

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et écologie végétale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا وعلم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biodiversité et physiologie végétale*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

**Caractérisation et évaluation du potentiel biocontrôle d'une
collection de *Trichoderma* issus d'un écosystème agricole**

Présenté par : BOUTRA Doua
DJEGHDIR Belkeiss.

Le 22/06/2023

Jury d'évaluation :

Président de jury : Dr. Abdelaziz Widad (MCA UFM Constantine)

Rapporteur : Dr. HARRAT Wahiba (MRB - INRAA Constantine)

Examineur : Dr. BOUDCHICHA Hinde (MRB UFM Constantine)

Année universitaire : 2022 - 2023

Remerciement

Tous d'abord nous tenons à remercier le bon **Allah** tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nos remerciements vont aux membres du jury **Dr. Abdelaziz Widad** et **Dr. Boudchicha Hinde** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.

Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrante **Dr. Harrat Wahiba** pour son encadrement, conseils et sacrifices afin de donner le meilleur et pour son suivi durant la période de préparation de notre mémoire d'afin d'étude.

Nous adressons nos sincère remerciements à tous les professeurs qui par leurs conseils et leurs efforts durant tous les années passées nous sommes là, vraiment un grand remerciement pour leurs qualité d'enseignement qui nous a été dispensé.

Dédicace

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

** Mon très cher père **Ismail Bouteraa**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

Ma très chère mère **Samia Djemal, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie*

**Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur.*

Mon chère frère **Haithem et mes chères sœurs **Salsbil**, **Taouba** et **Safia** puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

Mon meilleur ami pour toujours **Mouka je te souhaite de réussir dans ta vie et merci pour tout ce que tu m'as donné.*

** Ma cher binôme **Djeghdir Belkiss**.*

**A tous ma famille*

Douaa

Dédicace

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

Ma très chère mère **Boussmaha selsabil , qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

** Mon très cher père **Djeghdir rabia**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

Mes très chers grand-parents **Inouche djamilla et Boussmaha said , qui attend ce jour depuis si longtemps, je suis la grace à vos prières.*

A mon très cher marié : **Mechirah Mouhamed merci d'avoir été ma force dans mes moments difficiles.*

**Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur.*

** Ma sœur **LINA** et mon frère **Ramzi** puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

Mes chères oncles **Ninou Ramzi Slimen Hamza merci pour tous ce que vous me donne.*

Ma deuxième famille : mes parents **Rabah et Karima, et mes frère **Didine Ayoub Abed erahim***

** Ma cher binôme **boutraa douaa**.*

*A toute mes chères ami (e)s : **Wissam Abir nada kaouter et sirine**.*

*Et bien sur mon chat « **Michou** » qui me soulage de la pression de la vie.*

Belkiss

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction	1
Partie 1. Synthèse bibliographique.....	2
1. Le genre <i>Trichoderma</i>	3
1.1. Généralités	3
1.2. Historique du genre.....	3
1.3. Taxonomie	4
1.4. Classification.....	5
1.5. Caractérisation des espèces de <i>Trichoderma</i>	5
1.5.1. Caractérisation macroscopique.....	5
1.5.2. Aspect microscopique.....	6
1.5.3. Identification moléculaire.....	8
1.6. Habitat et conditions environnementales	8
2. Utilisation des <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique	10
2.1. Applications agronomiques des <i>Trichoderma</i>	10
2.2. Mécanisme d'antagonisme des espèces de <i>Trichoderma</i> :.....	11
2.2.1. Antibiose.....	11
2.2.2. Mycoparasitisme	12
2.2.3. Compétition	13
2.3. Stratégies de la lutte biologique en utilisant <i>Trichoderma</i>	14
Partie 2. Etude expérimentale.....	16
MATERIEL ET METHODES	16
2.4. Matériel fongique.....	16
2.5. Préparation du milieu de culture	17
2.6. Ravivement de la gamme <i>Trichoderma</i>	17
2.7. Etapes de caractérisation morphologiques des <i>Trichoderma</i>	18
2.7.1. Repiquage des souches <i>Trichoderma</i>	18

2.7.2.	Mesure de vitesse de croissance :	18
2.7.3.	Caractérisation macroscopique	19
2.7.4.	Caractérisation microscopique	20
2.8.	Caractérisation moléculaire des <i>Trichoderma</i>	20
2.8.1.	Extractions de l'ADN génomique	20
2.8.2.	Amplification des amorces universelles	21
2.8.3.	Séquençage sanger et alignement des séquences par l'outil BLAS	21
2.9.	Evaluation de l'activité antagoniste <i>in vitro</i>	22
2.9.1.	Méthode confrontation directe	22
2.9.2.	Mesures du pourcentage d'inhibition	22
RESULTATS ET DISCUSSION		23
Résultats		23
1.	Caractérisation des isolats de <i>Trichoderma</i>	23
1.1.	La vitesse de croissance	23
1.2.	Caractérisation macroscopique	24
1.2.1.	Caractérisation morphologiques	24
2.	Caractérisation microscopique	26
3.	Caractérisation moléculaire	27
4.	Résultats des confrontations <i>in vitro</i> vis-à-vis du <i>Fusarium sp.</i>	28
Discussion		30
Conclusion et perspectives		61
Références bibliographiques		91
Résumé		

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

BCA: Biocontrol Agent

CAL: Calmodulin

CAZYmes : carbohydrate-active enzymes

CMD : Cornmeal Dextrose Agar

COV : Compose Organique Volatils

CRBt : Centre de Recherche en Biotechnologie

CTAB :Cetyltrimethyl Ammonium Bromide

dNTP :Désoxynucléosides Triphosphates

EF-1 α : Elongation factor 1-alpha

INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique en Algérie

PCR : Polymérase Chain Reaction

PGPB : Bactéries capables de stimuler la croissance végétale

pH :Potentiel Hydrogène

RNase : Ribonuclease

RPB2 : DNA-directed RNA polymerase 2 subunit

URC : Unité de Recherche Constantine

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> et quelques - unes des espèces y appartenant (Bisset, 2015).....	4
Figure 2. Exemple sur un aspect microscopique de <i>Trichoderma sp.</i> (Samuels <i>et al.</i> , 1994).	7
Figure 3. Exemple de caractérisation phénotypique (A) aspect de la culture ; (B) verso de la boîte ; (C) observation microscopique (GX 40) (Harrat <i>et al.</i> , 2022).....	7
Figure 4. Exemples de métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i> impliqués dans les interactions avec les plantes et leurs effets sur la stimulation de la croissance (A) ; métabolites secondaires impliqués dans le mycoparasitisme avec effet antibiotique (B).....	12
Figure 5. Mécanisme de mycoparasitisme exercé par les souches de <i>Trichoderma</i> (Irina <i>et al.</i> , 2001).....	13
Figure 6. Préparation du milieu de culture Potato Dextrose Agar. (A) pesage du glucose ; (B) pesage de l'Agar ; (C) filtrat de pomme de terre.....	17
Figure 7. Ravivement de la gamme <i>Trichoderma</i> . (A) Prélèvement des disques stockés ; (B) Le disque est déposé sur le milieu ; (C) Isolats repiqués dans une nouvelle boîte de Pétri.	17
Figure 8. Repiquage des isolats dans de nouvelles boîtes de Pétri pour caractérisation	18
Figure 9. Mesure de la croissance mycélienne.....	18
Figure 10. Code de couleur universel vert	19
Figure 11. Caractérisation macroscopique des cultures en boîte de Pétri (Site 1).....	19
Figure 12. Préparation des lames avec bleu de méthylène pour l'observation microscopique. (A) préparation des lames ; (b) séchage.....	20
Figure 13. Quelques étapes de l'identification moléculaire de <i>Trichoderma</i> . (A) centrifugeuse pour l'extraction d'ADN ; (B)préparation du mix pour la PCR ; (C) mise en place dans le thermocycleur ; (D) préparation des gels pour la révélation des produits de la PCR.	21
Figure 14. Illustration graphique du test d'antagonisme (R1 : <i>Fusarium sp.</i> en bleu et le <i>Trichoderma sp.</i> en vert ; R2 : Témoin <i>Fusarium sp.</i>).....	22
Figure 15. Groupes de vitesses de croissance des isolats.....	23

Figure 16. Pourcentage des groupes de <i>Trichoderma</i> en fonction de l'aspect.....	24
Figure 17. Pourcentage des isolats selon : (A) les nuances de couleur verte (B) le verso de la boite.	25
Figure 18. Aspect phénotypique des isolats. (A) 2 ^{ème} groupe « <i>Trichoderma atroviride</i> ». (B) 3 ^{ème} groupe « <i>Trichoderma virens</i> » ; (3) observation microscopique (G X 100)	27
Figure 19. Aspect phénotypique des isolats du 1 ^{er} groupe « <i>Trichoderma harzianum</i> ». (A) un cercle ; (B) deux cercles ; (C) trois cercles. (1) recto de la boite ; (2) revers ; (3) observation microscopique (G X 100).....	28
Figure 20. Confrontations directes « <i>Trichoderma</i> - <i>Fusarium sp.</i> ». (A) <i>T. harzianum</i> ; (B) <i>T. atroviride</i> ; (C) <i>T. virens</i> . (D) Témoin <i>Fusarium sp.</i> (1) recto de la boite ; (2) le revers de la boite.	29
Figure 21. Taux d'inhibition du <i>Fusarium sp.</i> par <i>Trichoderma sp.</i>	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Historique de l'identification des espèces de <i>Trichoderma</i>	3
Tableau 2. Classification taxonomique de <i>Trichoderma</i>	5
Tableau 3. Origine d'isolement des isolats de <i>Trichoderma</i>	16
Tableau 4. Analyse de variance de croissance	23
Tableau 5. Groupes d'isolats selon l'aspect de la culture	24
Tableau 6. Répartition des isolats selon les nuances de la couleur verte des conidies	25

Introduction



INTRODUCTION

Les écosystèmes agricoles en Algérie dépendent de sa position biogéographique et la structure de ses étages bioclimatiques qui font d'elle un gisement important de ressources agrobiologiques. Ces dernières ont évolué sous l'influence des apports de diverses civilisations en termes d'introduction de taxons et d'apports de savoir-faire qui ont contribué à façonner, de biens de façons, la richesse et l'originalité des écosystèmes agricoles.

L'agroécosystème est un complexe dynamique avec des interactions entre le climat, le sol, la végétation, et les savoirs humains. Ces systèmes sont simplifiés en comparaison avec les écosystèmes naturels et sont, par conséquent, fragiles et instables (Benkhetto, 2016).

Parmi les systèmes agricoles en Algérie, l'agriculture irriguée qui est essentielle pour les cultures stratégiques telles que les céréales, les légumes, les fruits et les olives (MADR, 2016). Aussi, l'agriculture pluviale qui est pratiquée en utilisant uniquement l'eau de pluie pour cultiver des cultures résistantes à la sécheresse. Les céréales, telles que le blé et l'orge, sont les cultures principales dans ces zones. L'agriculture de montagne est aussi importante ou l'élevage pastorale est pratiqué avec des cultures en terrasses et enfin l'agriculture saharienne (Bessaoud *et al.*, 2019).

Certaines pratiques agricoles, trop intensives ou moins respectueuses de l'environnement, peuvent entraîner une dégradation des sols et une perte de biodiversité (FAO, 2020). Le travail fréquent du sol, notamment en profondeur, l'utilisation intensive d'engrais chimiques et de pesticides, dessèchement, inondations et incendies, provoquent une perturbation des organismes du sol (macrofaune, mésofaune, micro-organismes), une diminution du stock de matière organique (principale énergie des habitants du sol sources) et une perturbation de la structure, l'aération, la compaction, la texture, le pH ou la composition du sol en altérant ainsi sa fonction (Altieri, 2018).

Les biofertilisants à base de champignons et de bactéries sont de plus en plus utilisés dans l'agriculture moderne. Parmi les champignons utilisés certaines espèces du genre *Trichoderma* qui intéressent de plus en plus les chercheurs et les agriculteurs en raison de leur potentiel de biocontrôle et de biostimulation des végétaux (Gupta *et al.*, 2020).

L'objectif de notre travail est de réaliser une caractérisation morphologique et moléculaire d'une gamme de 20 isolats de *Trichoderma* appartenant à la mycothèque de L'INRAA-Unité de Recherche Constantine, isolés à partir de rhizosphères de cultures appartenant à différents agrosystèmes. Evaluer aussi le potentiel antagoniste, de certaines espèces identifiées de la gamme, vis-à-vis de *Fusarium sp.*

Partie 1.
Synthèse bibliographique



1. Le genre *Trichoderma*

1.1. Généralités

Les espèces du genre *Trichoderma* sont connues pour leurs propriétés antagonistes depuis 1887 et sont considérés comme les agents de biocontrol les plus utilisés dans la lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes (Betissam, 2008). De même, certaines espèces de *Trichoderma* ont un effet positif sur la croissance des plantes en influençant la production d'hormones végétales (Gravel *et al.*, 2007 ; Herrera-Jamenez *et al.*, 2018 ; Bader *et al.*, 2020).

Le genre *Trichoderma* comprend un groupe de champignons saprophytes imparfaits qui se trouve dans le sol, le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plantes. Généralement facilement identifiable en culture par la couleur verdâtre de ses spores et ses phialides typiques (Caron, 2002). *Trichoderma harzianum* est l'espèce la plus fréquente dans le genre *Trichoderma* (Santos-Vaz, 2010).

1.2. Historique du genre

L'historique de de l'identification et de la phylogénie des espèces du genre *Trichoderma* est mentionné au niveau du tableau 1.

