

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

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

المعهد الوطني للعلوم الزراعية- الحراش
Institut National Agronomique –El Harrach

THESE

en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Présentée par

Bouregghda Houda

Recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. à l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (*Foc*), agent du flétrissement du pois chiche

Soutenue le 02 /05 /2009

Devant le jury composé de :

Président : Pr. Bellal M. INA-El Harrach (Alger)
Directeur : Pr. Bouznad Z. INA-El Harrach (Alger)
de thèse

Examineurs : Pr. Sabaou N. ENS- Kouba (Alger)
Dr. Louanchi M. INA-El Harrach (Alger)
Dr. Guezlane A. INA-El Harrach (Alger)
Dr. Decock C. UCL- Louvain la Neuve (Belgique)

DEDICACES

A LA MEMOIRE DE NARDJES

A MA FAMILLE

A TOUS CEUX QUI M'ONT AIDE ET ENCOURAGE

Ce travail est dédié

Houda

REMERCIEMENT

En premier lieu, je remercie mon directeur de thèse M. Bouznad Z. d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, et ses orientations.

Je remercie sincèrement M. Bellal M. de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également :

M. Sabaou N. pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux, et d'avoir accepté pour la deuxième fois de faire partie du jury de ma thèse

Mme Louanchi M. pour l'aide qu'elle m'a apporté, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

M. Guezlane A. d'avoir fait partie de ce jury, pour son aide et à l'intérêt qu'il a toujours porté à mes travaux.

M. Cony Decock, de m'avoir accueilli au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de la MUCL où j'ai acquis de nouvelles techniques qui m'ont permis d'avancer dans mon travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également :

Au professeur Lorito et son équipe du laboratoire de lutte biologique de l'université Fredireco II de Napoli (Italie) : Michelina, Sheridan, Patricia, Roberta, Franshesco, Stephania. Je remercie en particulier Michelina Ruocco et sa famille pour leur accueil, et gentillesse.

A l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire de la mycothèque de l'université Catholique de Louvain : Françoise, Stephanie, Philippe, Celine pour leur aide durant mon séjour.

A M. Kedad A. pour l'importance qu'il a donnée à mon travail, ses conseils ainsi que les documents qu'il a mis à ma disposition.

A Mme Laraba F. pour m'avoir consacré un peu de son temps malgré ses occupations.

A Salim Benkraouche pour son aide dans la réalisation de l'expérimentation

A monsieur Zitouni de l'ENS de Kouba pour son aide dans la réalisation des analyses phylogénétiques.

A kinza pour son amitié sa présence, et son aide durant toute ces années que nous avons passé ensemble durant lesquelles nous avons partagé nos joies et nos peines, que notre amitié dure le temps que nous vivrons Inchaallah.

Un grand merci à Fatima pour sa grandeur d'âme, sa gentillesse et sa disponibilité, on peut compter sur toi Fatima, merci.

Je remercie sincèrement ma chère Ilhem, pour le temps qu'elle a consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je n'oublierais de remercier le défunt Hamid pour son aide dans mes débuts au laboratoire de mycologie.

Je remercie également M. Mabrouk Amar du département de Pédologie pour son aide.

Mes amitiés aux étudiants du département de botanique dont j'ai eu le plaisir de diriger les mémoires parallèlement à la réalisation de cette thèse, avec qui j'ai partagé ma passion pour la lutte biologique, et dont les travaux m'ont éclairci le chemin : Zakia kaci, Yamina Ousaid, Louiza Sidhoumi, Amira Hamel, Hakim Bouabcha, El Hadi Mahmoudi, Widad Soualhi, Laaldja Zikhouni, Salim Benkraouche et Rachida Renane.

Enfin, je remercie infiniment tous ceux qui m'ont aidé et encouragé

Houda

Sommaire

Page

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....1

Chapitre1. Données bibliographiques.....4

1.1 Présentation de la maladie

1.1.2. Agent pathogène..... 4

1.1.3. Races chez le *Foc*4

1.1.4. Diversité génétique chez le *Foc*4

1.1.5. Moyen de lutte 9

1.2. Données sur le genre *Trichoderma*9

1.2.1. Taxonomie du genre *Trichoderma*.. 9

1.2.1.1. Approche morphologique..... 9

1.2.1.2. Approche moléculaire.....10

1.2.3. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique 11

1.2.4. Rôle des enzymes chitinolytiques et glucanolytiques dans l'antagonisme 12

**Chapitre 2. Identification morphologique des isolats appartenant
au genre *Trichoderma***

2.1. Introduction 14

2.2. Matériel et méthodes18

2.2.1. Isolement de l'agent antagoniste18

2.2.1.1. A partir du sol18

2.2.1.2. A partir de la semence19

2.2.1.3. A partir de la rhizosphère19

2.2.2. Identification des espèces d'isolats appartenant au genre *Trichoderma*19

2.3. Résultats	19
2.4. Discussion	26
2.5. Conclusion	28

Chapitre 3. Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp..... 29

3.1. Introduction	29
3.2. Matériel et méthodes	31
3.2.1. Matériel fongique.....	31
3.2.2.Extraction de l'ADN.....	31
3.2.3. Séquençage de la région ITS (ITS-1, ITS-2 et 5,8S)	33
3.2.3.1. L'amplification par PCR	33
3.2.3.2.Séquençage des produits de l'amplification	33
3.2.3.3.Analyse automatique des séquences de l'ADN.....	35
3.2.4. Séquençage d'un fragment du gène codant pour les facteurs.....	36
d'élongation de la traduction EF-1 α	
3.2.4.1. L'amplification par PCR	36
3.2.4.2. Séquençage des produits de l'amplification	37
3.2.5. Analyse phylogénétique.....	37
3.2.6. Utilisation de la RAPD dans la recherche de marqueurs moléculaires.....	37
et étude de la diversité génétique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	
3.3.Résultats	38
3.3.1 Séquençage de la région ITS (ITS-1, ITS-2 et 5,8S).....	38
3.3.1.1. Amplification par PCR de la région ITS	38
3.3.1.2. Analyse des séquences.....	39
3.3.2. Séquençage du gène EF-1 α	43
3.3.2.1. Amplification par PCR du gène EF-1 α	43
3.3.2.2. Analyse des séquences	43
3.3.3. Résultats relatifs à la RAPD.....	48
3.4. Discussion	52
3.5. Conclusion	54

Chapitre 4. Effet de la température sur le taux de croissance et les56
caractères cultureux des isolats de *Trichoderma* spp.

4.1 Introduction	56
4.2. Matériel et méthodes.....	56
4.2.1. Matériel fongique et conditions de culture	56
4.2.2. Influence de la température sur le taux de croissance.....	56
et l'aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	
4.3. Résultats	59
4.3.1. Effet de la température sur le taux de croissance des isolats.....	59
de <i>Trichoderma</i> spp.	
4.3.2. Influence de la température sur les caractères cultureux	62
des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	
4.4. Discussion	80
4.5. Conclusion	81

Chapitre 5. Etude de l'activité antagoniste des isolats de 82
Trichoderma* spp. à l'égard des deux pathotypes du *Foc

5.1. Introduction	82
5.2. Matériel et méthodes	82
5.2.1 Isolement et conditions de culture de l'agent pathogène et des antagonistes	82
5.2.2. Matériel végétal	83
5.2.3. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	83
5.2.3.1.Confrontation directe	83
5.2.3.2. Confrontation à distance	84
5.2.3.3.Effet de l'agent antagoniste sur la sporulation du <i>Foc</i>	84
5.2.4. Activité antagoniste <i>In planta</i>	85
5.2.4.1. Inoculation du sol par le <i>Foc</i>	85

5.2.4.2. Traitement de la semence par les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	85
5.2.4.3. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la stimulation de la croissance du pois chiche.	87
5.2.5. Analyse statistique	87
5.3. Résultats	87
5.3.1. Action <i>in vitro</i> des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance et la sporulation des deux pathotype de <i>Foc</i>	87
5.3.2. Corrélation entre l'effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur les paramètres étudiés <i>in vitro</i> .	100
5.3.3. Action des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à l'égard des deux pathotypes du <i>Foc in planta</i>	100
5.3.3.1. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur le développement..... de la maladie	100
5.3.3.2. Corrélation entre l'effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'indice de maladie des pathotypes de flétrissement et de jaunissement .	105
5.3.3.3. Analyse comparative de l'efficacité des isolats de <i>Trichoderma</i> spp..... <i>in planta</i> et <i>in vitro</i>	105
5.3.3.4. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la stimulation de. la croissance végétale du pois chiche	106
5.3.3.5. Corrélation entre l'effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'indice de maladie et les paramètres de croissance du pois chiche	111
5.4. Discussion	111
5.5. Conclusion	115

Chapitre 6. Analyse des activités chitinolytiques et gluconolytiques.....117
chez les isolats de *Trichoderma* spp.

6.1. Introduction	117
6.2. Matériel et méthodes	121
6.2.1. Matériel fongique.....	121
6.2.2. Milieux de culture pour la production d'enzymes	121

6.2.3. Dosage des protéines totales	122
6.2.4. L'analyse de l'activité enzymatique	122
6.3. Résultats	123
6.3.1. Mise en évidence des activités chitobiosidase,	123
glucosaminidase et gluconase sur milieu SM + chitine	
6.3.2. Mise en évidence des activités chitobiosidase,	126
glucosaminidase et gluconase sur milieu SM + glucose	
6.3.3. Mise en évidence des activités chitobiosidase,	128
glucosaminidase et gluconase sur milieu SM + Saccharose	
6.3.4. Mise en évidence des activités chitobiosidase,	130
glucosaminidase et gluconase sur milieu SM + glycérol	
6.3.5. Corrélation entre l'activité enzymatique des isolats de..	132
<i>Trichoderma</i> spp. sur milieu SM + chitine et la réduction de	
l'indice de maladie <i>in planta</i> .	
6.4. Discussion	132
6.5. Conclusion	135

Conclusion générale et perspectives 137

Références bibliographiques.....141

Annexes

Article publié

Article soumis et accepté

Liste des abréviations

°C : degré Celsius

µm : micromètre

mm : millimètre

cm : centimètre

ng : nanogramme

min : minute

SM : milieu synthétique

PDA : Potato Dextrose Agar

T : *Trichoderma* spp.

