

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

RIAHI Zineb et TEBBAL Rawane Soumicha

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Génétique appliquée

Thème

Inventaire des champignons du sol dans les pépinières de la wilaya de Tlemcen

Soutenu le 07/2021, devant le jury composé de :

Président	GAOUAR S. B. S.	Pr.	Université Abou Bekr Belkaid- TLEMCEN
Encadrant	CHOUIKHI-SMAHI H.	MCB	Université Abou Bekr Belkaid- TLEMCEN
Examineur	BELHOUCINE-GUEZOULI L.	Pr.	Université Abou Bekr Belkaid- TLEMCEN

Année universitaire 2020/2021

ملخص: حصر فطريات التربة في مشاتل ولاية تلمسان

تلعب الفطريات، الفطريات الجذرية أو العفن دور مهم جدا في عالم الميكروبات. فهي ذات اهمية اقتصادية كبيرة بسبب فوائدها المتعددة او انشطتها الضارة. تهدف الدراسة الحالية التي اجريت في ثلاث مشاتل على مستوى ولاية تلمسان إلى:
اولا: حصر النباتات الفطرية الجذرية الموجودة في منطقة جذور الشتلات الصغيرة، ثانيا: تحديد الانواع المعزولة على اساس البيانات الميكروسكوبية و المجهرية، ثالثا: اختبار التأثير المضاد لبعض عزلات *Trichoderma sp.* على أنواع جنس *Diplodia sp.* و *Pythium sp.*

كشفت طريقة التخفيف عن وجود تنوع بيولوجي فطري مهم على وسط PDA للمواقع الثلاثة حيث تم عزل وتحديد سبعة عشر نوع من الفطريات و هي *P. cinnamomi*, *P. gonapodyides*, *P. ramorum*, *D. sapinea*, *Lasio. Exigua*, *Py. ultimum*, *Py. polare*, *F. oxysporum*

Aspergillus sp., *Penicellium sp.*, *Mucor sp.* *Trichoderma sp.* *Alternaria sp.*.

كما تم تسجيل نشاط التأثير المضاد في عزلات *Trichoderma sp.* ضد *Diplodia sp.* *Pythium sp.*
الكلمات المفتاحية: فطر، جذري، حصر، التعرف.

Résumé : Inventaire des champignons du sol dans les pépinières de la wilaya de Tlemcen

Les champignons endophytes, les mycètes, ou les moisissures ont un rôle très important dans le monde microbien. Ils présentent un intérêt économique, en raison de leur utilité ou de leurs activités néfastes multiples. La présente étude menée dans trois pépinières représentatives de la wilaya de Tlemcen vise à : (i) inventorier de la flore fongique telluriques qui existe dans le rhizosphère des jeunes plantules, (ii) identifier les espèces isolées sur la base des données culturels et microscopiques, (iii) tester l'effet antagoniste de quelques isolats de *Trichoderma sp.* sur les espèces du genre *Pythium sp.* et celles de *Diplodia sp.*

La méthode de dilution a révélé la présence d'une biodiversité fongique importante sur le milieu PDA pour les trois sites prospectés. Dix-sept espèces fongiques ont été isolés et identifiées à savoir : *P. cinnamomi*, *P. gonapodyides*, *P. ramorum*, *D. sapinea*, *Lasio. Exigua*, *Py. ultimum*, *Py. polare*, *F. oxysporum*, *Aspergillus sp.*, *Penicellium sp.*, *Mucor sp.* *Trichoderma sp.* et *Alternaria sp.*

Une importante activité antagoniste a été enregistrée pour les isolats de *Trichoderma sp.* contre les espèces de *Pythium sp.* et *Diplodia sp.*

Mots clés : champignons endophyte, pépinière, inventaire, identification

Abstract: inventory of soil fungi in nurseries of Tlemcen province

Endophytic fungi, fungi, and molds play a vital role in the microbial world. They are of economic interest due to its multiple beneficial or harmful activities. The present study carried out in three representative nurseries of Tlemcen province aims to: (i) inventory the telluric fungal flora that exists in the rhizosphere of young seedlings, (ii) identify the isolated species on the basis of cultural and microscopic data, (iii) test the antagonist effect of some isolates of *Trichoderma sp.* on species of the genus *Pythium sp.* and those of *Diplodia sp.*

For the three prospected locations, the dilution method revealed the presence of significant fungal biodiversity on the PDA medium. Seventeen fungal species have been isolated and identified, namely: *P. cinnamomi*, *P. gonapodyides*, *P. ramorum*, *D. sapinea*, *Lasio. Exigua*, *Py. ultimum*, *Py. polare*, *F. oxysporum*, *Aspergillus sp.*, *Penicellium sp.*, *Mucor sp.* *Trichoderma sp.* and *Alternaria sp.*

Significant antagonist activity was recorded for isolates of *Trichoderma sp.* against *Pythium sp.* and *Diplodia sp.*

Key words: endophytic fungi, nurseries, inventory, identification,

Dédicaces

A nos chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leurs tendresses, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études, On dédie toutes les familles RIAHI, TEBBAL,

Nos aimables sœurs et nos frères pour le soutien moral,

A toute nos familles pour leurs soutiens tout au long de mon parcours universitaire,

A Tous nos collègues de promotion de génétique,

A Nos amis qui nous ont permis d'oublier les moments de stress et de découragement.

Tous ceux qui nous sont chers.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible,

Merci d'être toujours là pour nous.

Zineb et Rawane

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier Allah pour nous avoir inspiré la volonté et le courage d'acheminer ce travail jusqu'à la fin.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Dr. CHOUIKI-SMAHI Hadjer pour avoir accepté de diriger ce travail, et pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit. Ses compétences techniques, son efficacité et surtout sa rigueur ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mr. GAOUAR Suheil Bechir Semir Professeur à l'Université Abou Bekr-Belkaid (TLEMCEM) d'avoir accepté de présider ce jury. Sans oublier ses compétences, ses qualités scientifiques et humaines, son dynamisme, ses idées et conseils précieux et ses discussions constructives. Ses encouragements qui nous ont été précieux afin de mener notre travail à bon port.

Je remercie, Pr. BELHOUCINE-GUEZOULI Latifa Professeur à l'Université Abou Bekr-Belkaid (TLEMCEM), qui a bien voulu examiner ce travail.

Je tiens également à rendre hommage à toute l'équipe de laboratoire N°31 Gestion Conservatoire de l'eau sol et forêts.

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Desoxyribonucléique

C° : degré Celsius.

cm : centimètre

cm² : centimètre carrée

FAO : Organisation of Food and Agriculture

g : Gramme

h : heure

ha : hectare

Km : Kilomètre

L : litres

m : mètre

mg : milligramme

ml : millilitre

MEA : Malt Extract Agar

PDA : milieu à la pomme de terre

sp. : Espèce

T° : Température

% : Pourcent

Liste des tableaux

Tableau 01 : Propriétés principales des Champignons.....	7
Tableau 02 : Les constituants organiques du sol	14
Tableau 03 : Représentation taxonomique du genre Fusarium	21
Tableau 04 : Description des sites d'étude.....	31
Tableau 05 : Taxonomie des champignons isolés.....	45
Tableau 06 :L'isolement des espèces fongique à partir des jeunes plantules des trois pépinières.....	47
Tableau 07 : Indice de Shanon et Weaver.....	53

Liste des figures

Figure 01 : Classification phylogénétique du monde vivant	6
Figure 02 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium	8
Figure 03 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium ...	10
Figure 04 : Pépinière de plantes fruitières.....	18
Figure 05 : <i>Fusarium oxysporum</i>	22
Figure 06 : Cycle biologique de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
Figure 07 : Pépinière « l'arbre qui pousse » kiffane.....	29
Figure 08 : pépinière « My garden » Aboutachfine.....	29
Figure 09 : pépinière de la rocade.....	30
Figure 10 : la position des pépinières visitées.....	31
Figure 11 : Prélèvement des échantillons du sol à partir d'un arbre symptomatique.....	33
Figure 12 : la technique d'appâtage.....	35
Figure 13 : L'apparition des tâches noirâtre sur les pétales du Rosier, (B) Le développement du mycélium entourant les carré du rosier sur un PDA.....	35
Figure 14 : protocole de la méthode de dilution.....	36
Figure 15 : La méthode de dilution (la dilution avec l'eau physiologique).....	37
Figure 16 : La purification des espèces sur un milieu PDA.....	38
Figure 17 : Technique de sporulation.....	39
Figure 18 : Test d'antagonisme de <i>Trichoderma sp.</i> contre <i>Pythium sp.</i> et <i>Trichoderma sp.</i> contre <i>Diplodia sp</i>	41
Figure 19 : Symptomatologie observées chez les plantules infectées dans les pépinières prospectées.....	44
Figure 20 : Pourcentage d'incidence par les endophytes fongiques dans les trois pépinières prospectées.....	46
Figure 21 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°1.....	49

Liste des figures

Figure 22 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°2.....	50
Figure 23 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°3.....	51
Figure 24 : La moyenne totale de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules des trois pépinières prospectées.....	52
Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Phytophthora gonapodyides</i>	54
Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	55
Figure 27 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Phytophthora ramorum</i>	56
Figure 28 : Aspect macroscopique et microscopique <i>Pythium ultimum</i>	57
Figure 29 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Pythium polare</i>	58
Figure 30 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Diplodia sapinea</i>	69
Figure 31 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Lasioidiplodia exigua</i>	60
Figure 32 : Aspect macroscopique et microscopique <i>Fusarium oxysporum</i>	61
Figure 33 : Aspect macroscopique et microscopique <i>Alternaria solani</i>	62
Figure 34 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Alternaria alternata</i>	63
Figure 35 : Aspect macroscopique et microscopique <i>Trichoderma harzianum</i>	64
Figure 36 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma viride</i>	65
Figure 37 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Rhizopus stolonifer</i>	66
Figure 38 : Aspect macroscopique et macroscopique de <i>Mucor racemosus</i>	68
Figure 39 : Aspect macroscopique et microscopique <i>Aspergillus niger</i>	68
Figure 40 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Aspergillus fumigatus</i>	70
Figure 41 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Penicellium solitum</i>	71
Figure 42 : Inhibition du développement de <i>Diplodia sp.</i> (à gauches) et du <i>Pythium sp.</i> (à droite) par les souches de <i>Tri. Harzianum</i> et <i>Tri. Viride</i>	71

Table des matières

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE 1

Partie Bibliographique

CHAPITRE I : LES ENDOPHYTES FONGIQUES 4

I.1. Les maladies phytopathogènes 4

I.2. Les champignons endophytes 5

I.3. Biodiversité des champignons endophytes 6

I.4. Propriétés principales des Champignons endophytes 7

I.5. Mode de reproduction et de transmission 8

I.5.1. La reproduction asexuée (Végétative) 8

I.5.2. La reproduction sexuée 8

I. 6. Interaction plante hôte – champignon endophytes 9

I. 6.1. Les facteurs de pathogénicité..... 10

I.6.2. Les métabolites secondaires des champignons endophytes..... 11

I.7. Mécanismes de l'antagonisme entre les champignons..... 11

I.7.1. Les types d'antagonisme 12

I.8. Le sol et les mycètes 13

CHAPITRE II. PEPINIERES : DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES .. 17

II.1. Définition de la pépinière..... 17

II.2. Type de pépinière..... 17

II.2.1. Classification selon le type de plante cultivé..... 18

II.2.1.1. Pépinière des plantes fruitières 18

II.2.1.2. Pépinières de plantes ornementales	18
II.2.1.3. Pépinières de plantes médicinales et aromatiques	19
II.2.1.4. Pépinière de plantes forestières	19
II.2.2. Les maladies phytopathogènes des pépinières	19
II.2.2.1. Facteurs favorables à l'infection des maladies.....	19
II.2.2.2. La fusariose.....	20
II.2.3.3. La fonte de semis	25
II.2.3.4. Les méthodes de lutte utilisées	26

Partie expérimentale

CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES	29
III.1. Description des trois pépinières prospectées	29
III.1.1. La pépinière 1	29
III.1.2. La pépinière 2	29
III.1.3. La pépinière 3	30
III.2. Prospection et échantillonnage	31
III.2.1. Présentation des sites prospectés	31
III.2.2. Méthode d'échantillonnage.....	32
III.3. Isolement, identification et caractérisation des espèces fongiques	32
III.3.1. Milieux de culture utilisés.....	32
III.3.1.1. Milieu PDA (Potatos Dextrose Agar)	33
III.3.1.2. Milieu MEA (Malt Extract Agar)	33
III.3.2. Méthodes d'isolement des endophytes fongiques.....	33
III.3.2.1. Méthode d'appâtage.....	33
III.3.2.2. Méthode de dilution	36

III.3.3. La purification	38
III.3.4. L'identification des espèces	38
III.3.5. Technique de sporulation	39
III.3.6. Test d'antagonisme	39
CHAPITRE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	43
IV. 1. Symptomatologie	43
IV.2. Importance des champignons endophytes sur les jeunes plantules des pépinières prospectées.....	45
IV.2.1. Présence ou absence des endophytes fongiques dans les trois pépinières prospectées	45
IV.2.2. La mycoflore associée aux sols des pépinières prospectées	46
IV. 3. Identification et caractérisation des espèces fongiques isolées.....	53
IV.3.1. <i>Phytophthora gonapodyides</i>	53
IV.3.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	54
IV.3.3. <i>Phytophthora ramorum</i>	55
IV.3.4. <i>Pythium ultimum</i>	56
IV.3.5. <i>Pythium polare</i>	57
IV.3.6. <i>Diplodia sapinea</i> (Syn. <i>Sphaeropsis sapinea</i>)	58
IV.3.7. <i>Lasiodiplodia exigua</i>	59
IV.3.8. <i>Fusarium oxysporum</i>	60
IV.3.9. <i>Alternaria solani</i>	61
IV.3.10. <i>Alternaria alternata</i>	62
IV.3.11. <i>Trichoderma harzianum</i>	63
IV.3.12. <i>Trichoderma viride</i>	64
IV.3.13. <i>Rhizopus stolonifer</i> Vuill (1902)	65
IV.3.14. <i>Mucor racemosus</i>	66

IV.3.15. <i>Aspergillus niger</i>	67
IV.3.16. <i>Aspergillus fumigatus</i>	68
IV.3.17. <i>Penicellium solitum</i>	69
IV. 4. Test d'antagoniste	70
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76

INTRODUCTION

Introduction générale

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement, mais aussi un fantastique réservoir de Microorganismes (Bactéries et champignons), en terme de diversité et de densité. En effet, un gramme de sol végétalisé contient environ 1 milliard de bactéries réparties en 5 à 25 000 espèces dont la plupart ne sont pas encore connues, ni même cultivables en laboratoire (Curtis *et al.*, 2002). Ainsi, jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). Cette communautés microbienne telluriques jouent un rôle clé et influencent un grand nombre de processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith et Read, 2008 ; Sprent, 2001), les cycles biogéochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). De plus, elle exerce également des effets bénéfiques ou délétères sur la croissance et la santé des plantes.

La rhizosphère, définie comme le volume de sol soumis à l'influence de la racine, est une zone d'intense activité microbienne. En effet, la plante, via les exsudats racinaires, met à disposition de la microflore des substrats, sucres et acides aminés, qui favorisent le développement des microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou bénéfiques. Les interactions complexes entre ces populations microbiennes et le sol déterminent la santé du sol. L'impact de ces microorganismes sur la croissance et la santé des plantes est encore mal compris.

Le manque de connaissance des champignons microscopiques en Algérie été la raison pour laquelle cette biodiversité fongique fortement active dans la nature, est restée négligée dans les études biologiques. Donc, il n'existe pas de données scientifiques significatives sur ces microorganismes.

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Cardon et Gage, 2006 ; Kent et Triplett, 2002). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue comme les champignons commensaux, certains sont favorables aux plantes, c'est le cas des champignons mycorhizes. Tandis que d'autres ont des effets délétères sur les plantes, connus sous le nom des champignons parasites ou phytopathogènes.

La majorité des maladies de plantes sont causées par ce genre des champignons telluriques, largement distribuées dans le sol, provoquant les pourritures de cultures aussi ils endommagent de nombreuses plantes d'ordre forestier, fruitier ou ornementale, dans les forêts, les champs agricoles ou les pépinières qui ne respectent pas les mesures sanitaires. À l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. Entres autres les fusarioses qui affectent diverses cultures: des lentilles (Belabid *et al.*, 2004), du pois chiche (Bouregghda et Bouzned, 2009) et le palmier dattier (Sabaou *et al.*, 1983).

Ces espèces fongiques qui vivent en se développant au contact des agglomérats terreux ou dans les interstices caverneux du sol sont, morphologiquement ou biologiquement structurés en fonction même de la nature du milieu auquel ils sont soumis. La survivance des espèces fongiques parasites dans le sol se manifeste en outre par la production d'organes particulièrement adaptés tels des enkystements mycéliens ou clamydospores, des nodules mycéliens ou sclérotés, des cordons ou rhizomorphes provenant du rassemblement des hyphes (Viennot-Bourgin, 1970). D'après Tschén (1985), c'est une raison pour laquelle ces espèces telluriques sont difficiles à contrôler. De plus, leurs processus d'infection est rapide, soit à travers le sol par voie racinaire, l'eau d'irrigation, ...

A cet égard, et dans un but d'approfondir nos connaissances sur les champignons telluriques associées à la mortalité des jeunes plantules dans les pépinières algérienne, une étude a été réalisé, et qui vise à :

- Inventorier la mycoflore fongiques associées aux trois pépinières de la wilaya de Tlemcen ;
- Identifier et caractériser les espèces fongiques isolées ;
- Et enfin, de mettre en évidence, les propriétés antagonistes de quelques isolats de *Trichoderma sp.* sur les espèces du genre *Pythium sp.* et celles de *Diplodia sp.*

Pour cela, nous avons conçu notre travail sur deux parties distinctes, avec une introduction générale, une conclusion et quelques perspectives :

La première partie est une analyse bibliographique répartie en deux chapitres : Le premier comprend généralités sur les endophytes fongiques, leurs biodiversités, mode de reproduction et l'interaction qu'ils exercent avec la plante hôte. Alors que le deuxième chapitre traite les pépinières ; classification et description. Il est ensuite complété par quelques exemples des maladies phytopathogènes les plus rencontrées (La fusariose et la fonte de semis).

La deuxième partie dite expérimentale, est divisée en deux chapitres : le premier consacré au matériel et méthodes. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette étude avec discussion, ont été regroupés dans le quatrième chapitre.

Le document s'achève par la présentation des références bibliographiques et annexes.

CHAPITRE I

LES ENDOPHYTES FONGIQUES

CHAPITRE I

LES ENDOPHYTES FONGIQUES

I.1. Les maladies phytopathogènes

Chez les plantes il existe à l'état normal un équilibre dans l'accomplissement des différentes fonctions végétatives ou reproductrices ; leurs actions coordonnées aboutissent, suivant un rythme régulier, à faire parcourir à la plante son cycle habituel. Ces fonctions sont perturbées quand ils sont touchés par des organismes vivants pathogènes ou par certains facteurs environnementaux. Quand une plante souffre, nous l'appelons malade, à savoir qu'il est à «mal-aise». Plusieurs auteurs ont songé de donner des différentes définitions des «maladies des plantes» qui très souvent se complètent les unes aux autres : En 1940 « American phytopathologie Society » a défini une maladie chez la plante comme un écart par rapport à un fonctionnement normal des processus physiologiques de la durée ou l'intensité suffisante pour provoquer des perturbations ou la cessation des activités vitales. Selon Agrios (2005), Lorsque la capacité des cellules, ou l'une des parties de la plante responsable d'une ou à plusieurs fonctions essentielles est entravé soit par un organisme pathogène ou par un facteur environnemental négatif, les activités des cellules sont rompues, modifiées ou inhibées, les cellules dysfonctionnement ou mourir, et la plante devient malade.

Pour Walker (1950) et Sigh (2007), la maladie peut être considérée comme un phénomène de nature réactionnelle, déclenché sous l'effet d'un facteur quelconque, défavorable à la vie de la plante, se produit à la suite de changements anormaux dans la forme, la physiologie, l'intégrité ou le comportement de la plante. Ce processus physiologique préjudiciable, causé par l'irritation continue d'un facteur causal primaire, exposé par l'activité cellulaire anormale et exprimée en état pathologique caractéristiques appelées symptômes (Westcott, 1950). Elle a pour origine la cellule elle-même, considérée dans son fonctionnement intime ; lorsque les systèmes compensateurs deviennent incapables de maintenir les équilibres existant naturellement entre les différents phénomènes dont elle est le siège, il en résulte des variations anormales et néfastes des constantes protoplasmiques et les fonctions peuvent être soit suspendues, soit exagérées, soit enfin déviées de leur sens habituel (Roger, 1951). Vis-à-vis de la plante, doit être considérée comme pathologique toute cause ou toute influence empêchant ou seulement gênant l'exercice de ses fonctions naturelles.

Au départ, les plantes réagissent aux agents pathogènes, en particulier sur le site de l'infection. Plus tard, la réaction devient plus répandue et les changements histologiques ont lieu. De tels changements sont exprimés sous forme de différents types de symptômes de la maladie qui peut être visualisé de manière macroscopique. À la suite de la maladie, la croissance des plantes en réduit, déformé ou meurt, même la plante (Singh, 2007).

I.2. Les champignons endophytes

Les différentes populations microbiennes vivent dans le sol en communautés, et se comportent en parasites, en symbiotes ou en saprophytes. En présence de végétaux, ces populations deviennent importantes surtout au niveau de l'interface sol-racine où elles sont attirées par les exsudats racinaires plus disponibles dans la rhizosphère que dans les autres parties du sol éloignées des racines. En effet, le rhizoplan et la rhizosphère constituant l'interface d'échanges entre le végétal et le milieu environnant, conditionnent, dans une certaine mesure, la croissance et l'état sanitaire de l'espèce végétale. De fortes populations de bactéries et de champignons colonisent les racines des cellules saines corticales épidermiques et externes, mais seulement un nombre réduit d'organismes peut s'introduire dans la pièce intérieure du cortex des racines (Bazin *et al.*, 1990).

Les champignons ce sont des organismes eucaryotes à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994). Leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Ces organismes sont dépourvus de chlorophylle et sont tous hétérotrophes (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002).

Le mot moisissure est aussi utilisé par plusieurs auteurs y compris (Kendrick 2002) pour définir les champignons microscopiques. Ces derniers sont des organismes vivants constitués de filaments et de cellules spécialisées productrices de spores. Le terme «moisissure» fait référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse. Tout comme les animaux et les plantes, les moisissures sont des eucaryotes, leur matériel génétique est confiné à l'intérieur d'un noyau. Elles diffèrent des autres eucaryotes de par la présence de cellulose et de chitine dans leur paroi. Les moisissures, contrairement aux plantes, sont dépourvues de chlorophylle. Elles sont généralement non mobiles. Les champignons constituent le 5e groupe du règne des vivants, celui des mycètes (Marie.J, 2015)

L'origine étymologique du mot «*endophyte*» provient du grec «*endo*» qui signifie «*dedans* » et «*phyton*» «*plante* » = à l'intérieur de la plante. L'usage de ce terme est aussi large que sa définition, comme le spectre des hôtes ainsi que les organismes qui les habitent (Schulz et Boyle, 2006). Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par Debary en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus des végétaux, des tiges et des feuilles (Wilson, 1995). Le même terme a été utilisé par (Petrini 1991), pour inclure tous les microorganismes qui habitent les tissus vivants des plantes, sans causer des maladies pendant une période de temps. De sa part, (Sieber 2002) a défini les endophytes comme des habitants de racines de plantes apparemment saines et fonctionnelles.

L'endophytisme des champignons est une interaction biologique qui se caractérise par le fait, pour un individu issu du règne «*Fungi*», de coloniser l'intérieur d'un organisme végétal, de manière asymptomatique. Il est parfois retrouvé dans la littérature, que l'endophytisme donne systématiquement lieu à une interaction biologique mutuellement

positive ou à défaut, au moins non délétère pour la plante hôte, auquel cas cette interaction pourrait être qualifiée de mutualisme. À la différence de la symbiose, l'endophytisme n'est pas une interaction systématiquement durable (Andeol et Benjamin., 2016)

On a longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt; cependant, dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (Moricca et Ragazzi, 2008) qu'on considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides...etc. (Maheshwari, 2006).