Tableau 1. Historique de l'identification des espèces de *Trichoderma*

L'année	L'auteur	Description
1794	Persson	Décrit les premières <i>Trichoderma sp</i> et établit 4 espèces : <i>T. viride</i> , <i>T. aureum</i> , <i>T. roseum</i> , and <i>T. nigrescens</i> (Samuels 1996)
1821	Fries	Classement des <i>Trichoderma sp.</i> parmi les Gastéromycètes.
1939	Bisby	Démonstré que ce fût un genre monotypique et que la seule espèce le constituant fût <i>T. viride</i> .
1969	Rifai	A identifié neuf espèces agrégées et a suggéré que chaque espèce agrégée pourrait être constituée de différentes sous-espèces si de nouvelles méthodes d'identification devenaient disponibles. Rafai (1969)
1996	Bisset	Réarrangements et regroupement des espèces dans cinq section <i>Trichoderma</i> , <i>Pachybasium</i> , <i>Hypoceanum</i> , <i>longibrachiatum</i> et <i>Saturnisporum</i> (Leuchtmann., 1996)
1998 et 2000	Kindermann <i>et al.</i> et Dodd <i>et al.</i>	Introduction de l'utilisation de méthodes moléculaires pour décrire les espèces de <i>Trichoderma</i> .
2015	Bissett et al.	254 espèces ont été reconnues dans <i>Trichoderma</i>
2021	Cai and Druzhinina	375 espèces ont été reconnues dans <i>Trichoderma</i>

1.3. Taxonomie

Dans le règne des vivants, les limites du « genre » reposent sur la possibilité de croisement entre individus. La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études. La forme sexuelle (téломорphe) de *T. harzianum* est « *Hypocrea lixii* » découverte par (De Respinis *et al.*, 2010).

Actuellement, l'identification de *Trichoderma sp.* Sont divisées en cinq sections comprenant chacune plusieurs espèces. Certaines espèces présentent des complexes d'espèces (Fig.1).

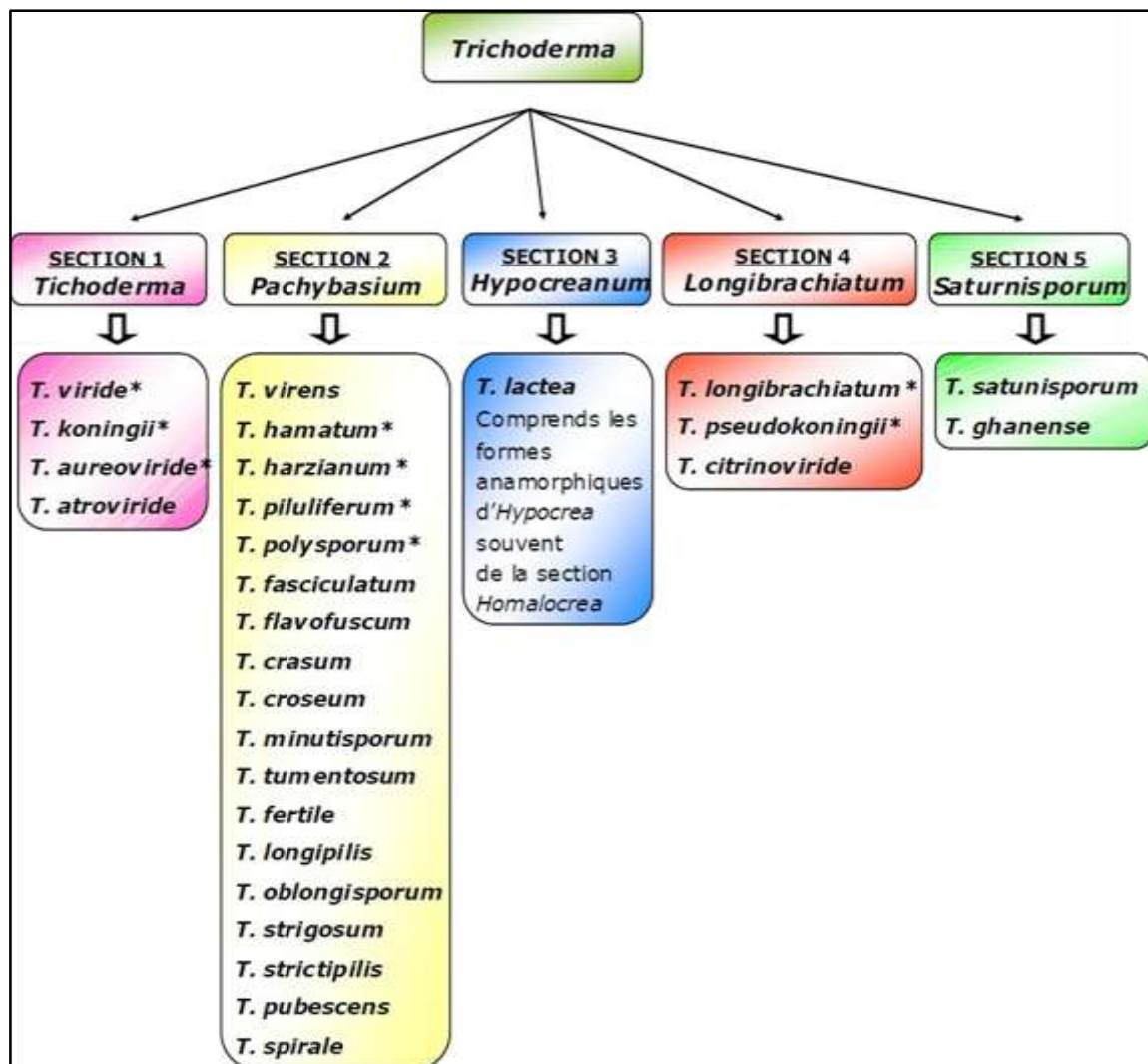


Figure 1. Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp.* et quelques - unes des espèces y appartenant (Bisset, 2015).

1.4. Classification

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des *Deuteromycotina*, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.* Se présente comme suit selon Bissett, 2015 (**Tab.2**).

Tableau 2. Classification taxonomique de *Trichoderma*

Embranchement	<i>Amastigomycota</i> et/ou Eumycètes
Sous embranchement	<i>Ascomycotina</i>
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Sous division	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Hypocreaceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>

1.5. Caractérisation des espèces de *Trichoderma*

1.5.1. Caractérisation macroscopique

L'identification des espèces de *Trichoderma* commence toujours par la caractérisation morphologique réalisée par observation macroscopique dans les différents milieux de culture et caractères microscopiques.

La caractérisation morphologique des espèces de *Trichoderma* a été basée sur divers types de milieux de croissance dont le Potato Dextrose Agar ou PDA afin de faire ressortir la diversité morphologique étroitement similaire des isolats (Gams and Bissett, 1998).

La température idéale pour la croissance des *Trichoderma* est de 25°C. Plusieurs traits morphologiques peuvent être observés pour identifier les espèces de *Trichoderma* en fonction de la morphologie de leur colonie, comme l'aspect de la culture, la couleur de spores et du recto de la boîte, odeurs caractéristiques et formation d'exsudats (Jaklitsh, 2009).

Initialement, la colonie se développe sous forme de touffes blanches pelucheuses qui se transforment plus tard en couleur verdâtre due à la production de conidies. La culture peut être

caractérisée par la présence d'anneaux concentriques sur milieu glosé. Le revers de la colonie est de couleur blanche, jaune, beige ou orange pâle (Bisset, 1991 ; Rifai, 1969).

Le taux de croissance des colonies est un paramètre important pour la caractérisation. La majorité des souches de *Trichoderma* ont un taux de croissance rapide et peuvent remplir une boîte de Pétri entière de 90 mm en moins d'une semaine dans des conditions optimales (Kim *et al.*, 2012).

1.5.2. Aspect microscopique

Au microscope optique, des structures microscopiques caractéristiques des *Trichoderma sp.* sont observées d'après les recherches de Cournut (1984), Landreau (2001) et Kubicek (2003).

Type de phialide : *Trichoderma sp.* forme généralement des phialides lagéniformes, en forme de flacon, lancéolés ou subulés qui sont courbés ou élancés. Les phialides peuvent apparaître en verticilles ou se produire solitaires.

Conidiophores : réguliers ou irréguliers. Les *conidiophores* réguliers peuvent ressembler à des arbres ou à des pyramides avec de nombreuses branches à la base et moins de ramifications au sommet, tandis qu'un *conidiophore* irrégulier est reconnu en montrant des ramifications non appariées à partir du stipe.

Forme des conidies : Conidies peuvent être des conidies ellipsoïdales, sous-globeuses, globuleuses, oblongues ou ovales.

Chlamydospores : peuvent être absentes ou présentes chez *Trichoderma*. Les traits notables des chlamydospores sont globuleux à pyriformes, lisses ou rugueux, à parois épaisses. Ces structures sont normalement observées dans les cultures plus anciennes (à partir de 10 jours).

Type de conidiophore : *Trichoderma* développe divers types de conidiophores pouvant être utilisés pour classer les espèces : *acrémonium-like*, *verticillien-like* et *Trichoderma-like*.

Ornementation des conidies : les conidies de *Trichoderma* peuvent présenter diverses ornementations et apparaître comme verruqueuse, lisse, partiellement rugueuse ou rugueuse. Les ornementations peuvent être facilement observées à partir de conidies matures (**Fig.2**).

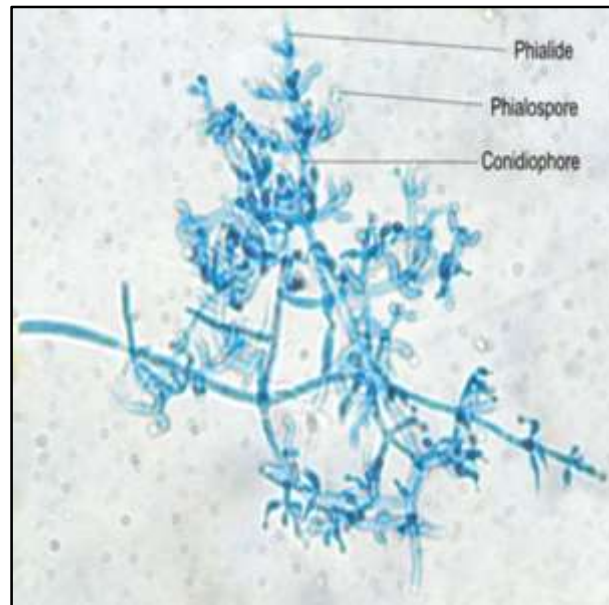


Figure 2. Exemple sur un aspect microscopique de *Trichoderma* sp. (Samuels *et al.*, 1994).

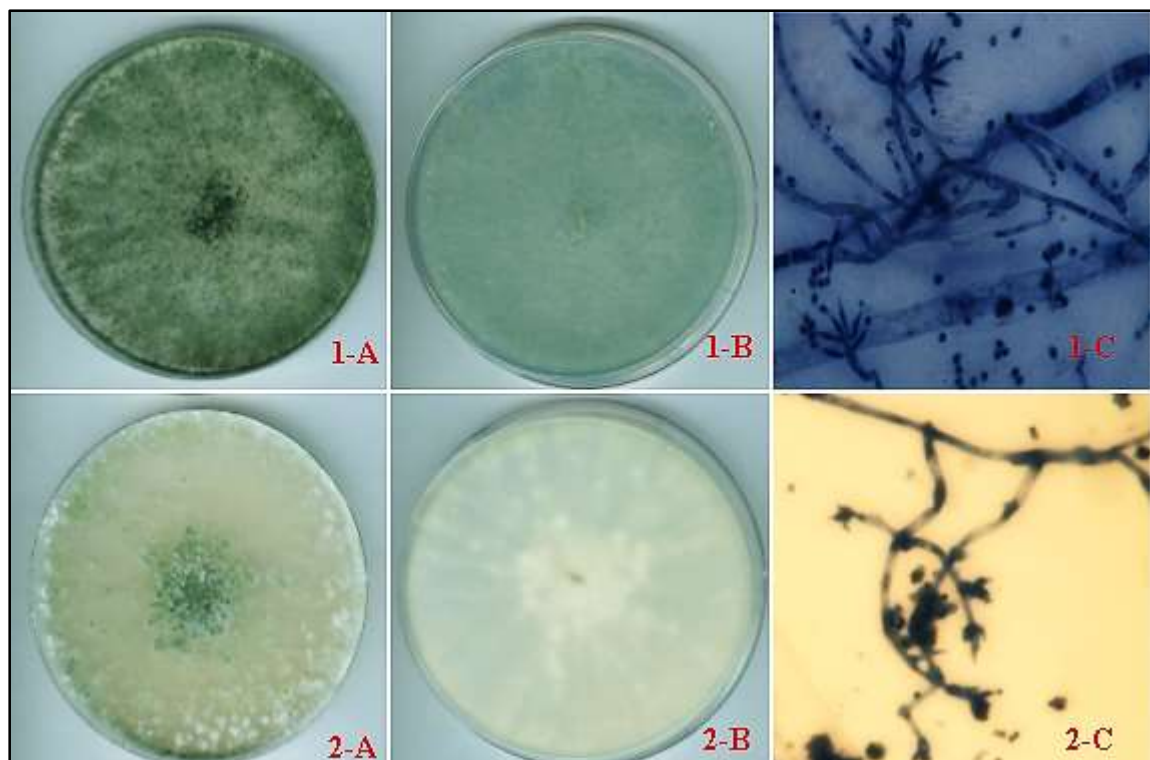


Figure 3. Exemple de caractérisation phénotypique (A) aspect de la culture ; (B) verso de la boîte ; (C) observation microscopique (GX 40) (Harrat *et al.*, 2022)

1.5.3. Identification moléculaire

Les espèces de *Trichoderma* sont difficiles à distinguer morphologiquement et leur identification reste incertaine. Par conséquent, la taxonomie de *Trichoderma* est constamment ajustée et mise à jour. Donc, les méthodes moléculaires sont devenues nécessaires pour fournir une identification plus précise au niveau de l'espèce (Oskiera *et al.*, 2015).

Plusieurs régions d'ADN sont analysées pour l'identification moléculaire des espèces de *Trichoderma*, à savoir l'actine (ACT), la calmoduline (CAL), ITS1 et 2, les agrégats d'ARN Enzyme II (RPB2) et séquences du facteur 1 α (EF-1 α). Parmi ceux-ci, le fragment EF-1 α était le plus recommandé pour l'analyse moléculaire à région unique, le séquençage de ces fragments a montré une résolution interspécifique élevée de la phylogénie de *Trichoderma* (Chaverri *et al.*, 2015 ; Jang *et al.*, 2018).

Une étude récente a porté sur l'analyse génomique d'une souche de lutte biologique anciennement connue sous le nom de *T. harzianum* ITEM 908 et renommée en *T. atrobruneum* du complexe d'espèces *Trichoderma harzianum*. Cette étude a révélé la présence d'un large éventail de gènes codant pour des enzymes glucidiques actives, des protéines impliquées dans la production de métabolites secondaires, des composés peptidiques, des *épidithiodixo* pipérazines et des *sidérophores*. Ces différentes molécules peuvent être impliquées dans des activités parasitaires de lutte biologique ainsi que dans des activités antagonistes. Ces travaux ont contribué à une meilleure compréhension du mode d'action et à l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques à l'activité qui peuvent aider à la sélection de souches de biocontrôle (Fanelli *et al.*, 2018).

