Chaetomium Cellulolyticum*, a new thermotolerant and cellulolytic *Chaetomium*. I. Isolation, description and growth rate. *Mycologia* 68(3):600–610.

Chang KF, Hwang SF, Conner RL, Ahmed HU, Zhou Q, Fu H, Turnbull GD, Nyandoro R, Strelkov SE, McLaren DL, Gossen BD. (2019) Effects of *Fusarium avenaceum* and *Rhizoctonia solani* on the growth of soybean in saline soils *Can. J. Plant Sci.* 99: 128–137

Chen AJ, Tang D, Zhou YQ, Sun BD, Li XJ, Wang LZ, Gao WW. (2013). Identification of Ochratoxin A producing fungi associated with fresh and dry liquorice. *PLoS One* 8: e78285.

Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K, Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. (2016) Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *J Ginseng Res.*

Chung D, Kim H, Seok Choi H. (2019) Fungi in salterns. *Journal of Microbiology*. 57 (9) : 717–724

Corral P, Esposito FP, Tedesco P, Falco A, Tortorella E, Tartaglione L, Festa C, D’Auria MV, Gnani G, Varese GC. (2018) Identification of a Sorbicillinoid-producing *Aspergillus* strain with antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*: A new polyextremophilic marine fungus from Barents Sea. *Mar. Biotechnol.* 20 : 502–511.

## **D**

Daami-Remadi M, Souissi A, Ben Oun H, Mansour M, Nasraoui B. (2009) Salinity Effects on Fusarium Wilt Severity and Tomato Growth Dynamic Soil, *Dynamic Plant* 3 (1) : 61-69

Dal Bello G, Lampugnani G, Abramoff C, Fusé C, Perelló A. (2015) Postharvest control of Botrytis gray mould in tomato by antagonists and biorational compounds. *IOBC-WPRS Bulletin*. 111:417-425

Dalboge, H. (1997) Expression cloning of fungal enzyme genes: A novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:29-42.

Damare S, Singh P, Raghukumar S. (2012) Biotechnology of marine fungi. In: Raghukumar C, editor. *Biology of marine fungi*. Berlin, Heidelberg: Springer. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 53 : 278–291.

DasSarma S, DasSarma P. (2012) Halophiles. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

DasSarma S, DasSarma P. (2015) Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Curr. Opin. Microbiol.* 25:120–126.

Davis ND, Diener UL, Morgan-Jones G. (1977) Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. *Appl. Environ. Microbiol.* 34 : 155–157

de Diego T, Manjon A, José L. (2014) Biocompatibility of ionic liquids with enzymes for biofuel production. In: Fang, Z., Smith, R.L., Jr., Qi, X. (Eds.). *Production of Biofuels and Chemicals with Ionic Liquids*, vol. 1. Springer, New York, 284–290.

Demnati F. (2013) Biodiversité et Enjeux Socio-économiques des lacs salés (Chotts et Sebkhass) d’Algérie. Cas du Chott Merouane et Melghir. Thèse de Doctorat. Université de Mohamed Khider- Biskra. 143p

Dennis C, Webster J. (1971a) Antagonism properties of species of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57 (1) : 41-48.

Dennis C, Webster J. (1971b) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1) : 25–39.

Desroches TC, McMullin DR, Miller JD. (2014) Extolites of *Wallemia sebi*, a very common fungus in the built environment. *Indoor Air*. 24(5):533±42.

Díaz-Valderrama JR, Nguyen HDT, Aime MC. (2017) *Wallemia peruviana* sp. nov., a new xerophilic fungus from an agricultural setting in South America. *Extremophiles*. 21:1017-1025.

Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol*. 52(2): 137-145.

Dubost D. (2002) *Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes*. Biskra: C.R.S.T.R.A. édition.

Dubuis A, Simonneau P. (1960) Contribution à l'étude de la végétation halophiles des bassins fermés du plateau d'Oran. Direction de l'hydrolique et de l'équipement rural. Clairbois Birmondreis, Alger, 114 p.

## **E**

Edbeib MF, Wahab RA, Huyop F. (2016) Halophiles: biology, adaptation and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 32(135):1-23.

Einax E, Voigt K (2003) Oligonucleotide primers for the universal amplification of b-tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum fungi. *Org Divers Evol* 3:185–194.

El-Abyad MS, Abu-Taleb AM, Khalil MS. (1992). Impact of salinity stress on soil-borne fungi of sugarbeet. *Plant and Soil*, 143(1), 75–83.

El-Said AHM, Saleem A. (2008) Ecological and physiological studies on soil fungi at Western Region, Libya. *Mycobiology*. 36:1–9.

Eshel D, Lichter A, Dinoor A, Prusky D. (2002) Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol. Plant Pathol*. 3, 347–358.

## **F**

Fairlamb IJ, Marrison LR, Dickinson JM, Lu FJ, Schmidt JP. (2004) 2-pyrones possessing antimicrobial and cytotoxic activities. *Bioorg Med Chem*. 12(15): 4285–4299.

Feliziani E, Romanazzi G. (2016) Postharvest decay of strawberry fruit: etiology, epidemiology, and disease management. *J Berry Res* 6:47–63

Feng W, Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, 18(9), 1126–1130.

Fenta L, Mekonnen H, Gashaw T. (2019) Biocontrol potential of trichoderma and yeast against post harvest fruit fungal diseases: A review *World News of Natural Sciences* 27 : 153-173

Ferreira EMS, Resende DA, Vero S, Pimenta RS. (2019). The Use of Psychrophilic Antarctic Yeast in the Biological Control of Post-harvest Diseases of Fruits Stored at Low Temperatures. *Fungi of Antarctica*, 243–263.

Frank M, Kingston E, Jeffery JC, Moss MO, Murray M, Simpson TJ, Sutherland A. (1999) Walleminol and walleminone, novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi*. *Tetrahedron Lett.* 40(1):133- 136.

Frisvad JC. (2008) Fungi in Cold Ecosystems. In : R. Margesin et al. (eds.) *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Frisvad JC, Samson RA. (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and airborne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49: 1–173.

## **G**

Gao SS, Li XM, Li CS, Proksch P, Wang BG. (2011) Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 : 2894–2897.

Gargas A, Taylor JW. (1992) Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84: 589– 592.

Gashgari R, Gherbawy Y, Ameen F, Alsharari S. (2016) Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur J Microbiol.* 9(1): e26157.

Geiser DM, Jimeénez-Gasco MDM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'donnell K. (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 473–479.

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. – *Stud. Mycol.* 59: 1–10.

Ghali FS, Abood JK, Abbas AK. (1986) The influence of *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, salinity of irrigation well water and the type of soil on the growth and production of tomato crop in Basrah. *AGRIS* 5 : 2 197 212

Ghosh GR, Orr GF, Kuehn HH. (1961) A re-evaluation of *Arachniotus indicus*. *Mycologia* 53: 221-227.

Giraldo A, Gené J, Sutton DA, Madrid H, de Hoog GS, Cano J, Decock C, Crous PW, Guarro J. (2015) Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales) *Persoonia* 34: 10 – 24

Glass NL, Donaldson GC. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4):1323-30.

Gloer JB, Poch GK, Short DM, McCloskey DV. (1988) Structure of brassicolin A: A novel isocyanide antibiotic from the phylloplane fungus *Alternaria brassicicola*. *J. Org. Chem.* 53 : 3758–3761.

- Gnancadja L, Tonon D, Faton E, Douro Kpindou K, Dannon E, Akoegninou A. (2015). Efficacité de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agent pathogène de la tomate. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 770.
- Gómez F. (2011). Extreme Environment. *Encyclopedia of Astrobiology*, 570–572.
- Gonsalves V, Nayak S, Nazareth S. (2011) Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 3:30-36.
- González-Estrada R, Blancas-Benítez F, Montaña-Leyva B, Moreno-Hernández C, Del Carmen Romero-Islas L, Romero-Islas J, ... Gutierrez-Martinez P. (2019). A Review Study on the Postharvest Decay Control of Fruit by *Trichoderma*. *Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide*.
- Ghorbanpour A, Salimi A, Ghanbary MAT, Pirdashti H, Dehestani A. (2018) The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Sci. Hortic*. 230 : 134–141.
- Gorjan A, Plemenitas A. (2006) Identification and characterization of ENA ATPases HwENA1 and HwENA2 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*, *FEMS Microbiol. Lett.* 265 : 41–50.
- Gostincar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A. (2011) Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Advances in Applied Microbiology*. 77 ISSN 0065-2164,
- Gostincar C, Turk M, Plemenita A, Gunde-Cimerman N. (2009) The expressions of D9-, D12-desaturases and an elongase by the extremely halotolerant *Hortaea werneckii* are salt dependent, *FEMS Yeast Res.* 9 : 247–256.
- Gostincar C., Gunde-Cimerman N, Turk M. (2012) Genetic resources of extremotolerant fungi: A method for identification of genes conferring stress tolerance, *Bioresour. Technol.* 111 : 360–367.
- Green W J, Lyons W B. (2009) The saline lakes of the McMurdo dry valleys, Antarctica. *Aquat. Geochem.* 15 : 321–348.
- Grishkan I, Nevo E, Wasser SP. (2003) Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. *Mycology Progress*. 2:19-28.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. (1999) Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 12(3): 454–500.
- Guevarra ED, Tabuchi T. (1990) Production of 2-hydroxyparaconic and itatartaric acids by *Ustilago cynodontis* and simple recovery process of the acids. *Agric Biol Chem.* 54:2359–2365.
- Guevara-Suarez M, García D, Cano-Lira JF, Guarro J, Gené J. (2020). Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in *Aspergillaceae*. *Fungal Systematics and Evolution*, 5(1) : 39–76.

Guiraud P, Steiman R, Seigle-Murandi F, Sage L. (1995) Mycoflora of soil around the Dead Sea II – Deuteromycetes (except *Aspergillus* and *Penicillium*). Systematic and Applied Microbiology. 18:318-322.

Gunde-Cimerman N, Zalar P. (2014) Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. Fungi in Solar Salterns, Food Technol. Biotechnol. 52 (2) : 170–179

Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitas<sup>˘</sup> A. (2000) Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol 32(3):235–240

Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas<sup>˘</sup> A, Butinar L, Sonjak S, Turk M, Ursic V, Zalar P. (2005) Halotolerant and halophilic fungi from coastal environments in the Arctics. In: Gunde Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A (eds) Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, Dordrecht, pp 397–423

Gunde-Cimerman N, Plemenitas<sup>˘</sup> A (2006) Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. Rev Environ Sci Biotechnol. 5(2):323–331

Gunde-Cimerman N., Ramos J, Plemenitas<sup>˘</sup>A. (2009) Halotolerant and halophilic fungi. mycological research. 113 : 1231– 1241

Guo R, Wang Z, Huang Y, Fan H, Liu Z. (2018). Biocontrol potential of saline- or alkaline-tolerant *Trichoderma asperellum* mutants against three pathogenic fungi under saline or alkaline stress conditions. Brazilian Journal of Microbiology.

## **H**

Halo BA, Maharachchikumbura SSN, AL-Yahyai RA, AL-SADI AM. (2019). *Cladosporium omanense*, a new endophytic species from *Zygophyllum coccineum* in Oman. Phytotaxa, 388(1), 145.

Hankin L, Anagnostakis SL. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 67:597-607.

Hassan SA, Shahzad S. (2004) Effect of sea salt on in vitro growth of *Sclerotinia sclerotiorum* Pak. J. Bot., 36(3): 677-682.

Hassani MI. (1987).- Hydrogéologie d'un bassin endoréique semi -aride, le bassin versant de la grande Sebkhia d'Oran (Algérie). *Thèse. 3ème cycle*, Univ de Grenoble, 304 p.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Biol. Sci. 270 (1512): 313–321.

Hellwig V, Grothe T, Mayer-Bartschmid A, Endermann R, Geschke FU, Henkel T, Stadler M. (2002) Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure elucidation and biological activities. J. Antibiot. 55 : 881–892.

- Hemphill CFP, Sureechatchaiyan P, Kassack MU, Orfali RS, Lin W, Daletos G, Proksch P. (2017) OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *The Journal of Antibiotics*. 1–7
- Hennebert GL, Weresub LK. (1977) Terms for states and forms of fungi, their names and types. *Mycotaxon* 6:207–211.
- Hibbett D, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *mycological research* 111 : 509–547.
- Hibbett D, Abarenkov K, Koljalg U, Opik M, Chai B, et al. (2017): Sequence-based classification and identification of Fungi. – *Mycologia* 108(6): 1049–1068.
- Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, Lutzoni F. (2007) Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Mol. Phylogenet. Evol.* 44:412–426
- Hohmann S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(2):300–372
- Hollingsworth PM. (2007) DNA barcoding: potential users. *Genom Soc Pol.* 3:44–7.
- Horinouchi H, Muslim A, Suzuki T, Hyakumachi M. (2007). *Fusarium equiseti* GF191 as an effective biocontrol agent against *Fusarium* crown and root rot of tomato in rock wool systems. *Crop Protection.* 26(10) : 1514–1523.
- Horinouchi H, Muslim A, Hyakumachi M. (2010) Biocontrol of *Fusarium* wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF183. *J. Plant Pathol.* 92:249-254.
- Hoshino Y, Ivanova VB, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Zaki SM, Karam AA, Youssef YA, Gräfe U. (2002) Queenslandon, a new antifungal compound produced by *Chrysosporium queenslandicum*: production, isolation and structure elucidation. *J Antibiot.* 55(5): 516–519.
- Houbraken J, Samson RA. (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* 70: 1–51.
- Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, Overy DP, Tuthill DM, Valdez JC, Samson RA. (2012) New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. – *Persoonia* 29: 78–100.
- Houbraken J, Visagie CM, Meijer M, Frisvad J C, Busby PE, Pitt JI, Seifert KA, Louis-Seize G, Demirel R, Yilmaz N, Jacobs K, Christensen M, Samson RA. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 78 : 373–451.
- Houbraken J, Wang L, Lee HB, Frisvad JC. (2016) New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds *Persoonia*. 36: 299–314.