Ta : *Trichoderma atroviride*

TL : *Trichoderma longibrachiatum*

Th : *Trichoderma harzianum*

Foc : *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceris*

EF : Facteur d'élongation de la traduction des protéines

ITS : Espaceurs Internes Transcrits (Intragenic transcribed spacer)

SeQ : Séquenceur

mA : milli ampère

V : volt

UV : Ultraviolet

Pb : paire de bases

Kb : Kilo base

KDa : Kilo dalton

ech 42 : endochitinase 42 KDa

HT : Hauteur de la tige

PF : Poids frais

PS : Poids sec

SS : Sol stérilisé

SNS : Sol non stérilisé

PT : Protéine totale

INA : Institut national Agronomique

ITGC : Institut Technique des grandes cultures

MUCL : Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain

Liste des figures	Page
Figure 1. Symptôme de flétrissement fusarien en plein champs induit par.....5 par le pathotype de flétrissement	
Figure 2. Genealogie du gène des facteurs d'élongation de la traduction EF-1 α ,7 montrant l'origine monophylétique chez le <i>F. oxysporum</i> fsp. <i>ciceris</i> .	
Figure 3. Dendrogramme dérivé de l'analyse par RAPD de 57 isolats de <i>Fusarium</i>8 <i>oxysporum</i> fsp. <i>ciceris</i> et 4 isolats de <i>F.oxysporum</i> non pathogène au pois chiche en utilisant les amorces OPI-01, OPI-09, OPI-18, OPF-06, OPF-10, OPF-12 et OPF-16.	
Figure 4. Illustration des cinq sections reconnus par Bissett 17	
Figure 5. Aspect microscopique des isolats avec des conidiophores et phialides22 correspondant à la section <i>T. longibrachiatum</i>	
Figure 6. Schéma montrant l'aspect morphologique de l'espèce <i>T. citrinoviride</i>23	
Figure 7. Morphologie des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.avec des conidiophores.....25 et des phialides correspondant aux sections <i>Trichoderma</i> et <i>Pachybasum</i> .	
Figure 8. Arbre phylogénétique de 47 espèces de <i>Trichoderma</i> obtenu par.....30 analyse des séquences ITS-1, ITS-2, 28S, mit SSU DNA, tef1 et ech42.	
Figure 9. Structure schématique de la région ITS (ITS1, 5,8S et ITS2) de.....34 l'ADN ribosomal.	
Figure 10. Structure schématique du gène EF-1 α de l'espèce <i>Hypocrea jecorina</i> ,36 avec la localisation des amorces utilisées dans son amplification.	
Figure 11. Amplification de la région ITS des 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par39 les amorces NS7 et ITS-4.	
Figure 12. Relation phylogénétique entre les 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....41 résultant de l'analyse des séquences de l'ADNr (ITS-1, 5,8S et ITS-2).	
Figure 13. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences ITS, montrant.....42 la position des 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par rapport aux isolats de références.	
Figure 14. Amplification du gène EF-1 α des 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par.....43 les amorces EF-1 et EF-2.	

Figure 15. Relation phylogénétique entre les 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	45.
résultant de l'analyse des séquences du gène EF-1 α .	
Figure 16. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences EF-1 α , montrant	46
la position des 18 isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par rapport aux isolats de références.	
Figure 17. Profil RAPD des 10 isolats de <i>T. longibrachiatum</i> (1,2,4,5,8,9,10,11,14, et 17), .48	
5 Isolats de <i>T. harzianum</i> (6, 12, 15, 16, et 18), et des 3 isolats de <i>T. atroviride</i>	
(3, 7,13) générés par les amorces OPA1(A), OPA10(B), OPA17(C) et le minisatellite	
M13 (D).	
Figure 18. Dendrogramme dérivé de l'analyse par RAPD de 10 isolats	50
<i>T. longibrachiatum</i> , 5 isolats de <i>T. harzianum</i> et 3 isolats de <i>T. atroviride</i> par	
la combinaison de 4 amorces (OPA1, OPA10, OPA17 et le minisatellite M13).	
Figure 19. Diamètre des colonies <i>T. longibrachiatum</i> (A,B) <i>T. harzianum</i> (C,D), et	61
<i>T. atroviride</i> (E,F) après 48h d'incubation à 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C	
sur le milieu PDA (A,C, E) et SNA (B,D,F).	
Figure 20. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 15°C sur milieu PDA.....	66
Figure 21. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 20°C sur milieu PDA.....	67
Figure 22. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 25°C sur milieu PDA.....	68
Figure 23. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 30°C sur milieu PDA.....	69
Figure 24. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 35°C sur milieu PDA.....	70
Figure 25. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 40°C sur milieu PDA.....	71
Figure 26. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 15°C sur milieu SNA.....	74
Figure 27. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 20°C sur milieu SNA.....	75
Figure 28. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 25°C sur milieu SNA.....	76
Figure 29. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 30°C sur milieu SNA.....	77
Figure 30. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 35°C sur milieu SNA.....	78
Figure 31. Aspect cultural des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. à 40°C sur milieu SNA.....	79
Figure 32. Schéma montrant la confrontation à équidistance du <i>Foc</i> et de	83
<i>Trichoderma</i> spp. sur milieu PDA.	

Figure 33. Schéma montrant la confrontation à distance entre le <i>Foc</i> et <i>Trichoderma</i> spp. sur milieu PDA.	84
Figure 34. Inoculation du sol par le <i>Foc</i> selon la technique de Singh et al. (1979).	86
Figure 35. Confrontation directe des isolats de <i>T. atroviride</i> à l'égard des deux pathotypes du <i>Foc</i> .	90
Figure 36. Confrontation directe des isolats de <i>T. longibrachiatum</i> à l'égard des deux..... pathotype du <i>Foc</i> .	91
Figure 37. Confrontation directe des isolats de <i>T. harzianum</i> à l'égard des deux..... pathotypes <i>Foc</i> .	92
Figure 38. Confrontation indirecte des isolats de <i>T. atroviride</i> à l'égard des deux pathotypes du <i>Foc</i> .	93
Figure 39. Confrontation indirecte des isolats de <i>T. harzianum</i> à l'égard des deux pathotypes du <i>Foc</i> .	94
Figure 40. Confrontation indirecte des isolats de <i>T. longibrachiatum</i> à l'égard des deux..... pathotypes du <i>Foc</i> .	95
Figure 41. Arrêt de la croissance du pathotype de flétrissement sous l'effet des substances antifongiques volatiles émises par l'isolat <i>T. atroviride</i> Ta.13.	96
Figure 42. Modifications morphologiques affectant le mycélium du <i>Foc</i>	97
Figure 43. Symptômes de jaunissement (a) et flétrissement (b) induits par les deux..... Pathotypes du <i>Foc</i> .	101
Figure 44. La molécule de chitine.....	119
Figure 45. La molécule β (1-3) glucane.....	119

Liste des tableaux	Page
Tableau 1. Intervalle des dimensions et forme des conidies des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	26
Tableau 2. Caractéristique morphologique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. utilisés dans l'étude	32
Tableau 3. Matrice de coefficient de similarité basée sur les analyses de la RAPD.....	51
Tableau 4. Origine des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. utilisés dans l'étude.....	58
Tableau 5. Caractéristiques culturales des isolats de <i>Trichoderma</i> spp sur milieu PDA	64
Tableau 6. Caractéristiques culturales des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur milieu SNA.....	72
Tableau 7. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance et la sporulation du..... pathotype de flétrissement.	98
Tableau 8. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance et la sporulation du pathotype de jaunissement.	99
Tableau 9. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'indice de maladie du pathotype de.. flétrissement.	103
Tableau 10. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'indice de maladie du pathotype... de jaunissement.	104
Tableau 11. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance du pois chiche.. (Pathotype de flétrissement dans le sol stérilisé).	107
Tableau 12. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance du pois chiche..... (Pathotype de flétrissement dans le sol non stérilisé).	108
Tableau 13. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance du pois chiche..... (Pathotype de jaunissement dans le sol stérilisé).	109
Tableau 14. Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> spp sur la croissance du pois chiche (Pathotype de jaunissement dans le sol non stérilisé).	110
Tableau 15. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + Chitine.....	125
Tableau 16. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + glucose.....	127
Tableau 17. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + saccharose	129
Tableau 18. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + glycérol.....	131

Introduction générale

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est l'une des plus importantes légumineuses alimentaires cultivées dans le monde ; il occupe la 3^{ème} place après le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.) (Sharma et al., 1994). En Algérie, le pois chiche est la seconde légumineuse alimentaire après la fève (Hamadache et Ait Abdallah, 1998).

En alimentation humaine, le pois chiche est une excellente source de protéines pour les populations pauvres avec une teneur de 25.3 % - 28.9 % du poids du grain, riche également en fibres, en glucides complexes, en vitamines et en minéraux (Muehlbauer et Tullu, 1997 ; MacMichael, 2001) ; il est utilisé aussi dans l'alimentation animale.

Cultivé essentiellement dans les zones littorales et les plaines intérieures, la situation du pois chiche en Algérie n'est pas encourageante à cause des faibles productions et rendements enregistrés ces dernières années. Ceci est dû essentiellement aux mauvaises conditions climatiques, à la non maîtrise de l'itinéraire technique et des conditions phytosanitaires (Bouznad et al., 1998). L'Algérie est l'un des principaux importateurs du pois chiche dans le monde, elle occupe la 6^{ème} place après l'Inde, le Pakistan, l'Espagne, le Bangladesh et les AEU (Mac Michael, 2004).