I.3. Biodiversité des champignons endophytes

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senal *et al.*, 1993; Kirk *et al.*, 2001). Le règne des champignons regroupe entre 3,5 et 5,1 millions d'espèces selon une estimation datant de 2005 (O'Brien *et al.*, 2005). Les champignons constituent un règne à part entière, au même titre que les animaux, les plantes, les protistes, les archéobactéries et les eubactéries (Fig. 1) Contrairement aux végétaux, les champignons sont hétérotrophes. Ils sont incapables de synthétiser de la matière organique à partir de substances inorganiques. Ils sont obligés de recycler des composés organiques préexistants comme source d'énergie et de carbone (Andéol et Benjamin, 2016).

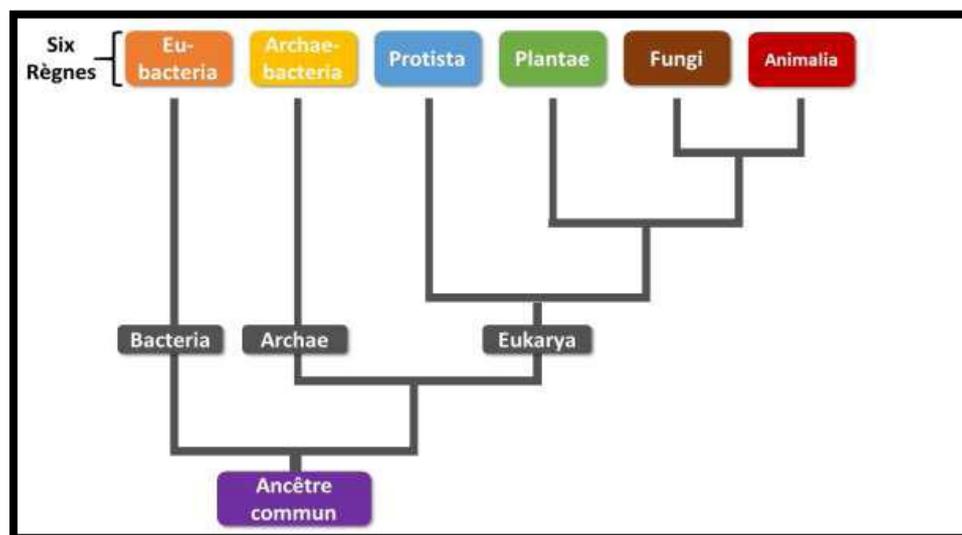


Figure 1 : Classification phylogénétique du monde vivant (Andéol et Benjamin, 2016).

La diversité des espèces, la fréquence et l'abondance des endophytes dépendent des conditions climatiques et édaphiques et de l'hétérogénéité des habitats et des niches occupées par leurs hôtes (Sieber, 2002). Beaucoup d'endophytes colonisent des organes spécifiques, alors que d'autres sont seulement trouvés dans les racines ou dans les organes de surface, mais dans tous les cas, chaque organe de l'hôte peut être colonisé (Schulz et Boyle, 2005).

Les variations géographiques sont les facteurs qui contribuent le plus souvent à la diversité des champignons endophytes. Ces derniers s'ils sont isolés d'un même hôte, tendent à changer d'une zone géographique à une autre (Collado *et al.*, 1999). Dans un contexte géoclimatique, les endophytes semblent être plus divers dans les zones tropicales que dans les zones tempérées ou froides du monde (Fisher *et al.*, 1995 ; Arnold et Lutzoni, 2007). L'âge de la plante hôte influe aussi la diversité des champignons endophytes ; par exemple, il apparaît que les plantes âgées hébergent plus d'endophytes dans leurs tissus que les plantes jeunes (Arnold *et al.*, 2003).

I.4. Propriétés principales des Champignons endophytes:

Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium (Gonçalves *et al.*, 2005). Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 µm et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Fig. 2) (Girbardt, 1957; Trinci, 1969; Gregory, 1984 ; Bartnicki, 2002).

Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules (Tab. 01) (Justa- Schuch *et al.*, 2010). Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. (Chabasse *et al.*, 2002).

Tableau 01: Propriétés principales des Champignons (Delarras, 2007).

Formes	- Structure filamenteuse, hyphes ou filaments à paroi souvent composées de chitine, septes ou phones - Espèces dimorphiques avec une forme levure qui se multiplie par bourgeonnement ou scissiparité
Croissance des hyphes	Croissance strictement apicale, puis ramification de l'hyphe conduisant à la formation d'un mycélium ou thalle
Métabolisme générale	- Chimiohétérotrophes - Source de carbone et d'énergie : molécules carbonés organiques - Suivant les espèces, peuvent lyser les polymères complexes grâce à des enzymes extracellulaires : cellulose, amidon, pectines, mais aussi des protéines et des lipides
Mode de reproduction	Sexuée ou asexuée par l'intermédiaire des spores
Habitats naturels et autres	- Air, eaux, sols ...vivent en saprophytes ou parasites - Champignons pathogène pour l'homme - Matières premières alimentaires, aliment... pouvant être contaminés par des moisissures toxigènes

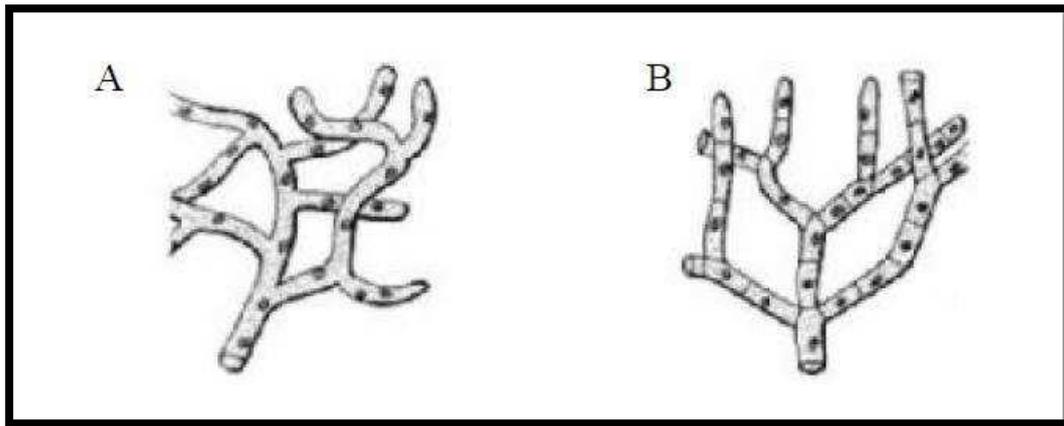


Figure 02 : Structure d'une hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A) : hyphe coenocytique ; (B) : hyphe cloisonnée (Chabasse *et al.*, 2002).

I.5. Mode de reproduction et de transmission :

La reproduction des endophytes fongiques se réalise par sporulation qui intervient selon deux modes:

I.5.1. La reproduction asexuée (Végétative) : Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (Selosse et Schardl, 2007); ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (Saikkonen *et al.*, 2004a). Ceci est communément appelé transmission verticale (Saikkonen *et al.*, 2004b). Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (Saikkonen *et al.*, 2010). De plus, il existe d'autres modes de transmission des spores, comme par exemple les écoulements d'eau d'irrigation ou de pluie dans les pépinières, c'est le cas des espèces du genre *Phytophthora*. D'autres espèces sont transmises par le déplacement de matériel végétal. Le vent et les insectes sont aussi considérés parmi les principaux disséminateurs des spores et des conidies.

I.5.2. La reproduction sexuée : Le second se fait via les spores (Clay, 1986) ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement (Saikkonen *et al.*, 2004a), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (Saikkonen *et al.*, 2004b) pour infecter d'autres plantes (Arnold *et al.*, 2003; Gallery *et al.*, 2007).

Étant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (Saikkonen *et al.*, 2004a). Pour les endophytes non systémiques des plantes ligneuses, la transmission se fait horizontalement provoquant généralement des infections locales très limitées, mais ils

peuvent être trouvés aussi dans les graines et les glands (Wilson et Carroll, 1994) mais la transmission verticale est rare (Saikkonen *et al.*, 1998).

I.6. Interaction plante hôte – champignon endophytes

Une interaction biotique désigne un processus impliquant des échanges ou relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments (espèces, groupes..) dans un écosystème (relations interspécifiques), ou entre deux ou plusieurs individus d'une même population (relations intraspécifiques). Il existe plusieurs types de relations rendant les individus plus ou moins interdépendants (Mitchel *et al.*, 2006) dont les principales sont : la compétition, la prédation, neutralisme, commensalisme, coopération, mutualisme et le parasitisme.

Les microorganismes endophytes établissent une relation plus étroite avec leurs hôtes et sont davantage protégés contre les différents types de stress biotiques et abiotiques et de ce fait, peuvent interagir plus longtemps avec la plante (Hallmann *et al.*, 1997). Les effets de cette interaction peuvent se manifester par une promotion de la croissance, une protection via l'induction de l'ISR (Induced Systemic Resistance) ou une résistance systémique induite et/ou une action antagoniste directe sur les agents pathogènes (He *et al.*, 2009).

Afin d'assurer la pérennité de sa propre espèce, le parasite est amené à subir des transformations, à adopter des voies évolutives parfois extrêmement complexe : c'est le cycle parasitaire (Fig. 3).

N'importe quelle interaction plante-champignon endophyte est précédée par un contact physique entre la plante et le champignon, suivie par plusieurs barrières physiques et chimiques qui doivent être surmontées pour établir une association réussie (Kusari et Spiteller, 2012).

D'après (Kusari *et al.* 2014), l'interaction entre le champignon et la plante hôte est caractérisée par un équilibre entre la virulence fongique et les défenses de l'hôte. Des réseaux biologiques relient les endophytes fongiques, les bactéries, les virus, les endosymbionts et les plantes hôtes associés sous divers facteurs biotiques comme les agents pathogènes, les agresseurs et les facteurs abiotiques tels que les précurseurs des plantes /endophytes, les métabolites secondaires, le pH, la lumière et la température.

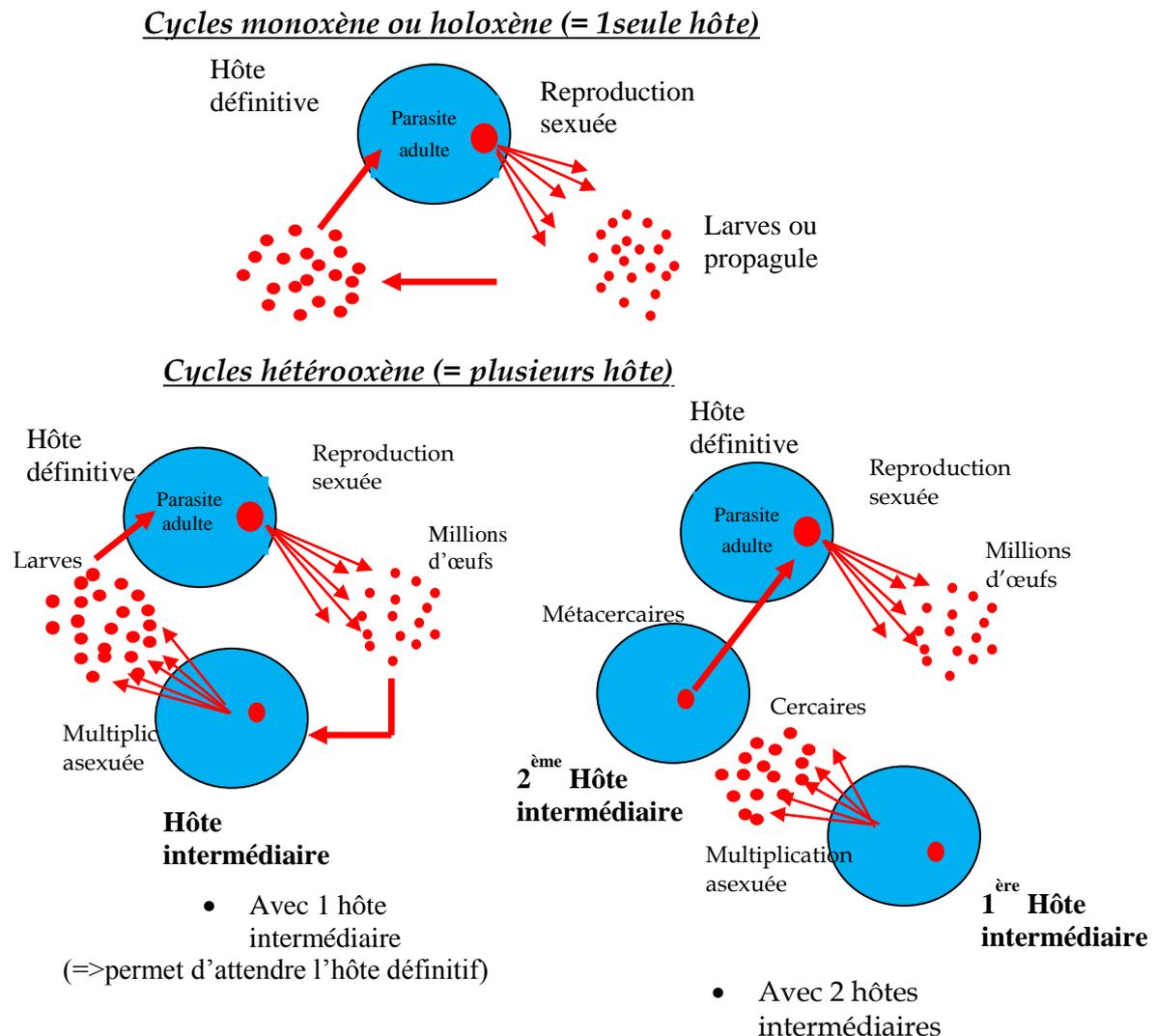


Figure 03 : Caractérisation des différents types de cycles pour les parasites [Web 1].

I.6.1. Les facteurs de pathogénicité :

En générale, la virulence correspond à la pathogénicité liée à l'infection parasitaire (Noir et Lashermes, 2000). De plus, la pathogénicité liée à la charge parasitaire et à la capacité des parasites à contourner les défenses de l'hôte.

Selon Lepoivre (2003), les principaux facteurs de pathogénèse liés aux étapes d'adhérence et de pénétration, et généralement les fondements biochimiques de la pathogénèse reposent sur : l'action des toxines et des enzymes hydrolytiques.

A. Les toxines : Certains champignons phytopathogènes sont connus pour leur aptitude à synthétiser certaines toxines comme par exemple les espèces du genre *Fusarium*. D'après Gaumann (1958), Tzeng et Devay (1985), ces espèces sont capables de produire chez les plantes hôtes les lycomarasmies et les acides fusariques. Ces toxines augmentent la

perméabilité cellulaire et provoquent une importante transpiration des plantes atteintes (Corbaz, 1990).

B. Les enzymes hydrolytiques : Généralement la paroi des cellules végétales est formée essentiellement de substances pecto-cellulosiques, le champignon parasite s'attaque à cette dernière en utilisant ces deux enzymes : La pectine méthyle estérase (PME) qui hydrolyse les liaisons glucidiques.

I.6.2. Les métabolites secondaires des champignons endophytes

Un métabolite secondaire est généralement défini par opposition à un métabolite primaire qui intervient dans le fonctionnement vital d'un organisme. Les acides nucléiques et les acides aminés sont deux exemples de métabolites primaires. Les métabolites secondaires ne sont pas impliqués de façon directe dans le développement ou la reproduction de l'organisme, mais procurent à l'organisme un avantage généralement écologique. Si certaines de ces molécules peuvent avoir un intérêt thérapeutique pour l'homme, le rôle des métabolites secondaires chez le champignon endophytes est diversifié, on y retrouve par exemple des toxines et des phytohormones.

Ces molécules ne sont pas synthétisées pendant tout le cycle biologique des microorganismes mais généralement en fin de croissance active .cette synthèse s'effectue lorsqu' un ensemble de conditions interne (concentration des précurseurs, synthèse des enzymes) et externes (concentrations résiduelles des nutriments, température, pH....) sont remplies.

Les métabolites secondaires des champignons endophytes sont très variés. Les classes chimiques les plus retrouvées sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides et les terpènes (Spatafora, 2015 ; Spiteller 2015). Les terpènes sont synthétisés à partir du mévalonate, les polycétides ont pour origine le malonyl CoA (malonyl Coenzyme A), les alcaloïdes et les peptides utilisent des acides aminés. Les principaux systèmes enzymatiques producteurs de métabolites secondaires des champignons endophytes sont donc les polycétides synthases (PKS pour polyketide synthase en anglais), les non ribosomal peptid synthases (NRPS), et les enzymes responsables de la synthèse d'alcaloïdes indoliques (Spatafora, 2015, Keller *et al.*, 2005).

I.7. Mécanismes de l'antagonisme entre les champignons

Le terme antagonisme est souvent pris dans un sens très large, notamment dans les ouvrages traitant de lutte biologique. Nous utilisons ici dans un sens beaucoup plus restreint, pour désigner la situation où un organisme exerce un effet inhibiteur sur un autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer. L'antagonisme présente donc une étape bien définie entre l'amensalisme (situation - 0) et la compétition (situation où, comme nous le verrons, les deux partenaires sont en difficulté) (Davet, 1996). Beaucoup d'antagonistes existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. L'homme a toujours essayé d'augmenter l'efficacité des antagonistes à travers

l'introduction de nouvelles population de ces microorganismes aux champignons où elle n'existe pas, ou à travers la stimulation de leur croissance en apportant des amendements au sol. Dans les deux cas, le résultat est un accroissement des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes. Bien que certains cas de lutte biologique efficace aient été enregistrés, le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre, les résultats aux champignons ne sont pas d'habitude d'un succès particulier (Nasraoui, 2006).

Parmi les champignons antagonistes les plus communs, il y a des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium*, particulièrement *T.harzianum* et *G.virens*, qui sont efficaces contre plusieurs pathogènes comme des espèces de *Phytophthora*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Biscognauxia* et *Fusarium* (Bouneghou, 2011 ; et Smahi, 2013).

I.7.1. Les types d'antagonisme

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou une antibiose (Soufiane, 1998).

A. Compétition

Il s'agit de la compétition de deux ou plusieurs espèces pour l'utilisation d'une même ressource qui peut être de l'espace ou de la nourriture. Une population d'une espèce qui possède un avantage compétitif dans l'appropriation d'une ressource, s'assure du contrôle de cette ressource et élimine la population d'autre espèce appartenant au même peuplement (Lévêque et Claud, 2001).

B. L'hyperparasitisme

Le parasitisme est une forme de relation dans laquelle un organisme (le parasite) tire de l'hôte les parasites détournent à leur profit une partie des ressources normalement destinée à la croissance, la survie et la reproduction des hôtes, bien qu'ils soient le plus souvent invisible, les parasites n'en sont pas moins omniprésents. L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel (Gagné, 1984). On peut mentionner chez les champignons (mycoparasitisme) ou un champignon est parasité par un autre champignon (chet, 1990)

C. Production de sidérophores

Les sidérophores sont des molécules extracellulaires qui possèdent une grande affinité pour le fer ferrique (Fe^{+3}). Ce dernier est présent dans le sol à faible concentration sous forme de $Fe(OH)_3$. Les champignons et toutes les bactéries aérobique et anaérobique facultatives produisent une grande variété de sidérophores (Lynch, 1990 et Kapulnik, 1996).

Le phénomène d'antagonisme peut se manifeste aussi soit par une inhibition de la germination des spores des champignons. Ce phénomènes est connu sou le nom de mycostase soit par une lyse du mycélium des champignons c'est la mycolyse, ou par lyse des bactéries

(bactériolyse) qui est un phénomène peut fréquent qu'on va s'intéresser plus particulièrement à ces phénomènes à cause de leur importance dans le domaine de la lutte contre les champignons phytopathogènes (Soufiane, 1998).

D. L'antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres provoquent la distorsion des hyphes fongiques, modifiant l'aspect des colonies ou entraînant le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité membranaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez l'agent de lutte biologique ; ceci est lié à l'adoption fréquente de protocoles de sélection *in vitro* de souches antagonistes qui favorisent ce mécanisme et à la simplicité expérimentale de telles études. Cependant, la production d'antibiotique dans un milieu de culture ne signifie pas automatiquement que l'antibiotique est synthétisé *in-vivo*, et même si c'est le cas, qu'il joue un rôle dans cette protection *in-vivo*. Par contre, l'antibiose n'a jamais été mise en évidence chez les levures antagonistes vis-à-vis de phytopathogènes (Lepoivre, 2003).

I.8. Le sol et le mycètes

A. Définition : Plusieurs définitions de sol ont été adoptées par des scientifiques :

Selon Joffe (1949) : « Le sol est un corps naturel de constitution minérale et organique, différencié en horizons d'épaisseur variable qui diffère des matériaux sous-jacents par sa morphologie, ses propriétés physiques et chimiques, sa composition et ses caractéristiques biologiques ».

D'après Davet (1996), le sol est un des compartiments essentiels de l'écosystème agissant comme contrôleur et révélateur de nombreux processus écologiques par ses caractères physiques, chimiques et biologiques à court et à long terme.

Les agronomes le considèrent comme un support dans lequel la plante prend appui, les racines y puisant eau et les éléments minéraux indispensables à la croissance de la plante (Claud-Michel, 2005).

C'est un milieu minéral poreux : gaz et liquides peuvent y circuler. On y distingue donc trois compartiments physiques : solide, liquide, gazeux mais le sol n'est pas seulement un substrat physico-chimique, c'est aussi un support de vie, créatrice de matière organique (Davet, 1996).

B. La composition du sol

On peut considérer le sol comme un système composé de quatre compartiments ; les trois phases, solide, liquide et gazeuse, et les organismes vivants. Ces compartiments sont en

interaction permanente par des échanges de matière et d'énergie dus à plusieurs phénomènes physiques, chimiques et biologiques (Tab. 02) (Calvet, 2003).

Tableau 02 : Les constituants organiques du sol (Calvet, 2003).

Constituants vivants	Constituants morts
Tissus végétaux	Matière organique Particulièr
Corps microbiens vivants	Matière organique Moléculaire
Animaux du sol	Matière organique inerte

C. Sol -Mycètes :

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres (Anderson et Martens, 2013; Bugmann, 1996; Garrido-Jurado *et al.*, 2011 ; Moallaei *et al.*, 2006; Sun et Liu ; 2008). Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000; Smith *et al.*, 2000; Kachuei *et al.*, 2012)

L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Bååth et Söderström, 1980 ; Schnürer *et al.*, 1985) Certaines espèces fongiques se retrouvent sur la plupart des terrains, comme les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc. On y retrouve aussi communément des Oomycetes et des Chytridiomycetes (Boiron, 1996).

Dans le sol, la plupart des champignons phytopathogènes ne persistent généralement pas sous forme mycélienne active, mais à l'état passif sous forme d'organes adaptés à la conservation tels que des sclérotés, des chlamydospores ou des oospores. Ce phénomène, dénommé fongistase, est lié à la présence dans le sol de substances inhibitrices de la germination des organes fongiques ou au manque de substrats nutritifs indispensables au développement des champignons. Si l'équilibre biologique du sol est modifié, en particulier par l'apport de substances organiques, les organes de conservation des champignons germent, mais le mycélium ainsi formé est ensuite plus ou moins rapidement lysé après avoir donné naissance ou non à de nouveaux organes de conservation.

Cette levée de fongistase se produit en particulier au voisinage des parties souterraines des plantes. Dans cette zone, les champignons phytopathogènes entrent en activité et, s'ils se trouvent en présence de plantes avec lesquelles ils ne peuvent pas établir de relations durables,

ils sont détruits ou entrent à nouveau sous forme de conservation. Par contre, s'ils sont susceptibles de vivre aux dépens de ces plantes, ils poursuivent leur développement saprophytique puis parasitaire

Les champignons pathogènes dans le sol peuvent également attaquer les semences en cours de germination ou le collet des plantes. Leur activité souterraine est alors conditionnée de façon semblable par les modifications qui se produisent dans la spermosphère et autour de la base de la tige. Il faut donc considérer les phénomènes rhizosphériques dans un sens large et pas seulement au niveau des racines elles-mêmes (Louvkt, 1975).

CHAPITRE II LES PEPINIERES: DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES

CHAPITRE II

LES PEPINIÈRES: DESCRIPTION

ET

CARACTERISTIQUES

II.1. Définition de la pépinière :

Etymologiquement, le mot « pépinière » dérive du mot « pépin » : graine de certains fruits. En effet, à l'origine, les pépinières étaient les lieux où l'on semait les graines de certains arbres fruitiers ou forestiers

Les pépinières sont des espaces aménagés où on peut produire des semis cultivés pour le but de plantation dans des conditions favorables (FAO, 1989). En agriculture, sylviculture ou arboriculture, une pépinière est un champ ou une parcelle de terre réservée à la multiplication des plantes ligneuses principalement (arbres, arbustes), mais aussi de plantes vivaces, et à la culture jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade où elles peuvent être transplantés ou commercialisées.