Hubka V, Kolarik M. (2012)  $\beta$ -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*. 29:1–10.

Hubka V, Nováková A, Kolařík M, Jurjević Ž, Peterson SW. (2015) Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. *Mycologia*. 107(1) : 169–208.

Hujšlova M, Kubatova A, Chudi Kova M, Kola IKM. (2010) Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Reserve, Czech Republic. *Mycology Progress*. 9:1-15.

Huu Phong N, Pongnak W, Soyong K. (2016) Antifungal Activities of *Chaetomium* spp. against *Fusarium* Wilt of Tea Plant *Protect. Sci.* 52 (1) : 10–17.

## I

Ismail MA, Moubasher AH, Ramadan MA, AL-Bedak OA. (2017) Extremophilic fungi and chemical analysis of hypersaline, alkaline lakes of Wadi-El-Natrun, Egypt. *International Journal of Technical Research and Science*. 1: 345-363.

Isshiki S, Shitasue S, Mase T, Kondo T, Kamino S, Kamei Y. (2017) Characterization of an aminopeptidase from *Pseudozyma hubeiensis* 31-B and potential applications. *Mycoscience*. 58: 60–67.

## J

Jacobson ES, Ikeda R. (2005) Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol*. 43(4):327–333

Jančíč S, Nguyen HDT, Frisvad JC, Zalar P, Schroers HJ, Seifert KA, Gunde-Cimerman N. (2015) A taxonomic revision of the *Wallemia sebi* species complex. *PLoS ONE*. 10 (5) e0125933.

Jančíč S, Zalar P, Kocev D, Schroers HJ, Džeroski S, Gunde-Cimerman N. (2016a) Halophily reloaded: New insights into the extremophilic life-style of *Wallemia* with the description of *Wallemia hederæ* sp. nov. *Fungal Divers*. 76(1):97-118.

Jančíč S, Frisvad JC, Kocev D, Gostinčar C, Džeroski S, Gunde-Cimerman N. (2016b) Production of Secondary Metabolites in Extreme Environments: Food- and Airborne *Wallemia* spp. Produce Toxic Metabolites at Hypersaline Conditions. *PLoS ONE*. 11(12): e0169116.

Janisiewicz W, Korsten L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. 40:411-441.

Jaouani A, Neifar M, Prigione V, Ayari A, Sbissi I, Ben Amor SB, Seifeddine BT, Varese GC, Cherif A, Gtari M. (2014) Diversity and enzymatic profiling of halotolerant micromycetes from Sebkhâ El Melah, a Saharan salt flat in southern Tunisia. *Biomed. Res. Int.* 1-11.

Joye SB, Samarkin VA, Orcutt BN, MacDonald IR, Hinrichs KU, Elvert M, Teske AP, Lloyd KG, Lever MA, Montoya JP, Meile CD. (2009). Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nat. Geosci.* 2 : 349–354.

**K**

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. (2008) A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr. Microbiol.* 57:503-507.

Katoch A, Kapoor P. (2014) Recent Concepts in Fungal Taxonomy: A Review. *Research and Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences.* 3 (2).

Kitano K, Kintaka K, Suzuki S, Katamoto K, Nara K, Nakao Y. (1974) Production of cephalosporin antibiotics by strains belonging to the genera *Arachnomyces*, *Anixiopsis* and *Spiroidium*. *Agr. Biol. Chem.* 38: 1761 – 1762.

Kobayashi H, Slijnaga R, Furihatat K, Morisaki N, Iwasaki S. (1995) Isolation and Structures of an Antifungal Antibiotic, Fusarielin A, and Related Compounds Produced by a *Fusarium* sp. *The Journal of Antibiotics.* 48.

Koch L, Lodin A, Herold I, Ilan M, Carmeli S, Yarden O. (2014) Sensitivity of *Neurospora crassa* to a marine-derived *Aspergillus tubingensis* anhydride exhibiting antifungal activity that is mediated by the MAS1 protein. *Mar. Drugs.* 12 : 4713–4731.

Kogej T, Gostinar C, Volkmann M, Gorbushina AA, Gunde-Cimerman N. (2006) Mycosporines in extremophilic fungi – Novel complementary osmolytes?, *Environ. Chem.* 3 : 105–110.

Kogej T, Stein M, Volkmann M, Gorbushina AA, Galinski EA, Gunde-Cimerman N. (2007) Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization, *Microbiology*, 153 : 4261–4273.

Koopmanschap E., Hammami M., Klok C., 2011. Lac Ayata dans la Vallée d'Oued Righ.

Quick-scan of options and preliminary recommendations for the Management of Lake Ayata in the Valley of Oued Righ. Wageningen: Centre for Development Innovation Wageningen UR edition.

Kretsinger RH. (1980) Structure and evolution of calcium-modulated proteins. – *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8: 119–174

Kuehn HH. (1958) A preliminary survey of the Gymnoascaceae I. - *Mycologia* 50: 417-439.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and evolution* 35 : 1547 – 1549.

Kwon-Chung KJ. (2012) Taxonomy of Fungi Causing Mucormycosis and Entomophthoromycosis (Zygomycosis) and Nomenclature of the Disease: Molecular Mycologic Perspectives. *Clinical Infectious Diseases.* 54 (1) : 8–15.

L

- Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA, Elhaitoum A. (2014) First Report of *Fusarium equiseti* Causing Damping-Off Disease on Aleppo Pine in Algeria. *Plant Dis.* 98(9):1268
- Lebogang L, Taylor JE, Mubyana-John T. (2009) A preliminary study of the fungi associated with saltpans in Botswana and their anti-microbial properties. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability.* Global Science Books. 3(2): 61–71.
- Lenassi M, Gostinar C, Jackman S, Turk M, Sadowski I, Nislow C, Jones S, Birol I, Gunde Cimerman N, Plemenitaš A. (2013) Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genomesequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*, *PLoS ONE*, 8 e71328.
- Lenassi M, Vaupotic T, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A. (2007) The MAP kinase HwHog1 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns. *Saline Systems* 3.
- Li MF, Li GH, Zhang KQ. (2019) Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, 9(3), 58.
- Libkind D, Brizzio S, van Broock M. (2004) *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. *Folia Microbiol.* 49 : 19–25.
- Liu YL, Whelen S, Hall BD. (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.
- Liu YJ, Hodson MC, Hall BD. (2006). Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology.* 6(1), 74.
- Liu S, Su M, Song SJ, Jung JH. (2017) Marine-derived *Penicillium* species as producers of cytotoxic metabolites. *Mar. Drugs.* 15: 329.
- Liu S, Su M, Song SJ, Jung JH. (2017) Marine-derived *Penicillium* species as producers of cytotoxic metabolites. *Mar. Drugs.* 15: 329.
- Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. (2015) Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology.* 80:189–245.
- Lombard L, Houbraeken J, Decock C, Samson RA, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. (2016) Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae* *Persoonia* 36: 156–246
- Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson RA. (2004) The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S generated rDNA phylogeny. *Mycologia* 96: 773–780.
- Luangsa-ard J, Houbraeken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samson RA. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 141–149.

**M**

- Macena AMF, Kobori NN, Mascarin GM, Vida JB, Hartman GL. (2019). Antagonism of Trichoderma-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Abdullah SK, Descals E, Salinas J, Lopez-Llorca LV. (2008) Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:90-105.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, et al. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56: 131–144.
- Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Hyde KD. (2014) The genus *Bipolaris* *Studies in Mycology* 79: 221–288.
- Mandeel Q, Al-Laith A, Mohsen L. (1999) Survey of *Fusarium* Species in an Arid Environment of Bahrain. V. Antimicrobial Activity of Some Local and International *Fusarium* Species, *Pharmaceutical Biology*, 37:3, 181-187,
- Mandeel QA. (2006) Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. *Journal of Basic Microbiology*. 46:480-494.
- Manganiello G, Sacco A, Ercolano MR, Vinale F, Lanzuise S, Pascale A, ... Woo SL. (2018). Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Martin FN, Hancock JG (1981) Relationship between soil salinity and population density of *Pythium ultimum* in the San Joaquin Valley of California. *Phytopathology* 71 : 893
- Marzano M, Gallo A, Altomare C. (2013). Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control*, 67(3) : 397–408.
- Mastouri F, Björkman T, Harman G.E. (2010) Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*. 100 : 1213–1221
- Matheny PB. (2005) Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1), 1–20.
- McGenity TJ, Oren A. (2012). Hypersaline environments. In *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. 402 –437.
- Medina-Cordova N, Rosales- Mendoza S, Hernández-Montiel L, Angulo C. (2018) The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*. 121:216-222.

- Meng LH, Zhang P, Li XM, Wang BG. (2015) Penicibrocazines A–E, five new sulfide diketopiperazines from the marine-derived endophytic fungus *Penicillium brocae*. *Mar. Drugs*. 13 : 276–287.
- Mercier J, Wilson CL. (1994) Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4 : 138–144.
- Mitchell TG. (2005) Kingdom fungi: fungal phylogeny and systematics. In: Merz WG, Hay RJ (eds) *Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. Medical mycology*, 10th edn. Hodder Arnold, London, pp 43–68
- Mitchell JI, Zuccaro A. (2006) Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20, 62–74.
- Mohamed HA-LA, Haggag WM. (2006). Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2).
- Mohammadi AH, Banihashemi Z, Maftoun M. (2007). Interaction Between Salinity Stress and *Verticillium* Wilt Disease in Three Pistachio Rootstocks in a Calcareous Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 30(2), 241–252.
- Montenecourt BS, Eveleigh DE. (1977) Semi quantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microb.* 33(1):178-183.
- Morales H, Marín S, Ramos JA, Sanchis V. (2010) Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control* 21:953–962
- Morath SU, Hung R, Bennett JW. (2012) Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol Reviews*. 26: 73-83.
- Morita T, Ishibashi Y, Hirose N, Wada K, Takahashi M, Fukuoka T, Imura T, Sakai H, Abe M, Kitamoto D. (2011) Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75:1371–1376.
- Mortuza M, Ilag L. (1999) Potential for biocontrol of *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control*.15:235-240.
- Moubasher AH, Abdel-Sater MA, Soliman ZSM. (2018) Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycol*. 70(1): 1-32.
- Moussa K. (2006) Etude d'une Sebkhia : la Sebkhia d'Oran (Ouest algérien), thèse de Doctorat, Université d'Oran. 205p.
- Moussa K, Saint Martin JP (2011) Esquisse géologique de la grande sebkhia d'Oran. *Bulletin du Service Géologique National* Vol. 22, n° 3.

Moussa K, Boughalem M, Lachgueur M, Satour L. (2014) Contribution to the study of the vegetation of the Oran's Great Sabkha basin (west Algeria); Characterization and Cartography Scholarly Journal of Agricultural Science. 4(5) : 273-279

Moustafa AF, Al-Musallam AA. (1975) Contribution to the fungal flora of Kuwait. Trans. Brit. Mycol. Soc. 65: 547-553.

Munawar N, Engel PC. (2013) Halophilic Enzymes: Characteristics, Structural Adaptation and Potential Applications for Biocatalysis Current Biotechnology. 2 : 334-344

Musetti R, Polizzotto R, Vecchione A, Borselli S, Zulini L, D'Ambrosio M, Di Toppi L.S, Pertot I. (2007) Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: an ultrastructural study. Micron 38, 643–650.

Mwangi MW, Muiru WM, Narla RD, Kimenju JW, Kariuki GM. (2018). Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and root-knot nematode disease complex in tomato by use of antagonistic fungi, plant resistance and neem. Biocontrol Science and Technology, 1–10.

## **N**

Nachmias A, Kaufman Z, Livescu L, Tsrer L, Meiri A, Caligari PDS (1993) Effect of salinity and its interaction with disease incidence on potatoes grown in hot climates. Phytoparasitica 21, 245-255

Nazareth S, Gonsalves V, Nayak S. (2012) A first record of obligate halophilic aspergilli from the Dead Sea. Indian J. Microbiol. 52:22-27

Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Koljalg U. (2006) Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. PLoS One. 1:e59.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evol Bioinforma. 4:193–201.

## **O**

O'Donnell K, Cigelnik E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol. 7:103–16.

O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI. (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465–493.

O'Donnell K, Sutton DA., Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG., Brandt ME., Zhang N, Geiser DM. (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. Journal of Clinical Microbiology 46 : 2477–2490.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, et al. (2009a) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 46, 936–948.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM. (2009b). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 47, 3851–3861.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA et al. (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 : 3708-3718

O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJ, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VA, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM. (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet Biol*. 52:20-31

Oren A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 : 334–348.

Oren A. (2016) Life in High-Salinity Environments. *In* Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (ed), *Manual of Environmental Microbiology*, Fourth Edition. ASM Press, Washington, DC.

Oren A. (2006) Life at High Salt Concentrations 2006 *Prokaryotes*. 2:263–282

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63.

Oren A (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.* 1:2

Orr GF, Kuehn HH, Plunkett OA. (1963) The genus *Gymnoascus* Baranetzky. - *Mycopath. Mycol. appl.* 21: 1-18.

Overy DP, Frisvad JC, Steinmeier U, Thrane U. (2005) Clarification of the agents causing blue mould storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology*. 35:217-221.

## **P**

Pandin C, Le-Coq D, Canette A, Aymerich S, Briandet R. (2017) Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microb Biotechnol.* 10(4):719-734.

Park MS, Fong JJ, Oh SY, Kwon KK, Sohn J, Lim YW. (2014) Marine-derived *Penicillium* in Korea: Diversity, enzyme activity, and antifungal properties. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106(2):331-345.

Passarini MRZ, Rodrigues MVN, da Silva M, Sette LD. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2) : 364–370.