1.6. Habitat et conditions environnementales

Des *Trichoderma* ont été isolés à partir de l'eau, le bois et le sol en décomposition (rhizosphère) et même à partir de matériaux non naturels comme le caoutchouc mousse ou bidons de kérosène (Klein et Eveleigh, 1998).

Les espèces de ce genre sont des champignons à croissance rapide et sont communs sur les sols agricoles, les prairies, les forêts, les marécages et les sols désertiques sous tous les climats (Danielson et Davey, 1973a ; Domsch *et al.*, 1980 ; Roiger *et al.*, 1991 ; Wardle *et al.*, 1993). Ils sont généralement présents dans la litière de feuilles des forêts décidues. Les *Trichoderma* sont généralement apparentés aux saprophytes, sauf qu'ils peuvent affecter d'autres champignons.

Lorsqu'ils sont présents dans le sol, ils confèrent une odeur de noix de coco due à la 6-pentyl-a-pyrone volatile (Collins et Halim, 1972 ; Kikuchi *et al.*, 1974 ; Moss *et al.*, 1975).

T. viride se trouve dans les régions à températures fraîches, tandis que *T. harzianum* se trouve dans les climats chauds. Cela correspond aux exigences de température optimales pour chaque espèce. En général, ce genre semble être plus commun sur les sols acides (Danielson et Davey, 1973b).

Plusieurs recherches ont étudié l'influence des températures sur la croissance mycélienne de *T. viride in vitro*. La croissance fongique est optimale dans la plage de température de 25 à 30°C.

Le pH est également un facteur important qui affecte la croissance de ce champignon. Le poids sec maximal est noté à pH 7 (Bissett *et al.*, 2015).

2. Utilisation des *Trichoderma* dans la lutte biologique

2.1. Applications agronomiques des *Trichoderma*

Le degré élevé d'adaptation écologique révélé par les souches du genre *Trichoderma* se reflète par le fait que ses espèces sont répandues dans le sol partout dans le monde, dans des conditions environnementales différentes et vivant sur divers substrats.

Cette adaptation importante, associée à leur capacité de se développer sur des substrats peu coûteux, font des isolats de *Trichoderma* des candidats intéressants pour différentes applications en lutte biologique (Hjeljord et Tronsmo, 1998).

Les espèces de *Trichoderma* ont été testées avec succès à l'égard de plusieurs maladies d'origine tellurique. Leur capacité à protéger les plantes contre des agents phytopathogènes est habituellement attribuée à leur effets antagonistes directs sur le pathogène fongique et en particulier leur capacité à produire des enzymes lytiques comme les chitinases et les β -1,3-glucanases. Ces enzymes hydrolysent la paroi cellulaire, limitant ainsi la croissance des pathogènes fongiques (Benítez *et al.*, 2004).

Les *Trichoderma* sont très efficace pour lutter contre les maladies des plantes liées au sol ainsi que pour dégrader les composés toxiques présents dans le sol. Les sols inoculés protègent les cultures et assurent un environnement sain pour le développement normal de la végétation (Harman, 2000).

En effet, le champignon sécrète des enzymes, des antibiotiques et des hormones utiles à la croissance des plantes et les protège des agents pathogènes. Cela conduit également à une amélioration de la teneur en éléments nutritifs du sol. La présence des *Trichoderma* dans le sol a des propriétés préventives et curatives (Harman *et al.*, 2004 ; Singh *et al.*, 2007).

Trichoderma sp ont été largement utilisés comme agents de lutte biologique depuis 1920 (Samuels, 1996) contre une variété d'agents pathogènes végétaux (Elshahawy et coll., 2017). Par exemple, des souches de *Trichoderma* ont pu supprimer *Sclerotium cepivorum* qui provoque la pourriture blanche de l'oignon (Shalaby *et al.*, 2013), ainsi que *Alternaria porri* responsable de la maladie de la tache pourpre de l'oignon (Abo-Elyousr *et al.*, 2014).

De plus, certaines études ont montré le potentiel des souches de *Trichoderma* à contrôler d'autres agents pathogènes, à savoir *Sclerotium delphinni* (Mukherjee *et al.*, 2014), Fusariose de l'épi (Sarrocco et coll., 2013), *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium oryzae* (Swain *et al.*, 2018).

2.2. Mécanisme d'antagonisme des espèces de *Trichoderma* :

Les champignons du genre *Trichoderma* présentent des effets antagonistes bien connus contre un grand nombre d'agents pathogènes. Leur mode d'action repose sur quatre mécanismes

2.2.1. Antibiose

Le mécanisme de lutte biologique connu sous le nom d'antibiose implique la production et excrétion de métabolites secondaires, qui comprennent des composés de différents produits chimiques de différentes natures avec une activité cytotoxique, qui peut limiter ou inhiber la croissance des agents pathogènes.

L'antibiose est l'une des principaux modes d'action de *Trichoderma* et d'autres agents de lutte biologique, tels que les plantes bactéries favorisant la croissance (PGPB) (Mukhopadhyay *et al.*, 2020 ; Alfiky *et al.*, 2021 ; Wong *et al.*, 2019).

En fait, l'expression des gènes codants pour la production de métabolites antibiotiques est augmentée en présence d'agents pathogènes et de composés produit par les plantes, exerçant un effet stimulant de protection et de signalisation fine entre la plante, l'agent pathogène et l'agent de biocontrôle (Mukhopadhyay *et al.*, 2020) (Alfiky *et al.*, 2021).

Les différentes espèces de *Trichoderma* sont une usine de métabolites secondaires, car plus de 180 types de composés différents ont été proposés et peuvent être classés selon leur fonction en compétition et métabolites chélateurs du fer, inducteurs de la plante résistance, métabolites favorisant la croissance des plantes, antibiotiques et si les métabolites sont volatils ou non volatils (Vinale *et al.*, 2020 ; Lee *et al.*, 2015).

Par exemple, les espèces de *T. virens* produisent des *Trichodermamides*, alors que *T. koningii* synthétise des koninginines, à la fois avec une activité antimicrobienne et antifongique (Garo *et al.*, 2003 ; Souza *et al.*, 2008). De plus, chez *T. harzianum* et *T. virens*, des composés tels que les azaphilones, les viridines, les composés hétérocycliques azotés (par exemple, l'harzianopyridone et l'acide harzianique), et les terpènes volatils ont été caractérisés et sont impliqués dans la lutte biologique contre les pathogènes champignons (Sood *et al.*, 2020).

La production d'enzymes hydrolytiques et de protéases, telles que les exo - et endochitinases, chitinases, xylanases, glucanases, lipases, endo - et exopeptidases, entre autres avec une action antifongique, ont également été caractérisés chez différents *Trichoderma* sp. (Khan *et al.*, 2020).

Les composés organiques volatil (COV) 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-pentyl- pyrone, 6-PP) est le COV le plus abondant de *T. atroviride*, et il améliore la croissance des plantes et régule le transport

du sucre dans les racines d'*Arabidopsis*, ainsi que d'autres COV produits par le champignon (Esparza-Reynoso et al., 2021).

La figure 4 montre un aperçu de l'arsenal du métabolite impliqué dans l'antagonisme fongique et certains composés impliqués dans la promotion de la croissance des plantes (par exemple, l'acide indole-3-acétique).

2.2.2. Mycoparasitisme

Le processus du mycoparasitisme est complexe, il se compose de plusieurs étapes notamment la reconnaissance de l'hôte par l'antagoniste grâce aux molécules peptides, pénétration, attaque de l'hôte et mort (Vinale et al. 2008). Au cours de ce processus, *Trichoderma* sécrète des enzymes (protéases et lipases) qui décomposent pénètre dans la paroi cellulaire du champignon hôte et libère ensuite des oligomères de paroi cellulaire du pathogène (Vinale et al., 2008). En fait, il existe plus de 20 gènes distincts qui peut être impliqué dans le mycoparasitisme. *Trichoderma* produit dix chitinases β -1,3-glucanases et protéases différentes et différentes (Vidhyasekaran, 2004).

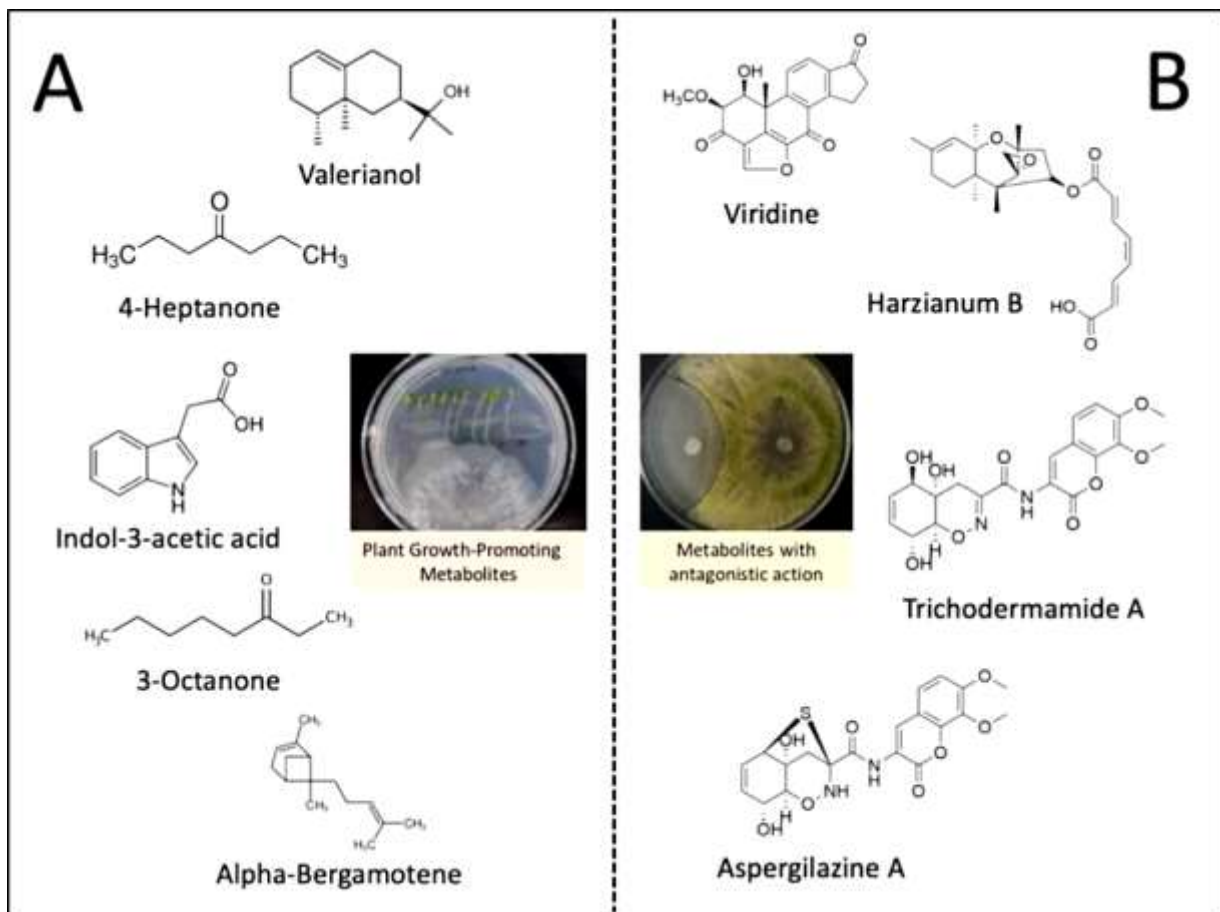


Figure 4. Exemples de métabolites secondaires de *Trichoderma* impliqués dans les interactions avec les plantes et leurs effets sur la stimulation de la croissance (A) ; métabolites secondaires impliqués dans le mycoparasitisme avec effet antibiotique (B).

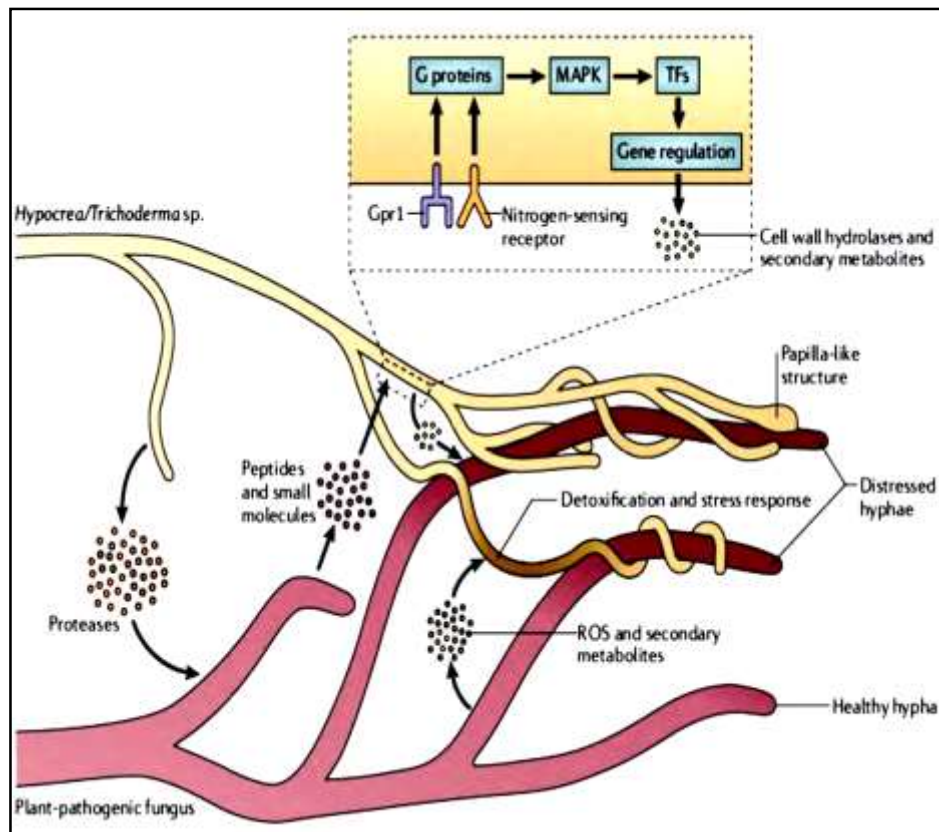


Figure 5. Mécanisme de mycoparasitisme exercé par les souches de *Trichoderma* (Irina *et al.*, 2001).