Pour satisfaire les besoins des utilisateurs, les pépinières produisent des quantités suffisantes de semi cultivés de haute qualité qui se caractérisent par une meilleure survie que les graines semis directement dans les champs ou par régénération naturelle (Ratha *et al.*, 2014).

L'obtention de ces résultats nécessite, le bon choix de l'emplacement de pépinière qui est une question importante à considérer, car il influence l'effort qui sera nécessaire pour le maintenir.

Selon Mbora *et al.* (2008), certains des facteurs à considérer dans le choix de l'endroit de pépinière comprennent les éléments suivants :

- le site de pépinière doit être près d'une rivière ou étangs pour assurer la disponibilité de l'eau.
- les sols et les autres matériaux nécessaires pour la plantation doivent être disponible facilement.
- le site doit être protégé des vents forts, et doit recevoir le soleil.
- le site doit être accessible toute l'année pour que le personnel de pépinière puisse gérer les plants et transporter les semis vers les sites de plantation.

II.2. Type de pépinière :

Les différents types de pépinières peuvent être classés en fonction de divers critères :

II.2.1. Classification selon le type de plante cultivé :

II.2.1.1. Pépinière des plantes fruitières

Ce sont les pépinières spécialisées dans la culture des espèces fruitières. Dans ce genre de pépinière, la reproduction végétative est la plus utilisée, dont il est plus facile et prend moins de temps pour fournir des plantes par rapport à la reproduction sexuée. Ce type de multiplication nécessite des techniques spéciales ainsi que l'entretien. Les espèces utilisées sont : Amandier, Goyave, L'olivier, Oranger, Citronnier,... etc. et tous ces derniers, sont multipliés par des moyens végétatifs (Fig. 4).

Les pépinières fruitières sont essentielles pour la production de greffons ainsi que les plantes mères de greffons et de porte-greffes.



Figure 04: Pépinière de plantes fruitières (Web 1)

II.2.1.2. Pépinières de plantes ornementales :

Les cultures ornementales et floricoles sont nombreuses et se multiplient par voie végétative.

Ce type de pépinière est très populaire surtout dans l'utilisation esthétique ; par conséquent les différents types de plantes avec différentes variétés sont apparus sur le marché. On peut trouver dans cette catégorie de pépinière, la floriculture (production des fleurs en plein air ou sous abris, en pleine terre ou hors sol).

II.2.1.3. Pépinières de plantes médicinales et aromatiques :

Ce sont les pépinières spécialisés dans la culture des plantes médicinales et/ou aromatiques. Plusieurs espèces ont été utilisées dans ce genre de pépinières, citons : La lavande, L'armoise annuelle, La sauge, La camomille allemande, L'ortie....

Les huiles essentielles présentes dans ces plantes, leur arôme et leur vertu médicinale apportent une valeur de santé et un sens esthétique.

II.2.1.4. Pépinière de plantes forestières :

La sauvegarde des arbres forestiers est un objectif important, car généralement, elles sont utilisées dans un reboisement dans les forêts. Les espèces forestières sont essentielles à la production des gommés, du miel, du bois et du combustible.

Les pépinières forestières peuvent être investies en privé et en collaboration avec le service des forêts pour sauver ces arbres et lutter leur disparition.

II.2.3. Les maladies phytopathogènes des pépinières :

II.2.3.1. Facteurs favorables à l'infestation des maladies

A. Facteurs abiotiques :

Les agents non vivants sont certainement considérés comme des agents primaires de la maladie ; ils irritent continuellement les cellules et les tissus végétaux ; ils entravent les processus physiologiques de la plante et évoquent des réponses pathologiques qui se manifestent plus tard sous forme de symptômes et caractéristiques des différentes maladies. Les agents abiotiques des maladies des plantes sont appelés non infectieuses et les maladies qu'elles provoquent sont appelées maladies non infectieuses. Parmi eux : le stress hydrique, sécheresse,...etc.

B. Micro-organismes :

Les micro-organismes obtiennent leur nourriture soit en se décomposant les restes végétaux et animaux morts (saprophytes) ou en attaquant des plantes et des animaux vivants (parasites). Afin d'obtenir des nutriments, les organismes parasites excrètent des enzymes ou des toxines et tuent les cellules des tissus de la plante hôte. Ces toxines tuent ou endommagent la plante entière ou une partie de celui-ci, et provoquent des perturbations considérables dans ses processus métaboliques normaux.

II.2.3.2. La fusariose :

A. Généralités

Parmi les champignons telluriques, les plus commun dans les pépinières, ceux appartenant au genre *Fusarium* sont les plus fréquents et les plus dommageables pour les cultures (Nelson *et al.*, 1981 ; Bounaga, 1985 et Messiaen *et al.*, 1991).

Le genre *Fusarium* qui a été tout d'abord introduit par Link en 1809 comprend de nombreux champignons phytopathogènes (Booth, 1984). Ceux-ci appartiennent à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Hypocréales et à la famille des Nectriaceae. Ces champignons eucaryotes tirent leur nom du latin «*fusus*» qui veut dire spores en forme de fuseau. Ce sont des organismes hétérotrophes dont la structure est organisée autour du thalle (partie non mobile) composée de structures filamenteuses appelées hyphes. À partir de ce thalle, se différencie le stade reproductif anamorphe (asexué) du stade reproductif téléomorphe (sexué) à l'origine du cycle de vie de ces champignons. Généralement, ce genre comprend des champignons microscopiques saprophytes capables de coloniser de nombreux végétaux (Liddell *et al.*, 1991).

Selon Benhamou *et al.* (1997), les *Fusarium* sont considéré parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées.

Le genre contient plus que 20 espèces. Les plus connus sont : *Fusarium solani* , *Fusarium oxysporum* , *Fusarium chlamydosporum* , *Fusarium roseum*, et *Fusarium subglutinans* (Hoog *et al.*, 2000). Selon Mayer (1967), de toutes ces espèces, c'est l'espèce *F. oxysporum* qui est la plus répandu, du fait qu'il est capable de retrouvé dans divers types de sol.

B. Taxonomie

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Ascomycota, à la classe des *Sordariomycetes* et à l'ordre des Hypocreales (Tab. 03) (Anonyme, 2014). Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxonomie complexe. Par exemple, *Fusarium solani* et *Fusarium verticillioides* possèdent des formes sexuées (téléomorphes) appartenant respectivement aux genres *Nectria* ou *Gibberella* alors que *Fusarium oxysporum* n'est actuellement connu que sous sa forme asexuée (anamorphe). La taxonomie du genre autrefois basée sur les aspects morphologiques ou l'adaptation à un substrat particulier, a été revue en profondeur avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire. Les données récentes issues de ces travaux montrent que les anciennes taxonomies sont en partie erronées. Ceci s'est traduit par le rattachement d'espèces des genres

Acremonium ou *Cylindrocarpon* au sein du genre *Fusarium* telles que *Acremonium falciforme* ou *Cylindrocarpon lichenicola* (Summerbell *et al.*, 2002) mais aussi par la notion de complexes d'espèces non différenciables morphologiquement (espèces cryptiques).

Tableau 03 : Représentation taxonomique du genre *Fusarium* (Link et Gray, 1821)

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Fusarium</i>

C. Phylogénie

Le genre *Fusarium* représente la forme anamorphe ou asexuée (infection par les macroconidies) et le genre *Gibberella* représente la forme téléomorphe ou sexuée du champignon (infection par les ascospores). Chez plusieurs espèces de ce genre, le stade sexué demeure inconnu. D'après Burgess *et al.*, (1994), la présence de phialides et des cellules conidiogènes sont les principaux caractéristiques distinctifs des *Fusarium* et qui donnent naissance aux micro- et macroconidies fusiformes et cloisonnées. De plus, la détermination des espèces de ce genre se base aussi sur d'autres critères biologiques et moléculaires. (Ben Salem, 2015).

D. Morphologie

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (Larone, 1995)

De plus elles sont caractérisées par la production de conidies visqueuses, hyalines, cloisonnées, en forme de canot. Celles-ci se forment dans des structures fructifères appelées sporodochies. De plus, certaines espèces produisent d'autres types de conidies dans le mycélium aérien qu'on appelle microconidies. Selon l'espèce et l'environnement, l'une ou l'autre de ces formes (macroconidies ou microconidies) peut dominer sur un substrat naturel (Leslie *et al.*,

2007). Toutefois, des critères macroscopiques sont employés pour distinguer les espèces entres-elles.

1. Caractéristiques macroscopiques

Les caractéristiques macroscopiques sont utilisées pour l'identification des espèces du genre *Fusarium*. Celles-ci se fondent sur la couleur du mycélium sur gélose (blanc, jaune, rosé, crème etc.), la couleur de la pigmentation sécrétée par le champignon (rose, rouge, brun etc.), le type de mycélium (aérien ou rampant), l'aspect du mycélium (floconneux, duveteux ou luisant), la vitesse de croissance ainsi que l'odeur dégagée par la culture. Selon Nelson et *al.*, (1983), plusieurs espèces peuvent présenter ces mêmes caractéristiques; dans ce cas il est possible de s'orienter vers l'identification microscopique.

2. Caractéristiques microscopiques

Les caractéristiques microscopiques sont particulièrement basées sur la forme des micro- et macroconidies, la présence ou l'absence d'une de ces formes, le nombre de loges, la présence, la forme et la disposition de chlamydozoospores. Souvent, la forme des phialides (mono ou poly) peut s'avérer déterminante à l'identification (Seifert, 1996) (Fig. 05).

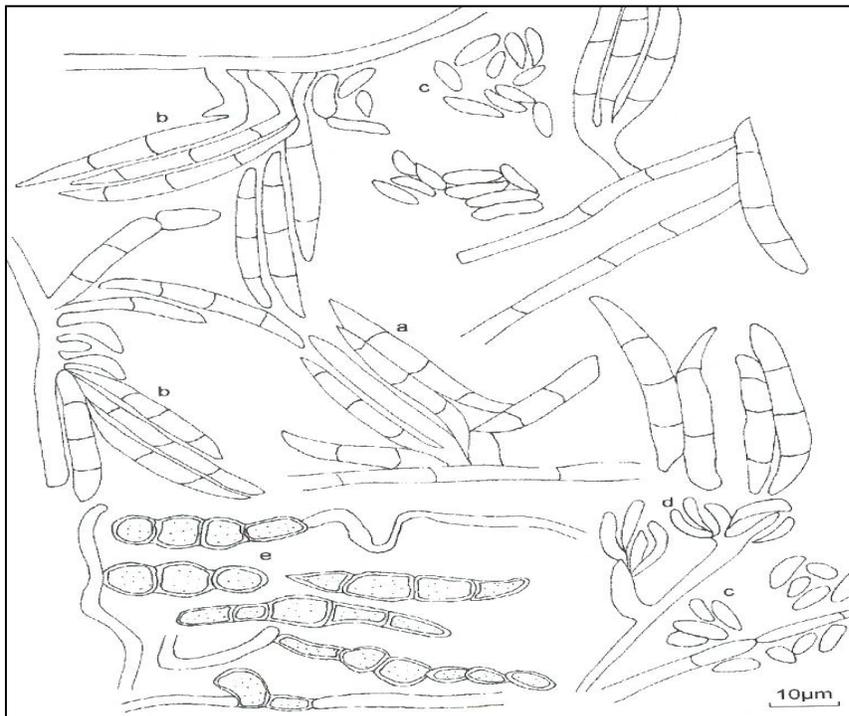


Figure 05 : *Fusarium oxysporum* : a) macronidie ; b) saporodochie; c) micronidie; d) monophialides: e) clamydospores (Seifert, 1996)

L'identification des espèces de *Fusarium* peut s'avérer difficile puisque certaines espèces telles que *F. graminearum* et *F. avenaceum* présentent des caractéristiques très semblables (Ben Salem, 2015).

E. Croissance et habitat

Fusarium roseum pousse bien sur la gélose de pomme de terre (PDA) avec une vitesse de croissance importante on donnant des colonies de couleurs allant du blanc vers le rose. Il est capable de produire des macroconidies et des microconidies, environ 4 par 14µm (Deshpande et Koppikar, 1999).

Les *Fusarium* se développent bien sur les plantes et dans le sol. Certaines espèces se trouvent dans tout type de sol, c'est le cas de *F. solani*, qui s'enregistre comme un agent pathogène sur une gamme vaste et diversifiée de plante hôte. D'autres espèces comme le *F. roseum*, pousse bien sur le maïs, l'avoine et le blé. Cette espèce aime une forte teneur en azote et peut vivre dans le sol aussi longtemps que le potassium et de phosphore restent faibles (Burgess et Liddell, 1997). Pour que les *Fusarium* se développent, il faut une humidité relative de 100 % pendant 48 à 60 heures. Les pluies d'orage constituent des situations idéales pour leur développement. Il faut aussi une température supérieure à 20 °C (Béatrice, 2001).

F. Cycle biologique

Les *Fusarium* peuvent se conserver dans le sol pendant plusieurs mois, en absence de la plante hôte sous forme de chlamydospores (Booth, 1971) ou de mycélium capable de se propager sur les débris végétaux. Des conidies se forment au niveau de coussinets roses sur les débris végétaux et à la base des tiges atteintes de Piétin (Kendall .2008). Une fois les conditions favorables sont réunies, et en contact avec l'hôte, les chlamydospores germent et les jeunes filaments pénètrent au niveau des racines. Après leur pénétration dans la cellule épidermique, le mycélium se ramifier, colonise ainsi toutes les cellules avoisinantes (El Mahdjoub, 1972).

Le mycélium peut infecter le tissu végétal sain, puis les plantes peuvent devenu infecté par leurs bouts de racine, directement, par des blessures, ou au moment de la formation des racines latérales (Agrios, 1988).

Les hyphes mycéliens progressent à l'intérieur des cellules puis colonisent le cortex, arrivé au niveau de cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème d'où il se propagera dans la tige par l'intermédiaire des micronidies aisément véhiculées par la sève dans toutes les parties de la plante.

A la surface des feuilles se forment des organes fructifères appelés sporodochies qui produisent des macronidies qui vont à leur tour contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont

transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes (El Mahdjoub, 1972) (Fig. 06).

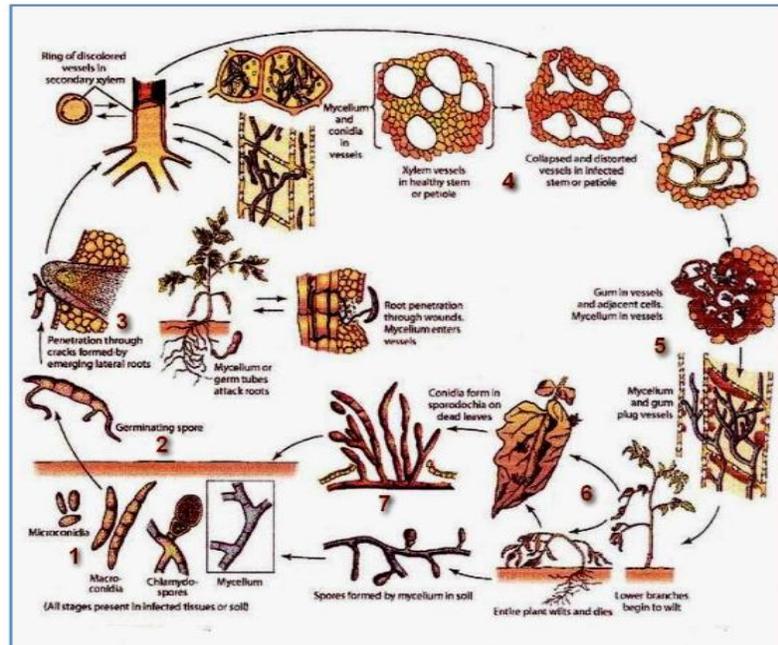


Figure 06 : Cycle biologique de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2005) : 1) Conidies, clamydospores ou mycélium vivant dans le sol ; 2) Germination des spores ; 3) Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines ; 4) Invasion des vaisseaux par les conidies et/ou mycélium ; 5) Production de gomme à l'intérieur des vaisseaux ; 6) Flétrissement et mort de la plante ; 7) sporodochies ou mycélium produisant des conidies.

G. Phytopathogénicité des espèces de *Fusarium sp.*

Les mycotoxines produites par le genre *Fusarium* constituent l'une des principales composantes de sa virulence; il s'agit de métabolites secondaires toxiques qui s'accumulent dans les grains et affectent les maillons supérieurs de la chaîne alimentaire dont la base est la céréale infectée (Walker *et al.*, 2001). Les principales mycotoxines retrouvées dans les céréales sont:

- ✓ **Le désoxynivalénol (DON), ou vomitoxine**, appartient à la famille des tricothécènes et constitue la toxine la plus présente dans les grains. Elle provoque des nausées et vomissements.
- ✓ **Le nivalénol (NIV)** appartenant aussi à la famille des tricothécènes et provoque les mêmes effets que le DON.

- ✓ **La zéaralénone (ZEA)** est une mycotoxine oestrogène, trouvée en faible quantité et provoque des problèmes de reproduction comme l'infertilité et l'avortement spontané chez le porc.

H. Effet sur la santé humaine

Depuis une vingtaine d'années, on sait que certaines espèces de *Fusarium* sont susceptibles de réaliser de graves infections opportunistes surtout chez les personnes immuno-déprimées. Les spores de *fusarium* aéroportées et inhalés, ou ingérées avec la nourriture, peuvent être une source importante de problèmes de santé (Mayayo *et al.*, 1999). Quelques espèces (*Fusarium* du groupe *roseum*) peuvent produire de puissantes toxines (mycotoxines), qu'on trouve parfois en concentrations significatives sur des grains ou des produits dérivés.

Ingérées par des animaux ou par l'homme, elles peuvent provoquer de graves intoxications alimentaires, éventuellement mortelles, avec risque cancérogène. Ces toxines peuvent affecter les systèmes circulatoire, digestif, cutané et nerveux (Hoog *et al.*, 2000). Les symptômes peuvent inclure la nausée, le vomissement, la diarrhée, la dermatite et hémorragie interne. Les spores peuvent se développer sur les yeux (première cause de kératomycose), dans les sinus, sur la peau et les ongles et sont susceptible de provoquer de la fièvre des foins et l'asthme. Ils causent fréquemment des lésions de la peau chez les patients brûlés, des mycoses des ongles, de l'otomycose, des ulcères variqueux, le mycétome, des ostéomyélites ou des infections disséminées. Les infections dues aux *Fusarium* sp. sont collectivement regroupées sous le terme de fusarioses (Anonyme, 2020).

II.2.3.3. La fonte de semis :

Il s'agit d'une maladie fongique causée par les espèces du genre *Pythium* sp. et autres champignons divers (Gupta *et al.*, 2018).

La gravité de l'attaque augmente généralement avec l'augmentation de l'humidité du sol. Le déversement peut se produire avant la germination, après la germination et lors de la piqure en dehors.

A. Les symptômes de la maladie :

La maladie se manifeste en deux phases :

- La fonte pré- émergence : dans lequel les graines germées se décomposent dans le sol et les jeunes plantules pourrissent avant la levée.
- La fonte poste- émergence :
Les semis nouvellement émergés se fanent soudainement, s'effondrent et meurent d'une pourriture molle au niveau du sol (Perrin, 1986).

B. Cycle de la maladie :

Les espèces du genre *Pythium* produit des spores mobiles qui peuvent infecter une racine de plante en quelques minutes. Ces spores germent pour produire des hyphes, des filaments tubulaires microscopiques qui constituent le corps de l'organisme.

Les hyphes poussent dans les racines, tuant les tissus végétaux au fur et à mesure de leur croissance. Le *Pythium* produit également des spores sexuelles dans les racines ou dans le sol qui résistent aux conditions environnementales défavorables telles que le séchage ou le froid. Ils peuvent survivre dans un état dormant pendant des mois ou des années. Ces spores germent et produisent des hyphes en présence d'humidité. Les hyphes pénètrent dans les racines de l'hôte et commencent le processus d'infection (Gupta *et al.*, 2018).

C. Les conditions favorables à la propagation de la maladie sont :

Plusieurs facteurs peuvent favoriser la propagation de la maladie dans les pépinières, on peut citer :

- L'intensité de semis élevée
- L'arrosage excessif (stress hydrique)
- L'utilisation de la terre avec un matériau sous-composé
- Endommagement de l'écorce des semis tendres.

II.2.3.4. Les méthodes de lutte utilisées :**A. La lutte chimique :****A.1. Lutte chimique conseillée :**

Dans ce cas, il y a l'utilisation réfléchie de pesticides à large spectre d'action, en relation avec un service d'avertissement. Elle est efficace, mais il faut l'utiliser de façon raisonnée en tenant compte de l'opportunité des traitements, de l'efficacité du produit, de son mode d'action et des effets secondaires de cette intervention. Cette méthode répond mieux aux exigences écologiques mais elle n'est pas sans danger sur l'environnement. L'emploi des produits phytosanitaires peut engendrer à long terme des modifications profondes de l'équilibre biologique de l'agrosystème.

B. Lutte raisonnée (ou dirigée)

C'est une autre phase d'approche de la lutte intégrée consistant en un aménagement progressif de la lutte chimique grâce à l'utilisation des seuils de tolérance économique et à l'emploi raisonné de produits spécifiques ou peu polyvalents. La lutte raisonnée fait appel aux pesticides, mais en réduisant au maximum les doses, en choisissant les produits les moins toxiques pour

l'environnement en tenant-compte des effectifs des espèces nuisibles sur le terrain. (ROUAG, 2017)

B. La lutte biologique :

Le contrôle biologique (ou biocontrôle) est un moyen de lutter contre un ravageur ou une maladie en augmentant les antagonistes du ravageur ou de la maladie.

Cette méthode est surtout dirigée contre les ravageurs (insectes, acariens et nématodes). On considère comme étant des ennemis naturels des ravageurs des cultures les organismes prédateurs, parasitoïdes ou infectieux (champignons entomophages, viroses) limitant la fréquence et la sévérité des pullulations.

Selon Draoui *et al.* (2016), cette méthode de lutte est la plus recommandée en agriculture biologique. En dépit de nombreux succès, le bien-fondé de la méthode est pourtant aujourd'hui discuté, tant en raison d'un taux de réussite jugé insuffisant par certains, que des risques biologiques encourus par la manipulation des complexes parasitaires.

B. La lutte physique :

En phytopathologie, il y a moins de travaux scientifiques sur le contrôle physique. Des films de polyéthylène avec des propriétés filtrantes pour des parties spécifiques du spectre solaire peuvent être utilisés pour contrôler la moisissure grise dans les serres. Il s'agit donc d'une technologie passive qui utilise une barrière physique. Le traitement par micro-ondes des graines de blé pour lutter contre *Fusarium graminearum* a été évalué.

Des tentatives similaires ont été faites pour inactiver le champignon du charbon sur les graines d'orge. Dans la culture de la pomme de terre, en plus des défoliants chimiques, les fongicides sont généralement utilisés comme mesures sanitaires pour empêcher la propagation de l'infection à *Phytophthora infestans* au maillon de production suivant. Le séchage thermique, qui remplace la défoliation chimique, réduit considérablement la vitalité de *Phytophthora infestans* présente dans les feuilles lors du séchage. (Charles *et al.*, 2001)

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

III.1. Description des trois pépinières prospectées :

III.1.1. La pépinière 1 « Arbre qui pousse »

Cette pépinière se situe à el Kiffane , Wilaya de Tlemcen elle est de type de pépinière avec du sol et son activité s'appuie sur la culture des arbres forestiers, arbres fruitiers, arbres décoratifs plus conseil et création d'espaces verts , sa superficie dépasse les 5 ha.



Figure 07 : Pépinière « l'arbre qui pousse » kiffane (originale)

III.1.2. La pépinière 2 « My garden »

« My garden » est une pépinière avec sol qui se spécialise dans la culture des arbres forestiers, arbres fruitiers, arbres décoratifs y compris l'importation de certaines plantes et les sols traités pour une meilleure culture, le système d'irrigation dans cette pépinière est basé sur l'arrosage avec de l'eau douce et les précipitations, elle se situe à « Aboutachfine » près de la gare routière et sa superficie est plus de plus de 10 000 m²



Figure 08: pépinière « My garden » Aboutachfine (originale)

III.1.3. La pépinière 3

La pépinière de la rocade est une pépinière un peu ancienne à la wilaya de Tlemcen (depuis 2013), elle se situe sur l'autoroute vers le pôle universitaire UABT, avec une superficie qui dépasse les 3 ha, elle s'appuie sur la culture des arbres fruitiers et quelques arbres forestiers. Le système d'irrigation se base sur le simple arrosage. En revanche, l'entretien est presque absent malheureusement et le sol est mal traité dans cette pépinière ce qui signifie l'apparition de plusieurs maladies et la mortalité de certains espèces.