Le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (*Foc*) est considéré comme étant la maladie transmise par le sol la plus importante sur pois chiche à travers le monde. Les attaques par le *Foc* peuvent détruire complètement la culture, quand les conditions sont favorables au développement de la maladie (Anjaih et al., 2003 ; Halila et Strange, 1996 ; Navas-Cortes et al., 2000a). Les pertes annuelles de rendement ont atteint 10 % en Inde (Mayer et al., 1997), 12 à 15 % en Espagne (Landa et al., 2004), 40 % en Tunisie (Navas-Cortés et al., 2000b) et de 10-50 % au Pakistan (Khan et al., 2001).

En Algérie, cette maladie rapportée pour la première fois par Bouznad et al.(1990) est considérée parmi les maladies les plus importantes sur pois chiche où des prospections réalisées dans les différentes régions du pays, ont révélé la forte présence de cette maladie. Dans le Nord Ouest du pays 20- 45 % des champs prospectés sont affectés par la fusariose du pois chiche (Maatougi, 1996). Selon Sayoud et al.(1999) la maladie reste assez localisée, surtout dans le Nord-Est du pays, avec des attaques sévères notamment dans la région de Guelma et Skikda (Bellah et al., 2003). Récemment Bekkar et al. (2007) ont étudié l'incidence et la gravité de la maladie dans trois régions du Nord-Ouest Algérien, à savoir Mascara, Sidi Bel-Abbès et Ain Temouchent.

Parmi les moyens de lutte, la rotation culturale, la solarisation du sol, l'utilisation de semence indemne de *Foc*, l'élimination des débris végétaux infestés, le traitement de la semence par les fongicides sont employés contre le *Foc*, dont le succès est limité (Haware et al., 1996 ; Trapero-Casas et Jiminez-Diaz, 1985). Le moyen de lutte le plus efficace et économique contre cette maladie est l'utilisation de cultivars résistants. Cependant, cette méthode est limitée par la grande variabilité pathologique du *Foc*.

La lutte biologique offre des potentialités de contrôle des maladies où certains agents antagonistes sont capables de contrôler des maladies contre lesquelles aucun moyen de lutte chimique ou résistance de l'hôte n'existe, et avec moins de contraintes environnementales que les pesticides (Hanson et Howell, 2002). Ces dernières années la lutte biologique par l'utilisation d'agents antagonistes fongiques et bactériens a été envisagée contre le *Foc*. Ainsi des isolats de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., et des isolats non pathogènes de *F. oxysporum* isolés à partir de la rhizosphère du pois chiche, ont montré leur efficacité dans la suppression de la fusariose du pois chiche sous des conditions contrôlées. Par conséquent, la lutte biologique pourrait offrir des potentialités pour la suppression de la fusariose en plein champ, particulièrement lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des cultivars partiellement résistants et un choix adéquat de la date de semis (Landa et al., 2004).

L'objectif de notre étude est la recherche d'agents antagonistes du *Foc*. Nous avons ciblé des isolats appartenant au genre *Trichoderma*, suite à des travaux antérieurs qui ont montré que les isolats de ce genre sont efficaces dans la réduction de l'incidence de la maladie lorsque les graines de pois chiche sont traitées avec une suspension de spores de *Trichoderma* spp. avant le semis dans un sol préalablement infesté par le *Foc* (Kaci et Oussaid, 1999 ; Zikhouni, 2005 ; Benkraouche, 2006). Ainsi l'isolement de l'agent antagoniste est effectué à partir du sol et de la rhizosphère des plants de pois chiche.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à une étude taxonomique des espèces de *Trichoderma* spp. utilisées dans cette étude. L'appartenance des isolats au genre *Trichoderma* et la détermination des espèces est basée sur les caractéristiques morphologiques décrites par Rifai (1969) ; Bissett (1984 ; 1991a,b,c). Cependant, la détermination des espèces chez ce genre est délicate à cause de la grande similitude qui peut exister entre elles. Les caractéristiques morphologiques sont douées d'une grande plasticité et la taxonomie basée uniquement sur les critères morphologiques chez le genre *Trichoderma* n'est pas suffisante. Ainsi, nous avons envisagé d'approcher cet aspect par un séquençage de gènes, notamment le

gène de la région ITS (ITS-1, 5.8 et ITS-2), et une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation de la traduction des protéines EF-1 α (Elongation Factor) pour clarifier l'identité de nos isolats *Trichoderma* spp. Une étude de la diversité génétique inter-spécifique et intra-spécifique des isolats de *Trichoderma* spp. par RAPD est également réalisée. L'identification des espèces de *Trichoderma* spp. par cet outil est également recherchée.

Après, la confirmation de l'identité de l'espèce des isolats de *Trichoderma* spp., nous avons réalisé une étude qui a porté sur le taux de croissance et l'aspect cultural à différentes températures, la sporulation ainsi que la production de pigments en milieu de culture chez les isolats. La variabilité de ces caractères chez les espèces de *Trichoderma* spp. est également étudiée, car certains de ces caractères peuvent être utiles dans l'identification.

Parmi les aspects étudiées, l'évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. *in vitro* et *in vivo* à l'égard de deux isolats du *Foc*. Le premier appartient au pathotype responsable du jaunissement, et le second appartient au pathotype responsable du flétrissement. Les paramètres étudiés *in vitro* concernent l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance (confrontation directe et indirecte), et la sporulation. L'efficacité *in planta* des isolats de *Trichoderma* spp. dans la protection des plants contre la fusariose du pois chiche est évaluée par des traitements de la semence du pois chiche à l'aide d'une suspension de spores avant le semis dans un sol préalablement infesté par le *Foc* . L'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la stimulation de la croissance végétale est également recherchée par une évaluation du taux de stimulation des différents paramètres de croissance.

Plusieurs auteurs ont rapporté le rôle des enzymes chitinolytiques et glucanolytiques comme déterminants des mécanismes de l'activité antagoniste chez les *Trichoderma* spp. L'analyse de ces enzymes est réalisée par l'étude de l'effet de plusieurs substrats sur l'induction et la répression des deux enzymes chitinolytiques (chitobiosidase et glucosaminidase) et glucanolytique (glucanase). La variabilité interspécifique et intra-spécifique des isolats étudiés concernant la production de ces enzymes sont également étudiées. Dans cette étude, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre la production d'enzyme et la capacité antagoniste des *Trichoderma* spp.

Chapitre 1

Données bibliographiques

1.1 Présentation de la maladie

1.1.1. Symptomatologie

Selon le type de symptômes, deux pathotypes sont décrits chez le *Foc*. Le 1^{er} pathotype est responsable d'un jaunissement foliaire progressif avec un brunissement des tissus vasculaires et une mort tardive des plants. Le 2^{ème} pathotype est responsable du flétrissement (Fig.1), induisant une chlorose sévère et rapide avec un brunissement des tissus vasculaires et une mort précoce des plants (Trapéro-Casas et Jiménez-Diaz, 1985).

1.1.2. Agent pathogène

Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (Hyphomycètes, Moniliales, Tuberculariaceae) est un champignon tellurique pathologiquement spécialisé au genre *Cicer*, et cause la fusariose sur pois chiche, seule espèce cultivée du genre *Cicer*.

1.1.3. Races chez le *Foc*

En se basant sur la réaction d'une gamme différentielle, 8 races sont rapportées chez le *Foc*: races 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 et 6. Les races 0 et 1B/C induisent le symptôme de jaunissement (Fig.1), alors que les races 1A, 2, 3, 4, 5 et 6 provoquent le symptôme de flétrissement (Corell, 1991 ; Kelly et al., 1994 ; Jiménez-Gasco et al., 2001). Les huit races possèdent également une distribution géographique distincte, puisque les races 2, 3 et 4 ont été rapportées uniquement en Inde, tandis que les races 0, 1B/C et 6 existent principalement dans la région méditerranéenne et aux USA (Californie). La race 1A est la plus répandue, rapportée en Inde, en Californie, et dans la région méditerranéenne (Jiménez-Gasco et al., 2001). En Algérie la présence des races 6 et 0 est rapportée par Bouznad et al.(1992). En plus de la différence dans la virulence, les races du *Foc* diffèrent également dans l'agressivité. Par conséquent, il apparaît que dans la majorité des cas, le pathotype de jaunissement est moins agressif que le pathotype de flétrissement (Jiménez-Gasco et al., 2004)

1.1.4. Diversité génétique chez le *Foc*

Le *Fusarium oxysporum* est un complexe d'espèces telluriques composé de formes spéciales pathogènes et saprophytes ; pour lesquelles aucune forme sexuée n'a jamais été observée. Ainsi les variations génétiques chez cette espèce peuvent résulter principalement de l'accumulation des mutations. En conséquence, chez ces champignons la totalité du génome

est liée, transmise comme une seule unité d'une génération à une autre, et leurs populations naturelles sont clonales dans la nature.



Figure 1. Symptômes de flétrissement fusarien en plein champs induit par le pathotype de flétrissement.

Certaines études ont montré que les formes spéciales chez le *Fusarium oxysporum* peuvent avoir différents modèles d'évolution. Certaines formes spéciales (*albedinis*, *canariensis*, *conglutinans*) ont une seule origine, et sont ainsi monophylétique ; tandis que d'autres (*cubens*, *lycopersici*, *melonis*) ont des origines multiples et sont ainsi polyphylétique. Que le *Foc* ait une origine monophylétique ou polyphylétique, il y a une conséquence directe sur la recherche d'une source de résistance génétique contre la maladie. Néanmoins la haute variabilité génétique et géographique observée chez ce champignon suppose que le *Foc* pourrait être polyphylétique.