2.2.3. Compétition

Les sols sont des écosystèmes complexes avec des compétitions continues entre les organismes vivants pour accéder aux ressources et maintenir leur survie. Dans la rhizosphère, un environnement beaucoup plus riche que les autres sols dû à l'excrétion des nutriments par les racines des plantes, tels que les acides aminés, les vitamines, acides organiques, saccharides, etc., la compétition est une stratégie essentielle pour la survie (Igiehon *et al.*, 2018).

Pour cette raison, les organismes résidant dans la rhizosphère avec un métabolisme efficace et les capacités compétitives accéderont aux meilleurs "sites" là où les ressources existent. En ce sens, Les espèces de *Trichoderma*, comme mentionné précédemment, sont capables de produire une série composés d'antagonistes (par exemple antibiotiques ou enzymes lytiques), qui en conjonction avec d'autres stratégies de croissance et de colonisation (par exemple polyvalence métabolique), ils peuvent occuper des espaces dans la rhizosphère et, directement, profitent à la croissance des plantes et restreignent le développement utilisé par PGPB, qui présente des mécanismes de colonisation efficaces pour occuper la rhizosphère (Rodriguez *et al.*, 2019). Par conséquent, lors

de la sélection d'espèces de *Trichoderma* pour le biocontrôle (ou d'autres microorganismes de biocontrôle), il est important d'effectuer des tests d'antagonisme vers organismes bénéfiques pour les plantes, tels que PGPB pour déterminer leur synergie (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018).

2.3. Stratégies de la lutte biologique en utilisant *Trichoderma*

L'utilisation de *Trichoderma* en biocontrôle et comme promoteur de croissance des plantes en agriculture n'est pas récente. Il existe d'importantes recherches sur les bioformulations les plus efficaces dans le domaine, ainsi que les questions relatives à l'utilisation et à la distribution de ces produits, telles que l'acceptation de la communauté des agriculteurs de ces produits, l'introduction de différentes espèces dans l'environnement, et leur efficacité par rapport aux engrais chimiques et aux pesticides (Rocha *et al.*, 2019).

D'où l'importance de produire ou de fabriquer des produits à base de *Trichoderma*, seuls ou en combinaison avec d'autres BCA, et de prouver leurs efficacités avec des tests, afin de convaincre les consommateurs de passer aux bioformulations et utiliser moins produits chimiques sur leurs cultures. Plusieurs formulations à base de *Trichoderma* ont été testées en serre ou en plein champ conditions, montrant des résultats positifs tels qu'une croissance accrue des plantes, une production et résistance aux maladies (Wong *et al.*, 2019).

L'utilisation de cinq déchets agro-alimentaires différents (compost, déchets végétaux, feuilles de thé usagées, bagasse de canne à sucre et bouse de vache) pour cultiver *T. lixii* et l'utiliser comme bioproduits qui favorisent la croissance de la plante (Sachdev *et al.*, 2018).

T. harzianum cultivé sur un substrat de champignon épuisé de *Pleurotus ostreatus* a montré une augmentation de la croissance des plants de tomates et une résistance accrue contre le pathogène *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Singh *et al.*, 2021).

L'enrobage des semences avec une bioformulation à base de *T. harzianum* et chitosan-PEG comme système d'administration ont montré une activité antagoniste contre *F. oxysporum*, *M. phaseolina* et *Aspergillus niger*. La bioformulation a également favorisé la croissance des plants de carthame et d'arachide (Prasad *et al.*, 2020).

Partie 2.
Etude expérimentale



MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été menée au niveau du laboratoire de phytopathologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique en Algérie-INRAA – Unité de Recherche Constantine (URC). Une partie de notre travail a également été réalisée au Centre de Recherche en Biotechnologie – CRBt.

2.4. Matériel fongique

Les isolats de *Trichoderma* testés dans cette étude appartiennent à la mycothèque de l'URC. Les isolements sont réalisés à partir de rhizosphères de culture annuelles dont les céréales et les légumineuses alimentaires (entre 20 et 30 cm) prélevées à partir de différentes régions agricoles à travers l'Algérie (**Tab.3**). Les isolements sont réalisés selon la méthode des dilutions. Le stockage se fait dans un milieu nutritif à -20°C.

Tableau 3. Origine d'isolement des isolats de *Trichoderma*

Isolat	Région	Rhizosphère de culture
T1	Tébessa	Céréales
T2	Mila	Luzerne
T3	Constantine	Avoine
T4	Mila	Lentilles
T5	Skikda	Céréales
T6	Tamanrasset	Oasis
T7	Khenchela	Blé
T8	Constantine	Jachère travaillée
T9	Boumerdes	Olivier
T10	Sétif	Blé
T11	Mila	Haricot
T12	Jijel-el	Olivier
T13	Oum El Bouaghi	Blé
T14	Skikda	Lentille
T15	Blida	Oranger
T16	Constantine	Blé
T17	Boumerdes	Vigne
T18	Jijel	Fraisier
T19	Tébessa	Orge
T20	Mila	Ail

2.5. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour cultiver les isolats de *Trichoderma in vitro* est le PDA « Potato dextrose agar » selon (Atlas, 2010), contenant : 200 g de pomme de terre, 20 g de dextrose, 20 g d'agar et compléter à 1L litre d'eau distillée. La préparation est par la suite stérilisée à l'aide d'un autoclave pendant 20min à 120°C (Fig.6).



Figure 6. Préparation du milieu de culture Potato Dextrose Agar. (A) pesage du glucose ; (B) pesage de l'Agar ; (C) filtrat de pomme de terre.

2.6. Ravivement de la gamme *Trichoderma*

Les isolats de *Trichoderma* précédemment conservée à (-20°C) dans des tubes Eppendorf contenant un milieu nutritif sont ravivés en premier lieu par décongélation en les plaçant à température ambiante pendant 2h. Par la suite et dans des conditions d'asepsie le contenu des tubes est transféré dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide PDA (Fig.7). Les boîtes sont incubées à 25°C, pendant une période de 7 jours. Après 7 jours d'incubation, la pureté des cultures obtenues est examinée et purifier si nécessaire.

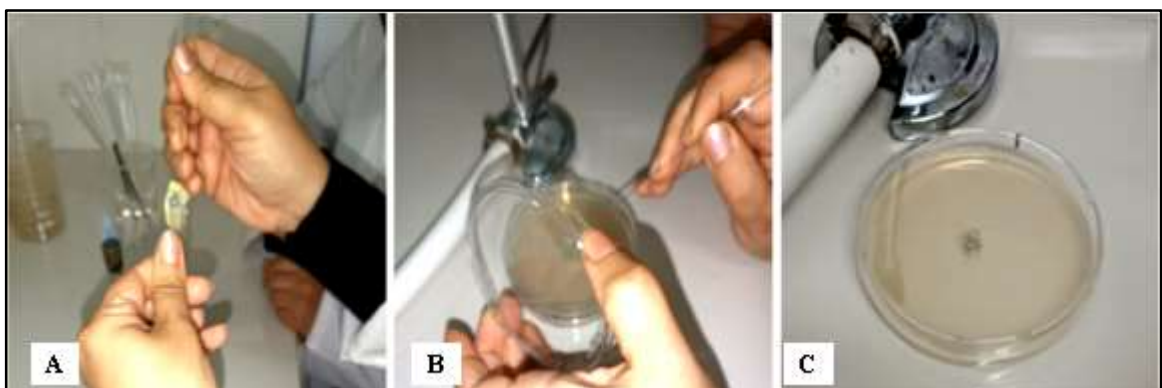


Figure 7. Ravivement de la gamme *Trichoderma*. (A) Prélèvement des disques stockés ; (B) Le disque est déposé sur le milieu ; (C) Isolat repiqué dans une nouvelle boîte de Pétri.

2.7. Etapes de caractérisation morphologiques des *Trichoderma*

Cette caractérisation morphologique est réalisée dans le but de diviser les isolats étudiés en groupes phénotypiques.

2.7.1. Repiquage des souches *Trichoderma*

Les 20 isolats sont repiqués sur milieu solide PDA en conditions stériles, à raison de deux répétitions par isolat.

Des disques de 6 mm de diamètre sont prélevés à partir de culture pure âgée de 7 jours et déposés à une distance de 1,5 cm du bord de la boîte de culture (**Fig.8**). Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et placées dans une étuve pour incubation (Botton *et al.* 1990).

Au bout de 7 jours, les cultures sont utilisées pour l'évaluation de plusieurs paramètres de caractérisation morphologiques, microscopique et vitesse de croissance.



Figure 8. Repiquage des isolats dans de nouvelles boîtes de Pétri pour caractérisation

2.7.2. Mesure de vitesse de croissance :

La vitesse de croissance mycélienne est évaluée en mesurant quotidiennement, pendant 7 jours (**Fig.9**), la distance parcourue par le mycélium en (mm). La vitesse de croissance est calculée en utilisant la formule de Mondo *et al.* (2016) : Calcul de $V_n - V_{n-1}$; Ensuite la moyenne de variation fut calculée, $V_1 + V_2 + V_n \dots /$ Nombre des jours d'observation.



Figure 9. Mesure de la croissance mycélienne

2.7.3. Caractérisation macroscopique

Les observations macroscopiques des isolats étudiés sur des cultures âgées de 7 jours à travers des caractéristiques phénotypiques.

L'identification macroscopique est généralement basée sur les critères suivants selon Rafai (1969) :

La couleur du recto, selon le code universel de la couleur verte (**Fig.10**), et la couleur du revers de la boîte.

La texture de la colonie qui peut être : laineuse, duveteuse, poudreuse ou glabre.

La topographie qui peut être (**Fig.11**) : plate, surélevée avec des stries radiales.



Figure 10. Code de couleur universel vert

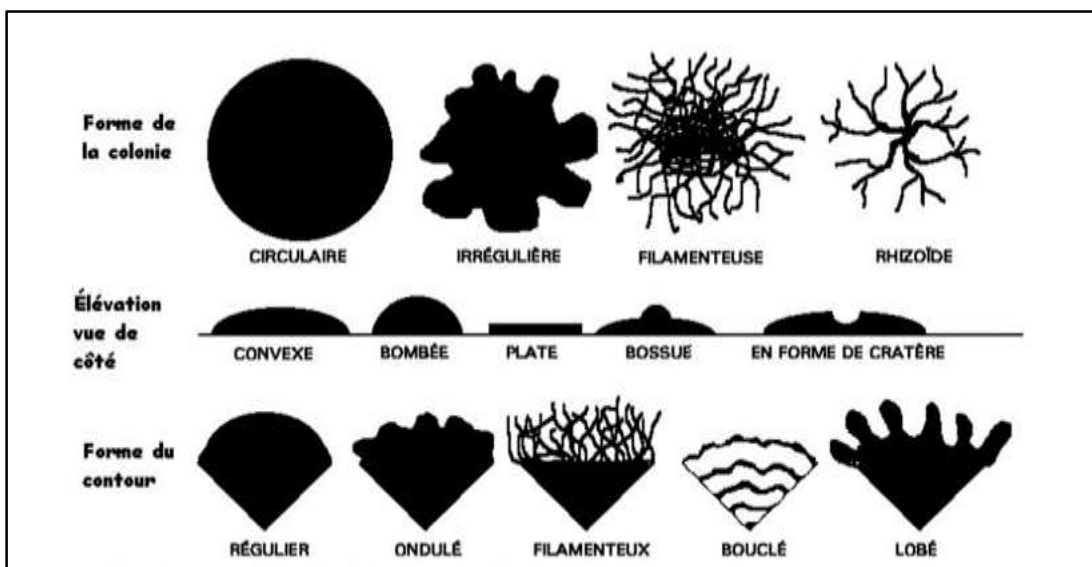


Figure 11. Caractérisation macroscopique des cultures en boîte de Pétri (Site 1)

2.7.4. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique est réalisée en observant les structures micromorphologiques caractéristiques de *Trichoderma*, notamment les conidies, les conidiophores, la disposition des philiades, la pigmentation et la structure des spores, à l'aide d'un microscope optique (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et al. 2003).

La préparation des échantillons pour l'observation microscopique en utilisant la technique du ruban adhésif. Le ruban contenant les colonies est déposé sur une lame porte objet contenant une goutte de bleu de méthylène (**Fig.12**). L'observation microscopique se fait en utilisant les grossissements (G×40) et (G×100).

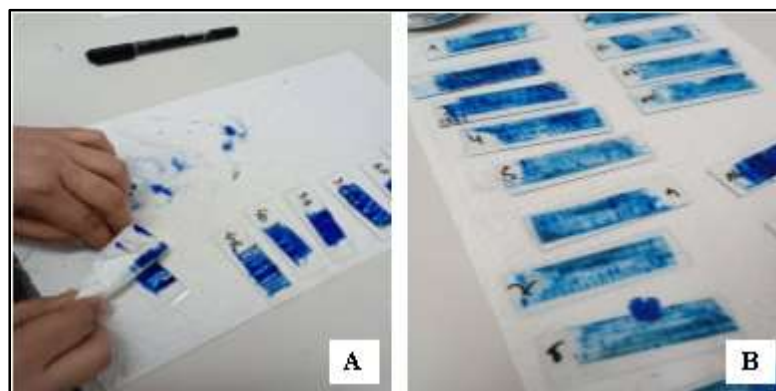


Figure 12. Préparation des lames avec bleu de méthylène pour l'observation microscopique. (A) préparation des lames ; (b) séchage.

2.8. Caractérisation moléculaire des *Trichoderma*

2.8.1. Extractions de l'ADN génomique

Les ADN ont été obtenus par la méthode d'extraction développée par Doyle et Doyle (1987) et modifiée par Benbouza *et al.* (2006). 0,1 g des mycéliums frais sont broyées par de l'azote liquide. Le protocole d'extraction de l'ADN est résumé en trois principales étapes :

- (1) isolation de l'ADN avec du CTAB 2% ;
- (2) élimination des protéines par le CIA (24 :1) ;
- (3) précipitation de l'ADN avec de l'isopropanol. L'ADN obtenu est dilué dans 200 μ l de tampon TE et traité avec de la RNase (1 μ l/ 100 μ l d'ADN). La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été mesurées par le spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA-USA).