Figure 09 : pépinière de la rocade (originale)

La présente étude a été réalisée selon deux étapes ; la première est sur terrain (échantillonnage), et la seconde (expérimentale) est au niveau de laboratoire.

III.2. Prospection et échantillonnage :

Notre étude a été menée dans trois pépinières au niveau de la wilaya de Tlemcen entre Janvier et Mars 2021. Le choix de ces pépinières est basé sur l'état sanitaire des plantules qui existe, ainsi que sur la présence des symptômes d'infections à *Phytophthora* et *Pythium* comme ceux décrits par plusieurs auteurs (Brasier, 1996; Scanu *et al.*, 2013 ; Smahi *et al.*, 2017 et Smahi, 2019) à savoir l'amincissement de la partie aérienne, décoloration ou jaunissement des feuilles, la présence des feuilles à taille réduite, et la nécrose progressive des fines racines nourricières.

Dans un but d'inventorier la flore fongique impliquée dans cet état de dégradation des jeunes plantules, nous avons effectué un échantillonnage aléatoire, basé sur la visualisation des plantules malades. Une plante est considéré malade lorsqu'elle présente des symptômes typiques des endophytes fongiques y compris le manque de la levée, des chancres au niveau du collet, la disparition des racines fines, des tâches noirâtres au niveau du système racinaires, jaunissement des feuilles et la mortalité des jeunes pousses.

III.2.1. Présentation des sites prospectés :

Notre étude a été menée dans trois pépinières différentes au niveau de la Wilaya de Tlemcen du 10/01 au 20/03/2021.

L'ensemble des caractéristiques et des données géographiques de ces trois sites d'étude ont été regroupés dans le tableau 04.

La figure 10, présente la situation géographique de ces trois pépinières dans la wilaya de Tlemcen.

Tableau 04: Description des sites d'étude

Nom de la pépinière	Le type	Localisation	La superficie
“ l'arbre qui pousse “	Arbres Forestiers, Arbres Fruitiers, Arbres Décoratifs Fleuriste, Conseil et Création d'espaces verts	El kiffane, Tlemcen	environ 5 ha
“ My garden Tlemcen“	Production avec sol, Arbres Forestiers, Arbres Fruitiers, Arbres Décoratifs	la gare routière(Aboutachfine)	plus de 10000 m ²
Pépinière de la rocade	Production avec sol, Arbres Forestiers, Arbres Fruitiers	La rocade	Environ 3ha

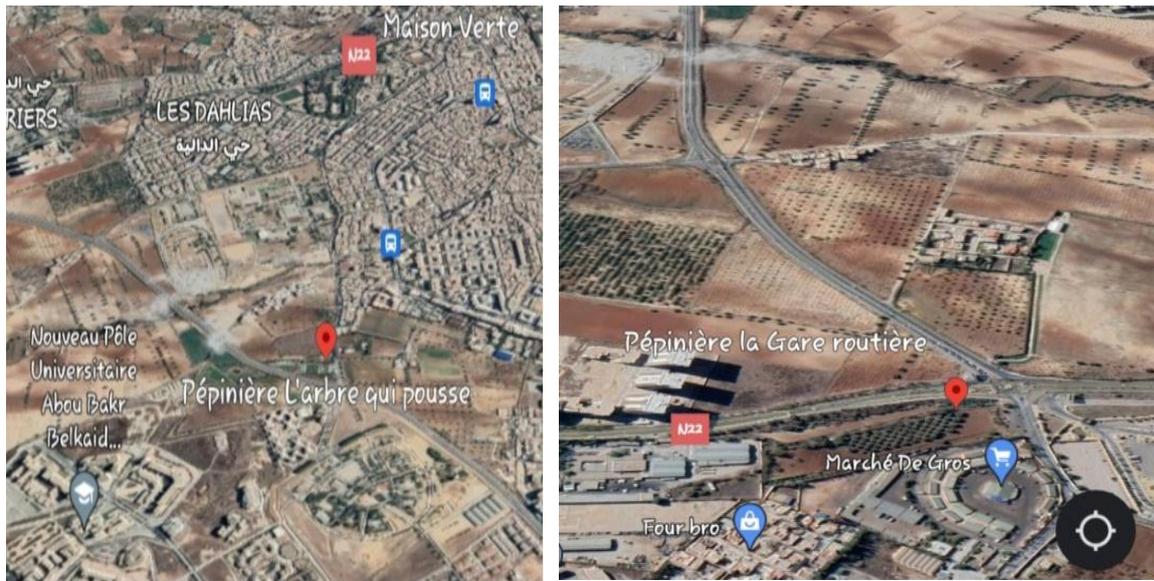


Figure 10 : la position des pépinières visitées (Google Earth, 2021)

III.2.2. Méthode d'échantillonnage :

Notre travail s'articule sur l'isolement et l'identification des endophytes fongiques telluriques des pépinières.

Un total de 42 échantillons ont été prélevés à partir des espèces forestières, fruitières et ornementales, dont 15 échantillons de la première pépinière, 15 autres échantillons de la deuxième pépinière et 12 de la troisième. Notre procédure d'échantillonnage a été basée sur la méthode décrite par Scanu *et al.* (2013), légèrement modifiée par Smahi (2019) :

A l'aide d'une spatule, on a creusé une couche de la partie racinaire du sol (environ 20 cm à 25 cm de profondeur) et environ 300g de sol a été prélevé dans des directions opposées. Chaque échantillon a été mis par la suite, dans un sac en plastique sur lequel les références d'échantillonnage ont été rapportées : numéro d'échantillon, le nom de la pépinière, nom de l'espèce hôte et la date de prélèvement. De plus, des parties de tissu cortical et de xylème au niveau du collet ont été pris de toutes les plantules symptomatiques de tâches brunâtres (Fig.11).

Tous les échantillons prélevés ont été transférés au laboratoire, conservés au réfrigérateur à 5°C jusqu'à leur utilisation.



**Figure 11 : Prélèvement des échantillons du sol à partir d'un arbre symptomatique
(original)**

III.3. Isolement, identification et caractérisation des espèces fongiques:

II.3.1. Milieux de culture utilisés :

Le choix d'un milieu de culture est très important pour une bonne croissance et une identification bien définie des endophytes fongique. La composition des milieux de cultures utilisées est indiquée dans l'annexe 1.

III.3.1.1. Milieu PDA (Potatos Dextrose Agar) :

Le milieu PDA est le milieu optimum pour la croissance de la plupart des champignons microscopiques grâce à sa capacité de conférer les besoins et les conditions vitaux d'une large gamme des champignons phytopathogènes (Smahi, Com. Pers.).

Ce dernier a été utilisé aussi pour l'isolement, la purification, l'identification, la caractérisation et pour la conservation des souches.

III.3.1.2. Milieu MEA (Malt Extract Agar) :

Le milieu MEA a été aussi utilisé pour l'isolement et la conservation des souches fongiques.

Les deux milieux de culture ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes, et additionnée par le Streptomycine avec 500 mg.l⁻¹ afin d'éliminer toute croissance bactérienne.

III.3.2. Méthodes d'isolement des endophytes fongiques :

Pour l'isolement des endophytes, on a utilisé deux méthodes, la première est basée sur l'appâtage des spores, tandis que la deuxième est celle de dilution.

III.3.2.1. Méthode d'appâtage :

Cette méthode a été utilisée uniquement pour l'isolement de certains oomycètes qui ont un tissu pathogène très difficile à isoler comme l'espèce du genre *Phytophthora*.

La méthode se base sur l'appâtage des spores à partir d'un sol infecté par l'utilisation des feuilles et pétales d'autres espèces végétales saines. Elle a été décrite par Jung *et al.* (1996), Scanu *et al.* (2015), Smahi *et al.* (2017) et Smahi (2019). Le protocole est le suivant :

On verse environ 200g de sol dans des boîtes en plastique (25x15x10 cm) (une boîte/par échantillon). Sur chaque boîte, le numéro d'échantillon, la plante hôte et date de manipulation ont été mentionnés (Fig. 12. A).

Toutes les boîtes ont été inondées, par la suite, par 500 ml d'eau distillée. La surface de l'eau est soigneusement nettoyée avec un papier absorbant pour éliminer tous les débris du sol flottant sur la surface pour avoir une surface totalement nette où on place directement 7 à 10 jeunes feuilles ou pétales des espèces végétales variées. Selon Smahi (2019), les pétales du Rosier (*Mister lincoln*), ont constitué un excellent appât pour les spores de *Phytophthora* (Fig. 12. B).

Les boîtes ont été incubées par la suite à une température ambiante pendant quelques jours. (Fig. 12. C).

Après 3 à 5 jours, les feuilles noirâtres ou présentant des taches sombres (Fig. 13. A) ont été séchées avec un papier filtre stérile ou papier Josef, découpées en petits carrés (0.5x0.5 cm), et placées sur un milieu de culture PDA (Potatos Dextrose Agar) (Fig. 13. B), puis incubées à 25°C dans l'obscurité.



Figure 12: la technique d'appâtage : (A) l'étiquetage des boîtes avec l'échantillon du sol, (B) la dispersion des feuilles et pétales, (C) l'incubation des boîtes à une température ambiante de laboratoire (original)

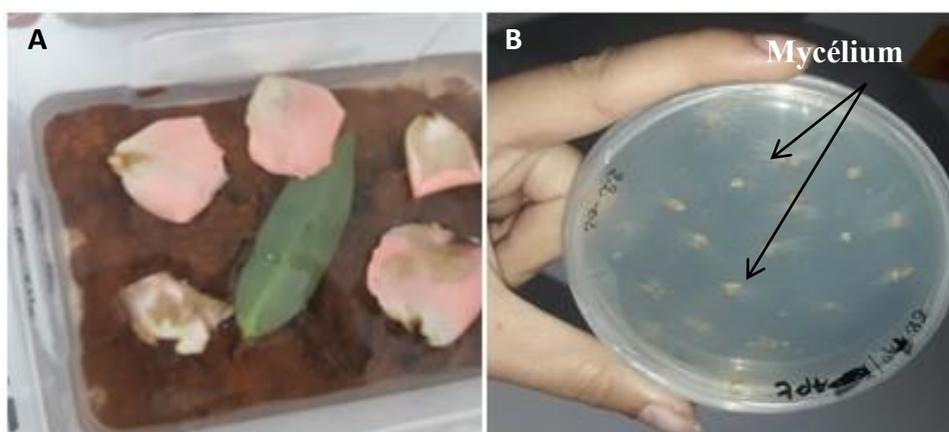


Figure 13: (A) L'apparition des tâches noirâtre sur les pétales du Rosier, (B) Le développement du mycélium entourant les carrés du rosier sur un PDA (original)

Tous les mycéliums en développement ont été repiqués sur un milieu PDA, et incubées à 25 °C dans l’obscurité puis examinées après quelques jours sous un microscope optique pour l’identification des espèces.

III.3.2.2. Méthode de dilution :

La capacité d'estimer avec précision la concentration de micro-organismes est nécessaire pour réussir l'identification, l'isolement, la culture et la caractérisation (Pepper *et al.*, 2019).

À ce titre, les microbiologistes ont utilisé la dilution en série et diverses techniques de placage depuis plus d'un siècle pour quantifier de façon fiable la charge bactérienne et virale dans les environnements cliniques, industriels, pharmaceutiques et universitaires de laboratoire (Koch, 1883 ; Ben-David et Davidson, 2014).

Les descriptions de cette méthodologie sont apparues pour la première fois en 1883 lorsque le scientifique et médecin allemand Robert Koch a publié ses travaux sur les agents pathogènes (Ben-David et Davidson, 2014).

La dilution en série est une réduction systématique d'une entité connue ou inconnue (un soluté, un organisme, etc.) par une re-suspension successive d'une solution initiale (solution 0) en volumes fixes d'un diluant liquide, Bien qu'un expérimentateur puisse choisir n'importe quel volume pour chaque diluant, il s'agit le plus souvent d'un multiple de 10, ce qui facilite la réduction logarithmique de l'échantillon (Fig. 14)

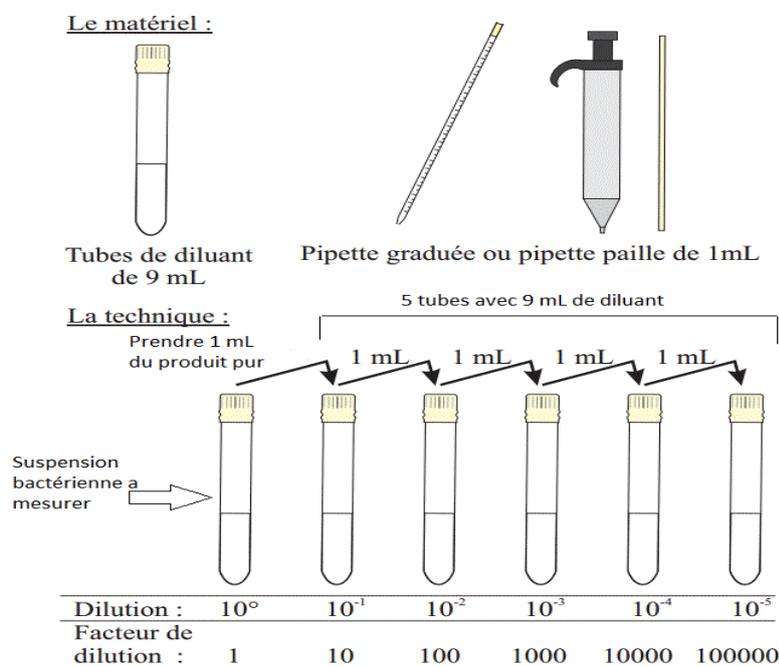


Figure 14 : protocole de la méthode de dilution (Anonyme, 2014)

La dilution de notre étude a été réalisée avec trois type de liquide : l'eau distillée stérile, l'eau peptonée (12g de peptone/ ml d'eau distillée), ou avec l'eau physiologique stérile (9g NaCl/1000 ml d'eau distillée).

Le protocole de cette technique est le suivant : 1g de sol de chaque échantillon est additionné à 10 ml de d'eau peptonée, distillée ou physiologique, ce qui correspond à la dilution 10^{-1} . Ensuite 1 ml de cette dernière est ajouté à 9 ml d'eau stérile pour avoir la dilution 10^{-2} jusqu'à arriver à la dilution 10^{-5} pour chaque échantillon (Fig. 15. A, B, et C).



Figure 15 : La méthode de dilution (la dilution avec l'eau physiologique) : (A) : Préparation des tubes à essais, (B) : Versement du sol, (C) : Agitation, (D) : l'étalement sur milieu PDA (original).

Ensuite, 1 ml de chaque dilution a été déposé dans des boites de Pétri contenant le milieu de culture PDA. Les boites ont été incubées durant 5 à 7 jours à une température de 25°C, dans des conditions d'obscurité totale (Fig. 15, D).

III.3.4. La purification :

La purification a été réalisée devant deux bèques benzène à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée par le repiquage successif des souches sur le milieu PDA jusqu'à l'obtention des souches pures (Fig. 16).



Figure 16: La purification des espèces sur un milieu PDA (original)

III.3.4. L'identification des espèces:

L'identification est une étude corrélative entre les caractères macroscopiques et microscopiques des champignons.

➤ L'identification macroscopique :

Les différentes souches pures obtenues ont été groupées conformément à leurs caractéristiques macroscopiques pour choisir uniquement des représentants de chaque groupe pour l'identification.

Ces caractéristiques morphologiques sont : La texture et l'aspect macroscopique du thalle, sa couleur (face et revers), son élévation, l'odeur et la forme de la marge.

Toutes ces caractères sont étudiés à l'œil nu.

➤ L'identification microscopique :

L'aspect microscopique des espèces a été étudié avec deux types de microscopes :

Le premier est un microscope optique avec un logiciel. Les images numériques ont été capturées avec un appareil photo numérique.

En ce qui concerne la préparation des lames : un petit fragment de mycélium a été prélevé à l'aide d'une anse de platine et mis sur une lame propre avec une goutte d'acide lactique, ce dernier assure l'isotonie de la cellule fongique. La préparation a été recouverte par une lamelle et une goutte d'huile d'immersion.

L'observation microscopique est aux grossissements x10, x40, x100 ; Les espèces fongiques ont été identifiées par suite, sur la base des critères microscopiques (la forme de la vésicule, la disposition et la forme des spores et des conidies, la septation des conidies, le cloisonnement du mycélium, ...ect). Les guides utilisés sont les suivants : Barnett et Hunter (1972), Champion (1997) ; et Botton *et al.* (1990), Erwin et Ribeiro (1996), Phillips *et al.* (2012) et (2013).

III.3.5. Technique de sporulation

Chez certains oomycètes, la production des pores pour l'identification de l'espèce est difficile, pour cela, une technique de sporulation a été mise en place. A partir de chaque colonie pure des oomycètes, 4 à 5 carrés de 1 cm² ont été prélevés, au niveau du front de croissance des thalles. Ces derniers ont été mis dans une boîte de pétri (60 mm) contenant environ 10 ml d'eau distillée non stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à la température de laboratoire sous un éclairage permanent pour accélérer l'apparition des sporanges, à défaut la lumière du jour (Smahi, 2019). Les petits carrés de mycélium ont été vérifiés quotidiennement au microscope optique pour la présence des sporanges. Dès leur apparition, ils ont été placés entre lame et lamelles, puis observés au microscope photonique (Fig.17).

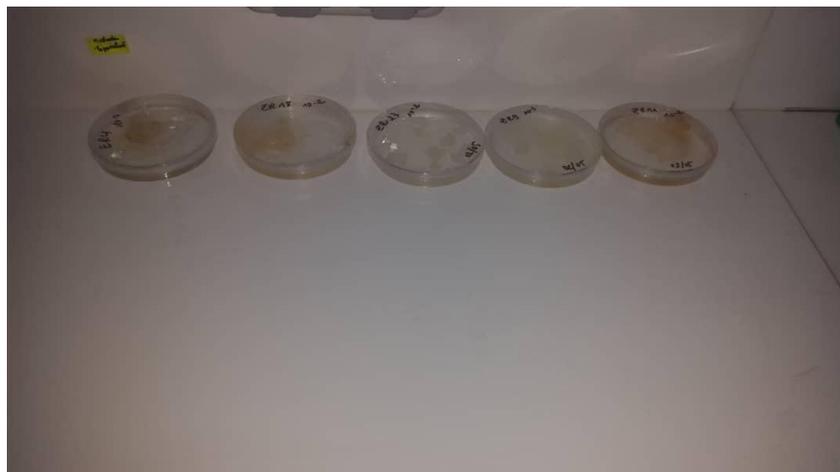


Figure 17 : Technique de sporulation (original).

III.3.6. Test d'antagonisme

Après l'opération de l'isolement des échantillons, l'évaluation des propriétés antagonistes est la seconde étape de la sélection d'un agent de lutte biologique, elle repose sur l'antagonisme révélé *in vitro* ou sur la capacité de la souche à protéger *in situ* les organes inoculés par le pathogène en conditions contrôlées (Lepoivre, 2003).

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte (Curl et Tnielove 1986). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, ou par une antibiose (c'est l'inhibition d'un micro-organisme par le produit métabolique d'un autre) (Soufiane, 1998).

En réalisant ce test, il va y avoir de types d'antagonismes :

➤ **1^{er} type d'antagonisme**

Dans ce cas-là, le 1^{er} pathogène va se croître et inhibe la croissance du 2^{ème} par la dispersion de certains métabolites qui vont occuper toute la surface de la boîte pour qu'il ne se développe plus.

➤ **2^{ème} type d'antagonisme**

Le mycélium du pathogène antagoniste se développe d'une façon où il arrive à la marge du 2^{ème} et le couvre complètement jusqu'à inhiber sa croissance.

Dans la présente étude, nous avons testé l'effet antagoniste des deux espèces de *Trichoderma* : *Tri. Harzianum* et *Tri. Viride* sur les espèces de *Pythium sp.* et *Dilplodia sp.*

Le test d'antagonisme a été réalisé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA. Ce test a été effectué en se basant sur la méthode décrite par Benhanou et Chet (1996), qui consiste à prélever sur le pourtour des cultures de chacun des deux champignons concernés par le test, un fragment mycélien de quelques millimètres. Ces fragments sont repiqués face à face dans la même boîte de Pétri, à 2 cm du centre de la boîte. Deux (2) répétitions sont réalisées pour chaque combinaison. L'incubation est réalisée à l'obscurité dans une étuve cryptogamique (Fig. 18).



Figure 18 : Test d'antagonisme de *Trichoderma sp.* contre *Pythium sp.* et *Trichoderma sp.* contre *Diplodia sp.*(original).

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

La présente étude a été réalisée selon deux étapes ; la première est sur terrain (échantillonnage), et la seconde (expérimentale) est au niveau de laboratoire.

IV. 1. Symptomatologie :

Les résultats obtenus sur les 42 échantillons sélectionnés selon la symptomatologie remarquable chez les différents types de plantes (fruitiers, forestière et ornementale), dans les trois pépinières visitées : la première pépinière (15 échantillons), les deuxièmes pépinières (12 échantillons) et les troisièmes pépinières (15 échantillons), ont montrés une forte diversité fongique pathogène et non pathogène. La première remarque qui a été signalé dans les trois pépinières, c'est que les jeunes plantules qui ont plus ou moins rapproché dans l'espace, ont les mêmes symptômes et ce qui confirme le transport des spores et la propagation des maladies phytopathogènes dans la pépinière.

Au cours de la prospection sur terrain, les symptômes observés sont très divers dépendent de l'espèce fongique qui attaqué les plantules. L'attribut le plus remarquable dans les trois pépinières c'est le flétrissement des pots de culture (Fig. 19. C), ainsi que la croissance réduite chez certaines espèces.

Au niveau des racines, dès qu'on a creusé le sol, différents symptômes ont été observés. D'une part, la pourriture et la nécrose ont été signalées, d'autre part, chez certaines espèces, l'absence des racines fines a été remarquée. Les nécroses racinaires d'une couleur brune sombre tendant vers le noire peuvent remonter jusqu'à la partie aérienne de la plante et envahissent dans les tissus xylmatique du collet (Fig. 19. D) ou celles du tronc. Une vérification du système racinaire peut être une bonne façon d'observer la maladie avant qu'elle ne soit trop avancée pour être contrôlée.

En coupe longitudinale, des stries brunes apparaissent dans un premier temps suivies de bandes longitudinales ou sectorielles. Les nécroses observées progressent avec le temps, de la périphérie vers le centre pour apparaître comme des chancres foncés au stade plus avancé. Le xylème est principalement affecté mais le phloème peut également être touché. Présence d'une bande longitudinale jaune sur l'épiderme se transformant progressivement en un chancre. Coloration brune et cortex (écorce) légèrement déprimé.

Chez certaines espèces des taches dispersées d'une couleur brune foncé, ont été observées. Ces dernières portent des formes rondes à allongées, avec des anneaux concentriques et un centre clair avec un chancre finit par encercler la tige et la plantule meurt. Au niveau des feuilles, différents symptômes ont été observés : au premier lieu, les feuilles se commencent à se dessécher de la marge et progressant vers le limbe, ainsi que jaunissement total ou partiel affectant un seul côté du limbe chez certaines plantes (Fig. 19. A). De plus un flétrissement des feuilles et de l'inflorescence (Fig. 19. B), avec des nécroses en marge des feuilles et les feuilles mortes restent sur le plant et ne tombent pas. Dans les plants légèrement

plus âgés, les feuilles perdent leur turgescence ou leurs extrémités jaunissent, par exemple dans les fleurs à bulbes. Dans les plantes en pot, on observe la chute des boutons floraux.



Figure 19 : Symptomatologie observées chez les plantules infectées dans les pépinières prospectées : (A) tâches au niveau des feuilles infectées ; (B) le flétrissement de plantes ; (C) la mortalité des jeunes plantules infectées ; (D) nécrose du collet.

IV. 2. Importance des champignons endophytes sur les jeunes plantules des pépinières prospectées:

L'étude macroscopique et microscopique a révélé la présence de dix-sept espèces fongiques appartenant aux différents genres (Tab.05).