Une série d'études a montré que tous les isolats du pathogène sont génétiquement identiques, selon que l'on considère le critère race ou origine géographique (Jiménez-Gasco et al., 2004). Les isolats de *Foc* forment un seul groupe de compatibilité végétative (Woo et al., 1998). Ils présentent une similarité pour la longueur et le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial par RFLP (Perez-Artes, 1995). L'analyse des séquences de cinq gènes, EF-1 α , β tubuline, histone 3, actin, et calmoduline, montre qu'ils sont similaires (Jiménez-Gasco et al., 2004). La comparaison par analyse en parcimonie des séquences du gène EF-1 α de 17 isolats de *Foc* représentant toutes les races, les deux pathotypes, les régions géographiques du pathogène, et 3 isolats de *F. oxysporum* non pathogènes au pois chiche avec 24 séquences EF-1 α des isolats de 11 formes spéciales de *F. oxysporum*, a montré que les isolats du *Foc* forment une clade bien distincte des autres formes spéciales et des isolats *F. oxysporum* non pathogènes (Fig. 2). Toutes ces informations indiquent que le *Foc* possède une origine monophylétique (Jiménez-Gasco et al., 2002).

La variabilité génétique chez le *Foc*, n'a pas été mise en évidence au niveau des séquences des gènes étudiés, mais plutôt par la RAPD (Kelly et al., 1994 ; Jiménez-Gasco et al., 2001). Des isolats de *Foc* de tous les pathotypes, et de toutes les races d'origine géographique différente ont été testés avec trois amorces par Kelly et al. (1994), et 7 amorces par Jiménez-Gasco et al. (2001). Les résultats obtenus ont montré que les isolats de *Foc* sont subdivisés en deux groupes « clusters » séparant d'une part les pathotypes de jaunissement, et d'autre part les pathotypes de flétrissement. Cependant, les isolats du pathotype de jaunissement sont à leur tour divisés en deux « sub-clusters » qui correspondent à la race 0 et la race 1B/C (Fig.3). Les résultats de l'analyse moléculaire montrent que les différences génétiques sont très hautement significatives aussi bien entre les isolats du pathotype de jaunissement et du flétrissement que entre les races 0 et 1B/C (Jiménez-Gasco et al., 2001). La RAPD, a permis d'identifier des marqueurs moléculaires par la présence de bandes qui permettent de distinguer le pathotype de jaunissement de celui du flétrissement (Kelly et

al.,1994), ainsi que les races du *Foc* (Jiménez-Gasco et *al.*, 2001) ; ils ont pu identifier les races 0, 1B/C, 5, et 6 par la présence de bandes spécifiques pour chacune des races.

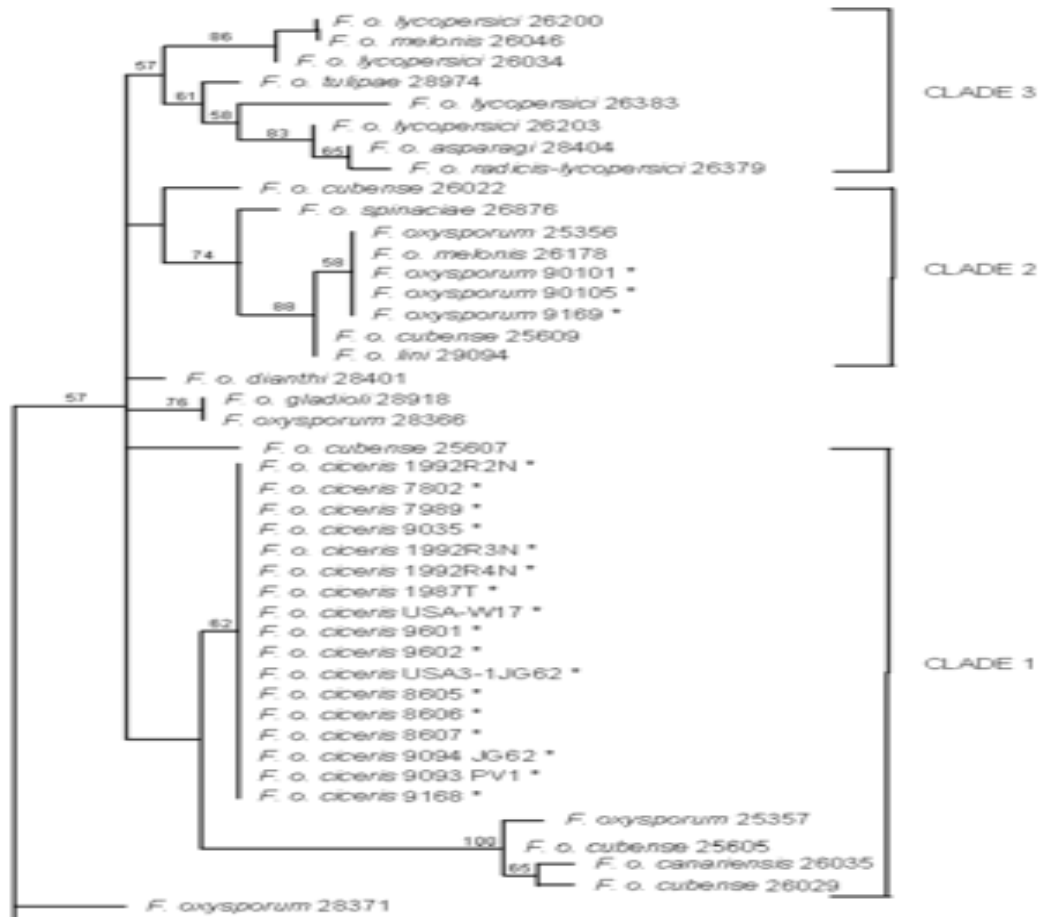


Fig.2 Généalogie du gène des facteurs d'élongation de la traduction EF-1 α , montrant l'origine monophylétique chez le *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Jiménez-Gasco et *al.*, 2002)

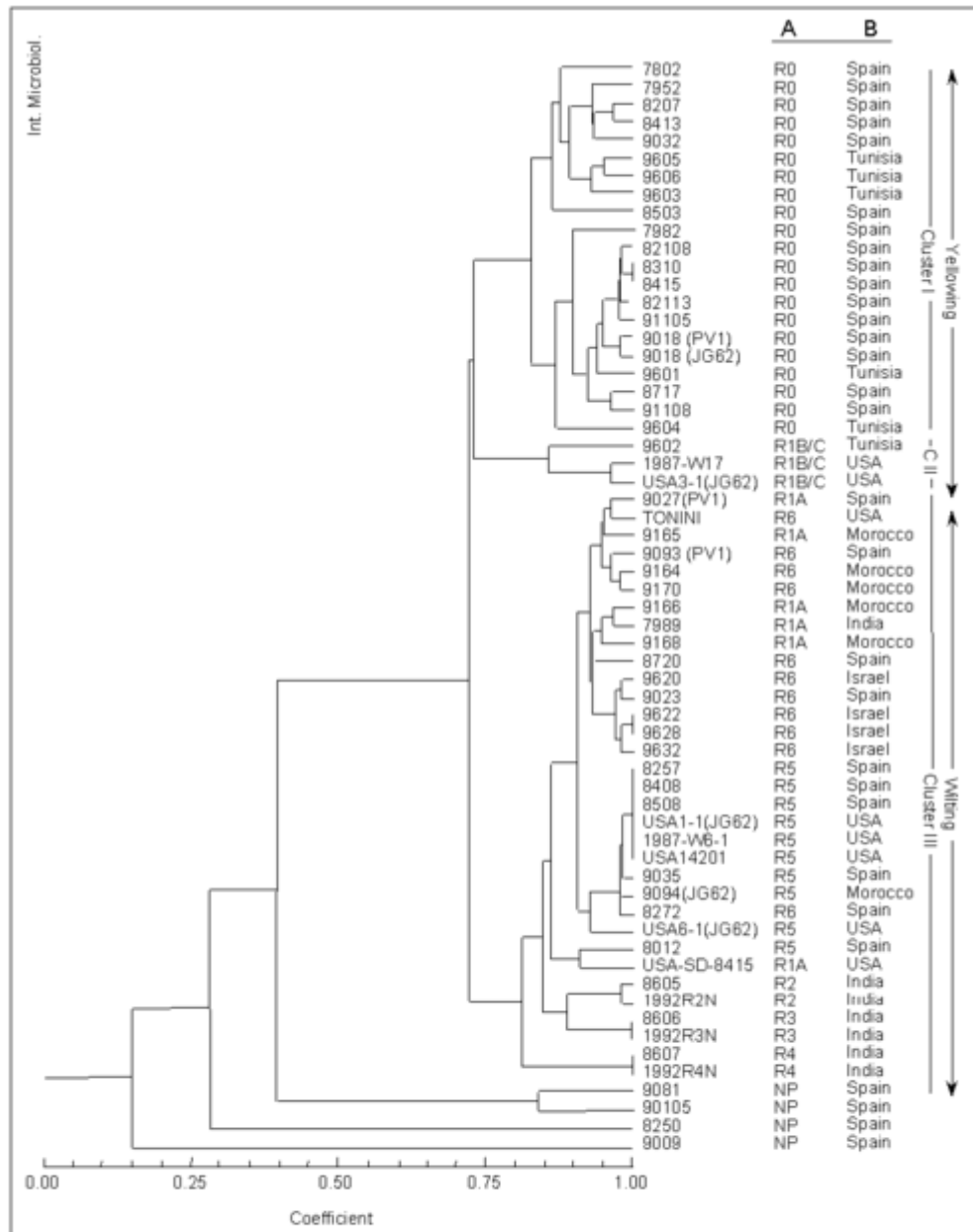


Fig.3. Dendrogramme dérivé de l'analyse par RAPD de 57 isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* et 4 isolats de *F. oxysporum* non pathogène au pois chiche en utilisant les amorces OPI-01, OPI-09, OPI-18, OPF-06, OPF-10, OPF-12 et OPF-16. Le dendrogramme est obtenu par la méthode UPGMA (unweighted paired group method with arithmetic averages). L'échelle correspond au coefficient de similarité de Jaccard. R0: race 0, R1A: race 1A, R1/BC: race 1B/C, R2: race 2, R3: race 3, R4: race 4, R5: race 5, R6: Race 6. NP: *F. oxysporum* non pathogène (B): origine géographique des isolats (Jiménez-Gasco et al., 2001).