2.8.2. Amplification des amorces universelles

L'amplification des régions ITS et un fragment du gène *tefl α* (translation elongation factor1-alpha). Comme décrit précédemment par Hermosa *et al.*, 2004. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 20 μ l contenant 1X tampon ; pH 8,8 ; 2 à 4 mM MgCl₂ ; 0,2 mM pour chaque dNTP ; 0,4 μ M pour chaque amorce ; 50 ng d'ADN génomique et 1 Unités de Taq DNA polymerase. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur 1000C (BioRad Laboratories, CA-USA) en utilisant le profile thermique suivant : une dénaturation initiale à 95°C durant 5 min, 35 cycles de 30 s à une température d'hybridation entre 55- 60°C (selon l'amorce) et 1 min à 72°C et une étape d'élongation finale à 72°C durant 5 min.

Les produits PCR sont ensuite été séparés sur gel agarose 2% contenant durant 20h à 100 V. Un marqueur de taille d'ADN le DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, CA, USA) est utilisé pour la lecture des tailles des fragments séparés. Enfin, l'identification des tailles des fragments est réalisée par le logiciel ImageLab (Biorad Laboratories, CA-USA) en utilisant le GelDoc™ XR (Biorad Laboratories, CA-USA).

2.8.3. Séquençage sanger et alignement des séquences par l'outil BLAS

Les produits amplifiés sont d'abord été purifiés des résidus de la PCR par le kit enzymatique ExoSap (Thermofisher), puis soumis à la réaction séquençage. Les séquences générées sont traitées par le logiciel BioEdit puis comparées avec des séquences de références dans la base de données NCBI.

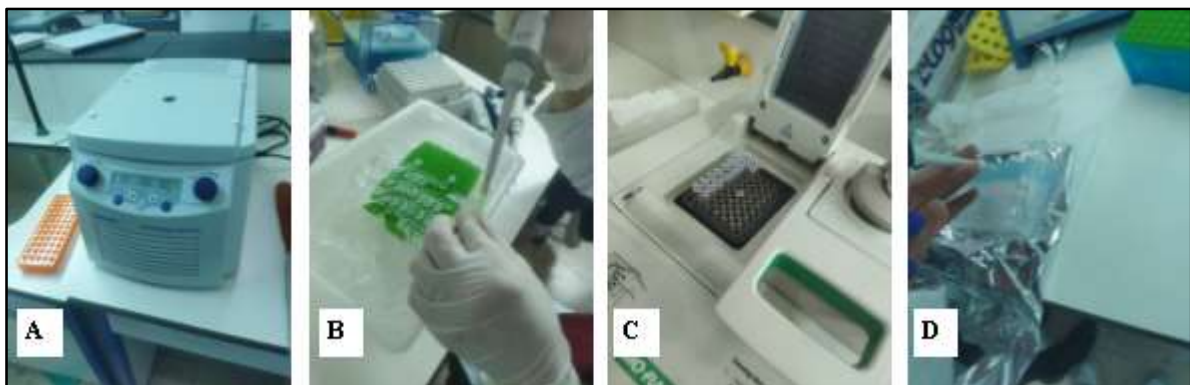


Figure 13. Quelques étapes de l'identification moléculaire de *Trichoderma*. (A) centrifugeuse pour l'extraction d'ADN ; (B)préparation du mix pour la PCR ; (C) mise en place dans le thermocycleur ; (D) préparation des gels pour la révélation des produits de la PCR.

2.9. Evaluation de l'activité antagoniste *in vitro*

2.9.1. Méthode confrontation directe

Cette technique est également appelée « technique de culture opposée ». Elle consiste à placer dans la même boîte de Pétri de 9cm contenant 15 ml du milieu PDA deux explants géloses de 6 mm de diamètre, dont un avec un isolat de *Trichoderma sp.* (Antagoniste) et l'autre étant une souche de *Fusarium sp.* isolé à partir de blé comme agent pathogène (Caron, 2002).

Les deux explants sont placés au même temps selon un axe diamétral à 5cm et à équidistance du centre de boîte (Benhamou, 1996). L'incubation est faite à 25°C pendant 7 jours avec observation quotidienne. Le témoin est constitué du pathogène seul.

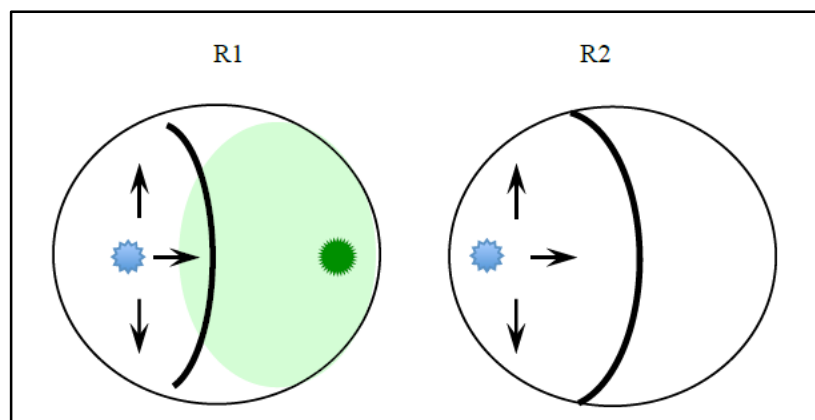


Figure 14. Illustration graphique du test d'antagonisme (R1 : *Fusarium sp.* en bleu et le *Trichoderma sp.* en vert ; R2 : Témoin *Fusarium sp.*)

2.9.2. Mesures du pourcentage d'inhibition

Après une incubation de 7 jours. Les mesures concernant la croissance mycélienne du pathogène sont réalisées. Ces mesures permettent d'estimer l'effet inhibiteur de *Trichoderma* sur le développement du pathogène en le comparant avec le témoin. Le taux d'inhibition est calculé selon la formule de Hmouni *et al.* (1996).

$$I\% = (1 - C_n / C_o) \times 100$$

C_n est le diamètre moyen des colonies du pathogène en présence de l'antagoniste ; C_o est le diamètre moyen des colonies du témoin du pathogène.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

La gamme de vingt isolats de *Trichoderma* sont caractérisés de différentes manières macroscopiques, microscopiques et moléculaire. Une nette diversité se trouve entre les groupes phénotypiques identifiés.

1. Caractérisation des isolats de *Trichoderma*

1.1. La vitesse de croissance

L'analyse de variance de la vitesse de croissance, à l'aide du logiciel SPSS, révèle un effet très hautement significatif entre les 20 isolats.

Le teste de Tukey monter l'existence de 5 groupes homogènes principaux (A.B.C.D.E) et un groupe intermédiaire (CD). Le groupe le plus intéressant est le groupe A avec une moyenne de 7,4mm/j, par contre le groupe qui présente la valeur inférieure de la vitesse de croissance est E avec une moyenne de 5 mm/j notée au niveau de T8 (Tab.13 ; Fig.14).

Tableau 4. Analyse de variance de croissance

Intracction	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	10,871	19	0,572	74,232	0,000***
Intragroupes	0,154	20	0,008		
Total	11,025	39			

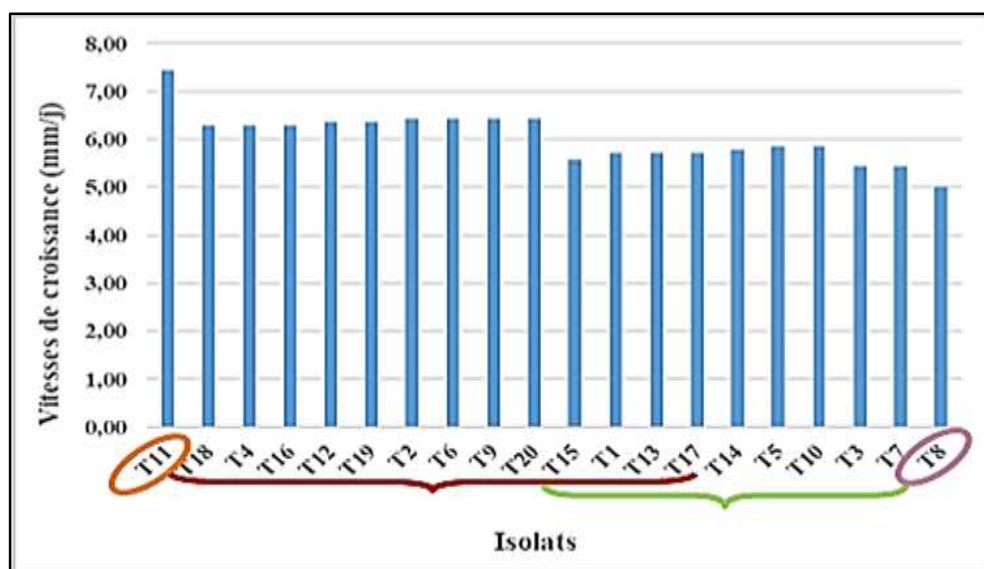


Figure 15. Groupes de vitesses de croissance des isolats

1.2. Caractérisation macroscopique

1.2.1. Caractérisation morphologiques

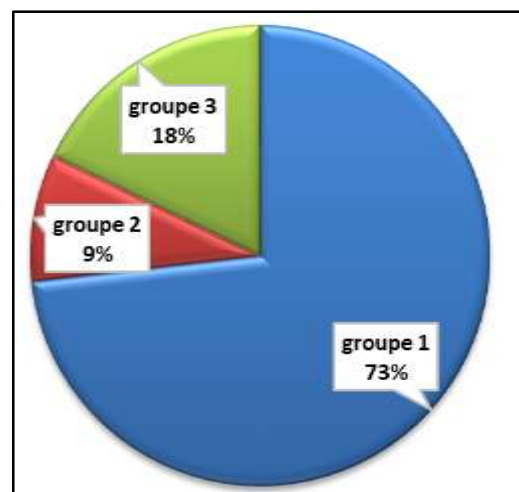
a. Aspect de la culture

Après 7 jours d'incubation. L'observation à l'œil nu a permis de distinguer 3 groupe d'isolats selon le nombre de cercle. Le groupe 1 présente la plus grande proportion 73%, ce dernier est composé 3 sous-groupes (**Fig.15 ; Tab.4**).

Tableau 5. Groupes d'isolats selon l'aspect de la culture

Groupe	Sous-groupe	<i>Trichoderma</i>	Aspect
Groupe 1	Sous-groupe 1	1	Cercle concentrique (1)
		3	Cercle concentrique (1)
		5	Cercle concentrique (1)
		8	Cercle concentrique (1)
		14	Cercle concentrique (1)
	Sous-groupe 2	2	Cercle concentrique (2)
		4	Cercle concentrique (2)
		7	Cercle concentrique (2)
		10	Cercle concentrique (2)
		11	Cercle concentrique (2)
		13	Cercle concentrique (2)
		15	Cercle concentrique (2)
		16	Cercle concentrique (2)
		17	Cercle concentrique (2)
18	Cercle concentrique (2)		
19	Cercle concentrique (2)		
	Sous-groupe 3	6	Cercle concentrique (3)
Groupe 2		9	Rien
Groupe 3		12	Stries
		20	Stries

Figure 16. Pourcentage des groupes de *Trichoderma* en fonction de l'aspect



b. Couleur de la culture

Selon le code universel de la couleur verte comparé au à la couleur des spores, 12 nuances de vert sont observées : mousse, viride, asperge, bouteille, gazon, malachite, poireau, prairie, sapin, vert et vessie (**Fig.15 ; Tab.6**). La plus grande proportion est au niveau de la couleur vert bouteille. Il n'existe pas de rapport entre la couleur de la culture et son aspect.

Concernant la couleur du verso, trois groupes se sont distinguées en fonction de blanc, beige et non coloré. Le blanc est dominant par rapport aux autres couleurs. La couleur beige est notée deux fois dans les échantillons T18 et T20. Les revers de boites non colorés sont observés au niveau de T2 et T10.

Tableau 6. Répartition des isolats selon les nuances de la couleur verte des conidies

Couleur	Isolats	Couleur	Isolats
Asperge	T12, T17	Vert	T14
Bouteille	T2, T5, T7, T9, T16	Vert impérial	T1
Gazon	T8	Vessie	T3, T11
Impérial	T10	Viride	T18
Malachite	T19	Poireau	T15
Mousse	T20	Poireau	T13
Sapin	T4,T6		

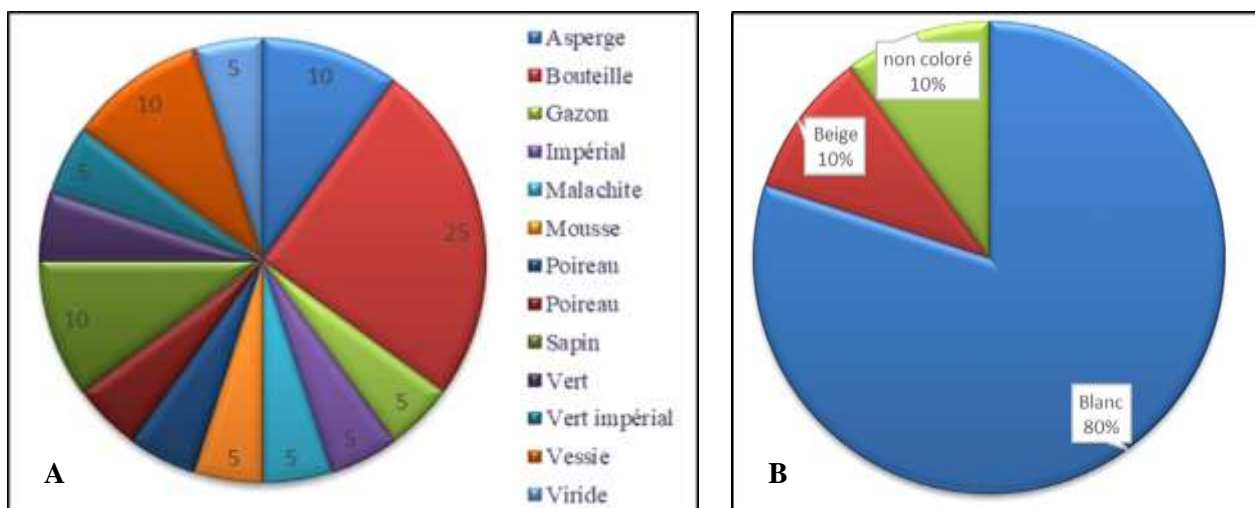


Figure 17. Pourcentage des isolats selon : (A) les nuances de couleur verte (B) le verso de la boîte.

c. Caractéristiques de la culture mycélienne

Selon le niveau d'élévation, les isolats se distinguent en deux groupes : Plate et surélevée. La majorité des isolats ont une élévation plate à part T9 et T15.