Patel S, Saraf M. (2015). Perspectives and Application of Halophilic Enzymes. *Halophiles*, 403–419.

Peng XP, Wang Y, Liu PP, Hong K, Chen H, Yin X, Zhu WM. (2011) Aromatic compounds from the halotolerant fungal strain of *Wallemia sebi* PXP-89 in a hypersaline medium. *Arch Pharm Res*. 34(6).

Peterson SW. (2004) Multilocus DNA sequence analysis shows that *Penicillium biourgeianum* is a distinct species closely related to *P. brevicompactum* and *P. olsonii*. *Mycological Research* 108 : 434–440.

Peterson SW. (2008) Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*. 100:205–226.

Pitt JI. (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London.

Plaza P, Usall J, Teixidó N, Viñas I. (2003) Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *J Appl Microbiol* 94:549–554

Plemenitas A, Vaupoti T, Lenassi M, Kogej T, Gunde-Cimerman N. (2008) Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: A molecular perspective at a glance, *Stud. Mycol.* 61 : 67–75.

Poveda J. (2020). *Trichoderma parareesei* Favors the Tolerance of Rapeseed (*Brassica napus* L.) to Salinity and Drought Due to a Chorismate Mutase. *Agronomy*, 10(1) : 118.

Prabakar K, Raguchander T, Saravanakumar D, Muthulakshmi P, Parthiban V, Prakasam V. (2008) Management of postharvest disease of mango anthracnose incited by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 41:333-339.

Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J. (2005) Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 5: 693–701.

Pryor B, Michailides T. (2002) Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*. 92:406–16.

## Q

Qiao M, Du X, Zhang Z, Xu JP, Yu ZF. (2018) Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. *MycKeys* 44: 63–80

Qin WT, Zhuang WY. (2016) Seven wood-inhabiting new species of the genus *Trichoderma* (Fungi, Ascomycota) in Viride clade. *Sci. Rep.* 6 : 27074

**R**

- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. 80 : 756–770
- Ramdial H, Latchoo R, Hosein F, Rampersad S. (2016) Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology*. 107(1): 109–120.
- Rasmussen SL, Stanghellini ME (1988) Effect of salinity stress on development of Pythium blight in *Agrostis palustris*. *Phytopathology* 78 : 1495-1497
- Rateb ME, Ebel R. (2011) Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.* 28 : 290–344.
- Raykov S, Tanova R. (2016) Influence of the medium salinity on the agent, causing the sugar beet root decay (*Rhizoctonia solani* kuhn). *International Journal of Current Agricultural Research*. 4 (1) : 202-204
- Reeb V, Lutzoni F, Roux C. (2004) Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:1036–1060
- Rinu K, Sati P, Pandey A. (2013) *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. *Journal of Basic Microbiology*. 54(5) : 408–417.
- Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. (1981) Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol.* 7(3):235–243
- Rossman AY. (2007) Report of the planning workshop for all fungi DNA barcoding. *Inoculum*. 58(6):1–5
- Rossman AY. (2014) Lessons learned from moving to one scientific name for fungi. *IMA Fungus*. 5(1) : 81–89.
- Rubio MB, Hermosa R, Vicente R, Gómez-Acosta FA, Morcuende R, Monte E, Bettiol W. (2017) The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. *Front. Plant Sci.* 8 : 294
- Russo G, Libkind D, Sampaio JP, van Broock MR. (2008) Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol. Ecol.* 65 : 415–424

S

- Salwan R, Rialch N, Sharma V. (2019) Bioactive Volatile Metabolites of Trichoderma: An overview. Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms. 87–111.
- Samraoui, B., F. Samraoui. (2008) An ornithological survey of Algerian wetlands: Important Bird Areas, Ramsar sites and threatened species. Wildfowl 58: 71–96.
- Samson RA, Mouchacca J. (1974) Some interesting species of Emericella and Aspergillus from Egyptian desert soil. Antonie Van Leeuwenhoek. 40(1):121–131
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. (2002) Introduction to Food and Airborne Fungi. 6th Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Samson RA, Frisvad JC. (2004) *Penicillium subgenus Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology, Utrecht.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. (2004) Introduction to Food and Airborne Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands (2004).
- Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, Varga J, Frisvad JC. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus Talaromyces and taxa accommodated in Penicillium subgenus Biverticillium. Studies in Mycology 70: 159–183.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong B., Hubka V, et al. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. 78: 141–173.
- Sanogo S (2004) Response of chile pepper to Phytophthora capsici in relation to soil salinity. Plant Disease 88 : 205-209
- Sanzani SM, Reverberi M, Geisen R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. Postharvest Biology and Technology, 122 : 95-105.
- Sarath G, De La Motte RS, Wagner FW. (1989) Protease assay methods. In: Beynon RJ, BondeJS, editors. Proteolytics Enzymes: A Pratical Approach. Oxford, UK: University Press. 1989.p. 25-54
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109:6241–6246
- Schroers HJ, O'Donnell K, Lamprecht SC, Kammeyer PL, Johnson S, Sutton DA., Rinaldi MG. (2009) Taxonomy and phylogeny of the Fusarium dimerum species group. Mycologia 101, 44–70.
- Schubert K, Groenewald J, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill C, Zalar P, de Hoog G, Crous P. (2007) Biodiversity in the Cladosporium herbarum complex (Davidiellaceae, Capnodiales),

- with standardization of methods for Cladosporium taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol.* 58:105–56.
- Scott PM. (2001) Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *J. AOAC Int.* 84, 1809–1817.
- Selosse MA, Durrieu G. (2004) Une classification mycologique phylogénétique francophone, *Acta Bot. Gallica*, 151(1) :73-102.
- Setati ME. (2010) Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant Eubacteria. *Afr.J. Biotechnol.* 9:1555-1560.
- Shaaban M, Shaaban KA, Abdel-Aziz MS. (2012) Seven naphtho- $\gamma$ -pyrones from the marinederived fungus *Alternaria alternata*: Structure elucidation and biological properties. *Org. Med. Chem. Lett.* 2 (6).
- Shang Z, Li XM, Meng L, Li CS, Gao SS, Huang CG, Wang BG. (2012) Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 30 : 305–314
- Sharma R, Singh D, Singh R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control.* 50:205-221.
- Shaw S, Le Cocq K, Paszkiewicz K, Moore K, Winsbury R, de Torres Zabala M, ... Grant MR. (2016). Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology*, 17(9) : 1425–1441.
- Shoemaker RA. (1959). Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. *Canadian Journal of Botany* 37: 879–887.
- Sigler L, Gibas C, Kokotovic B, Bertelsen MF. (2010) Disseminated mycosis in veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) caused by *Chamaeleomyces granulomatis*, a new fungus related to *Paecilomyces viridis*. *J Clin Microbiol* 48: 3182–3192.
- Simonneau P. (1954) la végétation des sols salés d'Oranie. *Ann agronomique, service des études appliquées à l'hydriques.* Alger, 91-117.
- Sipiczki M. (2006) *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl Environ Microbiol.* 72:6716-6724.
- Siqueira JPZ, Wiederhold N, Gené J, García D, Almeida MTG, Guarro J. (2018) Cryptic *Aspergillus* from clinical samples in the USA and description of a new species in section *Flavipedes*. *Mycoses*;61(11):814-825
- Sivanesan A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158: 1–261.

- Skouboe P, Frisvad J, Taylor J, Lauritsen D, Boysen M, Rossen L. (1999) Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol Res.* 103:873–81
- Snapp SS, Sherman C, van Bruggen AHC (1991) Effects of salinity on severity of infection by *Phytophthora parasitica* Dast., ion concentrations and growth of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytologist* 119 : 275-284
- Sohail M, Ahmad A, Khan SA. (2016) Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. *3 Biotech.* 6 : 103.
- Solé M, Cano J, Pitarch LB, Stchigel AM, Guarro J. (2002) Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera. *Stud Mycol* 47:141–152.
- Soletanche (1950). Grande sebkha d'Oran : géologie et hydrogéologie. *Entreprise de Fondation et Travaux Hydrauliques*, Paris et Alger (document interne). In Moussa K. (2006) Etude d'une Sebkha : la Sebkha d'Oran (Ouest algérien), thèse de Doctorat, Université d'Oran. 205p.
- SOURISSEAU B. (1976).- Etude hydrogéologique du massif du Murdjadjo, région de Brédéah-Bou Sfer , *I.N.R.H (ex : A.N.R.H)*. Oran. In Moussa K. (2006) Etude d'une Sebkha : la Sebkha d'Oran (Ouest algérien), thèse de Doctorat, Université d'Oran. 205p.
- Sondergaard TE, Fredborg M, Christensen AO, Damsgaard SK, Kramer NF, Giese H, Sørensen JL. (2016) Fast Screening of Antibacterial Compounds from *Fusaria*. *Toxins.* 8 : 355.
- Soni SK, Soni R. (2010) Regulation of cellulase synthesis in *Chaetomium erraticum*. *Bioresources* 5(1):81–98.
- Sørensen JL, Akk E, Thrane U, Giese H, Sondergaard TS. (2013) Production of fusarielins by *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 160 : 206–211.
- Steiman R, Guiraud P, Sage L, Seigle-Murandi F, Lafond JL. (1995) Mycoflora of soil around the Dead Sea. I – Ascomycetes (including *Aspergillus* and *Penicillium*), Basidiomycetes, Zygomycetes. *System. Appl. Microbiol.* 18: 310-317.
- Sterflinger K, de Hoog GS, Haase G. (1999) Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Stud Mycol* 43:5–22
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, et al. (2015) One fungus, which genes? Development and Assessment of Universal Primers for Potential Secondary Fungal DNA Barcodes. *Persoonia.* 35: 242–263
- Stigter D, Alonso DOV, Dill KA. (1991) Protein stability: Electrostatics and compact denatured states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 4176–4180.
- Su DQ, Ding LJ, He S. (2018) Marine-derived *Trichoderma* species as a promising source of bioactive secondary metabolites. *Mini-Rev. Med. Chem.* 18, 1702–1713.

Sugar D. (1986) Effects of flotation salt solutions on spore germination of four decay fungi and on side rot of pear. *Plant Dis.* 70:1110

Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, et al. (2011) Acremonium phylogenetic overview and revision of Gliomastix, Trichothecium and Sarocladium. *Studies in Mycology* 68: 139–162.

Sun BD, Zhou YG, Chen AJ. (2017) *Bisifusarium tonghuanum* (Nectriaceae), a novel species of *Fusarium*-like fungi from two desert oasis plants. *Phytotaxa.* 317 (2): 123–129

Suzuki T, Shinogi T, Narusaka Y. (2003) Infection behavior of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype and localization of 1,3-D-glucan in compatible and incompatible interactions between the pathogen and host plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 69, 91–100.

## T

Tan YP, Madrid H, Crous PW, et al. (2014). *Johnalcornia* gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology.*

Tayung K, Barik BP, Jha DK, Deka DC. (2011) Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere* 2(3) : 203–213.

Tchoukoua A, Hasegawa R, Hendrapipta KA, Sato S, Koseki , Shiono Y. (2017) Structure elucidation of new fusarielins from *Fusarium* sp. and their antimicrobial activity. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 56(1) : 32–36.

Tekpinar AD, Kalmer A. (2019) Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia.* 109(1) : 187–224.

Thomas DN, Dieckmann GS. (2002) Antarctic Sea ice—A habitat for extremophiles. *Science.* 295 : 641–644.

Toor Y, Ilyas U. (2014) Optimization of cellulase production by *Aspergillus ornatus* by the solid state fermentation of *Cicer arietinum*. *American Journal of Research.* 2 : 125-141.

Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez-Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. (2017) *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLoS ONE.* 12(1): e0170782.

Trabelsi R, Gdoura R, Triki MA. (2018) *Fusarium Brachygibbosum* and *Fusarium Chlamydosporum* Causing Wilt and Die-back of Olive in Tunisia. *Advances in Science, Technology Innovation.* 581–582.

Triana-Alonso FJ, Chakraborty K, Nierhaus KH. (1995) The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J. Biol. Chem.* 270(35): 20473–20478.

Triky-Dotan S, Yermiyahu U, Katan J, Gamliel A. (2005). Development of Crown and Root Rot Disease of Tomato Under Irrigation with Saline Water. *Phytopathology*, 95(12), 1438–1444.

Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández ME (2014) *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In: Postharvest decay. 147–187

Turk M, Plemenitas A. (2002) The HOG pathway in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: isolation of the HOG1 homolog. *FEMS Microbiol Lett.* 5;216(2):193-9.

## U

Uchoa PKS, Pimenta ATA, Braz-Filho R, de Oliveira M, Saraiva NN, Rodrigues BSF, Pfenning LH, Abreu LM, Wilke DV, Katharine G. D. Florêncio KGD, Lima MAS. (2017) New cytotoxic furan from the marine sediment-derived fungi *Aspergillus niger*. *Nat. Prod. Res.* 31 : 2599–2603.

Usall J, Ippolito A, Sisquella M, Neri F. (2016) Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol Technol* 122:30–40

## V

Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, Masuelli RW, Overy DP, Piccolo RJ. (2006) First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology*. 55: 583.

Valenzuela N, Angel D, Ortiz D, Rosas R, García C, Santos M. (2015) Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*. 91:88-93.

van der Wielen PWJJ, Bolhuis H, Borin S, Daffonchio D, Corselli C, Giuliano L, D’Auria G, de Lange GJ, Huebner A, Varnavas SP, Thomson J, Tamburini C. (2005) The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*. 307 : 121–123.

Varga J, Houbraken J, Van Der Lee HAL, Verweij PE, Samson RA. (2008). *Aspergillus calidoustus* sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryotic Cell*, 7(4) : 630–638.

Vaupotic̃ T, Plemenitas̃ A. (2007) Differential gene expression and Hog1 interaction with osmoresponsive genes in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *BMC Genomics*. 8: 1–34.