1.1.5. Moyens de lutte

Le *Foc* peut survivre dans le sol pour plusieurs années par les chlamydospores, ce qui réduit le potentiel de la rotation culturale comme moyen de lutte (Haware et *al.*, 1996). Le contrôle du flétrissement fusarien peut être obtenu par l'utilisation de cultivars résistants avec un choix judicieux des dates de semis. Cependant, plusieurs facteurs influencent l'efficacité de ce moyen de lutte, la grande variabilité pathologique du *Foc*, ainsi que les facteurs abiotiques comme la température et l'humidité (Landa et *al.*, 2006).

La lutte biologique contre cette maladie avait été envisagée par l'utilisation d'agents antagonistes bactériens et fongiques. Des isolats saprophytes de *F. oxysporum* isolés de la rhizosphère du pois chiche ont montré une grande réduction de l'incidence de la maladie. Des agents antagonistes commercialisés tels que *Bacillus subtilis* GB03 et *T. harzianum* KRL-AG2(T-22G) sont utilisés avec succès contre le *Foc* (Hervàs et *al.*, 1997).

1.2. Données sur le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* Pers.:Fr. décrit par Persson en 1874, est utilisé depuis les années 1930 dans la lutte biologique appliquée en agriculture. Différentes espèces de ce genre ont montré leur efficacité dans la lutte contre des agents phytopathogènes aériens et telluriques. Depuis, différents travaux sur la taxonomie de ce genre basés sur les critères morphologiques, biochimiques et moléculaires, sur les mécanismes impliqués dans l'antagonisme, ainsi que l'augmentation du potentiel antagoniste par clonage de gène, sont effectués.

1.2.1. Taxonomie du genre *Trichoderma*

1.2.1.1. Approche morphologique

Selon les auteurs, les espèces du genre *Trichoderma* ont été initialement définies sur la base de caractères morphologiques.

Rifai (1969) a adopté le concept d'espèces agrégats, qu'il a défini comme une agrégation d'espèces très similaires et difficilement séparables. Il a conclu qu'il n'existe aucun critère pour définir une espèce biologique en terme morphologique. Les caractères morphologiques sont en continuelle variation, et il n'existe aucun critère pour connaître le degré de variation admis au sein de l'espèce. Cet auteur trouve une continuité dans les caractères morphologiques avec quelques caractères morphologiques de base.

Bissett (1984, 1991a-b-c, 1992), a adopté une analyse plus compréhensive des caractères morphologiques du genre *Trichoderma*. Il a élevé chaque espèce agrégat au niveau de section, et a décrit 27 espèces dont les caractères morphologiques des espèces biologiques ne sont pas continus (Bissett, 1991a).

Malheureusement, il est important de noter que certains caractères adoptés dans la reconnaissance des espèces chez les hyphomycètes sont en général soit non assez variables ou difficiles à décrire comme chez les *Trichoderma*. Ainsi, la taille et la forme des conidies qui sont des caractères très utilisés chez les autres genres sont d'une valeur très limitée chez les *Trichoderma*. La taille des conidies de la plupart des espèces est inférieure à 5 µm en longueur et en largeur ; les conidies peuvent être globuleuses, subglobuleuses, ellipsoïdes ou oblongues. La forme est utilisée dans la reconnaissance des groupes d'espèces mais à l'intérieur d'un groupe d'espèce, la valeur diminue (Samuels, 1996). Selon Lieckfeldt et al. (2001), la taxonomie des *Trichoderma* spp. est difficile car les cultures présentent peu de caractères morphologiques quantifiables, et qui sont en continuum.

La taxonomie par d'autres approches a montré que l'évaluation du polymorphisme enzymatique chez 5 espèces agrégats affirme que d'une part il existait une certaine base génétique pour les espèces agrégats morphologiques, et d'autre part a confirmé les propres constations de Rifai (1969) que chaque espèce agrégat est génétiquement hétérogène (Stasz et al., 1989).

1.2.1.2. Approche moléculaire

Bissett (1991b) considère que la détermination des espèces chez le genre *Trichoderma* ne peut être résolue sans une intégration des études morphologiques, moléculaires, et le cycle de vie (holomorphe) du champignon. L'intégration de ces méthodes est accomplie pour la première fois par Samuels et al. (1998) pour résoudre l'identification des 10 espèces de la section *Longibrachiatum* basée sur la morphologie des teleomorphes et l'anamorphe et les séquences nucléotidiques des espaceurs internes transcrit (ITS) de l'ADN ribosomal. Ils ont montré que *T. longibrachiatum* Rifai est différent de *T. reeseii* Simons. Ainsi, la synonymie entre *T. reesei* et *T. longibrachiatum* proposé par Bissett (1984) en se basant sur les caractères morphologiques n'a pas été retenue. Par contre, ces mêmes auteurs ont trouvé que *T. parceramosum* Bissett est un synonyme de *T. ghanense* Doi, Abe et Sugiyama. Samuels et al. (1998) ont également montré dans leurs travaux que l'anamorphe de *Hypocrea shweinitzii* (Fr.) Sacc est *T. citrinoviride* Bissett ; l'anamorphe de *H. jecorina* Berk et Broome est *T. reesei* et que *Hypocrea orientalis* Samuels et Petrini et *T. longibrachiatum* sont

génétiqumment très proches, différents seulement par 1-5 pb dans la région ITS du gène de l'ADN ribosomal, mais sont différents dans les caractères morphologiques. Depuis, les analyses moléculaires sont devenues essentielles pour la détermination et la délimitation de nouvelles espèces ainsi que la détermination des liens téléomorphes.

Récemment, dans une caractérisation moléculaire d'isolats de *Trichoderma* précédemment identifiés comme *T. harzianum* Rifai par séquençage des ITS1 et ITS2, Hermosa et al. (2000) ont confirmé la distribution de l'espèce *T. harzianum* en quatre biotypes, dont les biotypes Th1 et Th3 ne sont pas pathogènes sur champignons de couches. Les analyses basées sur les séquences ITS ont montré que le biotype Th3 coïncide avec *Trichoderma atroviride* P. Karst.

L'espèce *T. atroviride* décrite pour la première fois par Karsten en 1892, avait été ajoutée dans l'agrégat *harzianum* par Rifai (1969). Plus tard cette espèce avait été réintroduite et décrite par Bissett (1992) pour intégrer des isolats avec des phialides minces et des conidies sombres, larges avec des parois lisses Samuels et al. (2002). Dodd et al. (2003), ont décrit une nouvelle espèce *Hypocrea atroviridis* Dodd, Lieckfield et Samuels, comme téléomorphe de l'anamorphe *T. atroviride* en se basant sur l'analyse des séquences (ITS1-5,8S-ITS2) de l'ADN ribosomal et le gène EF-1 α ; *T. atroviride* et *H. atroviridis* formaient un clade bien distinct dans la section *Trichoderma*.

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

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* comme agents de lutte biologique avait été observé pour la première fois par Weinding (1932) in Howell (2003). Ce dernier auteur a rapporté l'action mycoparasitaire de *T. lignorum* (Tode) Harz contre *Rhizoctonia solani* Kühn. Il avait décrit avec détail l'enroulement des hyphes de l'agent antagoniste contre celles de l'agent pathogène, la pénétration, ainsi que la dissolution du cytoplasme de l'hôte. Deux années plus tard Weinding (1934) in Howell (2003) avait rapporté que la souche de *T. lignorum* produisait une substance toxique contre *R. solani* et *Sclerotinia americana* Norton et Ezekiel, et la nomma gliotoxine. Plus tard il avait été démontré que l'espèce qui produisait la gliotoxine n'était pas *T. lignorum* mais plutôt *Gliocladium virens* Miller, Gidden et Foster (Webster et Lomas, 1964). Cette dernière espèce est récemment renommée comme *Trichoderma virens* (Miller, Gidden et Foster) Arx (Rehner et Samuels, 1994).

Dans les années qui suivent ces travaux, plusieurs exemples de succès de la lutte biologique ont été attribués aux mécanismes de mycoparasitisme et où l'antibiose, à la rhizosphère compétente, aux enzymes lytiques qui dégradent les polysaccharides, la chitine et

le β -glucane telles que les chitinases et glucanases et à l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Chet, 1987 ; Howell et al., 1993 ; Lo et al., 1998 ; Yedidia et al., 1999). Le renforcement des activités antifongiques a été montré chez les plantes et les microorganismes. Des plants de tabac et de tomate exprimant des chitinases recombinantes à partir de *T. harzianum* (P1) ont exprimé une grande résistance à l'égard d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Lorito, 1998). Selon Migheli et al. (1998) la souche *T. longibrachiatum* (CECT2606) transformée par un gène codant pour la β -1,4 endoglucanase (overexpression) est plus efficace que la souche sauvage.

1.2.4. Rôle des enzymes chitinolytiques et glucanolytiques dans l'antagonisme

Les enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques sécrétées par *Trichoderma* spp. telles que les chitinases et les β glucanases sont considérées comme étant les déterminants majeurs de l'activité antagoniste (Elad et al., 1982 ; Lorito, 1998). Des données récentes indiquent clairement que en particulier les chitinases jouent un rôle principal (Kubicek et al., 2001). Quelques enzymes chitinolytiques de *T. harzianum* ont été purifiées et caractérisées (Harman et al., 1993).