Les marges sont filiformes pour la plupart des isolats sauf (T4, T5, T10 et T15) qui sont ondulés.

Le mycélium peut être aérien (T9, T12, T16 et T20) et non aérien, ce qui est le cas pour le reste des isolats.

2. Caractérisation microscopique

Les observations microscopiques montrent une concordance avec les groupes distingués en fonction de l'aspect morphologique des isolats. Les caractéristiques microscopiques sont comme suivies selon les trois groupes.

– **Groupe 1** (T5, T10, T3, T1, T14, T7, T16, T17, T17, T18, T15, T4, T13, T19, T14, T16)

Sont caractérisés par des conidiophores régulièrement verticillés ayant une structure pyramidale. Les *phialides* sont ampulliformes, généralement verticillé (3 à 4). Les conidies subglobuleuses, à paroi lisse et subhyaline (**Fig.17**).

– **Groupe 2** (T6, T9)

Les observations microscopiques révèlent des conidiophores caractéristiques présentant un large axe principal ramifié à intervalles réguliers, généralement avec des branches successives progressivement plus courtes et plus étroites. Les *phialides* sont solitaires ou de nombre de 2 à 4 verticillées, plus ou moins lagéniformes, souvent courbées. Les conidies sont vertes foncées, lisses, subglobuleuse à maturité (**Fig.16**).

– **Groupe 3** (T12, T20)

Les conidiophores sont sous forme de branches latérales à partir de mycélium aérien indifférencié, à la base fréquemment stériles et non ramifiées sur environ la moitié de la longueur. En allant vers l'apex des ramifications irrégulières se forment avec chaque branche et se terminent par un groupe de 3 à 6 *phialides* étroitement appariées. *Phialides* lagéniformes, apparaissant principalement en verticilles étroitement serrés et groupés par 2 à 5 sur les branches terminales, occasionnellement solitaires ou par paires latéralement sur le conidiophore et les branches. Conidies de forme ellipsoïdales, à parois lisses, vert foncé, les conidies des *phialides* adjacents fusionnent souvent en grandes masses entourant les *phialides* (**Fig.16**).

3. Caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire, de trois isolats représentatifs de chaque groupe (T12, T9, T16), a démontré l'existence de trois espèces de *Trichoderma* :

Groupe1 : T16 « *Trichoderma harzianum* »

Groupe 2 : T9 « *Trichoderma atroviride* »

Groupe3 : T12 « *Trichoderma virens* »

Les résultats de l'identification moléculaire concordent avec ceux obtenus par la caractérisation macroscopique et microscopique.

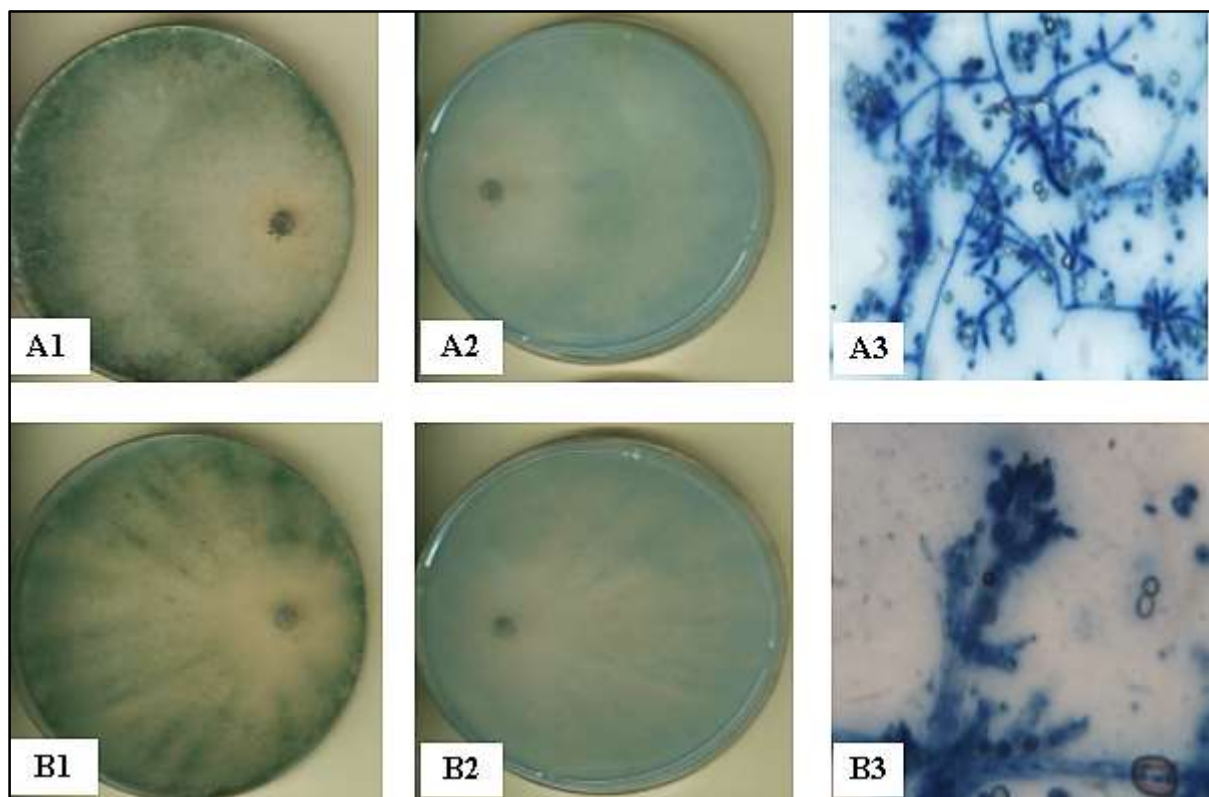


Figure 18. Aspect phénotypique des isolats. (A) 2^{ème} groupe « *Trichoderma atroviride* ». (B) 3^{ème} groupe « *Trichoderma virens* » ; (3) observation microscopique (G X 100)

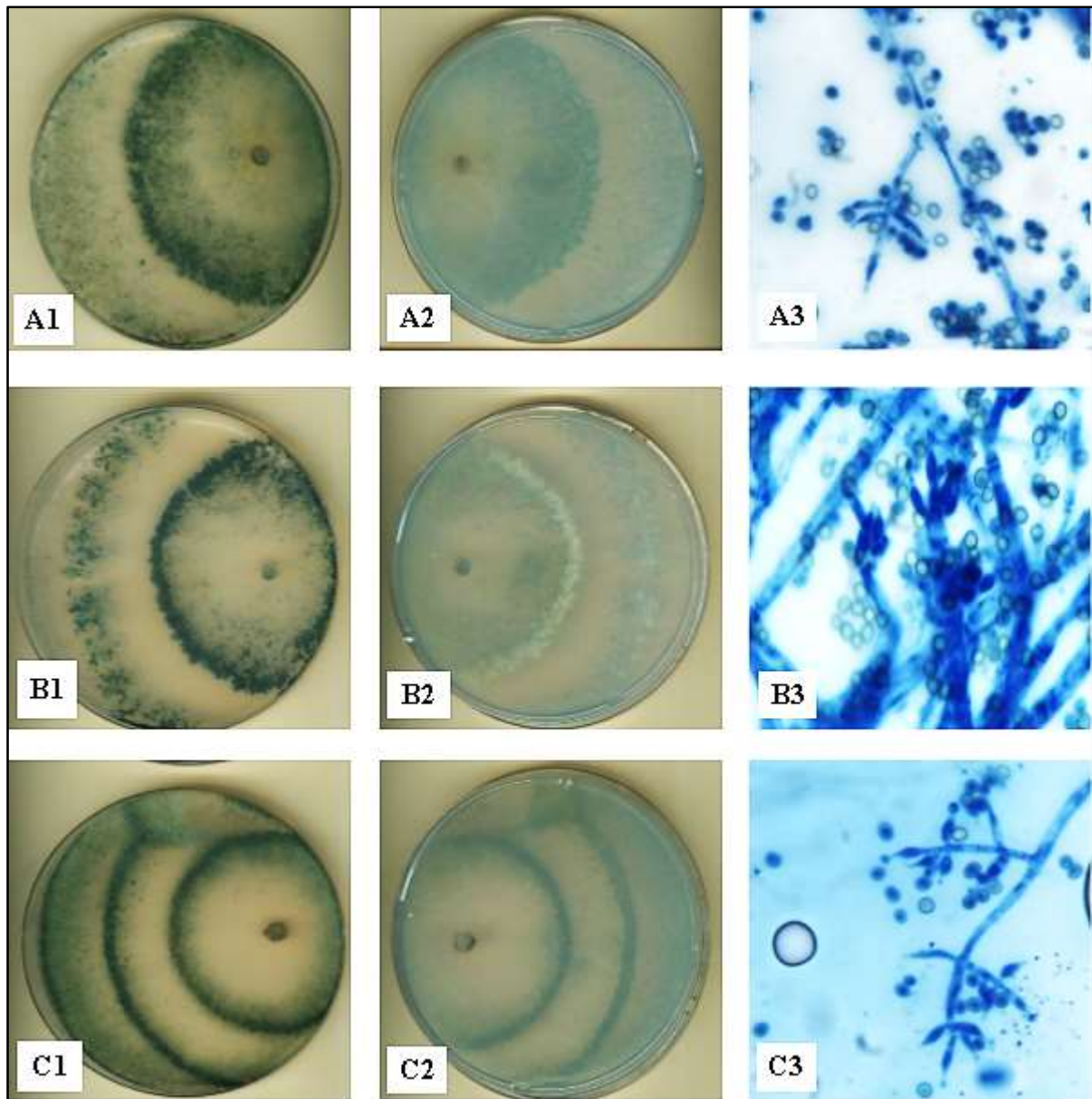


Figure 19. Aspect phénotypique des isolats du 1^{er} groupe « *Trichoderma harzianum* ». (A) un cercle ; (B) deux cercles ; (C) trois cercles. (1) recto de la boîte ; (2) revers ; (3) observation microscopique (G X 100)

4. Résultats des confrontations in vitro vis-à-vis du *Fusarium sp.*

Les isolats identifier par méthode moléculaire sont testés par la méthode de confrontation directe pour l'évaluation de l'effet antagoniste vis-à-vis du *Fusarium sp.* de blé.

Les résultats obtenus montrent une inhibition importante de la croissance mycélienne du pathogènes en confrontation par rapport aux témoins. L'espèce qui a révélé le taux d'inhibition le plus élevé est le T9 « *Trichoderma atroviride* » avec un taux d'inhibition de 89% (Fig.18 ; 19).

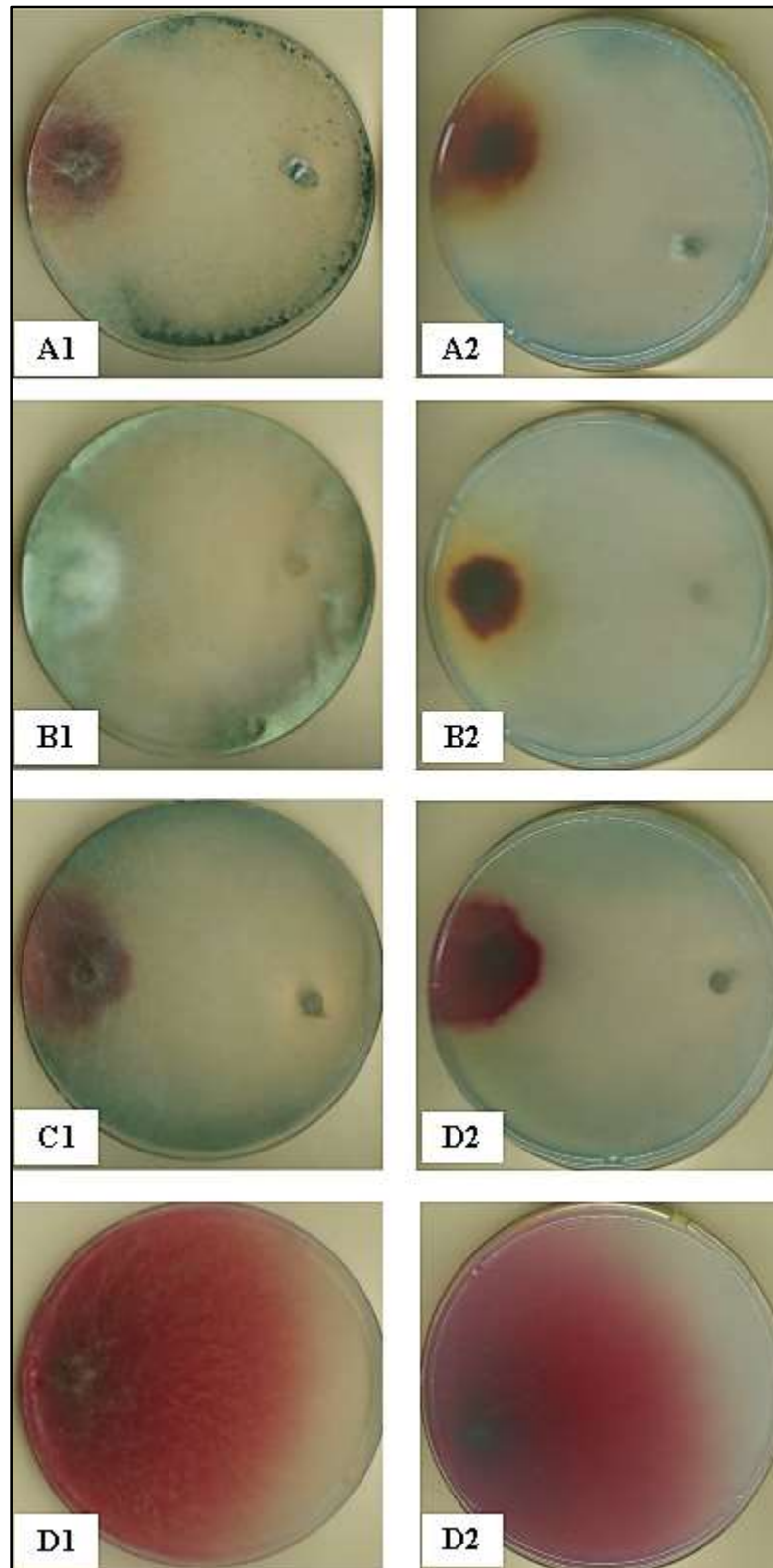


Figure 20. Confrontations directes « *Trichoderma - Fusarium sp.* ». (A) *T. harzianum* ; (B) *T. atroviride* ; (C) *T. virens*. (D) Témoin *Fusarium sp.* (1) recto de la boîte ; (2) le revers de la boîte.