Vero S, Garmendia G, González MB, Garat MF, Wisniewski M. (2009) *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Sci Technol*. 19(10):1033-1049.

Vilgalys R, Hester M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*. 172: 4239-4246

Vincent MA, Pitt JI. (1989) *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia*. 1989; 81:300-303.

Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78: 343–371.

Visagie CM, Renaud JB, Burgess KMN, Malloch DW, Clark D, LKetch L, Urb M, Louis-Seize G, Assabgui R, Sumarah MW, Seifert KA. (2016) Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia*. 36: 247–280.

Vitoratos A, Bilalis D, Karkanis A, Efthimiadou A. (2013) Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41 : 86-92

## **W**

Wang L, Zhuang WY. (2007) Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. – *Biosystems* 88: 113–126.

Wang Y, Bao Y, Shen D, Feng W, Yu T, Zhang J, Zheng XD. (2008) Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology* 123 (2008) 234–239

Wang Y, Zheng J, Liu P, Wang W, Zhu W. (2011a) Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Mar. Drugs*. 9 : 1368–1378.

Wang FZ, Wei HJ, Zhu TJ, Li DH, Lin ZJ, Gu QQ. (2011b) Three new cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* KLA03 by supplementing the cultures with L- and D-tryptophan. *Chem. Biodivers*. 8 : 887–894.

Wang XW, Houbraken J, Groenewald JZ, Meijer M, Andersen B, Nielsen KF, Crous PW, Samson RA. (2016a) Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*. 84 : 145–224.

Wang XW, Lombard L, Groenewald JZ, Videira SIR, Samson RA, Liu XZ, Crous PW. (2016b). Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia*. 36: 83–133.

Wang H, Dai H, Heering C, Janiak C, Lin W, Orfali RS, Muller WEG, Liu Z, Proksch P. (2016c). Targeted solid phase fermentation of the soil dwelling fungus *Gymnascella dankaliensis* yields new brominated tyrosine-derived alkaloids. *RSC Advances*. 6(85), 81685–81693.

Wang XC, Chen K, Zeng ZQ, Zhuang WY. (2017) Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. *Scientific Reports*. 7(1).

Wang XW, Yang FY, Meijer M, Kraak B, Sun BD, Jiang YL, Wu YM, Bai FY, Seifert KA, Crous PW, Samson RA, Houbraken J. (2019) Redefining *Humicola* sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae. *Studies in Mycology*. 93 : 65-153

Wanmolee W, Sornlake W, Rattanaphan N, Suwannarangsee S, Laosiripojana N, Champreda V. (2016) Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. *BMC Biotechnology*, 16 : 82.

Watanabe Y, Iwaki T, Shimono Y, Ichimiya A, Nagaoka Y & Tamai Y. (1999) Characterization of the Na<sup>+</sup>-ATPase gene (ZENA1) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng*. 88: 136–142.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New-York: Academic Press; 1990. p. 315-322.

Whittaker RH. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science New York*. 163:150-1

Williams WD. (1998) Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. *Hydrobiologia*. 381: 191-201.

Wu B, Hussain M, Zhang W, Stadler M, Liu X, Xiang M. (2019) Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 1–14.

## **X**

Xu L, Meng W, Cao C, Wang J, Shan W, Wang Q. (2015) Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. *Marine Drugs*. 13(6), 3479–3513

## **Y**

Yamashita M, Kawai Y, Uchida I, Komori T, Kohsaka M, Imanaka H, Sakane K, Setoi H, Teraji T. (1984) Chryscandin, a novel peptidyl nucleoside antibiotic. II. Structure determination and synthesis. *J Antibiot*. 37(11): 1284–1293.

Yang Z, Rannala B. (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Genetics*. 13: 303–313.

Yang SW, Buevich A, Chan TM, Terracciano J, Chen G, Loebenberg D, Patel M, Boehm E, Gullo V, Pramanik B, Chu M. (2003) A new antifungal sterol sulfate, Sch 601324, from *Chrysosporium* sp. *J Antibiot*. 56(4): 419–22.

## **Z**

Zajc J, Zalar P, Plemenitas A, Gunde-Cimerman N. (2012) The Mycobiota of the Salterns. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 133–158.

Zajc J, Kogej T, Galinski EA, Ramos J, Gunde-Cimerman N. (2013a) The osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl, *Appl. Environ. Microbiol*. 80 : 247–256.

- Zajc J, Liu YF, Dai WK, Yang ZY, Hu JZ, Gostincar C., Gunde-Cimerman N. (2013b) Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*. 14:617.
- Zajc J, Gunde-Cimerman N. (2018) The Genus *Wallemia*—From Contamination of Food to Health Threat. *Microorganisms*. 6 (46) ; 1 – 10
- Zajc J, Gostincar C, Cernoša A, Gunde-Cimerman N. (2019) Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. *Genes*. 10 : 42.
- Zajc J, Cernosa A, Francesco AJ, Castoria R, Curtis FD, Lima G, et al. (2020) Characterization of *Aureobasidium pullulans* Isolates Selected as Biocontrol Agents Against Fruit Decay Pathogens. *Fungal Genom Biol*. 10:163.
- Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. (1999a) Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud Mycol*. 43:38–48
- Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. (1999b) Taxonomy of the endoconidial black yeast genera *Phaeotheca* and *Hyphospora*. *Stud Mycol*. 43:49–56
- Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. (1999c) *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud Mycol*. 43:57–62
- Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, Varga J, Samson RA. (2008) Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia*. 100(5):779–795
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. (2007) Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol*. 58:157–183
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Frank JM, Gunde-Cimerman N. (2005) Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. Et ord. nov.), *Antonie van Leeuwenhoek*, 87 : 311–328.
- Zare R, Gams W, Starink-Willemse M, Summerbell RC. (2007) *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463–489
- Zare R, Gams W. (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73(1):1-50
- Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK. (2016) Secondary metabolism in *Trichoderma*. *Chemistry meets genomics. fungal biology reviews* 30 : 74-90
- Zeng ZQ, Zhuang WY. (2019) Two New Species and a New Chinese Record of Hypocreaceae as Evidenced by Morphological and Molecular Data. *Mycobiology*. 47:3, 280-291,
- Zheng J, Wang Y, Wang J, Liu P, Li J, Zhu W. (2013) Antimicrobial ergosteroids and pyrrole derivatives from halotolerant *Aspergillus flocculosus* PT05-1 cultured in a hypersaline medium. *Extremophiles*. 17 : 963–971.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. (2006) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 : 2186–2190.

Zhang Y, Wu W, Cai L. (2017) Polyphasic characterisation of *Chaetomium* species from soil and compost revealed high number of undescribed species. *Fungal Biology*. 121(1) : 21–43.

Zhou N, Zhang Y, Liu F, Cai L. (2016) Halophilic and thermotolerant *Gymnoascus* species from several special environments, China. *Mycologia*. 108(1):179-191.

Zhu L, Song J, Zhou J, Si J, Cui B. (2019) Species diversity, phylogeny, divergence time and biogeography of the genus *Sanghuangporus* (Basidiomycota). *Front. Microbiol.* 10:812.

# ***Annexes***

## Annexe 1 : Composition des milieux de culture, colorants et tampons

### Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rapilly, 1968)

Pomme de terre.....200g.  
 Glucose.....20g.  
 Agar..... 20g.  
 Eau distillée qsp.....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### Milieu utilisé pour la production d'amylase (Hankin et Anagnostakis, 1975)

Extrait de levure.....3g  
 Peptone.....5g  
 Amidon.....2g  
 Agar.....15 g  
 Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. pH 6

### Milieu utilisé pour la production de cellulase (Abe et *al.*, 2015)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....7g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....2g  
 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.1g  
 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....1g  
 Extrait de levure.....0.6g  
 Microcrystalline cellulose.....10g  
 Agar.....15g  
 Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. pH 5.5

### Milieu utilisé pour la production de protéase (Sarath et *al.*, 1989).

Lait écrémé.....300ml  
 Agar.....20g  
 Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### Milieu utilisé pour la production de lipase ( Hankin et Anagnostakis, 1975)

Peptone.....10g  
 NaCl.....5g  
 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0.1g  
 Agar.....17g  
 Tween 20.....10 mL  
 Eau distillée (qsp).....1000 ml.

Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes. pH 6. Le tween 20 est stérilisé séparément et ajoutés au milieu stérile.

**La solution d'iode :**

KI.....2g  
Iode.....1g  
Eau distillée.....300ml

**Tampon TAE 1 X**

40mM de Tris  
20mM d'acide acétique  
1 mM d'EDTA  
pH 8,4

**Tampon de charge**

0,03% de bleu de bromophénol  
0,03% de xylène cyanol  
60 mM EDTA  
60% de glycérol  
pH 7,6

**Annexe 2 : Composition des solutions réactionnelles d'amplification et les cycles de PCR****Les solutions réactionnelles d'amplification (25ul)**

	ITS	TUB	EF1	ACT	RPB1	RPB2	LSU	SSU	CAM
Eau	15.975	15.875	14.45	15	15.875	15.875	15.375	11.375	15.975
Tampon (5X)	5	5	6	5	5	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	1.5	1.8	2	1.5	1.5	2	2	2
Primer 1	0.2	0.5	3	0.625	0.5	0.5	0.5	2.5	0.2
Primer 2	0.2	0.5	3	0.625	0.5	0.5	0.5	2.5	0.2
dNTP (10mM)	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq (5U/ul)	0.125	0.125	0.15	0.25	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
ADN	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Conditions d'amplification**

Gène	Dénaturation initiale	cycles	dénaturation	hybridation	élongation	Elongation final	Période de repos
ITS	95°C, 5min	29	95°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 10min	10°C
TUB	94°C, 5min	35	94°C ; 1min	61°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 5min	10°C
EF1	95°C, 5min	29	95°C, 1min	62°C, 90s	72°C, 1min	72°C, 5min	10°C
ACT	95°C, 8min	35	95°C, 15s	55°C, 20s	72°C, 60s	72°C, 5min	10°C
RPB1	95°C, 3min	40	95°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 1min	72°C, 5min	10°C
RPB2	94°C, 5min	5	94°C, 45s	50°C, 45s	72°C, 60s		10°C
		5	94°C, 45s	52°C, 45s	72°C, 60s		
		30	94°C, 45s	55°C, 45s	72°C, 60s	72°C, 7min	10°C
LSU	95°C, 2min	36	95°C, 1min	52°C, 90s	72°C, 2min	72°C, 10min	10°C
SSU	94°C, 4min	30	94°C, 30s	52°C, 90s	72°C, 90s	72°C, 10min	10°C
CaM	94°C, 5min	35	94°C, 45s	55°C, 45s	72°C, 60s	72°C, 7min	10°C

## Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhia of Oran in Northwestern of Algeria

Rajaa Chamekh<sup>a</sup>, Franck Deniel<sup>b</sup>, Christelle Donot<sup>b</sup>, Jean-Luc Jany<sup>b</sup>, Patrice Nodet<sup>b</sup> and Lakhder Belabid<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Science of Nature and Life, Laboratory Research on Biological Systems and Geomatics, Mascara University, Mascara, Algeria; <sup>b</sup>Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, EA3882, Université de Brest, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France

### ABSTRACT

The Great Sebkhia of Oran is a closed depression located in northwestern of Algeria. Despite the ranking of this sebkhia among the wetlands of global importance by Ramsar Convention in 2002, no studies on the fungal community in this area have been carried out. In our study, samples were collected from two different regions. The first region is characterized by halophilic vegetation and cereal crops and the second by a total absence of vegetation. The isolated strains were identified morphologically then by molecular analysis. The biotechnological interest of the strains was evaluated by testing their ability to grow at different concentration of NaCl and to produce extracellular enzymes (i.e., lipase, amylase, protease, and cellulase) on solid medium. The results showed that the soil of sebkhia is alkaline, with the exception of the soil of cereal crops that is neutral, and extremely saline. In this work, the species *Gymnoascus halophilus*, *Trichoderma gamsii*, the two phytopathogenic fungi, *Fusarium brachygibbosum* and *Penicillium allii*, and the teleomorphic form of *P. longicatentum* observed for the first time in this species, were isolated for the first time in Algeria. The halotolerance test revealed that the majority of the isolated are halotolerant. *Wallemia sp.* and two strains of *G. halophilus* are the only obligate halophilic strains. All strains are capable to secrete at least one of the four tested enzymes. The most interesting species presenting the highest enzymatic index were *Aspergillus sp.* strain A4, *Chaetomium sp.* strain H1, *P. vinaceum*, *G. halophilus*, *Wallemia sp.* and *Ustilago cynodontis*.

### ARTICLE HISTORY

Received 27 March 2019  
Revised 17 May 2019  
Accepted 20 May 2019

### KEYWORDS

Fungal diversity; enzyme; salt tolerance; Sebkhia; soil fungi

### 1. Introduction

Sebkhia is an Arabic word referring to a closed depression temporarily occupied by a salt lake. It is characterized by an abundance of soluble salts concentrated on the surface that prevents any vegetation [1]. Halophilic vegetation appears in less salty soils that surround the sebkhia. In Algeria, several sebkhia or salt lakes stretch from the Algerian north coast to the Sahara. The Great Sebkhia of Oran is the largest sebkhia in northwestern of Algeria with an area of 1890 km<sup>2</sup>. It is temporarily occupied by a salt lake of 300 km<sup>2</sup> whose salt concentration is estimated at more than 100 g.L<sup>-1</sup> of dissolved salts [2].