Les enzymes chitinolytiques de *Trichoderma* spp. sont sécrétées de manière extracellulaire pour dégrader les substrats à base de chitine (exemple : le mycélium des champignons). Certaines de ces enzymes ont un rôle nutritionnel et peuvent être impliquées dans la lutte biologique (Muthumeenakshi et al., 1994 ; Speranzini et al., 1995 in Lorito, 1998). Belanger et al. (1995) in Lorito (1998) ont observé qu'une souche de *T. harzianum* efficace dans la lutte biologique agissait en premier lieu par la production d'antibiotiques pour tuer l'hôte, et beaucoup plus tard produit des enzymes chitinolytiques pour la colonisation saprophytique des tissus de la plante hôte déjà morte. Selon ces données, l'efficacité de la lutte biologique des souches de *Trichoderma* spp. serait associée à la production des antibiotiques non volatiles ou avec d'autres mécanismes autre que le mycoparasitisme (Lorito, 1998). Par contre, beaucoup de travaux ont montré l'implication importante des enzymes chitinolytiques dans le mycoparasitisme, l'antagonisme et la lutte biologique. Dans l'interaction mycoparsitaire *in vitro*, une induction de l'expression des enzymes chitinolytiques est induite dans les premières heures de contact avec le pathogène, ces enzymes apparaissent à être impliquées dans la pénétration et la mort de l'hôte (Carosolio et al., 1994 ; Chérif et Benhamou, 1990 ; Inbar et Chet, 1995 ; Haran et al., 1996 ; Lorito et al., 1996a.). Certains isolats de *Trichoderma* spp. commercialisés et utilisés dans la lutte biologique ne produisent pas d'antibiotiques non volatiles (Harman et al., 1993b), et une

corrélation directe est trouvée entre l'activité chitinolytique *in vitro* et la capacité de biocontrôle de certains isolats de *T. harzianum* (Elad et al., 1982)

Certaines enzymes chitinolytiques de *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp. peuvent être directement utilisées en combinaison avec les fongicides chimiques pour protéger les fruits au cours du stockage contre les maladies de conservations. Des applications basées sur des préparations enzymatiques dans les serres ou en plein champ peuvent être utilisées, puisque les enzymes peuvent améliorer l'efficacité des fongicides systémiques et des bactéries antagonistes (Lorito et al., 1993, 1994b). Ce qui est également prometteur pour la défense des plantes, et le transfert de gènes codant pour les enzymes chitinolytiques de différentes espèces végétales (Lorito et al., 1996c).

Concernant la dernière approche de lutte, de nombreux végétaux d'intérêt économique ont été génétiquement modifiés avec des chitinases d'origine diverse afin d'accroître leur résistance antifongique et insecticide. Le renforcement des activités antifongiques est montré chez des plantes exprimant des chitinases recombinantes d'origine bactérienne (Carstens et al., 2003 ; Itho et al., 2003) et fongique (Emani et al., 2003 ; Lorito, 1998 ; Terakakawa et al., 1997).

Le gène codant pour l'endochitinase chit-42 est exprimé de manière constitutive dans les plants de tabac, de tomate, de pomme et d'autres espèces. En effet chez le tabac transgénique, le gène chit-42 maintient son activité antifongique accumulée de manière extracellulaire dans les feuilles, les racines, les tiges, et les fleurs. Il n'affecte pas l'interaction de la plante avec les champignons mycorhiziques (Lorito, 1998 ; Rousseau et al., 1996). L'endochitinase peut agir en synergie avec les PR-proteines des plantes (Lorito et al., 1996 c), pour inhiber la pénétration des champignons, et libérer les oligomères qui élicitent les défenses des plantes (Lorito, 1998). Par conséquent les lignées transgéniques des plants de tabac, de pomme de terre et de pomme ont montré une augmentation de la résistance aux champignons aériens et telluriques tels que *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Rhizoctonia solani*, et *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (Lorito et al., 1996b, Lorito 1998).

Chapitre 2.
Identification morphologique des
isolats appartenant au genre *Trichoderma*

2.1 Introduction

L'utilisation d'un agent antagoniste en lutte biologique nécessite une identification très précise avant son application et sa commercialisation. Malheureusement des souches utilisées en biocontrôle sont déposées dans les banques génomiques avec des incertitudes dans l'identification (Hermosa et *al.*, 2000). Le genre *Trichoderma* avait été introduit à l'origine par Persoon en 1794, mais la taxonomie et l'identification de ses espèces est restée incertaine jusqu'à ces dernières années.

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et une sporulation abondante sur milieu de culture (Gams et Bissett, 1998). Il est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte de ses spores (Dubos, 1986). Ce genre est caractérisé par des conidiophores fortement ramifiés selon une structure pyramidale et se terminant par une ou plusieurs phialides. Ces dernières peuvent être cylindriques ou subglobuleuses, regroupées en masse ou en solitaire. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces ; les conidies globuleuses sont rares. Certaines espèces peuvent produire des chlamydospores globuleuses, qui sont intercalaires ou terminales (Samuels et *al.*, 2006). Le système de ramification du conidiophore est hautement variable et dans certains cas peut ressembler superficiellement au genre *Verticillium* et *Gliocladium*. (Gams et Bissett, 1998).

Au départ, la taxonomie de ce genre était basée en grande partie sur les caractères morphologiques et les résultats les plus importants ont été publiés par Rifai (1969) et Bissett (1984, 1991a 1991b, et 1991c). La première tentative de subdiviser le genre *Trichoderma* a été réalisée par Rifai (1969) qui a subdivisé le genre *Trichoderma* en 9 espèces agrégats, tout en reconnaissant que les dernières espèces qu'il a décrit ne sont pas vraiment des espèces biologiques. Cet auteur a bien reconnu que chaque espèce agrégat est hétérogène et comprend plus qu'une espèce biologique, car il n'était pas possible de définir les limites des espèces biologiques individualisées.

Les neuf espèces agrégats décrites par Rifai (1969) sont :

1. *Trichoderma piluliferum* Webster et Rifai
2. *Trichoderma polysporum* (Link : Fr.) Rifai
3. *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain
4. *Trichoderma koningii* Oud

5. *Trichodema aureoviride* Rifai
6. *Trichoderma harzianum* Rifai
7. *Trichoderma longibrachiatum* Rifai
8. *Trichoderma pseudokoningii* Rifai
9. *Trichoderma viride* Pers.:Fr.

Dans ces travaux Bissett (1984, 1991 a b c) a inclus des souches préalablement étudiées par Rifai (1969), mais les deux auteurs ont abouti à des conclusions différentes à propos de l'identité des espèces chez le genre *Trichoderma*. Bissett (1991a) a essentiellement érigé les espèces de Rifai (1969) au rang de section, reconnu 5 sections et dans chaque section, a identifié de deux à plusieurs espèces (Fig.4).

Les sections *Trichoderma* décrites par Bissett (1991a), sont présentées ci-dessous :

Section *Trichoderma*

Les espèces de cette section ont des conidiophores étroits et flexueux avec des branches et des phialides de forme subulée (effilée, en forme d'alène) ou lagéniforme (en forme de bouteille, renflé à la base et restreint en col vers le sommet), peu nombreuses, fréquemment en paires, et possèdent rarement plus de trois éléments dans le verticille. Nous pouvons citer comme exemple les espèces suivantes: *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. viride* et *T. atroviride* P. Karst. Ces deux dernières espèces sont caractérisées par la production d'une odeur de noix de coco caractéristique de l'antibiotique volatil 6-pentyl- α -pyrone (Dodd et al., 2003).

Section *Longibrachiatum* Bissett

Caractérisée par des conidiophores peu ramifiés, ayant un grand nombre de phialides solitaires et disposées irrégulièrement, leur forme varie d'ampoule à lagéniforme ou cylindrique. Les espèces de cette section sont caractérisées par une croissance très rapide et la production d'un pigment jaune vert sur milieu PDA. Dans cette section on peut citer les deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. pseudokoningii*.

Section *Saturnisporum* Doi et al.

Les espèces de cette section possèdent un système de ramification similaire à celui de *T. viride* avec des ramifications et des phialides peu nombreuses et fréquemment en paires, mais avec des phialides gonflées et des pustules conidiennes comme ceux de la section *Pachybasium* ; elles se différencient par les ornements de leur conidies. Cette section a été proposée par Doi et al. (1987) comprenant les deux espèces *T. saturnisporum* Hamill et *T. ghanense* Doi, Abe et Sugiyama. Cependant, les travaux de Kuhls et al. (1997) et Turner et al. (1997) ont permis de classer ces deux espèces dans la section *Longibrachiatum*, en se basant sur le séquençage de la région (ITS1 et ITS2) de l'ADN ribosomal.

Section *Pachybasium* Sacc.

Cette section inclue des espèces possédant des conidiophores fortement ramifiés qui sont regroupés en fascicules ou en pustules compactes, et possédant des branches relativement courtes et trapues portant des phialides gonflées en verticilles denses. Nous pouvons citer comme exemple: *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. virens* Miller, Gidden et Foster.

La section *Hypocreanum* sect. nov.

Cette section accommode les *Trichoderma*, formes anamorphes des *Hypocrea* qui ont une conidiogénèse diffuse, des conidiophores faiblement branchés, et des phialides cylindriques à subulées. Les sections *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* ont été créés et décrits par Bissett (1984) et Doi et al. (1987) respectivement.

La forme téléomorphe des espèces de *Trichoderma* appartient à l'ordre des *Hypocreales*, au genre *Hypocrea*, mais certaines espèces de *Trichoderma* ont été rattachées au genre *Podostroma* P. Karst. et *Sarawakus* Boedijn. Depuis 1860 plusieurs espèces du genre *Hypocrea* ont été cultivées et leur anamorphe *Trichoderma* sont décrits (Samuels, 1996).