Tableau 05 : Taxonomie des champignons isolés

Division	Ordre	Genre/espèce
Ascomycota	Hypocreales	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Pleosporales	<i>Alternaria solani</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
	Hypocreales	<i>Trichoderma harzianum</i>
		<i>Trichoderma viride</i>
Deuteromycotina	Eurotiales	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Eurotiales	<i>Penicillium solitum</i>
Oomycota		<i>Phytophthora gonapodyides</i>
		<i>Phytophthora cinnamomi</i>
		<i>Phytophthora ramorum</i>
	Pythiales	<i>Pythium ultimum</i>
		<i>Pythium polare</i>
Zygomycotina	Mucorales	<i>Mucor racemosus</i>
	Botryosphaerales	<i>Diplodia sapinea</i>
		<i>Lasiodiplodia exigua</i>
		<i>Rhizopus stolonifer</i>

IV.2.1. Présence ou absence des endophytes fongiques dans les trois pépinières prospectées :

L'inventaire réalisé sur 42 échantillons rhizosphériques a montré la présence de différentes espèces avec une fréquence qui varie d'une espèce à autres. Une humidité abondante du sol et une température élevée du sol sont les deux facteurs environnementaux

les plus importants qui régulent la distribution de ces espèces telluriques. Deux choses qui sont largement présents dans nos pépinières, et ce qui expliquent cette variation des endophytes fongiques.

Après l'identification des espèces fongiques dans les trois pépinières, nous avons constatés que dans chaque pépinière, le taux des plantules infectés est plus élevé par rapport aux plantules non infectées par les endophytes fongiques, sachant que tous les échantillons prélevés ont été symptomatiques à l'origine (Fig. 20). Ceux-ci peuvent être expliqués par l'infection de la plante par d'autres facteurs d'ordre abiotique (sécheresse, stress hydrique, ...) ou d'ordre biotique (attaque des insectes xylophages, défoliateurs, ...), sinon par un mal isolement du champignon au niveau de laboratoire (comme par exemple les espèces pathogènes nécessitent des techniques d'isolement spécifiques et des milieux de culture sélectives).

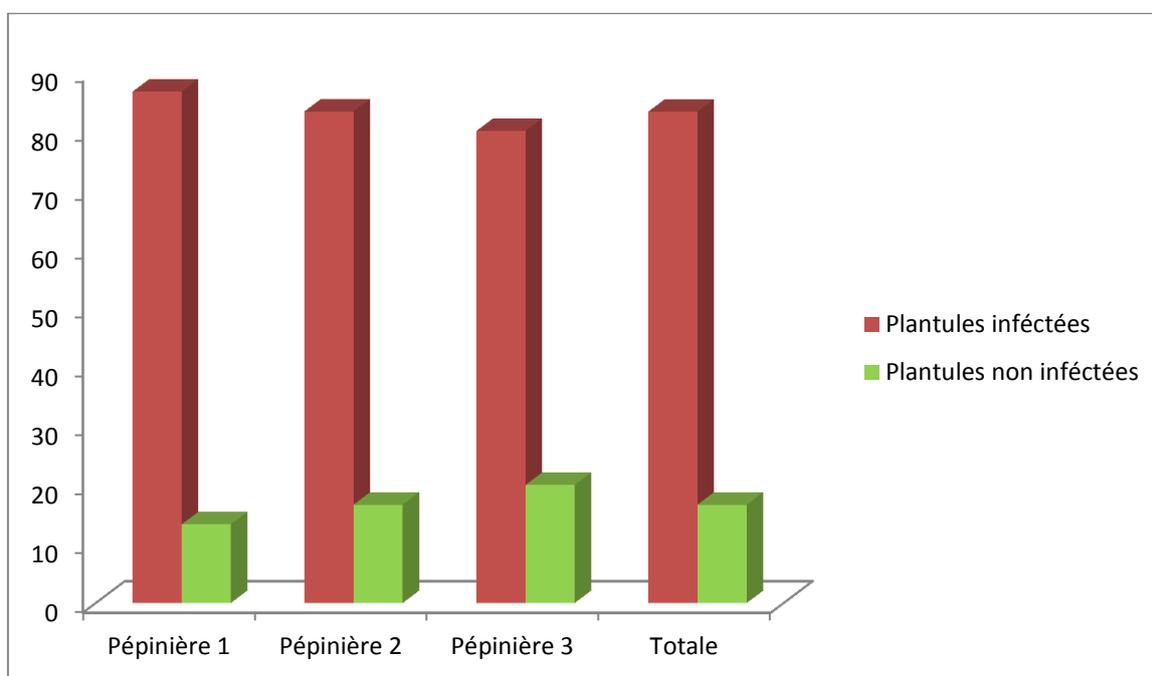


Figure 20 : Pourcentage d'incidence par les endophytes fongiques dans les trois pépinières prospectées.

IV.2.2. La microflore associée aux sols des pépinières prospectées

Les résultats obtenus après l'échantillonnage réalisés et l'identification microscopique et macroscopique dans la première pépinière « l'arbre qui pousse » au niveau de la wilaya de Tlemcen, a permettre de découverte une diversité fongique très importante au niveau de sol échantillonné (Tab. 06).

Tableau 06 : L'isolement des espèces fongique à partir des jeunes plantules des trois pépinières

N° d'échantillon	Pépinière	Plante hôte	Partie de prélèvement	+/-	Espèces identifiées
ZR 1	Pépinière 1	<i>Psidium guajava</i>	Sol	+	<i>Alternaria sp.</i> , <i>Py.ultimum</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
ZR 2	Pépinière 1	<i>Cupressus sp.</i>	Collet+sol	+	<i>Py.polare</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> ,
ZR 3	Pépinière 1	<i>Leucanthemum sp.</i>	Sol	+	<i>Py.ultimum</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> ,
ZR 4	Pépinière 1	<i>Ficus carica</i>	Sol	+	<i>Penicellium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
ZR 5	Pépinière 1	<i>Rosa sp.</i>	Racines	+	<i>Py.polare</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> ,
ZR 6	Pépinière 1	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	+	<i>D. sapinea</i> , <i>Alternaria sp.</i>
ZR 7	Pépinière 1	<i>Abies sp.</i>	Sol	+	<i>D. sapinea</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>Penicellium sp.</i>
ZR 8	Pépinière 1	<i>Pteridium aquilinum</i>	Sol	-	-
ZR 9	Pépinière 1	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	-	-
ZR 10	Pépinière 1	<i>Pteridium aquilinum</i>	Racines	+	<i>Py.ultimum</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> ,
ZR 11	Pépinière 1	<i>Quercus suber L.</i>	Sol	+	<i>Lasio.exigua</i> , <i>Mucor sp.</i> ,
ZR 12	Pépinière 1		Sol	+	<i>Py.polare</i> , <i>Penicellium sp.</i> ,
ZR 13	Pépinière 1		Sol	+	<i>Mucor sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> ,
ZR 14	Pépinière 1	<i>Citrus limon</i>	Sol	+	<i>Mucor sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> ,
ZR 15	Pépinière 1	<i>Ricinus communis</i>	Collet	+	<i>Alternaria sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicellium sp.</i> ,
ZR 16	Pépinière 2	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	+	<i>Mucor sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i> , <i>Py.ultimum</i> ,
ZR 17	Pépinière 2	<i>Pteridium aquilinum</i>	Racines	+	<i>F. oxysporum</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i> ,
ZR 18	Pépinière 2	<i>Prunus dulcis</i>	Sol	+	<i>Py.ultimum</i> , <i>F. oxysporum</i>
ZR 19	Pépinière 2	<i>Citrus limon</i>	Sol	+	<i>P. cinnamomi</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> ,
ZR 20	Pépinière 2	<i>Quercus suber L.</i>	Collet	+	<i>Lasio.exigua</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i>
ZR 21	Pépinière 2	<i>Ficus carica</i>	Sol	-	-
ZR 22	Pépinière 2	<i>Eucalyptus globulus</i>	Sol	+	<i>P. gonapodyides</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i>
ZR 23	Pépinière 2	<i>Prunus armeniaca</i>	Sol	+	<i>P. ramorum</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i>
ZR 24	Pépinière 2	<i>Abies sp.</i>	Collet	+	<i>D. sapinea</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Penicellium sp.</i>
ZR 25	Pépinière 2	<i>Abies sp.</i>	Collet	+	<i>D. sapinea</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> ,
ZR 26	Pépinière 2	<i>Citrus limon</i>	Sol	+	<i>Py.polare</i> , <i>Penicellium sp.</i> ,
ZR 27	Pépinière 2	<i>Olea europea</i>	Sol	-	-

ZR 28	Pépinière 3	<i>Ficus carica</i>	Sol	+	<i>Py.ultimum, Aspergillus sp., P. cinnamomi, Mucor sp.</i>
ZR 29	Pépinière 3	<i>Pteridium aquilinum</i>	Racines	+	<i>Penicellium sp., Mucor sp., Trichoderma sp.</i>
ZR 30	Pépinière 3	<i>Olea europea</i>	Sol	-	-
ZR 31	Pépinière 3	<i>Quercus suber L.</i>	Collet	+	<i>Lasio.exigua, Alternaria sp., P. gonapodyides, P. cinnamomi, Alternaria sp.</i>
ZR 32	Pépinière 3	<i>Prunus armeniaca</i>	Racines	+	<i>Alternaria sp., P. cinnamomi, F. oxysporum, Aspergillus sp.,</i>
ZR 33	Pépinière 3	<i>Prunus dulcis</i>	Racines	+	<i>Alternaria sp., Mucor sp., Aspergillus sp.</i>
ZR 34	Pépinière 3	<i>Abies sp.</i>	Sol	+	<i>D. sapinea, P. gonapodyidesdes, F. oxysporum,</i>
ZR 35	Pépinière 3	<i>Eucalyptus globulus</i>	Sol	+	<i>Py.polare, P. cinnamomi</i>
ZR 36	Pépinière 3	<i>Eucalyptus globulus</i>	Sol	-	-
ZR 37	Pépinière 3	<i>Abies sp.</i>	Sol	+	<i>D. sapinea, Alternaria sp., Aspergillus sp., Penicellium sp.</i>
ZR 38	Pépinière 3	<i>Citrus limon</i>	Sol	+	<i>Alternaria sp., Mucor sp., P. ramorum, Aspergillus sp.,</i>
ZR 39	Pépinière 3	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	-	-
ZR 40	Pépinière 3	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	+	<i>Alternaria sp., P. gonapodyides, Trichoderma sp.</i>
ZR 41	Pépinière 3	<i>Cupressus sp.</i>	Collet	+	<i>P. ramorum, Aspergillus sp., Mucor sp.</i>
ZR 42	Pépinière 3	<i>Citrus limon</i>	Sol	+	<i>Py.ultimum, F. oxysporum, Aspergillus sp., Mucor sp.</i>

L'analyse de la variance (ANOVA à un facteur), en utilisant le test de Fisher, a montré de nombreuses différences significatives dans la fréquence d'isolement des espèces fongiques avec un niveau de confiance de 95% (Fig. 21).

D'après la figure ci-dessous, les espèces appartenant aux genres *Asppergillus sp.* et *Mucor sp.* ne présentent aucune différence significative entre eux. Par contre, elles sont significatives par rapport à tous les autres espèces isolées. La même figure a révélé l'existence d'une légère différence significative entre les espèces identifiées comme *Penicellium sp.*, *Trichoderma sp.* et *Alternaria sp.* De plus, les deux espèces appartenant au même genre *Pythium* (*Py. ultimum* et *Py. polare*) ne montrent aucune différence significatives entre eux. Concernant les espèces d'importance économique *P. cinnamomi* et *Lasiodiplodia exigua*, l'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) en utilisant le test de Fisher ($p < 0,05$) n'a montré aucune différence significative entre eux, par contre les deux sont significativement différents par rapport à tous les autres espèces isolées.

En revanche, aucune espèce n'a été identifiée comme *Fusarium sp.*, *P. gonapodyides* ou *P. ramorum*.

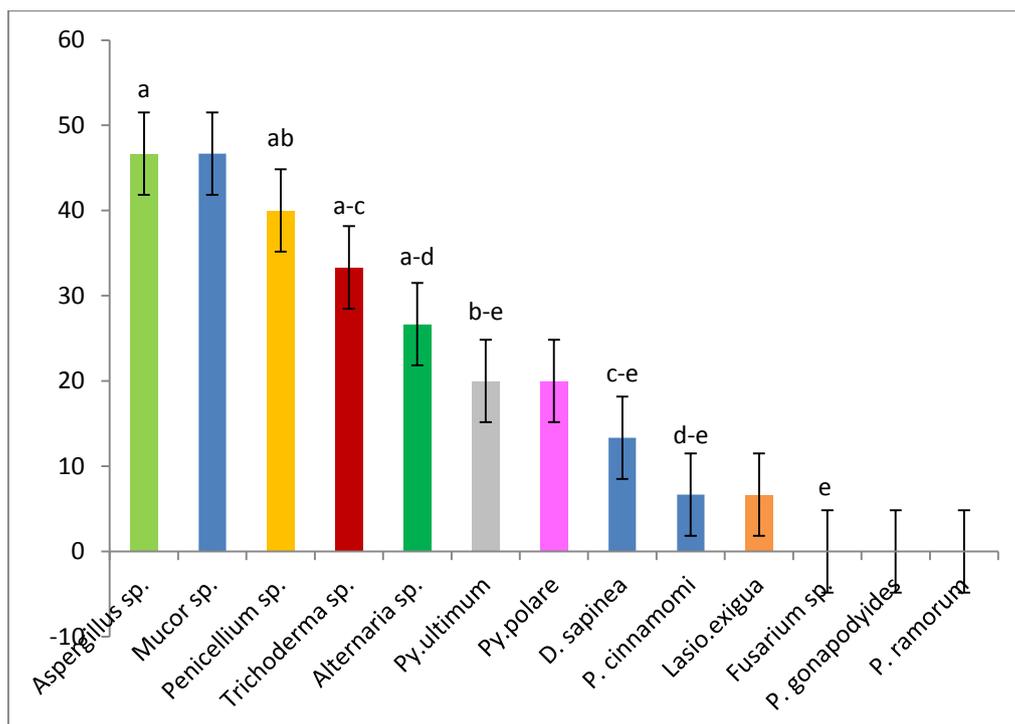


Figure 21 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°1 Moyenne ± erreur standard. Les différentes lettres indiquent les moyennes significativement différentes (Test de Fisher, $P < 0.05$).

L'existence des champignons saprophytes comme *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicellium sp.* et *Trichoderma sp.* a été aussi signalé dans la deuxième pépinière « My garden ».

Au contraire de la première pépinière, notre étude phytopathologique a révélé l'existence d'une espèce du genre *Fusarium*, identifiées sur la base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques comme *F. oxysporum*. Par contre, l'espèce *Py. polare* est complètement absente.

L'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) en utilisant le test de Fisher a montré quelques différences significatives dans l'effectif des espèces isolées avec un niveau de confiance de 95%. En effet, les trois oomycètes identifiées comme *P. cinnamomi*, *P. gonapodyides* et *P. ramorum* et l'espèce *Lasioidiplodia exigua* comptabilisent les effectives les plus réduites, elles ne présentent aucune des différences significatives entre eux. Par contre, elles sont significatives avec les saprophytes du genre *Penicellium* et *Trichoderma*. Les deux espèces identifiées comme *Py. ultimum* et *D. sapinea* enregistrent un taux de présence environ 17%. Ces deux dernières présentent une légère différence par rapport à d'autres espèces isolées (Fig. 22).

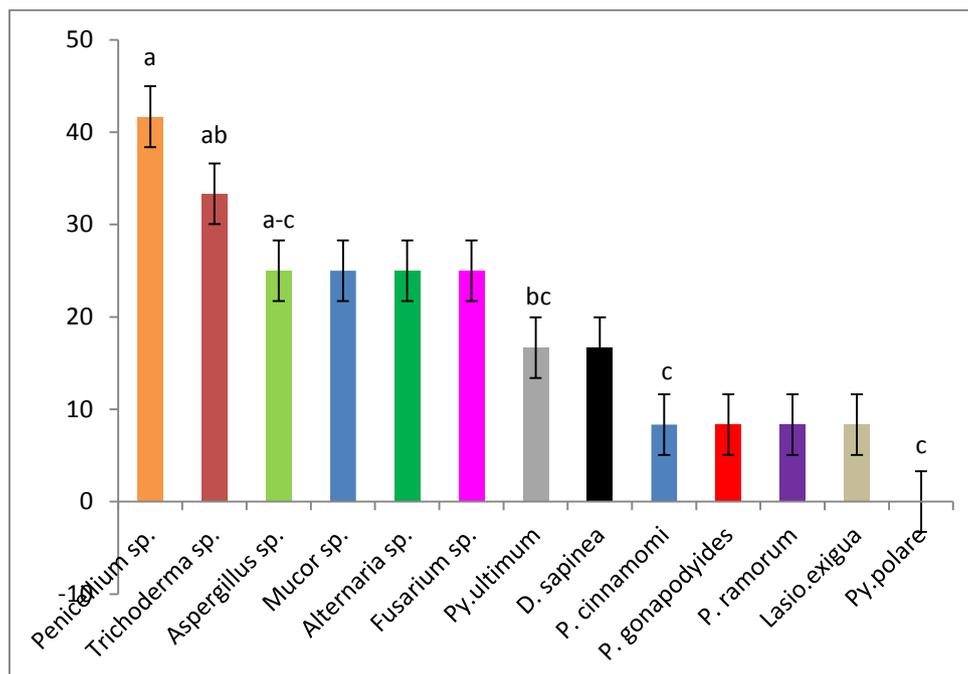


Figure 22 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°2 Moyenne ± erreur standard. Les différentes lettres indiquent les moyennes significativement différentes (Test de Fisher, P<0.05).

Dans la troisième pépinière les espèces du genre *Aspergillus sp.* et *Alternaria sp.*, sont les plus présents. Suivi par l'espèce *Mucor sp.* et *P. cinnamomi*.

L'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) en utilisant le test de Fisher, a montré des différences significatives entre les espèces isolées, avec un niveau de confiance à 95% (Fig. 23).

Les deux espèces *Aspergillus* et *Alternaria* qui enregistrent le taux de présence le plus élevé, leur présence est hautement significative avec d'autres espèces d'ordre économique comme *Py. polare* et *Lasiodiplodia exigua*.

Les cinq espèces *Penicellium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Py. ultimum*, *D. sapinea* et *P. ramorum* sont signalés avec un même taux de présence de 13%. De plus, les espèces citées présentent une légère différence significative par rapport aux oomycètes identifiées les espèces du genre *Mucor sp.* et *Lasiodiplodia exigua*.

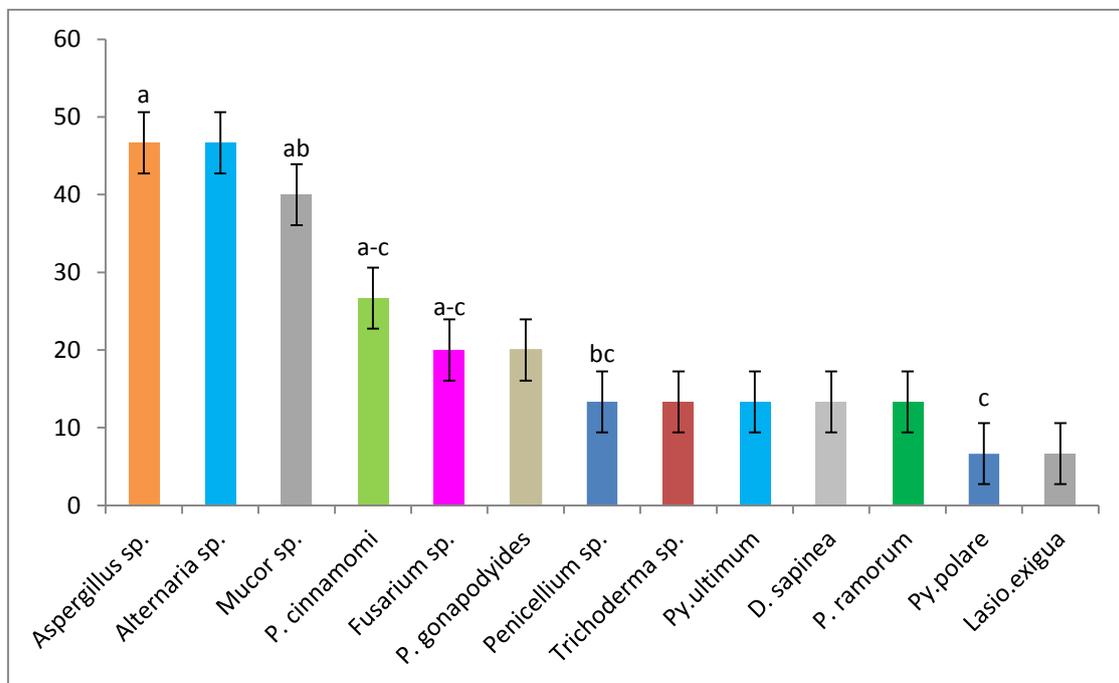


Figure 23 : La moyenne de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules de la pépinière N°3 ; Moyenne ± erreur standard. Les différentes lettres indiquent les moyennes significativement différentes (Test de Fisher, P<0.05).

Depuis le début des années 2000, les endophytes fongiques sont couramment étudiés dans les plantes tropicales surtout pour leurs utilisations en lutte biologique ou pour la production de substance ayant des propriétés pharmacologique (Azevedo, 2002; Peixoto-Neto, 2002)

La figure ci-dessous (24) récapitule le totale des champignons isolés dans les trois pépinières prospectées. L'analyse de la variance ANOVA à un facteur, en utilisant le test de Fisher (P< 0.05), a montré des différences significatives entre les espèces isolées. En effet, les champignons d'ordre saprophytes sont les plus présente, suivi par les oomycètes du genre

Pythium et *Phytophthora*, les champignons telluriques du genre *Fusarium* et celles vasculaire de la famille des Botryosphaeriaceae.

Une légère différence significative a été enregistrée entre les saprophytes du genre *Aspergillus* et *Mucor*, et entre *Alternaria* et *Penicillium*

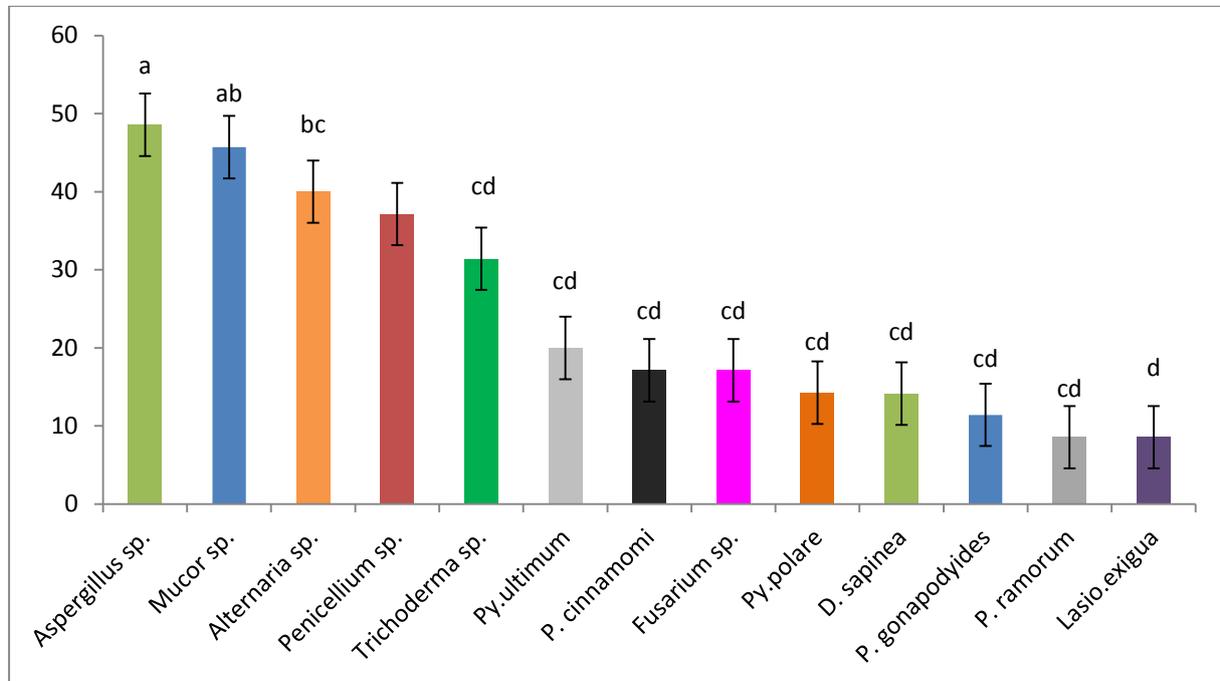


Figure 24 : La moyenne totale de la fréquence d'isolement à partir des jeunes plantules des trois pépinières prospectées ; Moyenne ± erreur standard. Les différentes lettres indiquent les moyennes significativement différentes (Test de Fisher, $P < 0.05$).

a. Indice de diversité de SHANON-WEAVER

L'indice de diversité de Shannon-Weaver (H') est couramment utilisé pour caractériser la diversité de l'habitat d'une station en se basant sur la diversité taxonomique. Dans les milieux naturels, il est généralement compris entre 0,5 pour une faible diversité et 4,5 pour une forte diversité (Trouilhé, 2006). Cet indice est calculé à partir de la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \text{Log}_2 P_i$$

P_i : représente la probabilité de rencontre de l'espèce de rang i . On peut écrire :

$$P_i = \frac{n_i}{N}$$

Sachant que:

ni : nombre d'individus de l'espèce i.