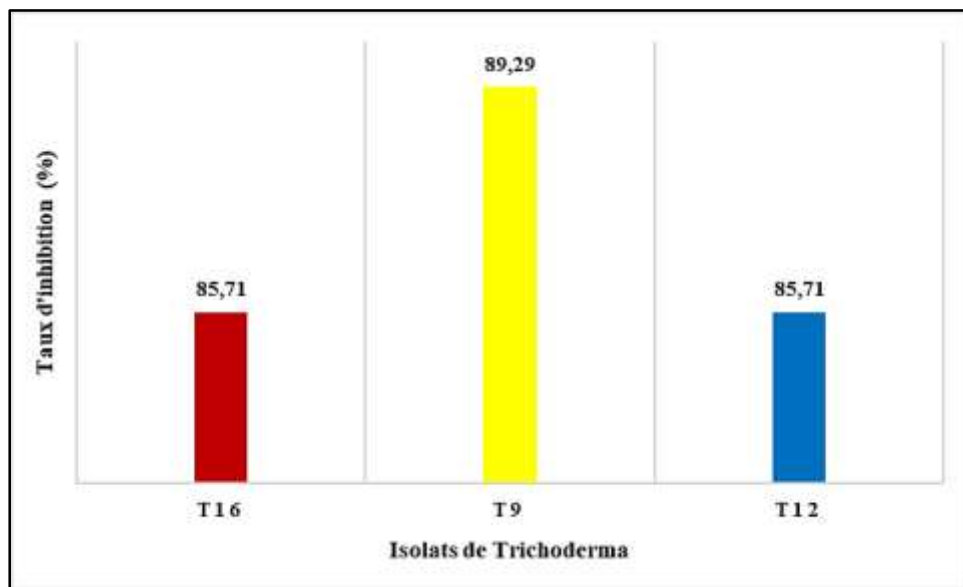


Figure 21. Taux d'inhibition du *Fusarium sp.* par *Trichoderma sp.*

Discussion

La caractérisation morphologique des espèces de *Trichoderma* est réalisée sur milieux de culture Potato Dextrose Agar ou PDA afin de faire ressortir la diversité morphologique étroitement similaire des isolats (Gams et Bissett, 1998).

L'examen macroscopique permet de définir la couleur, l'aspect des colonies et le taux de croissance. Ces critères ont été considérés comme des caractéristiques taxonomiquement utiles pour une identification préliminaire de *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2002). La colonie se développe sous forme de touffes blanches pelucheuses qui se transforment plus tard en couleur verdâtre due à la production de conidies. La culture peut être caractérisée par la présence d'anneaux concentriques sur milieu glosé. Le revers de la colonie est de couleur blanche, jaune, beige ou orange pâle (Bissett, 1991 ; Rifai, 1969). Sur le milieu PDA, les colonies sont blanches en raison de la formation d'un thalle à croissance rapide qui peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides, après quelque jour des taches bleu-vert ou jaune-vert dispersées deviennent observables lorsque des conidies se forment (Lilliana et bissett, 2011 ; Gams et Bissett, 2002).

Les identifications morphologique et moléculaire concordent avec ceux de Bissett (1991 et 1985) et Rifai, (1969). Selon cet auteur l'espèce *T. atroviride* possède des colonies caractérisées par une croissance rapide (5-8 cm/semaine). La sporulation a une apparence granuleuse ; initialement

glauque, virant rapidement au vert foncé. Le revers de la boîte est généralement incolore, sinon jaunâtre terne ou terne sur une culture âgée. De même pour *T. harzianum* qui est connue par ses colonies à croissance rapide (la plupart des isolats mesurent de 7 à 9 cm), une sporulation dense et dispersée, d'apparence granuleuse ou poudreuse et virant rapidement du vert jaunâtre au vert foncé, ou produisant des touffes ou des pustules bordées de mycélium blanc stérile. Le revers de la boîte est incolore à jaunâtre terne, beige ou terne. Concernant *T. virens*, les colonies sont à croissance rapide (6-7 cm). La sporulation est principalement effusée, couvrant toute la surface de la boîte, ou formant des pustules plates étalées concentrées près du bord de la plaque ou disposées concentriquement ; virant rapidement au vert bleuâtre foncé. Le revers de la boîte est incolore, ou développant lentement des nuances jaunâtres ternes à ambrées.

Les résultats obtenus, concernant le taux d'inhibition du *Fusarium sp.* par les trois espèces de *Trichoderma*, sont cohérents avec ceux de Albouvette *et al.* (1983), Dubot (1985) et Davet (1996) qui ont montré que la croissance de *Trichoderma sp.* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, ce phénomène est appelé compétition.

Trichoderma produit des substances qui agissent comme des antibiotiques et inhibent la croissance des agents pathogènes (Harana *et al.*, 1996 et Zhihe *et al.*, 1998). On peut aussi l'expliquer ces résultats par le mécanisme d'antibiose qui implique la production et excrétion de métabolites secondaires, qui comprennent des composés de différents produits chimiques de différentes natures avec une activité cytotoxique, qui peut limiter ou inhiber la croissance des agents pathogènes.

Les résultats du biocontrôle obtenus sont également similaires à ceux d'Elad *et al.* (1983) qui ont montré que *Trichoderma* est l'un des champignons connus pour son mycoparasitisme sur l'agent pathogène en enroulant son mycélium autour des hyphes du pathogène. Nos résultats sont similaires aussi à ceux obtenus par Debbi *et al.* (2018) et Bouanaka *et al.* (2021) qui ont montré que la croissance de certaines espèces de *Trichoderma sp.* est supérieure à celle du pathogène et notamment quelques espèces de *Fusarium* ce qui lui permet de se mettre en compétition avec le pathogène et freiner sa croissance en assimilant les éléments nutritifs du milieu. Cela peut aussi être interprété par l'existence de métabolites secondaires sécrétés par le *Trichoderma* qui possèdent un effet inhibiteur de la croissance du pathogène, c'est le mécanisme d'antibiose.

Conclusion et perspectives



CONCLUSION

À l'heure actuelle, l'agriculture est confrontée à un défi majeur, nourrir une population sans cesse croissante.

La lutte contre les maladies des cultures notamment « les fusarioses » est devenue une nécessité. La stratégie préconisée par la recherche est le développement d'une méthode de lutte intégrée, peu coûteuse et compatible avec les préoccupations environnementales.

Ainsi la lutte biologique est l'une des stratégies préconisées par la recherche ; celle-ci fait appel à l'utilisation de microorganismes antagonistes naturels. Parmi ces derniers des champignons antagonistes, tels les espèces du genre *Trichoderma* qui sont les meilleurs candidats à appliquer sous forme de cellules vivantes. Ils sont connus pour leur production de métabolites bioactifs. Leur capacité à coloniser la rhizosphère et les racines des plantes, à contrôler les microorganismes phytopathogènes, et à former des spores adaptées pour la formulation de produits stables, sont des caractères importants pour la réussite d'un bio contrôle.

Pour cela, notre étude visait à réaliser dans un premier temps une identification des isolats obtenus à partir de différentes régions agroécologiques. Et d'évaluer ensuite l'effet antagoniste de ces espèces afin de chercher les espèces autochtones d'intérêt.

Sur les 20 Isolats testés, 16 appartiennent à l'espèce « *Trichoderma harzianum* », (02) isolats à « *Trichoderma atroviride* » et (02) à « *Trichoderma virens* ». les caractéristiques morphologiques et l'identification moléculaire concordent avec nos résultats. Nous pouvons qualifier cela par l'existence d'une grande diversité des espèces de *Trichoderma* au niveau des rhizosphères des cultures et la dispersion de ces espèces dans l'espace.

Nos résultats affirment aussi le potentiel antagoniste des espèces algériennes de *Trichoderma* soit un taux d'inhibition dépassant les 85% pour les trois espèces testées. Ce qui nous ouvre une grande possibilité de pouvoir concrétiser la confection de pesticides et biostimulants locaux et à bas prix afin de limiter l'utilisation excessive d'intrants agricoles nocifs pour l'environnement.

Des travaux de recherche *in vitro* et *in situ* seront nécessaires pour la continuité de ce travail et la valorisation de la gamme.

Références bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abo-Elyousr K.A., Abdel-Hafez S.I. and Abdel-Rahim I.R. (2014).** Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. *Journal of Phytopathology*, 162(9), pp.567-574.
2. **Alabouvette C., Couteaudieur Y. et Lotjvert J. (1983).** Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
3. **Alfiky A., Weisskopf L. (2021).** Deciphering *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *J. Fungi*, 7, 61.
4. **Altieri M.A. (2018).** "Agroecology: The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 252, 1-2.
5. **Atlas Ronald M. (2010)** Handbook of Microbiological Media. 4th Edition. CRC Press. This handbook includes a section on Potato Dextrose Agar, providing details on its composition, preparation, and uses. 240p
6. **Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. and Mergeai G. (2006).** Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, agronomy, society and environment*, 10(2) : 77-81
7. **Benhamou N. and Chet I. (1996).** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86:405-416
8. **Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C. and Codón A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249–260.
9. **Benkhattou A., Boudaoud A., Hedia M., Benkhattou M. and Zedek M., (2016).** Étude des agroécosystèmes en milieu aride dans la région de Tiaret, Algérie. *Revue Écologie-Environnement* (12), 34-41
10. **Bessaoud O., Pellissier J. P., Rolland J. P., and Khechimi W. (2019).** Rapport de synthèse sur l'agriculture en Algérie (Doctoral dissertation, CIHEAM-IAMM).
11. **Bissett J. (1985).** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, 63(4), 860-863.
12. **Bissett J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) *Can. J. Bot.* 69 : 2373-2417
13. **Bissett J., Gams W., Jaklitsch W. and Samuels G. J. (2015).** Conducted a comprehensive review of the taxonomy, phylogeny, and biology of *Trichoderma*.

14. **Bissett J., Szakacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., and Kubicek C. P. (2003).** New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*, 81(6), 570-586.
15. **Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and V eau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (ed.) Masson, Paris
16. **Bouanaka H., Bellil I., Harrat W., Boussaha S., Benbelkacem Abdelkader and Douadi Khelifi. (2021).** On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31:68. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416>
17. **Caron J. (2002).** Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. *Phytopathologiste Hhorti-Protection inc.* Conference présentée lors des journées horticoles regiona
18. **Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T. and Samuels G.J. (2015).** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107: 558–90.
19. **Collins R. P. et Halim A.F. (1972).** Characterization of the Major Aroma Constituent of the Fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *J. Agric. Food Chem.*, 20, 437–438.
20. **Cournut B. (1984).** Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th. : Pharmacie : Marseille; 77 p.culture. Th. : Pharmacie : Nantes : 201 p.
21. **Danielson R.M. et Davey D.E. (1973).** The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 486- 494.
22. **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétales, (Ed.) INRA. Paris
23. **De Respini S., Vogel G., Benagli C., Tonolla M., Petrini O., and Samuels G.J. (2010).** MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9, 79-100.
24. **Debbi A., Boureghda H., Monte E., and Hermosa, R. (2018).** Distribution and Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* Associated with Tomato Diseases in Algeria and a Biocontrol Strategy with Indigenous *Trichoderma spp.* *Front. Microbiol.* 9:282. [doi: 10.3389/fmicb.2018.00282](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282)
25. **Domsch K.H., Gams, W., Anderson T.H. (1980).** *Compendium of Soil Fungi*, Vol. 1; Academic Press: New York.
26. **Doyle J.J. and Doyle J.L. (1987).** A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

27. **Dubos B. (1985).** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pourzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botritis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, pp 35-49. INRA, Paris (FR).
28. **Elad Y., Chet I., BOYLE P. (1983).** Parasitism of *Trichoderma sp.* on *Rhizoctonia solanii* and *sclerotium rolfsii.scaaning* electron microscopy and fluorescens microscopy .phytopathology,.73 :85-88
29. **Elshahawy I.E., Saied N., Abd-El-Kareem F. and Morsy A. (2017).** Biocontrol of onion white rot by application of *Trichoderma* species formulated on wheat bran powder. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50(3-4), pp.150-166.
30. **Esparza-Reynoso S., Ruíz-Herrera L.F., Pelagio-Flores R., Macías-Rodríguez L.I., Martínez-Trujillo M., López-Coria M., Sánchez-Nieto S., Herrera-Estrella A., López-Bucio, J. (2021).** *Trichoderma atroviride*-emitted Volatiles Improve Growth of Arabidopsis Seedlings through Modulation of Sucrose Transport and Metabolism. Plant Cell Environ, 44, 1961–1976
31. **Fanelli F., Liuzzi V.C., Logrieco A.F. et Altomare C. (2018).** Genomic characterization of *Trichoderma atrobrunneum* (*T. harzianum* species complex) ITEM 908: insight into the genetic endowment of a multi-target biocontrol strain BMC Genomics. 19:662. DOI.org/10.1186/s12864-018-5049-3
32. **FAO. (2020).** "Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report." Food and Agriculture Organization of the United Nations.
33. **Gams W. and Bissett J. (1998).** Morphology and identification of *Trichoderma sp.* In: *Trichoderma and Gliocladium* Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Kubicek C.P, Harman G.E et Ondik K.L (Eds.). London (UK): Taylor & Francis Ltd. p. 3-34.
34. **Garro (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study
35. **Garro E., Starks C.M., Jensen P.R., Fenical W., Lobkovsky E., Clardy J. (2003).** Trichodermamides A and B, Cytotoxic Modified Dipeptides from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma virens*. J. Nat. Prod., 66, 423–426.
36. **Gravel V. (2007).** Lutte contre *Pythium ultimum* chez la tomate de serre: une approche microbienne (Doctoral dissertation, Université Laval).
37. **Haran S., Scinckler H., Chet I. (1996).** Molecular mechanism of lyticenzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology142:2312-2331.
38. **Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43–56.