A specific fauna and flora characterize saline ecosystems. Beside this population, several studies have shown that other organisms such as eubacteria, archaea, algae, and fungi can grow under salt stress and populate saline ecosystems [3,4]. Various research have been carried out on the fungal diversity of the saline environments in the world in particular the solar salterns [5–8], Dead Sea [9–13],

arid desert [14,15], and some sebkhia [16,17]. In general, fungal communities in hypersaline environments are dominated by *Aspergillus*, *Penicillium* and some of their related teleomorphic genera (formerly *Eurotium*, *Emericella*, and *Eupenicillium*). Other genera such as *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Wallemia*, and *Hortaea* were also reported [18–20]. Some new species were also described from hypersaline environments including three species of the genus *Wallemia* [21], twelve species of the genus *Cladosporium* [22,23], two species of the genus *Emericella* [24] and three species of the genus *Gymnoascus* [25].

The main reasons for studying extremophiles including halophilic microorganisms are to understand their mechanisms involved in stress adaptation and for the biotechnological application of their metabolites capable of activity under extreme conditions. Low water activity and high salt concentration of hypersaline environments make these habitats an important source of halophilic microorganisms that

can provide enzymes of industrial interest [26]. Several researches on halophilic hydrolases such as amylases, cellulases, lipases and proteases have been reported from halophilic bacteria and fungi [27,28] including few investigations on enzymes from obligate halophilic fungi [29]. In addition, the increasing need for bioremediation of hypersaline environments and for biocontrol agents that can be used in agriculture irrigated by saline water stimulate the search for these halophilic organisms [30,31].

Although the Great Sebkhha of Oran is considered an extreme environment due to its high salt content, no studies on its fungal community have been published. In this present work, we report the first study on fungal diversity of the Great Sebkhha of Oran by isolating halotolerant and halophilic fungi from the saline soil in two zones of the Great Sebkhha. No isolation was done at the lake level because of the difficulty of access to the center of the sebkha. Fungal isolates were identified by morphological and microscopical observations and by the use of molecular techniques. In order to select strains of biotechnological interest, the salt tolerance of isolates and their ability to produce hydrolytic enzymes were evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling site and isolation

Samples were collected from the soil of the Great Sebkhha of Oran located in northwestern of Algeria at 12 km from the Mediterranean Sea (Figure 1). Sampling was carried out in an area of 5 km<sup>2</sup> between Boutlelis and Al Amria in 9 sites divided in two zones: zone1 (Figure 1: sites B, C, D, R, G, S) is characterized by halophilic vegetation and cereal crops and zone2 (Figure 1: sites A, E, H) is characterized by a total absence of vegetation.

Soil samples were collected after removing the surface layer of the soil at a depth of 5 to 15 cm, placed in a sterile bottle and transported to the laboratory where fungi were isolated.

Fungal isolations were made by using the dilution plate method on potato dextrose agar medium (PDA) prepared with different concentrations of NaCl (5%, 10% and 15%). Plates were then incubated at 25 °C for a month.

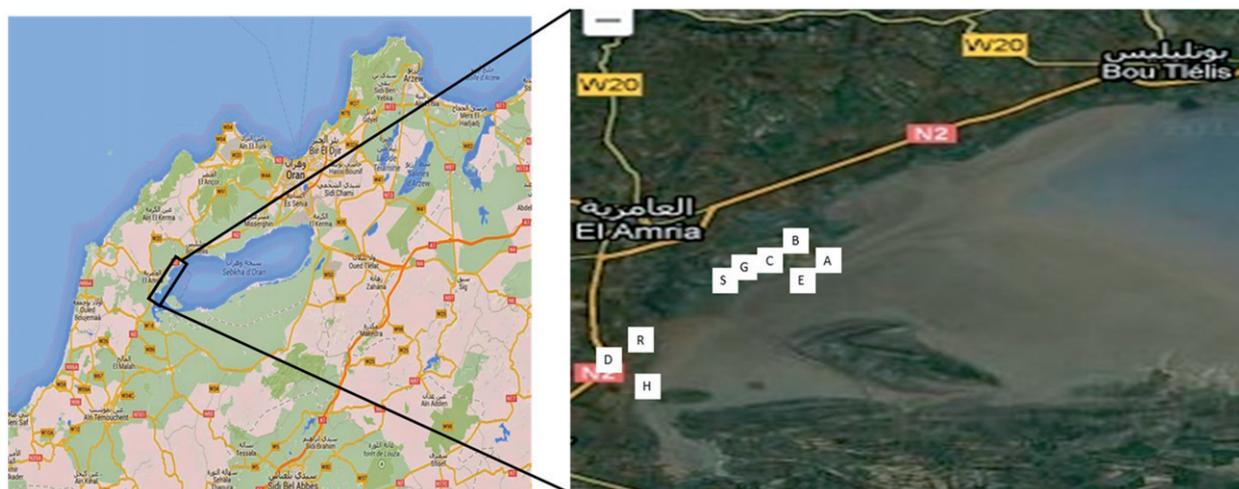
After one month, small agar plugs containing fungal mycelium, identified as different species by macroscopic and microscopic observations, were transferred to different fresh PDA plate (containing the same salt concentration than the isolation plate) then incubated in the dark at 25 °C for 3–4 weeks to assess the purity of each obtained isolate.

### 2.2. Physicochemical analysis of soil

Soil suspensions were prepared for physicochemical analysis by mixing 10 g of the soil in 50 ml of distilled water. Electrical conductivity, salinity, and pH of soil suspensions were determined using a conductivity meter and a pH meter.

### 2.3. Morphological identification of fungal isolates

The morphological identification of the isolates was based on a macroscopic observation of the cultural characteristics and a microscopic study of the morphological characters of the mycelium and of sexual and asexual reproductive organs. The identification keys of Pitt [32], Barnett and Hunter [33], Samson et al. [34] and Samson and Frisvad [35] were used to classify isolates in different genera.



**Figure 1.** Map of the Great Sebkhha of Oran. Letters indicate sites of sampling. (Image ©2018 DigitalGlobe, CNES/Airbus, DigitalGlobe, Données cartographiques ©2018 Google.)

## 2.4. DNA extraction and molecular identification of isolates

30-days-old fungal mycelium was scraped from the surface of a PDA plate using a sterile scalpel and transferred into a sterile 2 mL tube. Genomic DNA was then extracted using the FastDNA<sup>®</sup> SPIN kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) following the manufacturer's instructions with an initial homogenization step using the Retsch MM400 instrument (Retsch GmbH, Haan, Germany) at 30 Hz for 30 sec, for two times. The DNA was re-suspended in 100  $\mu$ L of sterile nuclease-free water, quantified and checked in quality using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After extraction, all DNA extracts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

In order to establish the species designation, different DNA regions were amplified according to the fungal genera. The  $1\alpha$  translation elongation factor gene (TEF- $1\alpha$ ) was amplified for strains belonging to the genus *Fusarium* and *Curvularia* using primers EF1F/EF1R [36],  $\beta$ -tubulin for strains of *Aspergillus*, *Penicillium*, and their teleomorphic forms using primers Bt2a/Bt2b [37], actine for the genus *Cladosporium* using primers ACT-512F/ACT-783R [38]. The ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA was amplified for the rest of genera using primers ITS4 and ITS5 [39]. Amplification reactions were performed in 25  $\mu$ L volume using 0.025 U/ $\mu$ L of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI) and 1  $\times$  GoTaq Flexi buffer (Promega), 25–50 ng of template DNA, 0.08  $\mu$ M of each primer, 2 mM of  $\text{MgCl}_2$  and 0.2 mM of 10 mM dNTP mix (Promega). Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1  $\times$  TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) with 1% (w/v) agarose gel (LE, analytical grade agarose; Promega) prepared using 1  $\times$  TAE buffer and detected by UV fluorescence after GelRed<sup>™</sup> (Biotium Inc., Fremont, CA) staining, according to manufacturer's instructions. The BenchTop 100-bp DNA ladder (Promega) was used as molecular size marker. PCR products were sent to Eurofins MWG (Ebersberg, Germany) for purification and sequencing in forward and reverse, using the same primers used for PCR. The sequence obtained from each isolate was further analyzed by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) at the National Center of Biotechnology Information (NCBI) website.

DNA extraction, amplification and sequencing were realized during two stays at Laboratory of Biodiversity and Microbial Ecology (LUBEM) Brest, UBO, France.

## 2.5. Halotolerance test

The halotolerance test was studied on PDA medium prepared with different concentrations of NaCl (from 0% to 20% with an interval of 2.5). Strains

were inoculated at the center of the Petri dishes containing 15 ml of culture medium and incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 days. The measurement of the radial growth of each thallus was carried out every 48 h.

## 2.6. Extracellular enzymes production

Enzymes production was evaluated on solid medium. In order to visualize the enzymatic activity a specific substrate of each enzyme was added to the culture medium as a carbon source. After inoculation and incubation of cultures for 2–5 days depending on the growth rate of the strains, the appearance of a clear halo or precipitation around the thallus indicates enzyme production.

Amylase activity was evaluated on nutrient agar medium supplemented with  $2\text{ g.L}^{-1}$  of soluble starch. After incubation, the cultures were flooded with a solution of iodine. The appearance of a clear zone around the thallus reveals the presence of amylase [40].

Cellulase activity was tested on medium supplemented with 1% cellulose ( $7.0\text{ g.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2.0\text{ g.L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.1\text{ g.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0\text{ g.L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0.6\text{ g.L}^{-1}$  yeast extract,  $10\text{ g.L}^{-1}$  microcrystalline cellulose and  $15\text{ g.L}^{-1}$  agar) [41]. At the end of the incubation period, the cultures were incubated at  $50^{\circ}\text{C}$  for 16 h to accelerate the action of the enzyme [42]. The cultures were then flooded with 5 ml of iodine and rinsed with distilled water to visualize the hydrolysis zone [43].

Protease activity was detected on milk agar medium containing 30% skim milk and 2% agar. After incubation, the degradation of casein was reflected by a clear zone around the thallus [44].

Lipase activity was determined on culture medium containing tween 80 as a lipid substrate ( $10\text{ g.L}^{-1}$  peptone,  $5\text{ g.L}^{-1}$  NaCl,  $0.1\text{ g.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $17\text{ g.L}^{-1}$  agar and  $10\text{ mL.L}^{-1}$  Tween 80). Tween 80 was sterilized separately then added to the sterile medium. After incubation, the cultures were put at  $4^{\circ}\text{C}$  for 12 h to better visualize the appearance of an opaque precipitation around the thallus [40].

For each enzyme, the activity was evaluated by an enzymatic index (EI) where  $\text{EI} = R/r$  (R being the diameter of the halo and r the diameter of the thallus). Strains with an EI equal to or greater than 2 are considered as good producers of the studied enzyme [40].

## 3. Results

### 3.1. Physicochemical properties of soil samples

The results of the physicochemical analyses presented in Table 1 show that the soil of the zone1 (dominated by halophilic vegetation) and the soil of

**Table 1.** Physicochemical analyses of soil samples.

Site sampling		Strain code	Date of sampling	pH	Electrical conductivity ms.cm <sup>-1</sup>	Salinity g.L <sup>-1</sup>
Zone1	Halophilic plants	B, C, D, R	December 2012	8.0	57.5	37
	Cereal crops	G, S	January 2015	7.2	6	3.8
Zone2	Total absence of vegetation	A, E	December 2012	7.7	43	28
		H	July 2015	8.2	71.5	46

the zone2 (characterized by a total absence of vegetation) are alkaline and have a high salinity rate. Nevertheless, it should be noted that in the sites G & S (zone1) characterized by the presence of cereal crops, the soil is neutral and less saline. According to the scale of Durand [45], all these soils are classified as extremely saline ( $EC > 4 \text{ ms.cm}^{-1}$ ).

### 3.2. Strains identification

A total of 136 isolates were isolated from both zones. One hundred and twenty three isolates were identified to the genera level by macroscopic and microscopic observation of cultures while 13 isolates were not identified (sterile mycelia). Fifty isolates representing the different morphologically identified genera as well as the 13 unidentified isolates were selected for molecular identification.

For the majority of the 50 assayed strains, the obtained sequences showed high similarity ( $\geq 97\%$ ) with fungal species sequences deposited in GenBank database (Table 2); 33 strains have been affiliated to 29 species belonging to 14 genera of Ascomycota division and one species of Basidiomycota division, the other 17 strains were identified only at the genus level. Among those 17 unidentified strains, 6 belonging to the genera *Penicillium* (R32, R33), *Trichoderma* (G15), *Alternaria* (G5), *Chaetomium* (H1) and *Wallemia* (H15) showing high similarity ( $\geq 97\%$ ) with sequences of more than one species. The sequenced gene used to identify these 6 strains does not allow distinction between species. Therefore, other genes need to be studied to have a more precise identification of those species. Four others strains belonging to the genera *Chrysosporium* (H18), *Tritirachium* (B2), *Lecanicillium* (R29) and *Pleospora* (H43) showing a high similarity (100%) with unidentified species of these genera. The last 7 unidentified strains belonging to the genera *Aspergillus* (A4, E2, E7), *Arachnomyces* (H10), *Fusarium* (R1) and *Chaetomium* (H38, H42) but presented only low similarity with sequences of fungal species available in GenBank database. These strains could represent new species but more molecular and phylogenetic studies will be necessary to confirm their correct taxonomic position.

#### 3.2.1. Strains isolated from zone1

A total of 83 isolates belonging to 17 genera and 26 identified species and 8 unidentified species were

isolated from the soil of sebkha where halophilic plants and cereal crops dominate (Table 3). The most dominant genus was *Fusarium* (32.5%) represented by 5 species: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. brachygibbosum*, *F. acuminatum* and one unidentified species belonging to dimerum clade (*Fusarium sp* strain R1). The species *F. equiseti* was the most frequently isolated representing 18% of all isolates and 55.5% of *Fusarium* isolates. The genera *Penicillium* and *Aspergillus* were isolated with a frequency of 26.50% and 13.25% respectively. Their teleomorphic form were represented by at least four species: *A. amstelodami*, *P. egyptiacum*, which were the dominant species, *P. longicatenatum* and two unidentified species *Penicillium sp.* strain R32 showing high similarity with *P. egyptiacum* or *P. sinaicum*, and *Penicillium sp.* strain R33 showing high similarity with *P. egyptiacum* or *P. molle* that were isolated with low frequency.