N : nombre total d'individus.

L'indice de diversité spécifique (Indice de Shannon-Wiener) est élevé lorsque la richesse taxonomique est importante et la répartition des individus entre taxons est équilibrée. Un peuplement moins diversifié avec des espèces dominantes se traduit par des faibles valeurs de cet indice (Maqboul *et al.*, 2009).

Le tableau suivant récapitule les valeurs de l'indice de Shannon et Weaver calculer. Généralement, leur valeur varie entre 0 et 1, tend vers 0 quand la quasi-totalité des effectifs est concentrée sur une espèce ; elle est de 1 lorsque toute les espèces ont la même abondance. L'indice d'équitabilité détermine, soit le rapprochement ou bien l'éloignement entre H et H max.

Tableau 7. Indice de Shanon et Weaver

Variétés	Asp.	Muc.	Alt.	Pen.	Tri.	Py.pol	P. cin	Py. ult	D. sap	P. gon	Las.exi	P.ram	Fus.	moy H'
GA	0,93	0,75	0,73	0,66	0,68	0,48	0,53	0,80	0,41	0,48	0,46	0,46	0,17	0,58
GB	0,95	0,74	0,77	0,74	0,73	0,75	0,66	0,75	0,48	0,56	0,58	0,44	0,16	0,63923076
GC	0,80	0,75	0,65	0,73	0,68	0,74	0,59	0,51	0,43	0,65	0,81	0,48	0,25	0,62076923
GD	0,75	0,77	0,69	0,63	0,76	0,78	0	0,77	0,78	0,66	0,73	0,69	0,13	0,62615384
GE	0,66	0,72	0,53	0,7	0,68	0,75	0,71	0,77	0,80	0,73	0,80	0,64	0,43	0,74538461
GF	0,74	0,68	0,59	0,49	0,43	0,54	0,67	0,64	0,52	0,74	0,83	0,72	0,66	0,63461538
moy H'	0,805	0,735	0,66	0,658	0,66	0,673	0,526	0,706	0,57	0,636	0,701	0,571	0,3	0,635

III. 3. Identification et caractérisation des espèces fongiques isolées:

Les cultures obtenues à partir des échantillons du sol confirment la présence de plusieurs endophytes fongiques appartenant à sept différents familles y compris : Pythiaceae, Botryosphaeriaceae, Nectriaceae, Pleosporaceae, Hypocreaceae, Mucoraceae et Trichocomaceae.

Sur la base des caractéristiques culturelles et microscopiques, dix-sept espèces ont été identifiées comme suit : *Phytophthora gonapodyides*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora ramorum*, *Pythium ultimum*, *Pythium polare*, *Diplodia sapinea*, *Lasiodiplodia exigua*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium solitum*. La classification des oomycètes (F. Pythiaceae) est historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observable. L'identification de ces espèces est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères. Dans le cas des *Phytophthora*, la forme des sporanges, permet à identifier

rapidement le genre, et en fonction de la présence ou non des papilles à l'extrémité des sporanges et la morphologie des anthéridies, les différentes espèces peuvent être déterminées. La morphologie des anthéridies est l'un des critères les plus difficiles à étudier, car elle disparaît souvent après la fécondation.

IV.3.1. *Phytophthora gonapodyides* (Petersen, 1909)

Les isolats obtenus dans cette étude forment tous une colonie de rosette caractérisée par une croissance relativement lente. Le mycélium est floconneux avec une couleur blanchâtre (Smahi, 2019).

Sur un milieu PDA, les colonies ont développées des motifs pétaloïdes ou de type chrysanthème très similaires avec des lobes pointus, petits et denses de différentes largeurs, pour la plupart submergés sur les bords, et avec un mycélium apprimé ou peu aérien vers le centre de la boîte (Fig. 25). Les gonflements des hyphes, les chlamydozoospores et les sporanges étaient absents sur les milieux gélosés solides (Smahi *et al.*, 2017). Les sporanges sont plus grands par rapport à d'autres espèces de *Phytophthora*. Elles sont non papillaires, persistants, avec une forme ellipsoïde et/ou ovoïde chez la plupart des isolats, coniques à l'apex. Dans certains cas, des proliférations internes et externes ont été observées. Ces caractéristiques morphologiques correspondaient toutes à celles rapportées pour *P. gonapodyides* (Brasier *et al.*, 1993 ; Erwin et Ribeiro, 1996).

Températures cardinales: La température de croissance optimale pour *P. gonapodyides* est comprise entre 25 °C et 30 °C. La température minimale de croissance est inférieure à 5 °C et la température maximale est comprise entre 30 °C et 35 °C.

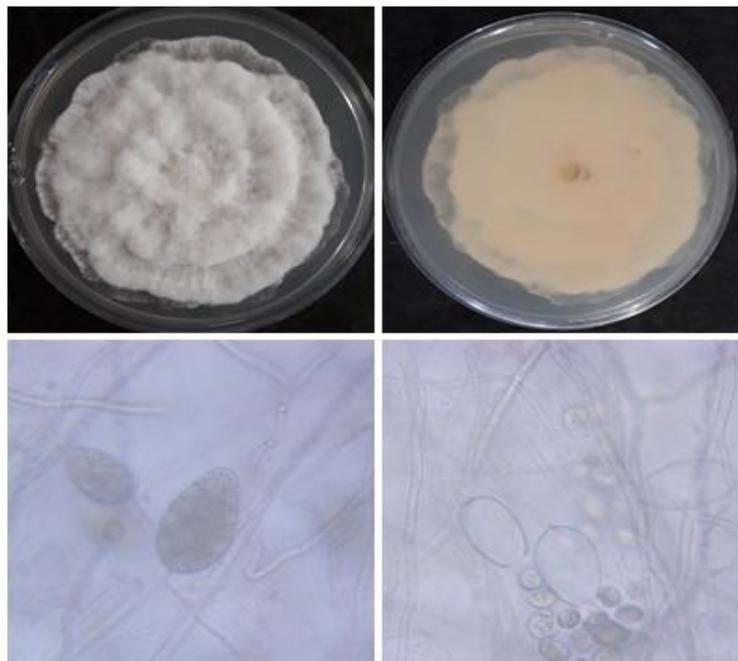


Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique de *Phytophthora gonapodyides* (originale)

IV.3.2. *Phytophthora cinnamomi* (Rands, 1920)

Les cultures de cette espèce, montrent un mycélium aérien dur, uniforme et abondant qui pousse parfois en rosette. Les hyphes sont typiquement coralloïdes avec des renflements hyphes abondants. Selon Smahi (2019), ces critères comptent parmi les principaux caractères morphologiques permettant de distinguer *P. cinnamomi* des autres espèces de *Phytophthora*.

Leurs sporanges sont non papilleux, persistants, principalement ovoïdes, ellipsoïdes à obpyriques avec un épaississement apicale, effilés ou arrondie à la base, avec une prolifération à la fois interne et externe (Fig. 26). Les chlamydospores sont produites abondamment sur milieu de culture.

Températures cardinales: La température maximale de croissance était de 33 °C, tandis que la température minimale était d'environ 5 °C. La température optimale se situe entre 25 °C et 30 °C.

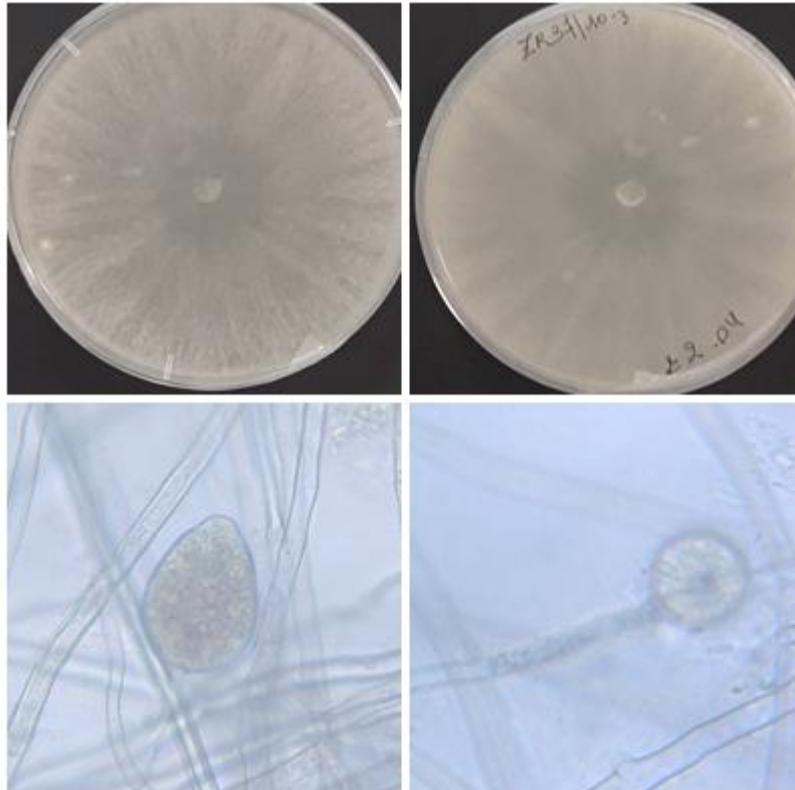


Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de *Phytophthora cinnamomi* (originale)

IV.3.3. *Phytophthora ramorum*

Les isolats identifiés comme *P. ramorum* ont caractérisés par un mycélium apprimé, formant des anneaux de croissance concentriques plus ou moins prononcés (Werres et al., 2001).

Leurs sporanges sont hyalins, ellipsoïdes, fusiformes ou allongés-ovoïdes, sympodiaux, semi-papillés et caduques, portés sur un court pédicelle. Ces sporanges se produisent seule, mais dans certains cas, elles se développent en grappes de 2–12 sur des sporangiophores ramifiés de manière sympodiale.

Les chlamydo-spores sont grandes, rondes et hyalines. Elles sont terminales et intercalaires ou plus rarement latérales, et constituent un bon élément diagnostique, notamment en raison de leur grande taille (moyenne 46-60 µm). Sur le milieu de culture, elles sont formées abondamment en gélose, d'une forme globuleuse à parois minces.

Les hyphes sont souvent extrêmement noueux, bien qu'ils soient dépourvus de renflements, et une septation abondante peut être observée, en particulier lors de la production de chlamydo-spores.

Températures cardinales: La croissance est optimale à 18-20°C : une croissance relativement lente. Les températures minimales et maximales sont 2°C et 30°C, respectivement. Sachant que, l'espèce peut survivre à des températures très basses, sans se développer.

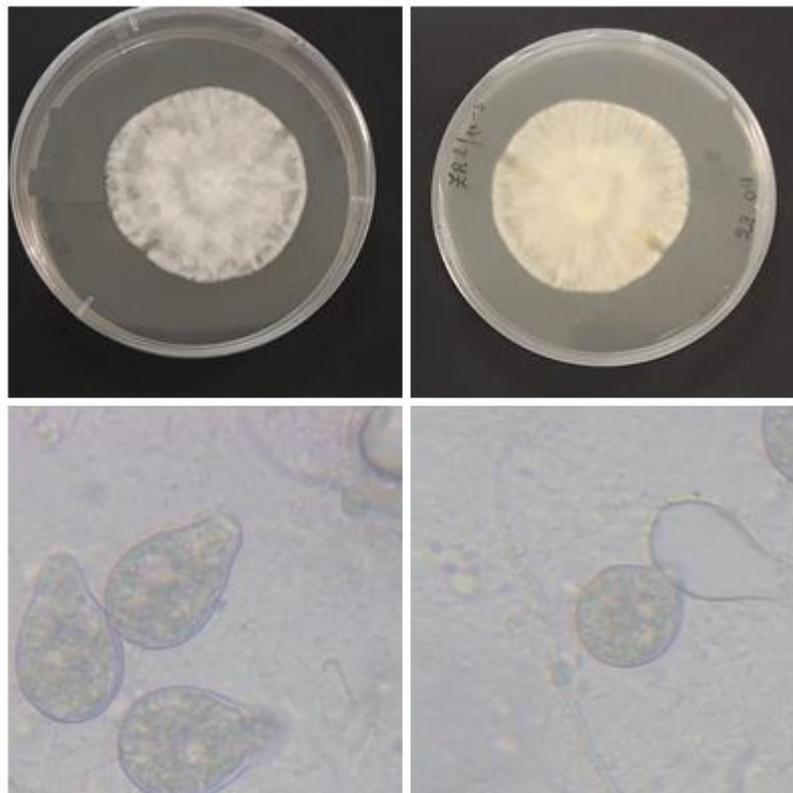


Figure 27 : Aspect macroscopique et microscopique de *Phytophthora ramorum* (originale)

IV.3.4. *Pythium ultimum*

L'isolement de cette espèce est généralement difficile à cause des espèces saprophytes les plus compétitifs, qui germent à la surface de gélose la plupart du temps.

Traditionnellement, l'identification des espèces appartenant à ce genre est basée sur la l'aspect du thalle sur la gélose. De plus, la forme des sporanges, les gonflements des hyphes, la forme des oogonies et celles des anthéridies.

Les isolats ZR1, ZR3, ZR10, ZR16, ZR18, ZR28 et ZR42 ont été identifiés comme *P. ultimum*. Leurs colonies sur un milieu de culture PDA ont un mycélium aérien, cotonneux, avec une croissance rapide par rapport à d'autres oomycètes isolés dans cette étude. Les gonflements des hyphes sont généralement terminaux, globuleuses en forme de citron.

Les sporanges et les zoospores se forment facilement. En effet, elles sont globuleuses, intercalaires et terminales. Selon Allen *et al.* (2004), cette forme sphérique des sporanges considère comme l'un des principaux clé d'identification de l'espèce.

Températures cardinales: L'espèce se développe entre 2 et 38 °C, avec un optimum entre 25 et 30 °C.

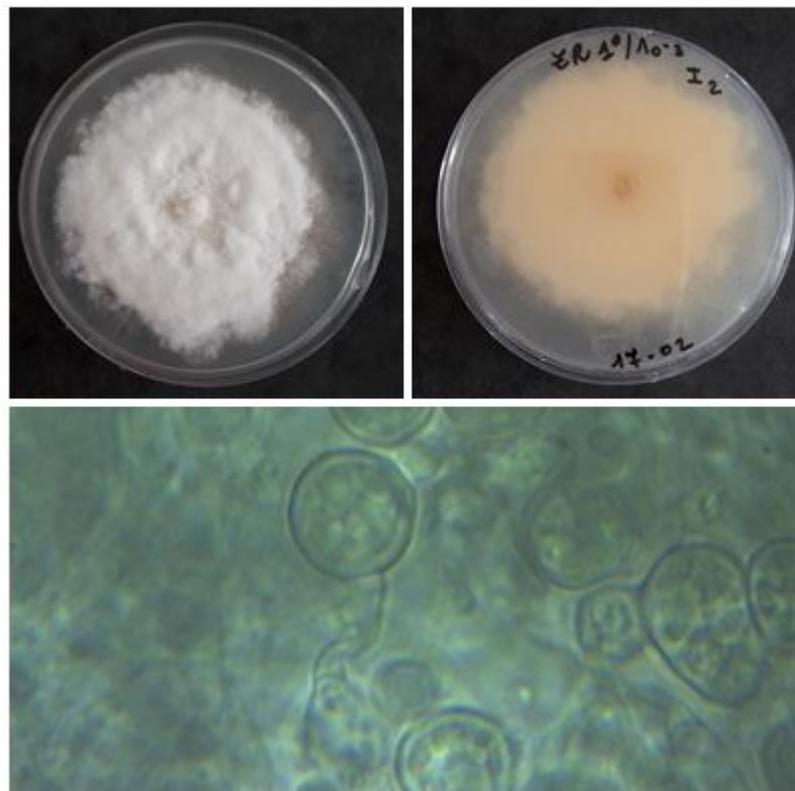


Figure 28: Aspect macroscopique et microscopique *Pythium ultimum* (originale)

IV.3.5. *Pythium polare* (Tojo, van West & Hoshino sp. nov.)

Etymologie : « polaire » fait référence à la zone à partir de laquelle il a été isolé.

Les isolats obtenus dans cette étude forment tous une colonie blanche, aérienne, en forme de rosette. Au cours de la germination des sporanges, ceux-ci produisent un tube d'émission surmonté d'une vésicule dans laquelle le protoplasme migre et les zoospores se forment puis sont libérées (Middleton, 1943). Ces sporanges ont une forme globuleuse. Ces dernières sont particulièrement difficiles à observer, étant donné que leur formation nécessite des conditions très précises (présence d'eau : technique de sporulation) (Fig. 29)

Températures cardinales: La température de croissance optimale pour tous les isolats de *P. polare* est comprise entre 22 °C et 25 °C. La température minimale de croissance est inférieure à 1 °C et la température maximale est comprise entre 27 °C et 30 °C.

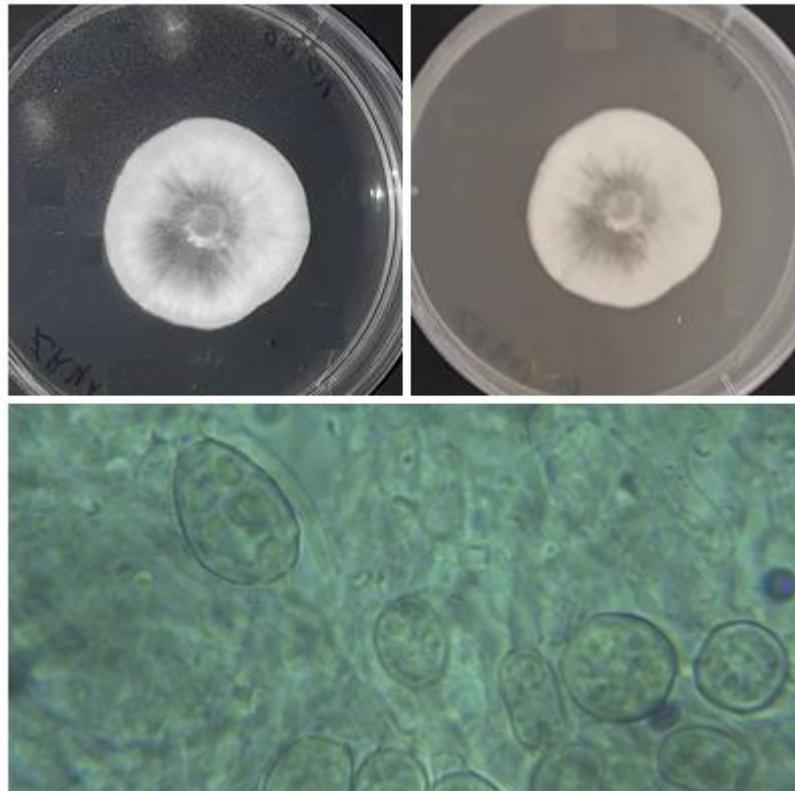


Figure 29: Aspect macroscopique et microscopique de *Pythium polare* (originale)

IV.3.6. *Diplodia sapinea* (Syn. *Sphaeropsis sapinea*) Fuckel Fr.

Étymologie : Son ancien nom « *Diplodia pinea* » est due à sa première description sur son hôte le Pin sylvestre, en France

Les isolats ZR6, ZR7, Zr24, ZR25, ZR34 et ZR37, ont été identifiés comme *D. sapinea*. Sur le milieu PDA, cette espèce se caractérise par un thalle duveteux, aérien, blanc à gris vers la marge. On remarque une légère pigmentation violette dans la marge des colonies. Cette pigmentation apparaît beaucoup plus à basse température. Le revers est d'une couleur grisâtre foncé. L'espèce se caractérise par une croissance relativement rapide (fig. 30)

Les conidies au sein des conidiomata sont oblongues, droites à légèrement courbées avec un apex obtus et une base tronquée. De plus, elles sont aseptées avec un ou deux septales, rarement avec trois, d'une couleur brun foncé. Elles possèdent des parois cellulaires épaisses. Selon Smahi (2019) l'espèce *D. sapinea* possède les sporanges les plus longues par rapport à d'autres espèces de Botryosphaeriaceae.

Températures cardinales: La température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30°C. Aucun isolat ne s'est développé à une température de 5 °C ou 40 °C.

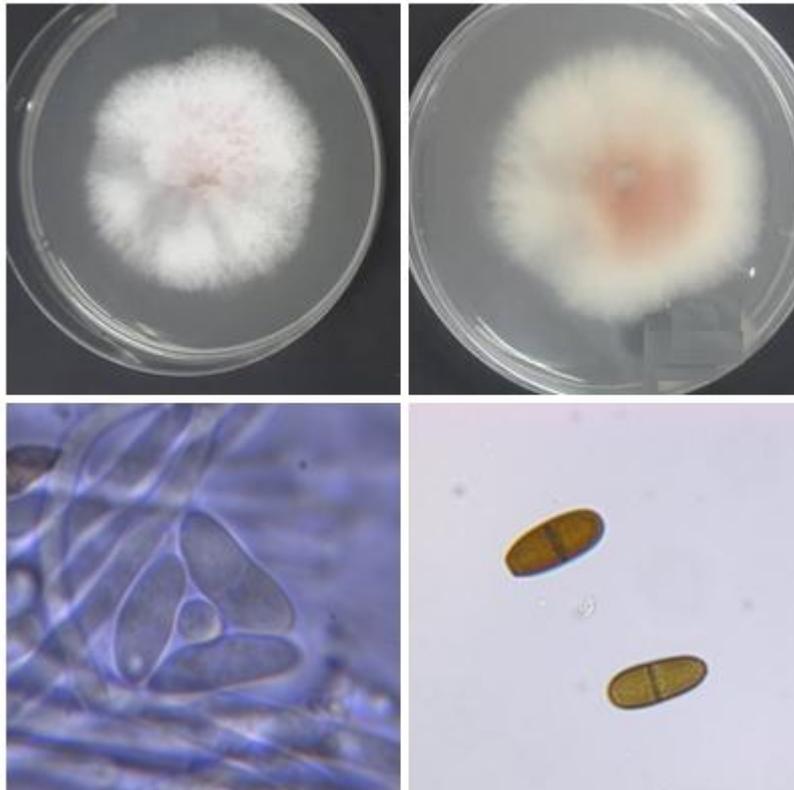


Figure 30 : Aspect macroscopique et microscopique de *Diplodia sapinea* (originale)

IV.3.7. *Lasiodiplodia exigua* Linaldeddu B. T., Deidda A. et Phillips A.J.L. sp. nov.

Etymologie : Nommée en raison de ses petites conidies par rapport à d'autres espèces de *Diplodia*.

Les isolats identifiés comme *Lasiodiplodia exigua* ont un mycélium aérien modéré, moelleux avec une croissance rapide sur le milieu de culture PDA. En effet, il est capable de remplir toute la boîte de pétri (φ 90mm), après 72 heures d'incubation entre 25°C à 30 °C. Elles sont d'une couleur initialement blanche qui devient rapidement gris pâle, avec un revers gris-olivacé (fig. 31)

Les conidies sont initialement hyalines et aseptées, d'une forme ellipsoïde à ovoïde, à sommet et à base arrondies. Elles possèdent une paroi cellulaire épaisse, et un contenu

granuleux. Après la libération, elles deviennent septées avec un septale, d'une couleur brune foncée et des stries longitudinales facilement observables.

Températures cardinales: L'espèce peut se développer entre une température supérieure à 5 °C jusqu'à 40 °C, avec un optimum entre 25 °C à 30 °C.