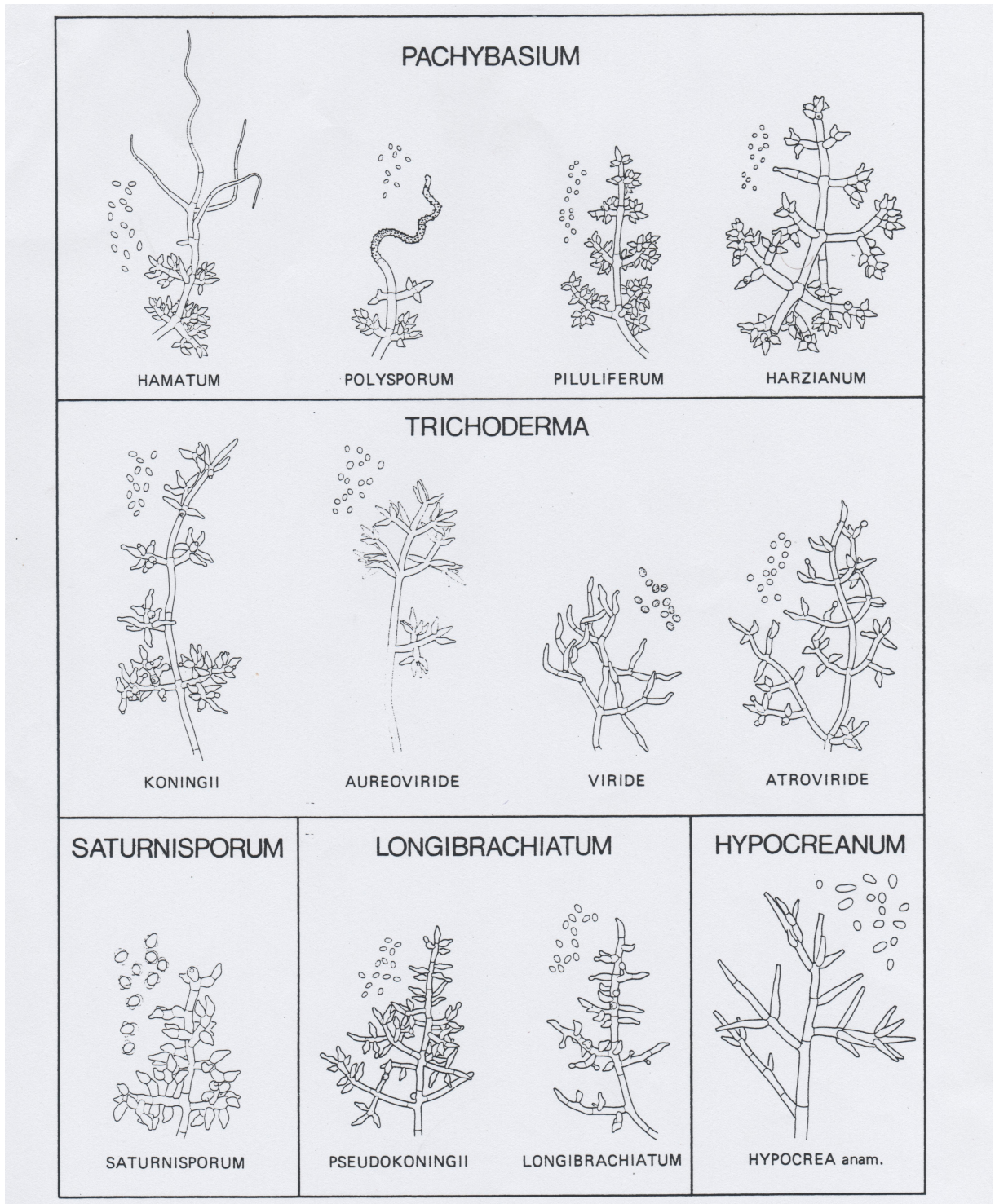


Figure 4. Illustration des cinq sections reconnus par Bissett (1991a).

Bissett (1991b) a rapporté que l'identification précise des espèces de *Trichoderma* spp. ne peut se faire sans intégrer les caractères morphologiques, l'analyse moléculaire et l'étude du cycle de vie du champignon (holomorphe). C'est pourquoi Samuels (1996) a conclu que la taxonomie basée uniquement sur les critères morphologiques chez le genre *Trichoderma* n'est pas suffisante.

Dans cette partie, nous avons procédé à un isolement des agents antagonistes du sol, de la rhizosphère des plants de pois chiche et de la semence du pois chiche, du blé et de la fève. Le sol utilisé pour les isollements provient de l'INA, de la station ITGC (Oued Smar) et de Bordj EL Bahri. Les isollements à partir de la rhizosphère des plants de pois chiche sont effectués à partir de plants provenant de l'INA et de la station l'ITGC (Oued Smar). La semence de pois chiche, du blé et de la fève utilisé pour les isollements provient de l'ITGC de Oued Smar.

L'identification est réalisée sur la base de la morphologie du conidiophore, de ses ramifications, et des phialides avec leur mode de groupement.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Isolement de l'agent antagoniste

2.2.1.1. A partir du sol

La technique utilisée est celle des suspensions de dilutions décrite par Rapilly (1968). Cette technique consiste à broyer 10g de terre préalablement séchée à 30°C dans un mortier stérile à sec, puis 90 ml d'eau distillée stérile sont ajoutées. La suspension est transvasée dans un Erlen qui est agité mécaniquement pendant 30 minutes. La suspension ainsi obtenue correspond à la dilution 1. De la dilution 1 sont prélevés 10 ml et ajoutés à 90 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 2, cette dernière est agitée. La même opération est répétée jusqu'à l'obtention de la dilution 8. L'ensemencement des flacons contenant 90 ml du milieu PDA est réalisé à l'aide d'une pipette stérile, en ajoutant 10 ml de la dilution choisie, à partir de la dilution 8 jusqu'à la dilution 1. Le milieu est coulé dans des boites de Pétri (5 boites/flacon). Ces boites sont incubées en chambre de culture à 22°C sous lumière continue. Après 4 à 5 jours d'incubation, les colonies sont repiquées à nouveau sur milieu PDA pour les identifier.

2.2.1.2. A partir de la semence

Après désinfection de la semence avec l'hypochlorite de sodium à 2 %, un lavage successif de la semence est réalisé dans trois bains d'eau distillée stérile. Ensuite la semence est séchée à l'aide de papier joseph stérile. Après séchage, la semence est déposée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, et mises à incuber à température ambiante du laboratoire (18-22°C) sous lumière continue.

2.2.1.3. A partir de la rhizosphère

L'isolement à partir de la rhizosphère est réalisé à partir de la terre qui se détache facilement des racines en les secouant modérément. Les isolements sont ainsi faits selon les techniques utilisées pour les analyses du sol précédemment décrites.

2.2.2. Identification des espèces d'isolats appartenant au genre *Trichoderma*

L'appartenance au genre *Trichoderma* est basée sur les caractéristiques culturales et morphologiques de ce genre déjà cité précédemment. Les observations microscopiques sont réalisées sur des cultures âgées de 7 jours incubées sous lumière continue à température ambiante.

L'identification morphologique des espèces de *Trichoderma* isolées est basée sur les caractéristiques morphologiques du conidiophore, de ses ramifications, la morphologie des phialides et leur mode de groupement tels que décrits par les travaux de Rifai (1969), Bissett (1984, 1991 a, b, c). La taille et la forme des conidies sont également prises en considérations. Ainsi, les mesures relatives à la taille des conidies sont réalisées sur 50 spores. La taille des conidies de la plupart des espèces est inférieure à 5 µm en longueur et en largeur ; les conidies peuvent être globuleuses, subglobuleuses, ellipsoïdes ou oblongues. Néanmoins l'identification des espèces chez le genre *Trichoderma* n'est pas facile à cause de la grande similitude qui peut exister entre les différentes espèces (Fig.4).

2.3. Résultats

18 isolats de *Trichoderma* spp. sont isolés du sol, de la semence (pois chiche, fève et blé), et de la rhizosphère du pois chiche. Les isolats sont doués d'une croissance rapide, et présentent un mycélium de couleur blanchâtre. Les spores sont initialement de couleur blanche et deviennent verdâtres avec l'âge ; elles sont produites en cercles concentriques chez

la plupart des isolats. L'observation microscopique montre que les isolats possèdent des conidiophores avec des ramifications en structure pyramidale et des phialides de forme allongée, cylindrique, ou gonflée. Ces caractéristiques correspondent à celle du genre *Trichoderma*, tels que décrits par Rifai (1969) ; Bissett (1984) et Bissett (1991a).

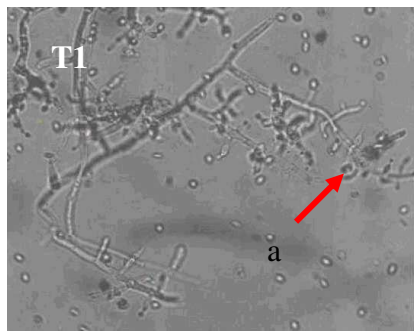
Sur le plan morphologique deux groupes se distinguent, le premier groupe formé de 10 isolats (T1,T2,T4,T5,T8,T9,T10,T11,T14 et T17) dont la morphologie du conidiophore, de ses ramifications, ainsi que la morphologie des phialides correspond à la section *Longibrachiatum*. Le conidiophore est peu ramifié, les phialides sont disposés de manière irrégulière en paire ou en solitaires, courte à longue et de forme qui est soit cylindrique allongée ou renflée à l'extrémité (Fig. 5). La morphologie du conidiophore et des phialides de ce groupe d'isolats peut être facilement confondu entre trois espèces de la section *Longibrachiatum* : *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride* Bissett et *T. pseudokoningii* (Fig. 2 et 4). Selon Bissett (1991a), les espèces dans la section *Longibrachiatum* peuvent être différenciées les unes des autres par la morphologie des phialides, et également par la taille et la forme des conidies.

Les phialides de l'espèce *T. longibrachiatum* sont solitaires ou en verticilles de 2 ou 3 généralement lagéniforme, légèrement étroites à la base, cylindriques ou légèrement gonflées près du centre. Les phialides terminales sont plus allongées et ne sont pas étroites à la base (Fig.2). Chez *T. citrinoviride*, les phialides sont relativement petites et distinctivement étroites à la base. La morphologie et les ramifications du conidiophore et des phialides de *T. pseudokoningii* sont difficilement distinguables de celles du *T. citrinoviride*. Néanmoins, nous avons constaté que basée sur la morphologie des phialides, il nous est difficile de distinguer l'espèce.