Two strains of *Trichoderma*, *T. gamsii* and *Trichoderma sp.*, were isolated from the soil of cereal crops. These two species and the rest of the strains belonging to the orders of Hypocreales, Pleosporales, Microascales, and Capnodiales were the least frequently isolated in this area.

#### 3.2.2. Strains isolated from zone2

A total of 53 isolates belonging to 14 genera and 13 identified species and 8 unidentified species were isolated from the soil of sebkha characterized by a total absence of vegetation (Table 3). Unlike zone1, where the genus *Fusarium* was the most frequently isolated, this genus and all the genera of the order of Hypocreales isolated from zone1 were not isolated from zone2 with the exception of the species *Sarocladium strictum* which has been isolated from both zones. The most frequently isolated species were *A. amstelodami*, *P. egyptiacum*, *Alternaria sp.* and *Gymnascella denkaliensis*. The species isolated with lower frequency belonged to the genera *Penicillium*: *P. flavigenum*, *P. griseofulvum* and *P. alii*, *Aspergillus*: *A. subramanianii*, *A. calidouustus*, and three strains of an unidentified species *Aspergillus sp.* strain A4, E2, and E7 having 95% to 96% similarity with the species *A. microneisensis*. Unidentified species of *Chaetomiaceae* represented by three strains H1, H38 and H42 were also isolated, the strain H1 has a high similarity with the two species *C. murorum* and *C. piluliferum*, and, in

**Table 2.** List of fungal isolates obtained from the sebka and their closest match with the NCBI GenBank database.

Strains code	Locus	Closest match in GenBank	Max ident / Query coverage	Accession number
A1	β tubulin	<i>Aspergillus subramanianii</i>	99/98	MK361155
A2	β tubulin	<i>Aspergillus subramanianii</i>	99/97	MK361156
S11	β tubulin	<i>Aspergillus terreus</i>	100/100	MK361157
S15	β tubulin	<i>Aspergillus calidoustus</i>	99/100	MK361158
S20	β tubulin	<i>Aspergillus europaeus</i>	99/100	MK361159
<b>A4</b>	<b>β tubulin</b>	<b><i>Aspergillus micronesiensis</i></b>	<b>95/97</b>	<b>MK361160</b>
<b>E2</b>	<b>β tubulin</b>	<b><i>Aspergillus micronesiensis</i></b>	<b>96/98</b>	<b>MK361161</b>
<b>E7</b>	<b>β tubulin</b>	<b><i>Aspergillus micronesiensis</i></b>	<b>95/98</b>	<b>MK361162</b>
H12	β tubulin	<i>Aspergillus amstelodami</i>	97/100	MK361163
S16	β tubulin	<i>Penicillium flavigenum</i>	99/100	MK361164
S17	β tubulin	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100/99	MK361165
S18	β tubulin	<i>Penicillium canescens</i>	98/98	MK361166
S19	β tubulin	<i>Penicillium mariae-crucis</i>	100/93	MK361167
H22	β tubulin	<i>Penicillium allii</i>	100/100	MK361168
R7	β tubulin	<i>Penicillium vinaceum</i>	99/100	MK361169
E9	β tubulin	<i>Penicillium egyptiacum</i>	99/100	MK361170
S12	β tubulin	<i>Penicillium longicatenatum</i>	99/91	MK361171
<b>R32</b>	<b>β tubulin</b>	<b><i>Penicillium sinaicum</i></b>	<b>99/95</b>	<b>MK361172</b>
		<i>Penicillium egyptiacum</i>		
<b>R33</b>	<b>β tubulin</b>	<b><i>Penicillium egyptiacum</i></b>	<b>98/100</b>	<b>MK361173</b>
		<i>Penicillium molle</i>	<b>97/100</b>	
H2	ITS	<i>Gymnacelladankaliensis</i>	100/98	MK361132
<b>H18</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Chrysosporium sp.</i></b>	<b>100/99</b>	<b>MK361133</b>
<b>H10</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Arachnomycesperuvianus</i></b>	<b>93/99</b>	<b>MK361134</b>
H19	ITS	<i>Gymnoascus halophilus</i>	100/100	MK361135
H20	ITS	<i>Gymnoascus halophilus</i>	100/100	MK361136
B8	TEF1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99/100	MK361174
D3	TEF1	<i>Fusarium equiseti</i>	100/97	MK361175
R38	TEF1	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	99/99	MK361176
S8	TEF1	<i>Fusarium acuminatum</i>	99/100	MK361177
S7	TEF1	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	97/99	MK361178
<b>R1</b>	<b>TEF1</b>	<b><i>Fusarium sp.</i></b>	<b>95/92</b>	<b>MK361179</b>
		<i>Fusarium cf. dimerum</i>	<b>90/61</b>	
R8	ITS	<i>Sarocladiumstrictum</i>	100/100	MK361137
S2	ITS	<i>Trichoderma gamsii</i>	100/100	MK361138
<b>G15</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Trichoderma koningii</i></b>	<b>99/100</b>	<b>MK361139</b>
		<i>Trichoderma koningiopsis</i>		
		<i>Trichoderma hispanicum</i>		
		<i>Trichoderma sp.</i>		
<b>B2</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Tritirachium sp.</i></b>	<b>100/100</b>	<b>MK361140</b>
C3	ITS	<i>Gibellulopsisnigrescens</i>	100/100	MK361141
R13	ITS	<i>Beauveriaabassiana</i>	100/100	MK361142
<b>R29</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Lecanicillium sp.</i></b>	<b>100/100</b>	<b>MK361143</b>
B1	ITS	<i>Purpureocilliumlilacinum</i>	100/100	MK361144
R5	ITS	<i>Myrothecium verrucaria</i>	99/100	MK361145
S3	ITS	<i>Clonostachysrosea</i>	100/100	MK361146
<b>H1</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Chaetomium piluliferum</i></b>	<b>98/100</b>	<b>MK361147</b>
		<i>Chaetomium murorum</i>	<b>98/100</b>	
<b>H38</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Chaetomium retardatum</i></b>	<b>93/100</b>	<b>MK361148</b>
<b>H42</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Chaetomium retardatum</i></b>	<b>93/100</b>	<b>MK361149</b>
B5	ITS	<i>Microascusmanginii</i>	99/100	MK361150
<b>G5</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Alternaria sp.</i></b>	<b>100/100</b>	<b>MK361151</b>
		<i>Alternaria alternata</i>		
		<i>Alternaria tenuissema</i>		
		<i>Alternaria chartarum</i>		
<b>H43</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Pleospora sp.</i></b>	<b>100/100</b>	<b>MK361152</b>
R20	TEF1	<i>Curvulariaspicifera</i>	100/97	MK361180
R36	ACT	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	100/100	MK361181
H14	ITS	<i>Ustilagocynodontis</i>	99/100	MK361153
<b>H15</b>	<b>ITS</b>	<b><i>Wallemia sp.F53 (related to Wallemia sebi)</i></b>	<b>98/100</b>	<b>MK361154</b>
		<i>Wallemia Canadensis</i>		
		<i>Wallemia mellicola</i>		

Strains not identified to the species level are mentioned in bold.

GenBank database, the closest homologue species to strains H38 and H42 was *C. retardatum* with a similarity of 93%. The rest of the isolates belonged to 7 species or genus of Ascomycota division: *Gymnoascus halophilus*, *Chrysosporium sp.*, *Arachnomyces sp.*, *S. strictum*, *Pleospora sp.*, *Curvularia spicifera* and *Cladosporium ramotenellum*, and two species of Basidiomycota division: *Ustilago cynodontis* and an

unidentified species *Wallemia sp.* belonging to *W. sebi* complex.

### 3.3. Halotolerance test

The salt tolerance test represented in Table 3 showed that all strains could grow on PDA medium without NaCl with the exception of *Wallemia*

**Table 3.** Number of isolates in each site and their salt tolerance.

Strains identity	Strains code	Number of isolates		Salt tolerance (NaCl %)	
		Zone 1	Zone 2	growth interval	optimal growth
<b>Eurotiales</b>					
<i>Aspergillus subramaniani</i>	A1	–	1	0–17.5	2.5
<i>Aspergillus subramaniani</i>	A2	–	2	0–15.0	2.5
<i>Aspergillus terreus</i>	S11	1	–	0–12.5	2.5
<i>Aspergillus calidoustus</i>	S15	3	2	0–12.5	2.5
<i>Aspergillus europaeus</i>	S20	1	–	0–12.5	5
<i>Aspergillus sp</i>	A4	–	1	0–17.5	2.5
<i>Aspergillus sp</i>	E2	–	1	0–15.0	2.5
<i>Aspergillus sp</i>	E7	–	1	0–15.0	[2.5–7.5]
<i>Aspergillus amstelodami</i>	H12	6	5	0–15.0	7.5
<i>Penicillium flavigenum</i>	S16	3	2	0–12.5	2.5
<i>Penicillium griseofulvum</i>	S17	4	3	0–12.5	2.5
<i>Penicillium canescens</i>	S18	2	–	0–12.5	2.5
<i>Penicillium mariae-crucis</i>	S19	2	–	0–12.5	2.5
<i>Penicillium allii</i>	H22	–	1	0–12.5	5
<i>Penicillium vinaceum</i>	R7	2	–	0–17.5	5
<i>Penicillium egyptiacum</i>	E9	5	6	0–15.0	2.5
<i>Penicillium longicatenatum</i>	S12	2	–	0–15.0	5
<i>Penicillium sp</i>	R32	1	–	0–15.0	5
<i>Penicillium sp</i>	R33	1	–	0–12.5	5
<b>Onygenales</b>					
<i>Gymnascelladankaliensis</i>	H2	–	6	0–12.5	2.5
<i>Chrysosporium sp.</i>	H18	–	1	0–7.50	2.5
<i>Arachnomyces sp.</i>	H10	–	1	0–12.5	2.5
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H19	–	1	2.5–17.5	10
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H20	–	1	2.5–17.5	10
<b>Hypocreales</b>					
<i>Fusarium oxysporum</i>	B8	6	–	0–12.5	2.5
<i>Fusarium equiseti</i>	D3	15	–	0–12.5	2.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	R38	2	–	0–12.5	2.5
<i>Fusarium acuminatum</i>	S8	1	–	0–10.0	2.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	S7	2	–	0–12.5	2.5
<i>Fusarium sp</i>	R1	1	–	0–12.5	2.5
<i>Sarocladium strictum</i>	R8	2	2	0–7.50	5
<i>Trichoderma gamsii</i>	S2	1	–	0–5.0	0
<i>Trichoderma sp.</i>	G15	1	–	0–5.0	0
<i>Tritirachium sp</i>	B2	1	–	0–12.5	[2.5–5.0]
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	C3	2	–	0–7.50	0
<i>Beauveria bassiana</i>	R13	1	–	0–7.50	0
<i>Lecanicillium sp.</i>	R29	1	–	0–12.5	2.5
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	B1	2	–	0–7.50	2.5
<i>Myrothecium verrucaria</i>	R5	1	–	0–7.50	0
<i>Clonostachys rosea</i>	S3	1	–	0–7.50	0
<b>Sordariales</b>					
<i>Chaetomium sp</i>	H1	–	1	0–7.50	2.5
<i>Chaetomium sp</i>	H38	–	1	0–10.0	[2.5–5.0]
<i>Chaetomium sp</i>	H42	–	1	0–12.5	5
<b>Microascales</b>					
<i>Microascus manginii</i>	B5	1	–	0–15.0	2.5
<b>Pleosporales</b>					
<i>Alternaria sp.</i>	G5	3	5	0–12.5	0
<i>Pleospora sp.</i>	H43	1	1	0–12.5	2.5
<i>Curvularia spicifera</i>	R20	1	1	0–12.5	0
<b>Capnodiales</b>					
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	R36	4	3	0–12.5	5
<b>Basidiomycetes</b>					
<i>Ustilagocynodontis</i>	H14	–	2	0–5.0	0
<i>Wallemia sp.</i>	H15	–	1	2.5–20	[2.5–7.0]
Total number of isolates	136	83	53		
Total number of genera	24	17	14		
Total number of identified species	30	26	13		
Total number of unidentified species	14	8	8		

*sp.*H15 and the two strains of *G. halophilus* H19 and H20 that are obligatorily halophilic. 74% of the strains could grow at 12.5% NaCl and 5 strains (*A. subramaniani* strain A1, *Aspergillus sp.* strain A4, *P. vinaceum* and the two strains of *G. halophilus*) at 17.5%. The only strain that could grow at 20% was *Wallemia sp.* The optimum growth of most strains is 2.5% or 5% NaCl. The

concentration of 10% is optimal for the growth of *G. halophilus*.