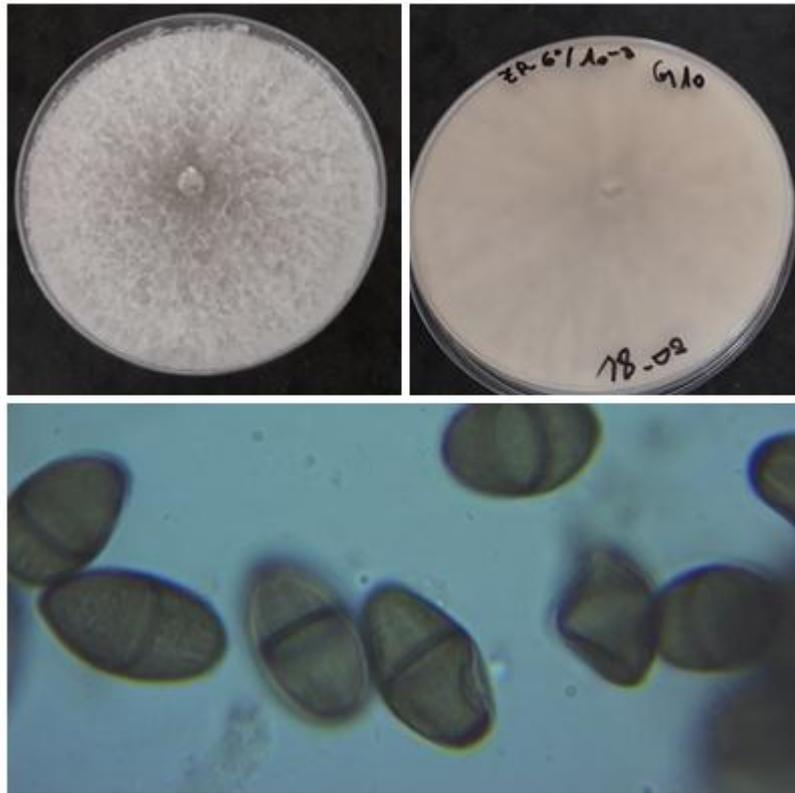


Figure 31: Aspect macroscopique et microscopique de *Lasiodiplodia exigua* (originale)

IV.3.8. *Fusarium oxysporum*

Le mycélium des isolats identifiés comme *F. oxysporum*, est floconneux d'une couleur varie du blanc au violet pâle sur le milieu PDA. Les macroconidies sont courtes, falciformes presque droite, à paroi mince et le plus souvent de 3cloisons. Les macroconidies sont formées à partir des monophialides sur conidiophores ramifiés (Fig. 32). Les microconidies sont généralement cloisonnées de un à une cloison, d'une forme ovale ou réniforme et sont formées en abondance avec des fausses têtes sur des monophialides court. Les chlamydospores sont intercalaires et formés en abondance dans les hyphes.

Températures cardinales: Les températures minimales et maximales de ce champignon sont 5 °C et 37 °C, respectivement. L'optimum de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C.

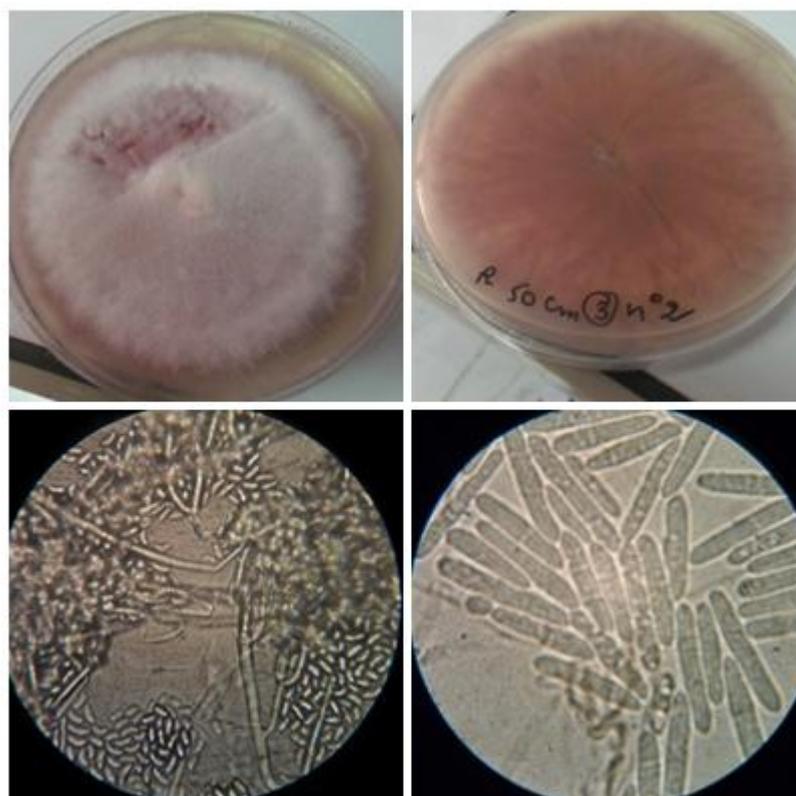


Figure 32 : Aspect macroscopique et microscopique *Fusarium oxysporum* (originale)

IV.3.9. *Alternaria solani*

Les cultures d'*Alternaria solani* se présentent sous forme de colonies rase verdâtre, et un revers noir. La couleur noire est due à la mélanine qui imprègne les parois. Les conidiophores à croissance sympodiale, noirs, foncés sont simples ou branchés, produisant, à leurs extrémités terminales, des chaînes de conidies. Ces dernières sont, à la naissance, ovoïdes à base large et sommet conique et, à maturité, prolongées par un bec qui leur confère, finalement, la forme d'une raquette ou d'une massue. Les conidies sont pluricellulaires, divisées par des septas transversaux, longitudinaux ou obliques tout à fait caractéristiques (Botton *et al.*, 1990) (Fig. 33)

Températures cardinales: L'espèce peut se développer bien entre 2 °C et 32 °C. Son optimum est de 25 °C et 29 °C.



Figure 33 : Aspect macroscopique et microscopique *Alternaria solani* (originale)

IV.3.10. *Alternaria alternata*

L'espèce *A. alternata* est la plus fréquemment rencontrée et un des mycètes les plus communs de la flore fongique aéroportée.

Les colonies se présentent sous forme de colonies vert foncé, veloutées et sillonnées. Le revers est vert noirâtre. Sur le milieu PDA, elles se caractérisent par une croissance rapide. Le mycélium est remplis la totalité de boîte pétri pendant 7 jours à 25 °C. Le thalle est plat, duveteux à laineux et est recouverte d'hyphes aériens courts et grisâtres devenant noir verdâtre ou brun olive, avec un pourtour plus clair (Fig. 34)

Le revers de la colonie est en général brun et peut noircir en raison de la production d'un pigment apparenté à la mélanine.

Les hyphes sont septés et dématiés. Les conidiophores sont courts, septés, bruns, et ils ont un aspect plus ou moins sinueux (en zigzag). Les conidiophores portent de grandes conidies simples ou ramifiées, ovoïdes ou ellipsoïdes, segmentées par des cloisons (septa) transversales et longitudinales. Ces conidies peuvent produire des tubes germinatifs. Elles sont fortement pigmentées, mûriformes et à parois lisses ou rugueuses. L'extrémité de la conidie située près du conidiophore est arrondie, tandis que l'extrémité située près de l'apex est effilée, conférant aux conidies leur aspect typique de massue

Les espèces du genre *Alternaria* sont cosmopolite, pathogène de végétaux, qui se comporte surtout comme un parasite de faiblesse et se développe sur les plantes sénescents, sur les légumes, sur des débris organiques divers, sur le sol, sur les produits alimentaires comme il se développe sur le papier.

Températures cardinales: L'espèce peut croître à des températures de 2 °C à 32 °C, avec un optimum entre 25 et 29 °C.

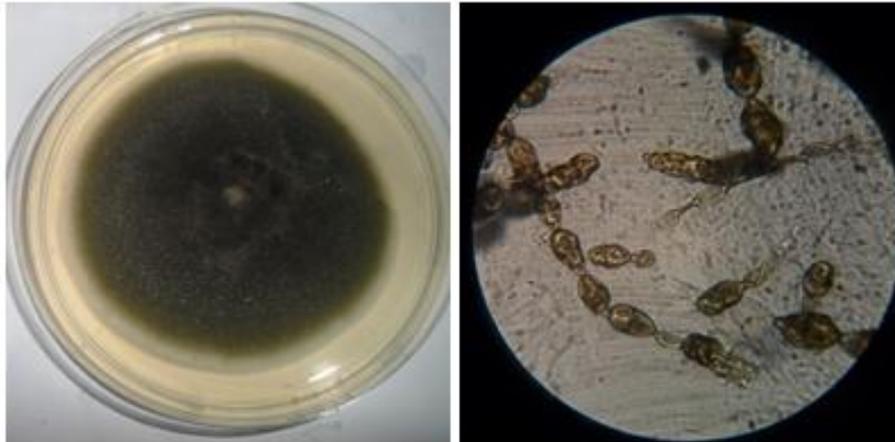


Figure 34 : Aspect macroscopique et microscopique de *Alternaria alternata* (originale)

IV.3.11. *Trichoderma harzianum*

Les espèces du genre *Trichoderma* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. La forme parfaite appartient à la classe des Ascomycètes (Hypocrea). Ce genre comprend 20 espèces environ, cellulolytiques.

Les isolats identifiés comme *T. harzianum* ont un mycélium laineuse, avec un aspect granuleux, à croissance rapide, et une couleur blanche au début, et vert foncé à la maturité. Cette couleur verdâtre est due aux structures de reproductions

Sous un microscope optique, le mycélium est apparu ramifié, incolore, avec des conidies d'une couleur verte. Les conidiophores hyalins, en touffe plus ou moins compactes, sont septés, régulièrement et abondamment ramifiés à angle droit par rapport à l'axe principal. Les phialides, ovoïdes à ellipsoïdales, isolées ou groupées en petit nombre (2-3) sont disposées sur les branches, généralement perpendiculaires à l'axe. Les conidies unicellulaires, rondes ou ellipsoïdales, lisses ou verruqueuses, sont produites en masses mucilagineuses formant des glomérules au sommet des phialides (Fig. 35).

Les espèces de *T. harzianum* ont un intérêt agro-alimentaire dans la production de cellulase et certaines espèces sont utilisées en lutte biologique pour la protection d'arbres et cultures végétales contre l'attaque d'agents phytopathogènes grâce à leur forte action antagoniste sur d'autres champignons comme *Fusarium oxysporum* (Samuels, 1996 ; Hermosa *et al.*, 2000).

Températures cardinales: La température optimale de cette espèce est variée entre 30 et 35 °C. Les températures minimales et maximale de sa croissance sont 5 et 42 °C, respectivement.

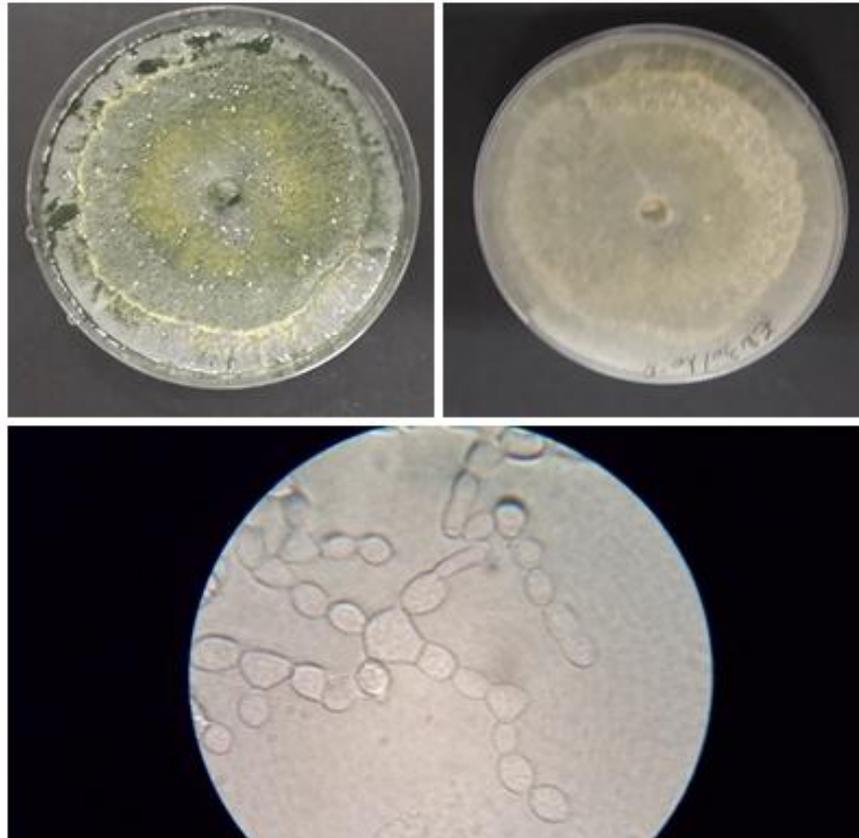


Figure 35: Aspect macroscopique et microscopique *Trichoderma harzianum* (originale)

IV.3.12. *Trichoderma viride*

En générale les espèces du genre *Trichoderma* est naturellement abondant dans le sol et la matière organique tels le bois mort ou en décomposition, les débris végétaux et la paille (Papavizas 1985; Sippell *et al.* 1985; Widden et Scattolin 1988). Ces espèces possèdent également des aptitudes à dégrader de nombreux substrats organiques du sol pour se nourrir et se développer ce qui suggère qu'elles peuvent survivre dans plusieurs niches écologiques (Papavizas 1985).

Nos colonies identifiées comme *T. viride* ont un mycélium avec un aspect cotonneux et une couleur de base jaune foncé qui surmonte par la suite par des conidies d'une couleur vert claire (Fig. 36). Le centre de la boîte est verdâtre. Le verso de la colonie porte une couleur jaune.

Les observations microscopiques révèlent que ces souches possèdent un mycélium septé et ramifié transparent ; la structure de reproduction (conidiophore) se développe à partir d'une cellule différenciée. Les conidies sont généralement produites aux extrémités des phialides.

Températures cardinales: L'espèce se développe bien entre 5 et 42 °C, avec un optimum qui varié entre 30 et 35 °C.

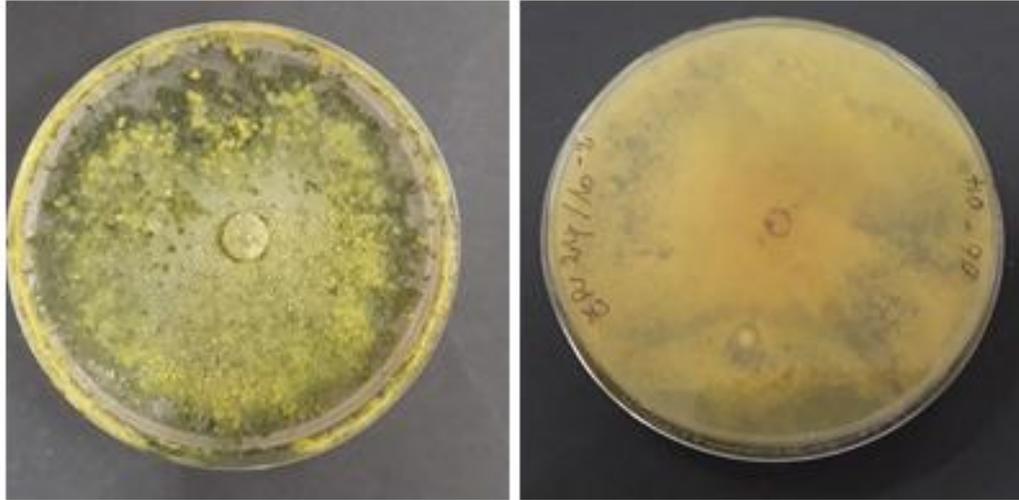


Figure 36 : Aspect macroscopique et microscopique de *Trichoderma viride* (originale)

IV.3.13. *Rhizopus stolonifer* Vuill (1902)

Les mucorales sont des champignons du sol, cosmopolites, saprophytes, rarement mycoparasites ; quelques-uns sont des parasites de plantes ou d'animaux (Hawksworth *et al.*, 1995).

Les champignons appartenant à cet ordre sont des champignons filamenteux à mycélium souvent envahissant à croissance très rapide, avec un aspect cotonneux de couleur blanche à grise et ces hyphes ne sont pas septés (Bottons *et al.*, 1990) (Fig. 37)

Les espèces isolées forment tous une colonie blanchâtre devenant brun grisâtre en raison du sporangiophore brunâtre et des sporanges brun-noir. Le mycélium, le sporangiophore et les spores peuvent se développer à l'extérieur de la boîte de Pétri et donc une contamination du laboratoire peut facilement se produire.

Les sporangiophores sont solitaires ou regroupés de 2 à 7 stolons à parois presque incolores à brun foncé, lisses ou légèrement rugueux opposés aux rhizoïdes ramifiés. Les sporanges sont globuleux à subglobuleux, brun noirâtre à maturité. Les spores ont une forme irrégulière souvent polygonales ou ovaïdes, globuleuses, elliptiques et striées (Samson *et al.*, 2011)

Températures cardinales: L'espèce peut se développée entre 5 et 33 °C, avec un optimum entre 25 et 26°C. Leur température maximale variée entre 32 et 33°C.

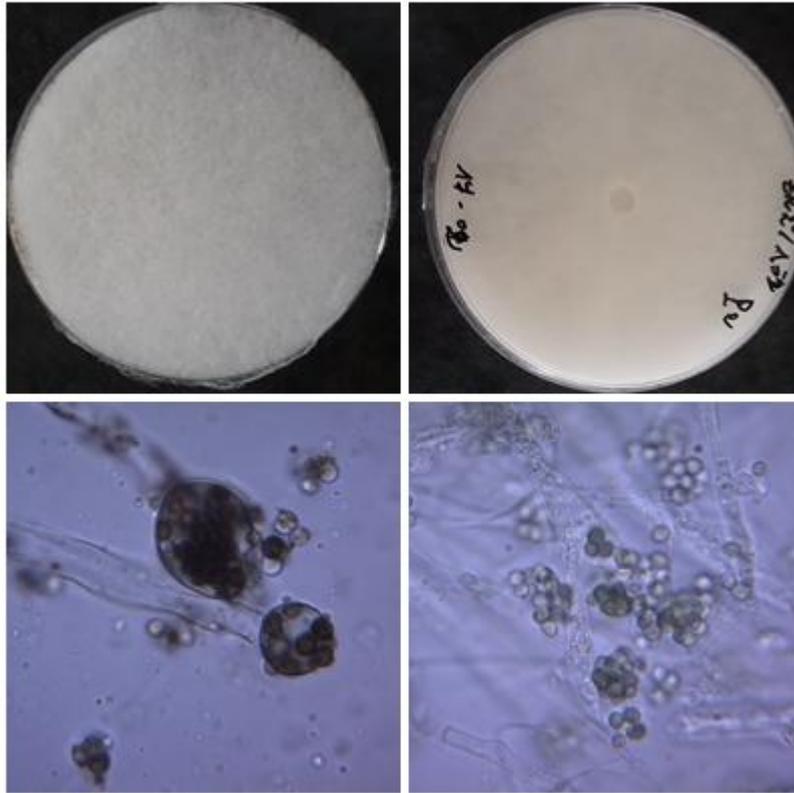


Figure 37 : Aspect macroscopique et microscopique de *Rhizopus stolonifer* (originale)

IV.3.14. *Mucor racemosus*

Les espèces du genre *Mucor* sont les champignons les plus importants du groupe des Mucorales ; il se présente avec un thalle siphonné, velouté ou floconneux, blanc, grise ou noir (Fig. 38). Ne présente pas de stolons. Sporocystophores dressés, toujours terminés par un sporocyste, simples ou à ramification sympodiale, monopodiale ou mixte. Sporocystes globuleux, blanc ou un peu coloré, sans apophyse, pourvus d'une collumelle, multispores. Spores de formes variées, lisses ou granuleuses. Clamydospores parfois présentes. Zygosporés sans appendices sur les suspenseurs (Botton *et al.*, 1990)

En outre, les champignons appartenant de ce genre peuvent aussi causer des infections chez l'homme, grenouilles, les amphibiens, les bovins,...etc ; et a plupart sont incapables de croître à 37 ° C (Anonyme, 2010).

Les souches identifiées comme *M. racemosus* ont un mycélium blanc qui devenant brun gris en vieillissant de 2 à 20 mm de haut.

Sous le microscope, les sporocystophores long sont observés ramifiés, avec une paroi incrustée. Les sporocystes sont hyalins, devenant gris à bruns en vieillissement, et une paroi rugueuse. Les clamydospores sont jaunâtre, cylindriques quand jeunes, et subglobuleuses avec l'âge, retrouvées dans toutes les parties du thalle, y compris les sporocystophores.

Températures cardinales: Le champignon se développe entre 4 et 37 °C, avec un optimum de 20 et 25 °C.

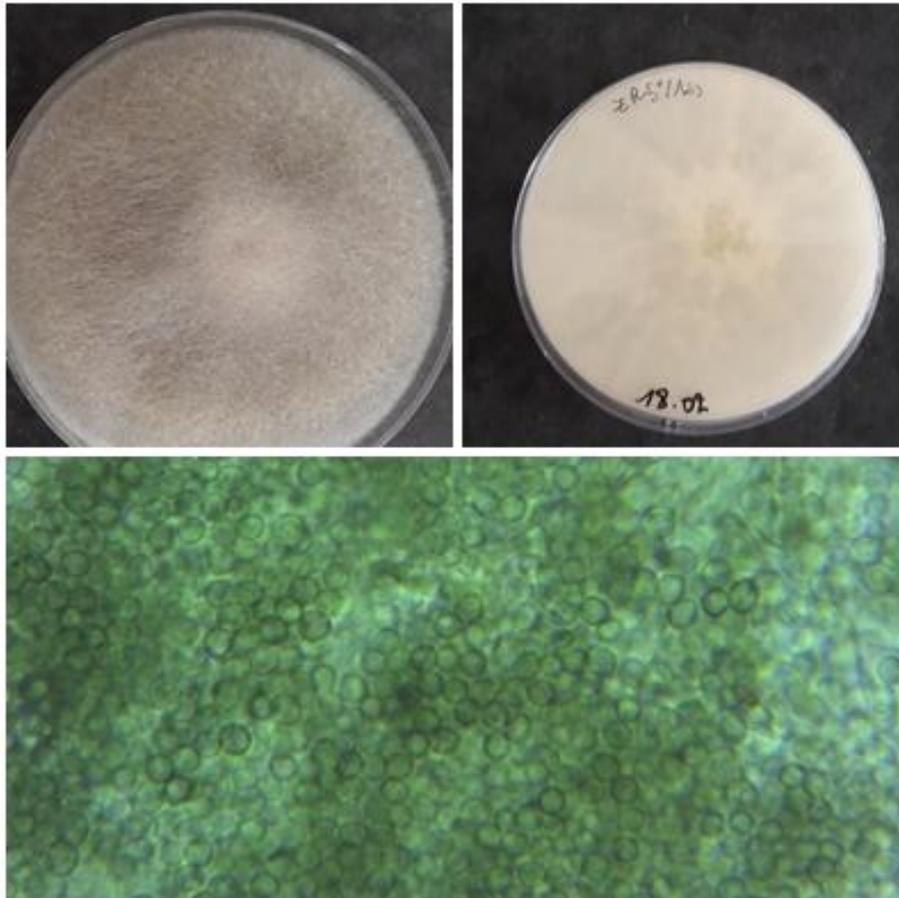


Figure 38: Aspect macroscopique et microscopique de *Mucor racemosus* (originale)

III.3.15. *Aspergillus niger*

Les colonies sur gélose pomme de terre et dextrose (PDA), sont caractérisées par une croissance rapide. En effet, elles sont une couleur blanche, devenant rapidement noires au moment de la production de conidies. Le revers de la colonie est jaune pâle et se plisse de façon radiale au cours de la croissance (Fig. 39)

Sur gélose à l'extrait de malt (MEA), les colonies se composent d'un feutre blanc ou jaune compact avec une couche dense de conidiophores de bruns à noirs; le revers de la colonie est de crème à jaune. De plus, elles sont fortement sporulées.

Les hyphes sont septés et hyalins. Les têtes de conidies sont noires, de configuration globuleuse à radiale, et, à maturité, les têtes se segmentent en colonnes lâches. Les conidies sont globuleuses à sous-globuleuses et elles sont brunâtres et de texture verruqueuse, échinulée ou striée. Les conidiophores sont longs à paroi lisse, hyalins, devenant plus foncés à l'apex et se terminant en une vésicule globuleuse à sous-globuleuse

Températures cardinales: L'espèce est un champignon mésophile. Sa température de croissance optimale est de 37 °C, mais le champignon peut survivre jusqu'à 40 °C.