39. **Harman G.E., (2000).** Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
40. **HArrat W., BOussaha S., Imami S. et Ouffroukh A.,** Caractérisation culturelle et morphologique de *Trichoderma sp.* rhizosphériques et évaluation du potentiel biocontrôle. Premier Webinaire International de Biodiversité Animale, Protection et Environnement « WIBAPE 2022 » ENSA, 26 et 27 mai 2022.
41. **Hermosa M. R., Keck E., Chamorro I., Rubio B., Sanz L., Vizcaíno J. A., & Monte E. (2004).** Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 108(8), 897-906.
42. **HERMOSA M. Rosa, KECK E., CHAMORRO I., RUBIO B., SANZ L., Juan A. V., GRONDONA I. and MONTE E. (2004).** Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* 108 (8): 897–906
43. **Herrera-Jiménez E., Alarcón A., Larsen J., Ferrera-Cerrato R., Cruz-Izquierdo S., & Ferrera-Rodríguez M. R. (2018).** Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18(1), 188-201.
44. **Hjeljord L. and Tronsmo A. (1998).** *Trichoderma* and *Gliocladium* vol. 2. Edited by Gary E. Harman and Christian P. Kubicek. Copyright© Taylor & Francis Ltd 1998
45. **Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A. (1996).** Résistance de *Botrytis cinere* a aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, p. 697–705.
46. **Igiehon N.O. and Babalola O. (2018).** Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 574.
47. **Irina S. Druzhinina, Verena Seidl-Seiboth, Alfredo Herrera-Estrella, Benjamin A. Horwitz, Charles M. Kenerley, Enrique Monte, Prasun K. Mukherjee, Susanne Zeilinger, Igor V. Grigoriev and Christian P. Kubicek. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*. Volume 9
48. **Jaklitsch W. M. (2009).** European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in mycology*, 63, 1-91.
49. **Jang S., Kwon S.L., Lee H., Jang Y., Park M.S., Lim Y.W., Kim C. and Kim J. (2018).** New Report of Three Unrecorded Species in *Trichoderma harzianum* Species Complex in Korea, *Mycobiology*, DOI: 10.1080/12298093.2018.1497792.
50. **Khan R.A.A.; Najeeb S.; Hussain S.; Xie, B.; Li Y. (2020).** Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma Spp.* against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 8, 817.

51. **Kikuchi T.; Mimura T.; Harimaya K.; Yano H.; Arimoto T.; Masada Y.; Inoue T. (1994).** Letter: Volatile Metabolite of Aquatic Fungi. Identification of 6-Pentyl-Alpha-Pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* Species. Chem. Pharm. Bull. 1974, 22, 1946–1948.
52. **Kim C. S., Park M. S., Kim S. C., Maekawa N., & Yu S. H. (2012).** Identification of *Trichoderma*, a competitor of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*), and competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* species in Korea. The Plant Pathology Journal, 28(2), 137-148
53. **Klein D., Eveleigh D.E. (1998).** Ecology of *Trichoderma* In *Trichoderma* and *Glicoladium*; Basic biology, taxonomy and genetics, pp.57- 74. Taylor and Francis Ltd, London, UK.
54. **Kubicek C. P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., & Szakacs G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. Fungal genetics and biology, 38(3), 310-319.
55. **Landreau A. (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes : 201 p
56. **Lee S.; Hung R.; Yap M.; Bennett J.W. (2015).** Age Matters: The Effects of Volatile Organic Compounds Emitted by *Trichoderma atroviride* on Plant Growth. Arch. Microbiol., 197, 723–727.
57. **Lilliana Hoyos-Carvajal et John Bissett. (2011).** Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. In: The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution, Oscar Grillo and Gianfranco Venora (Ed). Croatia: IntechOpen. p. 303-315.
58. **Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural de l'Algérie, 2016.** Le projet de la Vallée du M'zab.
59. **Moss M. O.; Jackson J. M.; Rogers D. The Characterization of 6-(pent-1-enyl)-alphapyrone from *Trichoderma viride*. Phytochemistry. (1975). 14, 2706–2708.**
60. **Mouria B., Ouazzani-Touhami A., & Douira A. (2007).** Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. Phytoprotection, 88(3), 103-110.
61. **Mukherjee A.K., Kumar A.S., Kranthi S. and Mukherjee P.K. (2014).** Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. 3 Biotech, 4(3), pp.275-281.
62. **Mukhopadhyay R.; Kumar D. (2020).** *Trichoderma*: Beneficial Antifungal Agent and Insights into Its Mechanism of Biocontrol Potential. Egypt. J. Biol. Pest. Control, 30, 133.

63. **Orozco-Mosqueda M.D.C.; Rocha-Granados M.d.C.; Glick B.R.; Santoyo G. (2018).** Microbiome Engineering to Improve Biocontrol and Plant Growth-Promoting Mechanisms. *Microbiol. Res.*, 208, 25–31.
64. **Oskiera M, Szczech M and Bartoszewski G. (2015).** Molecular identification of *Trichoderma* strains collected to develop plant growth-promoting and biocontrol agents. *Journal of Horticultural Research*. 23(1): 75-86. DOI: 10.2478/johr-2015- 0010
65. **Prasad R.D.; Chandrika K.S.V.P.; Godbole V. A. (2020).** Novel Chitosan Biopolymer Based *Trichoderma* Delivery System: Storage Stability, Persistence and Bio Efficacy against Seed and Soil Borne Diseases of Oilseed Crops. *Microbiol. Res*, 237, 126487.
66. **Rifai M.A. (1969).**A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia.Papers*, 116 :1-56
67. **Rocha I.; Ma Y.; Souza-Alonso P.; Vosátka M.; Freitas H.; Oliveira R.S. (2019).** Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Front. Plant Sci*, 10, 1357.
68. **Roiger D.J., Jeffers S.N., Cladwell R.W. (1991).** Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 353- 359
69. **Sachdev S.; Singh A.; Singh R.P. (2018).** Optimization of Culture Conditions for Mass Production and Bio-Formulation of *Trichoderma* Using Response Surface Methodology. *3 Biotech* , 8, 360
70. **Samuels G. J., Petrini O., and Manguin S. (1994).** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86(3), 421-435.
71. **Samuels G., Dodd S., Castlebury L. et Petrini O. (2002).** *Trichoderma* Species Associated with the Green Mold Epidemic of Commercially Grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*; 94: 146-170
72. **Samuels G.J. (1996).** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), pp.923-935.
73. **Santos-Vaz M.S. (2010).** Caracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum*. Thèse de doctorat, Escola Superior Agrária de Bragança, 67p.
74. **Sarrocco S., Moncini L., Pachetti G., Moretti A., Ritieni A. and Vannacci G. (2013).** Biological control of *Fusarium* head blight under field conditions. *IOCB-WPRS Bull*, 86, pp.95-100.
75. **Shalaby M.E., Ghoniem K.E. and El-Diehi M.A. (2013).** Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of Microbiology*, 63(4), pp.1579-1589.

76. **Singh A., S. Srivastava et Singh H.B. (2007).** Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology*, 98:470-473.
77. **Singh G.; Tiwari A.; Gupta A.; Kumar A.; Hariprasad P.; Sharma S. (2021).** Bioformulation Development via Valorizing Silica-Rich Spent Mushroom Substrate with *Trichoderma asperellum* for Plant Nutrient and Disease Management. *J. Environ. Manag*, 297, 113278
78. **Sood M.; Kapoor D.; Kumar V.; Sheteiwiy M.S.; Ramakrishnan M.; Landi M.; Araniti F.; Sharma A. (2020).** *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9, 762
79. **Souza A.D.L. ; Rodrigues-Filho E. ; Souza A.Q.L.; Pereira J.O. ; Calgarotto, A.K.; Maso V.; Marangoni, S.; Da Silva S.L. (2008).** Koninginins, Phospholipase A2 Inhibitors from Endophytic Fungus *Trichoderma koningii*. *Toxicon*, 51, 240–250.
80. **Swain H., Adak T., Mukherjee A.K., Mukherjee P.K., Bhattacharyya P., Behera S., Bagchi T.B., Patro R., Khandual A., Bag, M.K. and Dangar T.K. (2018).** Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. *Microbiological Research*, 214, pp.83-90.
81. **Tuesta-Popolizio D. A., Velázquez-Fernández J. B., Rodríguez-Campos J., and Contreras-Ramos S. M. (2021).** Isolation and identification of extremophilic bacteria with potential as plant growth promoters (PGPB) of a geothermal site: a case study. *Geomicrobiology Journal*, 38(5), 436-450.
82. **Vidhyasekaran P. (2004).** Concise encyclopedia of plant pathology. Food Products Press and The Haworth Reference Press. 587p
83. **Vinale F. Sivasithamparam K. et Ghisalberti E. L. (2008).** *Trichoderma*-plantpathogen interactions. *Soil biology and biochemistry* 40: 1-10.
84. **Vinale F.; Sivasithamparam K. (2020).** Beneficial Effects of *Trichoderma* Secondary Metabolites on Crops. *Phytother. Res.* 2020, 34, 2835–2842.
85. **Vinod K. G., Minsuk K., Utpal B., Kevin Y. C., John M. D. 3rd, Konstantinos N. L., Heidi N., Nicholas C., Jaeyun S. (2020).** "*Trichoderma spp.*: Efficient bioremediation and plant growth promotion." *Environmental Science and Pollution Research*, 27(15), 17881-17896.
86. **Wardle D.A., Nicholson K.S. and Rahman A. (1993).** Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass and microbial activity of pasture shoot and root litter. *New Zealand Journal of Agricultural Research.*, 37(1): 29-39.

87. **Wong C.K.F.; Saidi N.B.; Vadamalai G.; Teh, C.Y.; Zulperi D. (2019).** Effect of Bioformulations on the Biocontrol Efficacy, Microbial Viability and Storage Stability of a Consortium of Biocontrol Agents against *Fusarium* Wilt of Banana. *J. Appl. Microbiol*, 127, 544–555.
88. **Zhihe C.; Qingping W; Mlfflong X. (1998).** Advance of biocontrol of *Trichoderma* and Gliocladhan. *J. Microbiol*, 25(5) : 284-28
- **SITE 1.** <https://bio.libretexts.org/>

Résumé

L'objectif de ce travail est de déterminer les caractéristiques morphologiques et l'identification moléculaire des 20 isolats de *Trichoderma* isolés à partir de rhizosphères des cultures, ainsi que l'évaluation du potentiel antagoniste vis-à-vis de *Fusarium sp.*

Sur les 20 Isolats testés, 16 appartiennent à l'espèce « *Trichoderma harzianum* », (02) isolats à « *Trichoderma atroviride* » et (02) à « *Trichoderma virens* ». Les caractéristiques morphologiques et l'identification moléculaire concordent avec nos résultats. Nous pouvons qualifier cela par l'existence d'une grande diversité des espèces de *Trichoderma* au niveau des rhizosphères des cultures et la dispersion de ces espèces dans l'espace.

Mots-clefs : *Trichoderma* ; identification moléculaire ; caractérisation morphologique, biocontrôle

Summary

The objective of this work is to determine the morphological characteristics and the molecular identification of the 20 isolates of *Trichoderma* isolated from the rhizospheres of the cultures, as well as the evaluation of the antagonistic potential vis-à-vis *Fusarium* sp.

Of the 20 Isolates tested, 16 belong to the species "*Trichoderma harzianum*", (02) isolates to "*Trichoderma atroviride*" and (02) to "*Trichoderma virens*". the morphological characteristics and the molecular identification agree with our results. We can qualify this by the existence of a great diversity of *Trichoderma* species at the level of crop rhizospheres and the dispersion of these species in space.

Key words: *Trichoderma*; molecular identification; morphological characterization, biocontrol

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحديد الخصائص المورفولوجية والتعريف الجزيئي لعزلات 20 من *Trichoderma* المعزولة من جذور المناطق المزروعة ، بالإضافة إلى تقييم الجهد المضاد مقابل الفيزاريوم .

من بين 20 عزلة تم اختبارها ، 16 منها تنتمي إلى النوع "*Trichoderma harzianum*" ، عزلتان من "*Trichoderma atroviride*" و عزلتان من "*Trichoderma virens*". تتفق الخصائص المورفولوجية والتعرف الجزيئي مع نتائجنا. يمكننا تصنيف ذلك من خلال وجود تنوع كبير من أنواع التريكوودرما على مستوى جذور المحاصيل وتشنت هذه الأنواع في الفضاء.

الكلمات الرئيسية: *Trichoderma*، التعريف الجزيئي ،التوصيف المورفولوجي و المنافسة

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : Boutra Doua
Djeghdir Belkiss

Caractérisation et évaluation du potentiel biocontrôle d'une collection de *Trichoderma* issus d'un écosystème agricole

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biodiversité et Physiologie Végétale

Résumé

L'objectif de ce travail est de déterminer les caractéristiques morphologiques et l'identification moléculaire des 20 isolats de *Trichoderma* isolés à partir de rhizosphères des cultures, ainsi que l'évaluation du potentiel antagoniste vis-à-vis de *Fusarium sp.*

Sur les 20 Isolats testés, 16 appartiennent à l'espèce « *Trichoderma harzianum* », (02) isolats à « *Trichoderma atroviride* » et (02) à « *Trichoderma virens* ». Les caractéristiques morphologiques et l'identification moléculaire concordent avec nos résultats. Nous pouvons qualifier cela par l'existence d'une grande diversité des espèces de *Trichoderma* au niveau des rhizosphères des cultures et la dispersion de ces espèces dans l'espace.

Mots-clefs : *Trichoderma* ; identification moléculaire ; caractérisation morphologique, Biocontrôle

Laboratoire de recherche :

laboratoire de phytopathologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique en Algérie-INRAA – Unité de Recherche Constantine (URC) , Centre de Recherche en Biotechnologie – CRBt.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. ABDELAZIZ Widad (MCA - UFM Constantine)
Rapporteur : Dr. HARRAT Wahiba (MCB – INRAA Constantine)
Examineur : Dr. BOUDCHICHA Hind (MRB – CRBt Constantine)

Date de soutenance : 22/06/2023