### 3.4. Extracellular enzymes production

The 50 isolates previously selected for molecular analysis were assayed for extracellular enzyme activity. The secretion of the extracellular enzymes

**Table 4.** Enzymes activities of fungal isolates.

Strains	Strain code	Enzymatic index (EI)			
		lipase	amylase	protéase	cellulase
<i>Aspergillus subramaniani</i>	A1	–	–	0.21	1
<i>Aspergillus subramaniani</i>	A2	0.5	0.57	0.2	1.6
<i>Aspergillus terreus</i>	S11	0.2	–	0.2	1.8
<i>Aspergillus calidoustus</i>	S15	0.33	0.21	–	3
<i>Aspergillus europaeus</i>	S20	–	0.3	1	2
<i>Aspergillus sp</i>	A4	0.5	2.0	2.4	4.66
<i>Aspergillus sp</i>	E2	–	0.5	1	3
<i>Aspergillus sp</i>	E7	–	–	0.3	1.2
<i>Aspergillusamstelodami</i>	H12	0.8	–	–	2.5
<i>Penicillium flavigenum</i>	S16	0.2	0.28	0.3	0.8
<i>Penicillium griseofulvum</i>	S17	1.4	0.8	–	1.42
<i>Penicilliumcanescens</i>	S18	1	0.15	1	2
<i>Penicillium mariae-crucis</i>	S19	–	0.5	0.08	0.87
<i>Penicillium allii</i>	H22	0.28	0.6	0.23	2
<i>Penicillium vinaceum</i>	R7	5	1.8	0.8	4.33
<i>Penicillium egyptiacum</i>	E9	0.5	0.5	1.42	2
<i>Penicillium longicatenatum</i>	S12	0.3	1.14	0.75	1
<i>Penicillium sp</i>	R32	0.25	0.55	1.28	1.6
<i>Penicillium sp</i>	R33	0.5	0.4	1.16	1.16
<i>Gymnascelladankaliensis</i>	H2	0.25	0.5	0.2	–
<i>Chrysosporium sp.</i>	H18	3	–	1	3
<i>Arachnomyces sp.</i>	H10	–	–	0.8	3.33
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H19	–	2	4	5
<i>Gymnoascus halophilus</i>	H20	–	1.6	4.33	6
<i>Fusarium oxysporum</i>	B8	–	–	–	2.66
<i>Fusarium equiseti</i>	D3	–	–	–	3.33
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	R38	–	–	–	3.33
<i>Fusarium acuminatum</i>	S8	–	0.33	–	1.5
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	S7	–	–	–	3.66
<i>Fusarium sp</i>	R1	0.33	0.3	0.1	3.33
<i>Sarocladiumstrictum</i>	R8	0.8	0.5	0.83	3
<i>Trichoderma gamsii</i>	S2	–	–	–	0.75
<i>Trichoderma sp.</i>	G15	0.5	–	–	–
<i>Tritirachium sp</i>	B2	–	–	1	2.5
<i>Gibellulopsisnigrescens</i>	C3	0.83	0.37	–	1.4
<i>Beauveriaabassiana</i>	R13	–	0.2	0.36	2.5
<i>Lecanicillium sp.</i>	R29	–	–	0.41	1.66
<i>Purpureocilliumlilacinum</i>	B1	–	–	0.2	1.6
<i>Myrothecium verrucaria</i>	R5	–	–	0.2	0.71
<i>Clonostachyrosea</i>	S3	–	0.3	0.06	0.8
<i>Chaetomium sp</i>	H1	–	–	–	4
<i>Chaetomium sp</i>	H38	–	–	2	1.66
<i>Chaetomium sp</i>	H42	–	–	0.5	3.5
<i>Microascusmanginii</i>	B5	–	–	0.3	1.5
<i>Alternaria sp.</i>	G5	–	–	–	1
<i>Pleospora sp.</i>	H43	–	–	–	1.8
<i>Curvulariaspiciфера</i>	R20	–	–	–	0.46
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	R36	1.2	–	1.4	1.66
<i>Ustilagocynodontis</i>	H14	5	–	4	4.66
<i>Wallemia sp</i>	H15	5	–	–	–

(lipase, amylase, protease, and cellulase) by the strains was detected on solid medium containing the specific substrate for each enzyme. The enzymatic index of strains is represented in Table 4.

All strains secrete at least one enzyme. The production of cellulase was observed in all strains except *Gymnascella denkaliensis*. The strains that have the highest cellulase activity were the two strains of *G. halophilus* H19 and H20 with an EI of 5 and 6 respectively, *P. vinaceum*, *Aspergillus sp.* strain A4, *Chaetomium sp.* strain H1 and *Ustilago cynodontis* with an EI between 4 and 4.66. A lower cellulase production was observed in *Fusarium* species, *Chrysosporium sp.*, *Arachnomyces sp.*, *S. strictum*, *A. calidoustus*, *Aspergillus sp.* strain E2 and *Chaetomium sp.* strain H42 with an EI around 3.

About 46.15% of the strains produce lipase enzyme. The highest lipolytic activity was observed in *P. vinaceum*, *U. cynodontis* and *Wallemia sp.* with an EI of 5.

67.30% of the strains secrete the enzyme protease and 48.07% the enzyme amylase. The two strains of *G. halophilus* and *U. cynodontis* have the highest proteolytic activity with an IE of 4. All amylase-producing strains showed a low activity, the higher production was by *G. halophilus* strain H19 with an EI of 2.

The production of lipase, protease, and amylase enzymes was not detected in 10 strains. However, a negative result does not confirm the inability of a strain to produce the enzyme. This may mean that the medium is inadequate for the detection of the enzyme or that the enzyme has not been released

from the mycelium or the enzyme has been secreted into the medium but the mycelium predominated and covered the visualization area of the enzymatic activity.

#### 4. Discussion

The sebkha of Oran is the greatest sebkha in western Algeria with a superficies of 1890 km<sup>2</sup>. Our study on fungal diversity was conducted at only 2 locations because of the difficulty of accessing the sebkha. Zone1 (Figure 1: sites B, C, D, R, G, S) is characterized by halophilic vegetation and cereal crops and zone2 (Figure 1: sites A, E, H) is characterized by a total absence of vegetation. Sampling was done in an area of 5 km<sup>2</sup> representing only 0.26% of the total area of the sebkha. According to our results, 44 species (30 identified species and 14 unidentified species) belonging to 24 genera were isolated from both zones. To the best of our knowledge, this study is the first report on the mycoflora of the Great Sebkha of Oran.

The most dominant genera found in the sebkha were *Penicillium*, *Aspergillus*, their teleomorphic forms and *Fusarium*. Several species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* have already been reported as the most frequently isolated species in hypersaline environments [16,17,19,46,47]. *P. egyptiacum* (formerly *Eupenicillium egyptiacum*) found among the dominant species in zone2 was also isolated from the soil of the western shore of the Dead Sea [10,12]. *P. longicatenatum*, a second teleomorphic form of the genus *Penicillium* isolated in our study, has not been previously isolated from saline soils. This species was described by Visagie et al. [48]; but these authors only described the asexual form, so this is the first observation of the sexual reproduction for this species. A third teleomorphic form was represented by an unidentified species *Penicillium sp.* Strains R32 and R33. In the blast analysis, these strains appear quite close to *P. egyptiacum* but other studies will be necessary to identify them in a definite way. The species *P. allii* previously found in hypersaline environments [49,50] was also isolated from garlic as a phytopathogenic fungus [51–53]. Although Algeria is a garlic producing country, *P. allii* has never been isolated or reported as a pathogen of garlic in Algeria. Moreover, this is the first isolation of this species in Algeria.

The genus *Fusarium* isolated only from zone1 was represented by the species *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. brachygibbosum*, *F. acuminatum* and the unidentified species *Fusarium sp.* strain R1 belonging to dimerum clade. The two species *F.oxysporum* and *F. equiseti* were previously found in several hypersaline soils [9,14,47,54]. In the studies of Mandeel [18] on the biodiversity of the genus *Fusarium* in the saline

soil of Bahrain and the one of Macià-Vicente et al. [55] on fungal root endophytes from Mediterranean environments, both species *F. oxysporum* and *F. solani* were found to be the most dominant and the frequency of isolation of *F. equiseti* was lower. These results do not agree with our result where the species *F. equiseti* was found to be the most dominant and where none *F. solani* has been isolated. The species *F. acuminatum* and *Fusarium spp* of dimerum clade were rarely isolated from hypersaline soil [54,56]. *F. brachygibbosum* has been isolated from saline soils such as salt marshes [57] and native desert flora of Oman [58]. This species has also been reported as a pathogen of palm trees in Oman [59] and olive trees in Tunisia [60]. In Algeria, this species has never been reported and this is the first strain of *F. brachygibbosum* isolated in Algeria. As Algeria is the 7th world producer of olive this species should be watched carefully.

Two strains of *Trichoderma*, *T. gamsii* and *Trichoderma sp.* were isolated from cereal crops soil where salinity is lower and the pH is neutral. The two strains are halotolerant growing at a salinity of 5% NaCl. The species *T. gamsii*, generally isolated as endophytic fungi having a high ability to be used as a biological control agent and as plant growth promoting [61–63], was also isolated from marine sediments [64]. No studies have shown that this species has been isolated from terrestrial saline soils or its use as a biocontrol agent under salt stress. Several studies have been conducted on the search for halotolerant strains of *Trichoderma spp.* that could be used as biological control agents under salt stress because of the use of saline water for irrigation in agriculture in arid zone [31,65,66]. This is the first isolation of *T. gamsii* in Algeria. This opens the way for their possible use as biological control agents in agriculture irrigated by saline water.

Three obligate halophilic strains (H15, H19 and H20) were isolated from the zone2. The two strains, H19 and H20, were identified as *G. halophilus*, the new obligate halophilic species isolated for the first time from the sediments of the Chaka salt lake in China by Zhou et al. [25]. The strain isolated in China is more tolerant to the salt concentration with a maximum growth at 22.5% NaCl while our two strains have a maximum growth at a NaCl concentration of 17.5%. This is the second isolation of this species in the world.

The other halophilic strain (i.e., H15) belongs to the genus *Wallemia*. This basidiomycetous genus is a xerophilic food borne fungi repeatedly isolated from hypersaline environments. Until some years the genus *Wallemia* included three species *W. sebi*, *W. ichthyophaga* and *W. muriae* [21] but its classification was recently revised. According to Jančić et al.

[67], the species *W. sebi* presents a complex of four species: *W. sebi sensu stricto*, *W. mellicola*, *W. canadensis* and *W. tropicalis*. Moreover in 2016, Jančić et al. [68] added a new species to the genus: *W. hederæ*, a phylogenetic sister of *W. ichthyophaga*, and recently, another new species was described: *W. peruviana* that is closely related to *W. hederæ* [69].

The two species *W. ichthyophaga* and *W. muriae* are obligate halophilic while the *W. sebi* species complex, *W. hederæ* and *W. peruviana* are halotolerant species. Despite the fact that our strain H15 is an obligate halophilic, it belongs to *W. sebi* species complex. Additional studies will be needed to determine the exact species of this strain.

*U. cynodontis*, another basidiomycetous fungus, was also isolated from zone2. This inflorescence smut fungus has never been reported from hypersaline environments, its presence in our isolation will require further studies.

The halotolerance test revealed that the majority of the strains isolated in our study are halotolerant as they can grow in the absence of NaCl and tolerate a salt concentration of 12.5% with a maximum growth at 17.5% for only four species, and one species, *Wallemia sp.*, can grow at 20% NaCl. Fungi usually isolated from hypersaline environments have different levels of salinity tolerance, ranging from the low halotolerant to the extremely halotolerant growing at 25% NaCl or more [7]. Despite the large number of sebkha in Algeria, no study has been published on the mycoflora of these ecosystems or their rate of halotolerance. *Wallemia sp.* and the two strains of *G. halophilus* are the only obligate halophilic strains isolated during our study. These three strains were isolated from site H of zone2 characterized by the absence of any vegetation. Relative to the other two sites in zone2 (A and E), site H is the furthest from zone1 (where there is a halophilic vegetation) and this is also the one where the higher salinity was measured.

A few obligate halophilic fungi have been previously reported from extreme saline environments as *Gymnascella marismortui* [11], two species of *Wallemia* (*W. muriae* and *W. ichthyophaga*) [21], four species of *Aspergillus* (*A. gracilis*, *A. penicillioides*, *A. restrictus*, *A. unguis*) [13,70,71] and the yeast *Sterigmatomyces halophilus* [70].

Halophile and halotolerant fungi have adopted several adaptation mechanisms to be able to live in hypersaline environments. To adapt, the fungal cell must first be able to detect the evolution of salt concentration in the environment; the main mechanism involved in this detection is the high-osmolarity glycerol (HOG) pathway. This pathway is also involved in the response to salinity and osmoadaptation of fungal cells [72]. Under salt stress, most fungi accumulate

solutes such as polyols and free amino acids to increase their internal osmolality and allow water to enter their cells. Other strategies are used by fungi such as changes in ion transport or plasma membrane fluidity that play an important role in adaptation to high salt concentration [72,73]. Moreover, one of the results obtained in the molecular studies of salt tolerance of the obligate halophile *W. ichthyophaga* was the observation of a significant increase in salt-responsive genes coding for hydrophobins. Compared to other fungi, the main difference in the amino-acid compositions of hydrophobins from *W. ichthyophaga* is the high number of acidic amino acids [74]. This property, which is considered to be a characteristic of proteins exposed to high salinity, could multiply the fields of biotechnological application of hydrophobins especially under high salt concentration. To summarize, all salinity adaptation strategies adopted by fungi are of great importance and it will be worthy to study in more detail the adaptation mechanisms of our halophilic strains.

The biotechnological interest of the 50 strains was evaluated by testing their ability to produce extracellular enzymes (i.e., lipase, amylase, protease, and cellulase) on solid medium. In general, halophilic fungi are an important source of polyextremophilic metabolites. Their thermotolerant and halophilic properties allow them to be stable and applicable in wide range of pH and temperature of industrial process [75,76].

In our study, the most interesting species presenting the highest enzymatic index were *Aspergillus sp.* strain A4, *Chaetomium sp.* strain H1, *P. vinaceum*, *G. halophilus* and the two basidiomycetous *Wallemia sp.* and *U. cynodontis*.