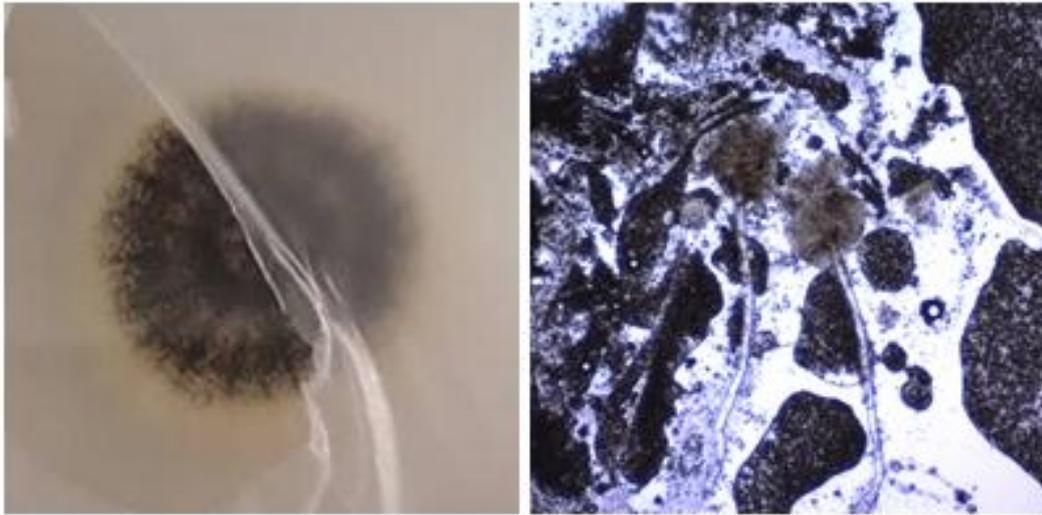


Figure 39 : Aspect macroscopique et microscopique *Aspergillus niger* (originale)

IV.3.16. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus sp. sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Quelques formes parfaites (sexuées) sont connues et appartiennent à la classe des Ascomycètes (*Emericella*, *Eurotium*, *Neosartorya*, etc). On connaît près de 200 espèces d'*Aspergillus* (Fig. 40)

Les colonies d'*Aspergillus fumigatus* sont généralement à croissance modérée à 25 °C sur gélose à l'extrait de malt (MEA) ou sur gélose pomme de terre (PDA). En effet, elles sont plates ou légèrement plissées et plutôt rases, denses et veloutées; le mycélium aérien est vert bleuté. À la maturité, la surface des colonies devient cotonneuse. Le revers de la colonie est brun à noir ou en nuances de vert. Le mycélium se compose principalement d'un feutre dense de conidiophores dressées. Les conidiophores se terminent dans une vésicule couverte soit avec une seule couche palissade comme des phialides (unisérié) ou une couche de cellules sous-tendant (métules) qui portent de petites volutes de phialides (la structure dite bisériés). Le thalle hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés avec une extrémité vésiculaire de forme très spécifique « la tête aspergillaire ». Les conidies généralement rondes de 2 à 3 µm, sont produites à partir des phialides, groupées sur le sommet ou sur la totalité de la vésicule, avec ou sans métules comme éléments intermédiaires.

À un faible grossissement, les têtes de conidies apparaissent en surface nettement radiales en début de croissance; plus tard, à maturité, les têtes sont compactes, et les chaînes de conidies sont en colonnes serrées.

Les espèces appartenant à ce genre sont des champignons cosmopolites. Ce sont des moisissures saprophytes et ubiquitaires (matière organique en décomposition, sol, poussière, compost, denrées alimentaires, céréales,...). Ils sont omniprésents dans l'environnement

humain. Chaque tête aspergillaire est capable de produire jusqu'à 10^4 spores (Botton *et al.*, 1999 ; Hawksworth *et al.*, 1995).

Températures cardinales: Cette espèce se développe bien à des températures allant jusqu'à 45 °C. Sa croissance optimale est de l'ordre 37 °C.

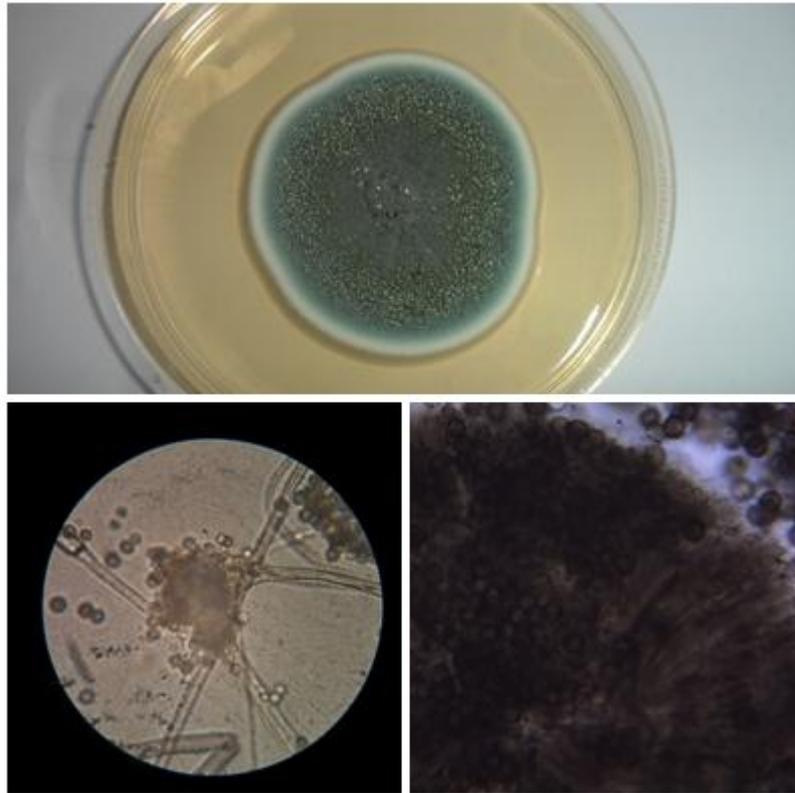


Figure 40 :Aspect macroscopique et microscopique de *Aspergillus fumigatus*(originale)

IV.3.17. *Penicillium solitum*

Les champignons du genre *Penicillium* sont filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Quelques formes parfaites (sexuées) sont connues et appartiennent à la classe des Ascomycètes (*Carpenteles*, *Eupenicillium*, *Talaromyces*). Ce genre comprend entre 100 et 250 espèces (Botton *et al.*, 1999). (Fig. 41)

Les colonies sont duveteuses ou poudreuses, à croissance rapide, sont généralement vertes ou plus rarement blanches. Les conidiophores isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien définies, simples ou ramifiés, possèdent une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres

Généralement, les *Penicillium* sp sont des champignons polyphages, très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les graines, les céréales, etc.... Diverses espèces sont cultivées au niveau industriel pour la

fabrication de fromages (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camembertii*), pour la production de métabolites tels que les antibiotiques (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*), l'acide gluconique (*Penicillium purpurogenum*), et de nombreuses mycotoxines (citrioviridine, griséofulvine, patuline, pénicilline, roquefortine, etc.) (Hawksworth *et al.*, 1995 ; Kiffer & Morelet, 1997)

Températures cardinales: L'espèce peut se développer entre 5 et 37 °C, avec un optimum de croissance à 25 °C.

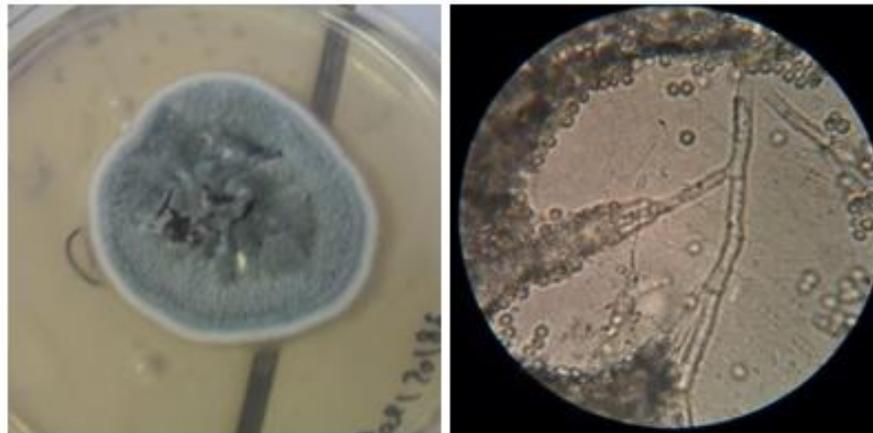


Figure 41: Aspect macroscopique et microscopique de *Penicillium solitum* (originale)

III. 4. Test d'antagoniste:

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro*, ont montré l'effet antagoniste des souches *Trichoderma Viride* et *Trichoderma Harzianum* vis-à-vis des souches pathogènes de *Diplodia* sp. et celles de *Pythium* sp. où on remarque que la croissance mycélienne des souches témoins est très importante.

Après 5 jours d'incubation, les deux souches de *Tri. Viride* et *Tri. Harzianum* ont montré une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes test, et ceux-ci, par l'apparition d'une zone d'inhibition en dispersant certains métabolites qui vont causer un arrêt de croissance. La figure 42 montre l'inhibition de croissance de *Diplodia* sp. et du *Pythium* sp. par les souches *Trichoderma Viride* et *Trichoderma Harzianum* sur le milieu de culture PDA à 25 °C.

Les résultats montrent qu'au bout de cinq jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que les isolats de pathogènes n'occupent qu'une petite surface variant de quelques mm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 50 %. Les mêmes résultats ont été obtenus par d'autres études (Smahi, 2013).



Figure 42 : Inhibition du développement de *Diplodia sp.* (à gauches) et du *Pythium sp.* (à droite) par les souches de *Tri. Harzianum* et *Tri. Viride* (originale)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'endophytisme des champignons est une interaction biologique qui se caractérise par le fait, pour un individu issu du règne « *Fungi* », de coloniser l'intérieur d'un organisme végétal, de manière asymptomatique. Il est parfois retrouvé dans la littérature, que l'endophytisme donne systématiquement lieu à une interaction biologique mutuellement positive ou à défaut, au moins non délétère pour la plante hôte, auquel cas cette interaction pourrait être qualifiée de mutualisme. A la différence de la symbiose, l'endophytisme n'est pas une interaction systématiquement durable (Andéol *et al.*, 2016).

Les champignons endophytes sont majoritairement issus du Phylum Ascomycota et présentent une grande diversité (Arnold, 2007). Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente de quelconques signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Andéol *et al.*, 2016).

C'est dans ce sens que s'article la présence étude vise à isoler et à identifier les espèces fongiques ayant une relation avec la mortalité des jeunes plantules.

D'après nos expériences, la rhizosphère des trois pépinières prospectées révèle la présence d'une grande diversité de la flore fongique. Selon les résultats obtenus par l'analyse mycologique du sol, il semble que la méthode de dilution en utilisant l'eau physiologique nous a permis un isolement plus élevé de endophytes fongiques d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

L'identification macroscopique et microscopique nous a confirmé la présence de dix-sept espèces fongiques, appartenant aux genres *Pythophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Lasiodyplodia*, *Alternaria*, *Mucror*, *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicellium*. Certains d'eux sont largement étudiés en raison de leur importance économique. En effet, ils peuvent causer des dégâts très importants sur les végétaux, ils peuvent être de redoutables parasites de cultures en pépinière, C'est le cas des espèces du genre *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* et *Fusarium sp.*

Ces espèces sont connues pour leurs spectres d'hôtes variables et leur pouvoir de colonisation très élevé sur les plantes cultivés comme sur les plantes forestières. Selon Nelson *et al.* (1981), l'espèce *F. oxysporum* est parmi les plus économiquement important compte tenu de ses nombreux hôtes et le niveau de perte qui peut entraîner. De plus, c'est l'espèce la plus réponde dans ce genre. Du fait qu'elle peut être trouvé dans la plupart des sols de l'Arctique (Kommedahi, *et al.*, 1988), tropical, désertique (Mandee, *et al.*, 1995) et cultivées ou non (McMullen *et al.*, 1984).

Les symptômes sont apparus, après les premières levées des jeunes semis. En Effet, les pourritures des racines ont été observées la plupart du temps, les plantules brunissent par la suite, et se dessèchent très rapidement. Les foyers s'étendent rapidement et peuvent en quelques jours atteindre le semis entier.

Le contrôle des maladies phytopathogènes peut se faire par certaines méthodes de lutte classiques, comme l'utilisation des variétés résistantes et l'application de certains fongicides,

dont les limites de leur efficacité sont bien connues. La lutte biologique à l'aide des agents de lutte biologique constitue une des solutions alternatives qui permettra de lutter contre l'agent causal et de réduire l'emploi de produits chimiques. Dans ce contexte, des isolats fongiques (*Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride*) ont fait l'objet d'une étude par des tests d'antagonisme, par confrontation directe avec *Pythium sp.* et *Diplodia sp.*

L'étude du pouvoir antagoniste *in vitro* est basée sur la capacité des champignons du genre *Trichoderma sp.* à inhiber la croissance mycélienne de avec *Pythium sp.* et *Diplodia sp.* Les isolats ont manifesté une activité antifongique extrêmement marquée.

En conclusion, l'arsenal de lutte contre les maladies des plantes se fonde sur une connaissance approfondie des agents pathogènes en cause, de leur biologie et de leurs interactions avec les plantes hôtes et l'environnement. A la lumière de cette conclusion, nous considérons que notre étude, comme toute autre recherche, ne peut être que participative et nécessite absolument la complémentarité d'autres études.

Pour cela, on propose :

Sur le plan technique :

- Utiliser des techniques moléculaires comme PCR pour révéler d'autres espèces qui existent et qui peut être stérile ou mal identifiées.

Sur le plan technologique :

- L'inventaire des souches isolées des champignons peut faire l'objet d'une recherche dans le domaine biotechnologiques comme : la production des antibiotiques.

- Identifier des espèces qui ont un rôle dans la lutte biologique.

- Les compétences acquises dans ce domaine peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité fongique d'autres types de sols (sol des forêts, sol des barrages ...).

Sur le plan thérapeutique :

- Production des molécules d'intérêt thérapeutique très diverses dont on peut citer les alcaloïdes, des polycétides, des terpènes. Ces molécules possèdent un spectre d'activité pharmacologique très large (Venugopalan *et al.*, 2015).

Sur le plan biologique :

- Savoir la richesse de notre pays aux espèces des champignons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Andéol S., Benjamin C., 2016.** Les champignons endophytes : impact sur les ecosystèmes et Production de molécules d'intérêt thérapeutique. dumas-01266084
- Arnold A. E. et Lutzoni F., 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88: 541-549.
- Arnold A. E., Mejía L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. et Herre E. A., 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (26): 15649-15654.
- Arnold A., 2007.** Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21: 51-66.
- Arnold A. E. et Lewis L. C., 2005.** Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. In: Vega F.E., M. Blackwell (ed.) *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York, 74-96.
- Anderson T.-H. and Martens R., 2013.** *Soil Biology and Biochemistry*, 57 : 487-495
- Bååthe E., Söderström B. E., 1980.** Comparisons of the agar-film and membrane filter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil, with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biol. Biochem.* 12 :385-387.
- Bazin M. J., Markham P., Scott E. M. et Lynch J. M., 1990.** Population dynamics and rhizosphere interactions, In J. M. Lynch (ed.), *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, 99-127.
- Bouneghou B., 2011.** L'effet inhibiteur de *Pythium* sp. sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata*, 17 pages.
- Boiron P., 1996.** *Organisation et biologie des champignons*. Nathan. Paris
- Bartnicki-Garcia, S., 2002.** Hyphal tip growth. Outstanding questions. In: Osiewacz, Heinz D. (Ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 29e58.
- Boiron P., 1996.** *Organisation et biologie des champignons*. Nathan. Paris.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., & Backhouse, D., 1994.** *Laboratory manual for Fusarium research*, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia, 133.
- Burgess, L.W., and C.M. Liddell., 1997.** *Laboratory manual for Fusarium research*. The University of Sydney, Australia (Béatrice,2001) .

BASF, the chemical company., 2008. Dynamique de propagation de la fusariose *Fusarium roseum* et *Microdochium nivale* publié sur internet le 13/11/2008.

Carlile M.J., Watkinson S.C. The Fungi. 1994. (Academic Press eds). Caron D.2000. Fusarioses des épis, Sait-on prévoir leur développement. Perspectives Agricoles Janvier 2000, pp 56-62.

Chet L., 1990. Biological-control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonistes in combination with soil treatment .in biological of soil-borne plant pathogens,ed D.Hornby ,pp15-25.CAB international ,Oxon,England.

Claud-Michel G., Walter C., Claud Rémy J., Berthelin J., Morel J., 2005. Sols et environnement, Ed Paris. 816 pages

Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P., 2002. Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

Collado J., Platas G., González I. et Peláez F., 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. New Phytol., 144: 525-532.

Clay K. et Schardl C., 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. American Naturalist 2002; 160 Suppl 4: S99-S127.

Clay K. Grass endophytes. In: Fokkema N. J. and Van Den Heuvel J.(eds). 1986. Microbiology of the phyllosphere, Cambridge, UK: Cambridge University Press 1986; pp. 188-204.

Claydon N., Grove J. F. et Pople M., 1985. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. Phytochemistry 1985; 24: 937-943.

Calvet R., 2003, Le sol propriétés et fonctions, Tome 1. Edition France agricole, Paris. 456 pages

Deshpande S. D., et. Koppikar G.V., 1999. A study of mycotic keratitis in Mumbai. Indian J Pathol Microbiol. 42:81-7.

De Hoog, G. S., Guarro J., Gene J. et Figueras M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Delarras C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier, 654 pages.

Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Ed, INRA, Paris, 382 pages.

Davet P. 1996. Vie microbien du sol et production végétale. Paris.383

Dajoz R., 2000. Précis d'écologie. 7ème Edition, Paris. 615 pages.

Fisher P. J., Graf F., Petrini L. E., Sutton B. C. et Wookey P. A., 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia.*, 87: 319-323.

Gagné S., 1984. Bactéries telluriques et rhizosphérique inhibitrice de certains champignons phytopathogènes.

Garrido-Jurado I., Ruano F., Campos M., Quesada-Moraga E., 2011. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biological Control.* 59: 239-244.

Gonçalves, A.B., Paterson, R.R.M. et Lima, N., 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health,* 209: 257-264.

Girbardt, M., 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta* 50, 47e59

Gregory, P.H., 1984. The fungal mycelium: an historical perspective. In: Jennings, D.H., Rayner, A.D.M. (Eds.), *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium.* Cambridge University Press, pp. 1e22

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F. et Kloepper. J. W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology,* 43: 895-914.

Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res.* 2007 ; 111(5) : 509–47

He R., Wang G. et Liu X., 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Journal of Biotechnology,* 8 (2): 191-195

Ingham E. R. 2000. The soil biology primer : soil fungi ,chapter 4, (edn) NRCS. Departement of agriculture. USA. ISBN.Quebec.Canada.

Justa-Schuch, D., Heilig, Y., Richthammer, C., Seiler, S., 2010. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 76, 220e235

Kapulink Y., 1996. Plant growth promotion by rhizosphère bacteria. In plant Roots, the hidden half. Eds. Y.Waisel, A.Eshel and U.Kafkafi, pp.769-781.

Kusari S. et Spiteller M., 2012. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics,* U. Roessner, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), 241-266.

Kusari S., Singh, S. et Jayabaskaran C., 2014. Biotechnological potential of plant associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in Biotechnology,* 32 (6): 297-303.

- Kendrick, B. 2002.** The fifty Kingdom. Third Edition. Mycologue Publications. Sydney Canada. 373 p.
- Kachuei R., Emami M., Naeimi B. and Diba K., 2012.** Isolation of keratinophilic fungi from soil in Isfahan province, Iran. *Journal de Mycologie Médicale*, 22 (1): 8-13.
- Keller N. P., Turner G., Bennett J. W., 2005.** Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2005 ; 3(12) : 937–47
- Lacoste A., Salanon R., 2001.** *Eléments de biogéographie et d'écologie.* Ed, Nathan, 318 pages.
- Laveque C. et Mounolou J. C., 2001.** Biodiversité Dynamique biologique et conservation .Ed.Dounod 284p.
- Lynch J-M., 1990.** Microbial métabolique In the rhizosphère . Eds.J.M.Lynch pp.177-206.wilay Series in Ecological and applied Microbiology.
- Lepoivre P. H.,2003.**phytopathologie . Ed,Bruxelles.
- Leslie, J. F., et Summerell, B. A., 2007.** The *Fusarium* Laboratory Manual.
- Larone, D. H., 1995.** Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Liddell, C. M., 2003.** *Fusarium* head blight of wheat and barley,35-43. 26 ref. [Book chapter]
- Link, H. F., 1809.** Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3: 3-42.
- Madigan M.T., Matinko J. M. et Parker J., 1997.** Brok biology of microorganisms, 8th Edition. USA.
- Moricca S. et Ragazzi A., 2008.** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 2008; 98: 380-386.
- Maheshwari R. 2006.** What is an endophytic fungus? *Current Science* 2006; 90: 1039.
- Mayayo, E., Pujol I. et Guarro., 1999.** Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J Med Microbiol.* 48:363-366 44.
- Madelin T.M., 1994.** Fungal aerosols: a review. *Journal of aerosol science.* 25: 1405-1412.
- Nasraoui B., 2006.** Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre universitaire Tunis.450.
- Nelson P. E., Toussoun, T. A., et W.F.O., M., 1983.** *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, 206.

- O'Brien H. E., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J., Vilgalys R., 2005.** Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2005 ; 71(9) : 5544–50
- Petrini O., Sieber T. N., Toti L. et Viret O., 1992.** Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1: 185-196. 134
- Peuk A.D. 2000.** The chemical composition of xylen sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am. Enol. Viticult.* 51 :329-339.
- Ruark G. H. et Zarnoch S. J., 1992.** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56 :1945-1950.
- Redecker D., 2002.** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil.
- Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Sieber T. N. et Grünig C. R., 2006.** Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. In: *Microbial Root Endophytes* (Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. N. (eds, Berlin: Springer, 107-132.
- Sieber T. N., 2002.** Fungal root endophytes. In: *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., rev. and expanded (Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds, New York, Basel: Marcel Dekker, 887-917.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. et Krohn K., 2002.** Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.
- Schulz B. et Boyle C., 2005.** The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, 109: 661-687.
- Schulz B. J. E. et Boyle C., et Sieber T. N., 2006.** What are endophytes? In *Microbial Root Endophytes*, in Shultz B. J. E., Boyle C. J. C., Sieber T. N., (eds), Springer. Berlin. Heidelberg, New York (U.S.A), 1-13.
- Sánchez Márquez S., Bills G. F. et Zabalgoitia I., 2008.** Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33: 87-100.
- Selosse M. A. et Schardl C. L. 2007.** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* 2007; 173: 452-458.
- Spatafora J. W. Et Bushley K. E., 2015.** Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Curr Opin Plant Biol.* 2015 ; 26(JUNE) : 37–44

Smith C. K., Coyea M. R., Munson A. D., 2000. Soil carbon , nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* 10 :75-78.

Spiteller P., 2015. Chemical ecology of fungi. *Natural product reports.* 2015 ; 32(7) : 971–93

Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. et Sullivan T. J., 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998; 29: 319-343.

Saikkonen K., Helander M. et Faeth S. H., 2004a. Fungal endophytes: high- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology.* Garland Science 2004a; pp. 81-101.

Saikkonen K., Wali P. R. et Helander M., 2010. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One* 2010; 5(6): e11395. doi:10.1371/journal.pone.0011395.

Saikkonen K., Wali P., Helander M. and Faeth S. H., 2004b. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 2004b; 9: 275-280.

Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Sieber T. N. et Grünig C. R., 2006. Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. In: *Microbial Root Endophytes* (Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. N. (eds, Berlin: Springer, 107-132.

Sieber T. N., 2002. Fungal root endophytes. In: *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., rev. and expanded (Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds, New York, Basel: Marcel Dekker, 887-917.

Subler S., Kirsh K.S., 1998. Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthworm middens in no-till cornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26 :243-249.

Seifert, K. A., 1996. Fusclé, Clé interactive de Fusarium. *Agriculture et Agroalimentaire Canada.*

Snyd.et Hansen., 1999. .Mycologia . www.inra.fr/hyp3/pathogene/3fusro2.htm

Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. et Krohn K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.

Schulz B. et Boyle C., 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, 109: 661-687.

Soufiane B., 1998. Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de Bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. *Canada*, pp56

Trinci A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Microbiology* 57, 11e24.

Walker, S. L., Leath, S., Hagler W.M, Jr., & Murphy, J. P., 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with fusarium head blight in North Carolina. *Plant Disease*, 85(4), 404-410

Wilson D. et Carroll G. C., 1994. Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 1994; 86: 635-647.

Wilson D., 1995. Endophyte- the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.*, 73: 274-276.

“Web1” [www.endophyte.eu.](http://www.endophyte.eu), 2012-2015. European Cooperation on Science and Technology Cost Action of Endophytes in Biotechnology and Agriculture.