The two unidentified species *Aspergillus sp.* strain A4 and *Chaetomium sp.* strain H1 are good producers of cellulase. Further studies will be required to confirm the identification of these species and their biotechnological interest. *Wallemia sp.* has a high lipase activity with an EI of 5 and no cellulolytic, amylolytic or proteolytic activity was detected. This result was also obtained by Jančić et al. [68] who studied the enzymatic profile of the four species of *Wallemia* (*W. sebi*, *W. ichthyophaga*, *W. muriae* and *W. hederæ*). They found that *Wallemia* spp. secrete several enzymes including lipase and esterase but no cellulolytic, amylolytic, and proteolytic activities were observed. *P. vinaceum* secretes the four tested enzymes but have only a high lipase and cellulase activity with an EI of 5 and 4.33 respectively. *P. vinaceum* is studied the most as marine derived fungi and has rarely been isolated from the soil. Several studies indicated that this species is an important source of bioactive molecules [77,78]. The two strains of *G. halophilus* H19 and H20

secrete amylase (EI near of 2), protease (EI of 4), and cellulase (EI of 5 and 6). This species was isolated for the first time in 2016 [25] and no study was realized on the enzymatic profile of this species until now. Our study is the first enzymatic characterization of *G. halophilus* in which both strains H19 and H20 were found to have a high amylolytic, cellulolytic, and proteolytic activity. This species could prove to be an interesting source of enzymes. The yeast *U. cynodontis* secretes three enzymes cellulase, protease and lipase with an EI of 4.66, 4 and 5 respectively. Several studies conducted on yeasts from Ustilaginaceae family have shown that these yeasts are a promising source of molecules of industrial interest including enzymes [79–81], organic acids [82] and biosurfactants [83].

In conclusion, the results of our study are consistent with the studies already carried out on hypersaline environments and confirm once again that the fungal flora of these extreme environments is of remarkable diversity. A total of 24 genera and 30 identified species were isolated including four species isolated for the first time in Algeria: *F. brachy gibbosum*, *P. allii* *T. gamsii*, *G. halophilus*, and a first isolation of the teleomorphic form of *P. longicatenatum*. We also have isolated 17 strains that have not been identified at the species level either by morphological study or in our molecular analysis. Further studies will be necessary to clarify their identification to the species level and to know if whether they are new species or not.

Our study also showed that six species *Aspergillus* sp. strain A4, *Chaetomium* sp. strain H1, *P. vineaceum*, *G. halophilus* and the two basidiomycetous *Wallemia* sp. and *U. cynodontis* have significant enzymatic activity requiring further studies to determine their biotechnological potential.

It must be pointed out that all these fungi were obtained from a region located at the margin of the sebkha representing only 0.26% of the total area of the Great Sebkha of Oran, which does not reflect the true fungal diversity preserved at the level of the central lake that has remained unscathed from any human activity and which should be very interesting to discover in our further studies.

### Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

### References

- [1] Moussa K. Study of a Sebkha: Sebkha of Oran (Western Algeria), doctoral thesis, University of Oran. 2006. 205p.
- [2] Benziane A. The aquifer system of the Great Sebkha of Oran: geological and hydrogeological considerations. Bulletin de L'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Terre. 2013;35:77–92.
- [3] Oren A. Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2002.
- [4] Gunde-Cimerman N, Zalar P, Petrovič U, et al. Fungi in the salterns. In: Ventosa A, editor. Halophilic microorganisms. Heidelberg: Springer-Verlag; 2004. p. 103–113.
- [5] Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, et al. Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol. 2000;32:235–240.
- [6] Butinar L, Sonjak S, Zalar P, et al. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. Botanica Marina. 2005;48:73–79.
- [7] Cantrell SA, Casillas-Martínez L, Molina M. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. Mycol Res. 2006;110:962–970.
- [8] Nayak SS, Gonsalves V, Nazareth SW. Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa – India. Indian J Mar Sci. 2012;41:164–172.
- [9] Guiraud P, Steiman R, Seigle-Murandi F, et al. Mycoflora of soil around the Dead Sea II – Deuteromycetes (except *Aspergillus* and *Penicillium*). System Appl Microbiol. 1995;18:318–322.
- [10] Steiman R, Guiraud P, Sage L, et al. Mycoflora of soil around the Dead Sea. I – Ascomycetes (including *Aspergillus* and *Penicillium*), Basidiomycetes, Zygomycetes. System Appl Microbiol. 1995;18:310–317.
- [11] Buchalo AS, Nevo E, Wasser SP, et al. Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. Proc R Soc Lond. 1998;265:1461–1465.
- [12] Grishkan I, Nevo E, Wasser SP. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. Mycol Progress. 2003;2:19–28.
- [13] Nazareth S, Gonsalves V, Nayak S. A first record of obligate halophilic *Aspergillus* from the Dead Sea. Indian J Microbiol. 2012;52:22–27.
- [14] Abdel-Hafez S. Survey of the mycoflora of desert soils in Saudi Arabia. Mycopathologia. 1982;80:3–8.
- [15] Sterflinger K, Tesei D, Zakharova K. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. Fungal Ecol. 2012;5:453–462.
- [16] Al-Musallam AAS, Al-Sammar HF, Al-Sane NA. Diversity and dominance of fungi inhabiting the sabkha area in Kuwait. Botanica Marina. 2011;54:83–94.
- [17] Jaouani A, Neifar M, Prigione V, et al. Diversity and enzymatic profiling of halotolerant micromycetes from Sebkha El Melah, a Saharan salt flat in southern Tunisia. Biomed Res Int. 2014;2014:1–11.
- [18] Mandeel QA. Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. J Basic Microbiol. 2006;46:480–494.
- [19] Gunde-Cimerman N, Zalar P. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. Food Technol Biotechnol. 2001;4;170–179.

- [20] Moubasher AH, Abdel-Sater MA, Soliman Z. Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycol.* 2018;70:1–32.
- [21] Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, et al. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;87:311–328.
- [22] Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol.* 2007;58:157–183.
- [23] Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardization of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol.* 2007;58:105–156.
- [24] Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, et al. Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia.* 2008;100:779–795.
- [25] Zhou N, Zhang Y, Liu F, et al. *Gymnoascus* species from several special environments, China. *Mycologia.* 2016;108:179–191.
- [26] Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol.* 2010;31:825–834.
- [27] Moreno ML, Perez D, Garcia MT, et al. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life.* 2013;3:38–51.
- [28] Damare S, Singh P, Raghukumar S. Biotechnology of marine fungi. In: Raghukumar C, editor. *Biology of marine fungi.* Berlin, Heidelberg: Springer. Progress in Molecular and Subcellular Biology 53;2012. p. 278–291.
- [29] Ali I, Siwarungson N, Punnapayak H, et al. Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pak J Bot.* 2014;46:983–988.
- [30] Edbeib MF, Wahab RA, Halophiles HF. Halophiles: biology, adaptation and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016;32:1–23.
- [31] Gal-Hemed I, Atanasova L, Komon-Zelazowska M, et al. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:5100–5109.
- [32] Pitt JI. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press Inc; 1979.
- [33] Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Fourth edition. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company; 1998.
- [34] Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, et al. Introduction to food and airborne fungi. 6th Ed. Utrecht: CentraalbureauvoorSchimmelcultures; 2002.
- [35] Samson RA, Frisvad JC. *Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites.* Utrecht: Studies in Mycology; 2004.
- [36] Brygoo Y, Gautier A. Molecular polymorphism of *Fusarium* strains isolated from wheat and corn ears in France Collects 2003 and 2004. Paper presented at the « conférence sur les progrès et perspectives de la recherche sur les mycotoxines de *Fusarium* dans les céréales ». Arcachon, France, 2007.
- [37] Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1323–1330.
- [38] Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 1999;91:553–556.
- [39] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* New-York: Academic Press; 1990. p. 315–322.
- [40] Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia.* 1975;67:597–607.
- [41] Abe CA, Faria CB, De Castro FF, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays L.*) grains and production of associated enzyme activities. *Int J Mol Sci.* 2015;16:15328–15346.
- [42] Montencourt BS, Eveleigh DE. Semi quantitative plate assay for determination of cellulose production by *Trichoderma viride*. *Appl Environ Microb.* 1977;33:178–183.
- [43] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, et al. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr Microbiol.* 2008;57:503–507.
- [44] Sarath G, De La Motte RS, Wagner FW. Protease assay methods. In: Beynon RJ, Bonde JS, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach.* Oxford, UK: University Press; 1989. p. 25–54.
- [45] Durand JH. Irrigable soil. Living techniques. (*Les sols irrigables. Techniques vivantes.*) Paris: Univ Press; 1983.
- [46] El-Said AHM, Saleem A. Ecological and physiological studies on soil fungi at Western Region, Libya. *Mycobiology.* 2008;36:1–9.
- [47] Ismail MA, Moubasher AH, Ramadan MA, et al. Extremophilic fungi and chemical analysis of hypersaline, alkaline lakes of Wadi-El-Natron, Egypt. *Int J Tech Res Sci.* 2017;1:345–363.
- [48] Houbraken J, Visagie CM, Meijer M, et al. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol.* 2014;78:373–451.
- [49] Hujslova M, Kubatova A, ChudiKova M, et al. Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Reserve, Czech Republic. *Mycol Prog.* 2010;9:1–15.
- [50] Park MS, Fong JJ, Oh SY, et al. Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014;106:331–345.
- [51] Vincent MA, Pitt JI. *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia.* 1989;81:300–303.
- [52] Overy DP, Frisvad JC, Steinmeier U, et al. Clarification of the agents causing blue mould storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biol Technol.* 2005;35:217–221.
- [53] Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, et al. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathol.* 2006;55:583–583.

- [54] Moustafa AF, Al-Musallam AA. Contribution to the fungal flora of Kuwait. *Trans Brit Mycol Soc.* 1975;65:547–553.
- [55] Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Abdullah SK, et al. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;64:90–105.
- [56] Lebogang L, Taylor JE, Mubyana-John T. A preliminary study of the fungi associated with saltpans in Botswana and their anti-microbial properties. *Bioremediation, biodiversity and bio-availability.* Global Sci Books. 2009;3:61–71.
- [57] Gashgari R, Gherbawy Y, Ameen F, et al. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9:e26157.
- [58] Al-Mahmooli IH, Al-Bahri YS, Al-Sadi AM, et al. First report of *Euphorbia larica* dieback caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Dis.* 2013;97:687–687.
- [59] Al-Sadi AM, Al-Jabri AH, Al-Mazroui SS, et al. Characterization and pathogenicity of fungi and oomycetes associated with root diseases of date palms in Oman. *Crop Prot.* 2012;37:1–6.
- [60] Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech.* 2017;7:28.
- [61] US EPA. Biopesticides registration action document. *Trichoderma gamsii* strain ICC 080 PC Code: 119207. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division. 2010.
- [62] Rinu K, Sati P, Pandey A. *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): a newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting and antagonistic fungal strain. *J Basic Microbiol.* 2014;54:408–417.
- [63] Chen JL, Sun SZ, Miao CP, et al. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *J Ginseng Res.* 2015;40:315–324.
- [64] Anand BG, Thomas CKN, Prakash S. In vitro cytotoxicity and antimicrobial activity of *Talaromyces flavus* SP5 inhabited in the marine sediment of Southern Coast of India. *Chin J Nat Med.* 2016;14:913–921.
- [65] Ouazzani Chahdi A, Chliyah M, Mouria B, et al. In vitro and in vivo effect of salinity on the antagonist potential of *Trichoderma harzianum* and sensitivity of tomato to *Verticillium* wilt. *Int J Recent Sci Res.* 2014;5:780–791.
- [66] Guo R, Wang Z, Huang Y, et al. Biocontrol potential of saline- or alkaline-tolerant *Trichoderma asperellum* mutants against three pathogenic fungi under saline or alkaline stress conditions. *Braz J Microbiol.* 2018;49:236–245.
- [67] Jančić S, Nguyen HDT, Frisvad JC, et al. A taxonomic revision of the *Wallemia sebi* species complex. *PLoS One.* 2015;10:e0125933.
- [68] Jančić S, Zalar P, Kocev D, et al. Halophily reloaded: new insights into the extremophilic lifestyle of *Wallemia* with the description of *Wallemia hederæ* sp. nov. *Fungal Divers.* 2016;76:97–118.
- [69] Díaz-Valderrama JR, Nguyen HDT, Aime MC. *Wallemia peruviensis* sp. nov., a new xerophilic fungus from an agricultural setting in South America. *Extremophiles.* 2017;21:1017–1025.
- [70] Ali I, Kanhayuwa L, Rachdawong S, et al. Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province. *Thailand Ann Microbiol.* 2013;63:887–895.
- [71] Gonsalves V, Nayak S, Nazareth S. Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *J Yeast Fungal Res.* 2012;3:30–36.
- [72] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:300–372.
- [73] Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res.* 2009;113:1231–1241.
- [74] Zajc J, Liu YF, Dai WK, et al. Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics.* 2013;14:617.
- [75] Setati ME. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant Eubacteria. *Afr J Biotechnol.* 2010;9:1555–1560.
- [76] Dalboge H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol Rev.* 1997;21:29–42.
- [77] Asiry IAM, Badr JM, Youssef D. Penicillinivacine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum*. *Phytochem Lett.* 2015;13:53–58.
- [78] Liu S, Su M, Song SJ, et al. Marine-derived *Penicillium* species as producers of cytotoxic metabolites. *Mar Drugs.* 2017;15:329.
- [79] Bussamara R, Fuentesfria AM, Oliveira ES, et al. Isolation of a lipase secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour Technol.* 2010;101:268–275.
- [80] Alex D, Shainu A, Pandey A, et al. Esterase active in polar organic solvents from the yeast *Pseudozyma* sp. NII 08165. *Enzyme Res.* 2014;2014:1–10.
- [81] Isshiki S, Shitasue S, Mase T, et al. Characterization of an aminopeptidase from *Pseudozyma hubeiensis* 31-B and potential applications. *Mycoscience.* 2017;58:60–67.
- [82] Guevarra ED, Tabuchi T. Production of 2-hydroxy-yparaconic and itartartaric acids by *Ustilago cyndontis* and simple recovery process of the acids. *Agric Biol Chem.* 1990;54:2359–2365.
- [83] Morita T, Ishibashi Y, Hirose N, et al. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75:1371–1376.