Concernant la morphologie et la taille des conidies, la majorité des isolats du premier groupe ont présenté des conidies à paroi lisse, et dont la forme varie du type ellipsoïde à cylindrique, à l'exception de l'isolat T4, qui a présenté des conidies globuleuses. La forme ellipsoïde à cylindrique, peut correspondre à celle des trois espèces citées précédemment à savoir *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride* et *T. pseudokoningii*. La différence entre la majorité des isolats réside dans la taille des conidies. Les isolats TL.1 (2,6-5,2 x 1.3-3,9 µm), TL.2 (2,6-5.2 x 1,3-2,6 µm), et TL.5 (2,6-5,2 x 1.3-2,6 µm) ont présenté des intervalles de mesures qui chevauchent avec ceux des trois espèces de la section *Longibrachiatum* : *T. citrinoviride* *T. pseudokoningii*, et *T. longibrachiatum* tels que décrits par Bissett (1984, 1991a).

Bissett (1984) avait rapporté que *T. citrinoviride* produit des conidies ellipsoïdes à paroi lisse de dimensions 2,2-3,7 x 1,5-2,1 µm, avec une moyenne de 3,1 x 1,8 µm soit plus petite que les autres espèces de la section *Longibrachiatum*, et généralement inférieure à 3,5 x 2 µm. Les conidies de *T. pseudokoningii* sont cylindriques ou presque ellipsoïdes à paroi lisse, avec les dimensions 2,5- 4,5 x 1,7 -2,6 µm et une moyenne de 3,5 x 2 µm.

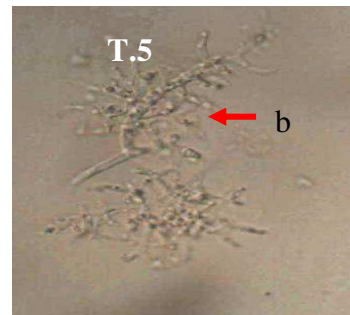
En revanche les conidies de *T. longibrachiatum* sont de taille plus grande à paroi lisse, de forme ovoïde à ellipsoïde, de dimensions 3,0- 3,4- 5,2 -6,6 x 2,3-3,5 µm, et 4,4 x 2,7 µm de moyenne. L'isolat T4 possède des conidies globuleuses dont l'intervalle de mesure est de 2,6-5,2 x 2,6-5,2 µm dépassant celui des deux espèces *T. citrinoviride* et *T. pseudokoningii*. Par contre la forme des conidies ne correspond pas à ceux des isolats de l'espèce *T. longibrachiatum* étudiés par Bissett (1984, 1991a). Le reste des isolats T8, T9, T10, T11, T14 et T17 produisent des conidies de grande taille, qui correspondent à l'intervalle de mesure de l'espèce *T. longibrachiatum* donnée par Bissett (1984, 1991a), mais la forme des conidies varie du type ellipsoïde à cylindrique, alors que celles décrites par l'auteur sont ovoïdes à ellipsoïdes (Tableau 1).



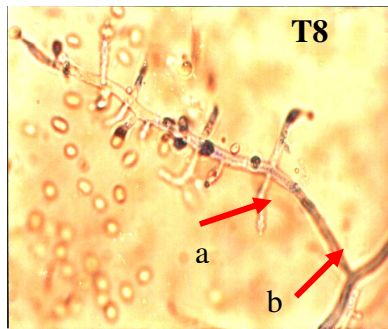
G : 3,2 x 25



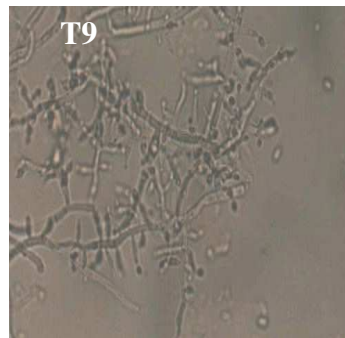
G : 3,2 x 25



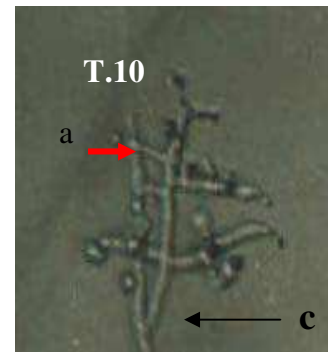
G: 3,2 x 25



G : 3,2 x 100



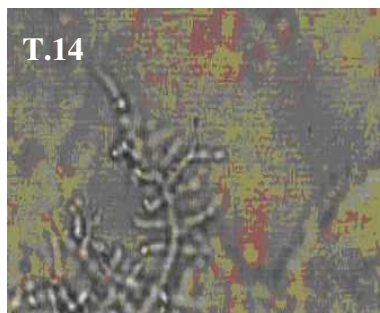
G : 3,2 x 25



G : 3,2 x 25



G : 3,2 x 25



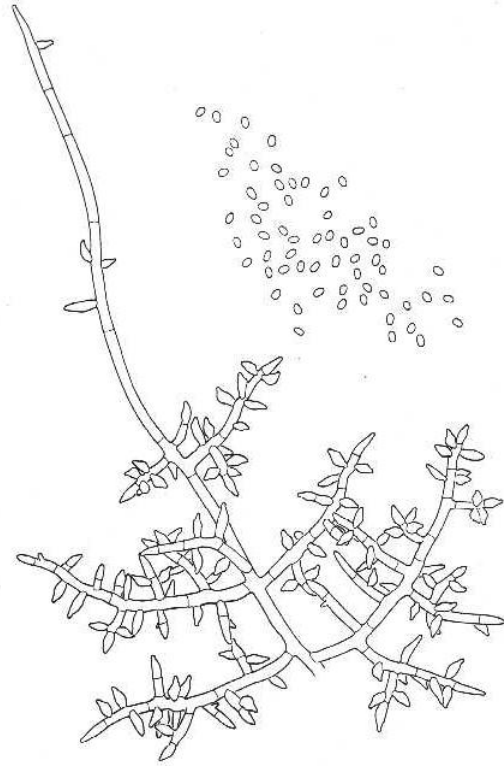
G : 3,2 x 25



G : 3,2 x 25

Figure 5. Aspect microscopique des isolats avec des conidiophores et phialides correspondant à la section *Longibrachiatum*

a : phialide
 b : conidiophore
 c : ramification du conidiophore.



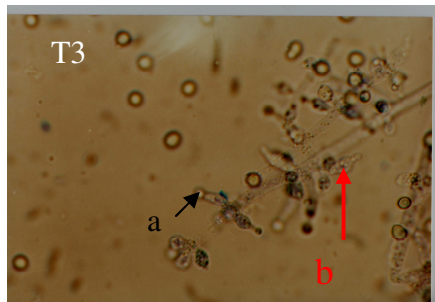
T. citrinoviride isolat DAOM 172792

Figure 6. Schéma montrant l'aspect microscopique de l'espèce *T. citrinoviride* (Bissett, 1984)

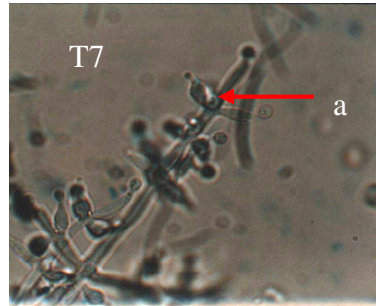
Le deuxième groupe constitué par les isolats (T3, T6, T7, T12, T13, T15, T16 et T18) est formé d'isolats dont les phialides gonflées sont disposées en paires ou en verticille correspondant à la section *Pachybasum*. Les isolats présentent des conidiophores étroits dont certains isolats (T6, T12, T15, T16 et T18) ont des branches courtes comparables à ceux de la section *Pachybasum*. Par contre les isolats T3, T7 et T13 présentent des conidiophores avec des branches longues comme ceux de la section *Trichoderma*. En revanche les phialides de la section *Trichoderma* varient de lagéniforme à subulée. Les caractères morphologiques de ces isolats peuvent facilement être confondus avec des espèces qui appartiennent à la section *Trichoderma*, telles que *T. atroviride* et *T. aureoviride* ou à la section *Pachybasum* telle que l'espèce *T. harzianum*. (Fig.4 et 7).

Les conidies du deuxième groupe d'isolats présentent toute une forme globuleuse et les mensurations les divisent en deux sous-groupes (Tableau 1). Le premier sous-groupe comprend les isolats T6, T12, T15, T16 et T18 présentant des dimensions variant de 2,6-3,9 x 2,6-3,9 μm , soit supérieur aux dimensions des conidies de *T. harzianum* et chevauchant avec l'intervalle de taille de *T. atroviride* décrit par Bissett (1991a, b). Cet intervalle, chevauche également avec celui rapporté par Lieckfeldt et al.(2001) pour les isolats de l'espèce *T. aureoviride*, cependant la forme des conidies diffère de celle décrite par les auteurs.

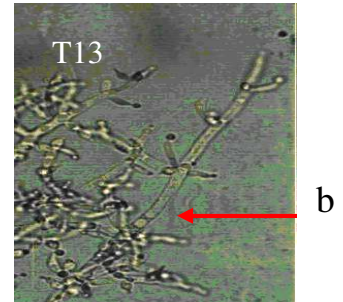
Le deuxième sous-groupe T3, T7 et T13 présente des conidies globuleuses avec un intervalle de taille variant de 3,9-5,2 x 3,9-5,2 μm , soit supérieur à celui rapporté par Bissett (1991a, b) pour *T. atroviride* et *T. harzianum*, et à celui de *T. aureoviride* rapporté par Lieckfeldt et al (2001). La forme de leurs conidies est globuleuse, et diffère de celles des cultures de *T. harzianum*, *T. atroviride*, et *T. aureoviride*. Par contre Samuels et al. (2007) ont décrit des conidies de forme globuleuse à subglobuleuse ou bien subglobuleuse à ovoïde pour les isolats appartenant aux espèces de *T. harzianum* et *T. atroviride*



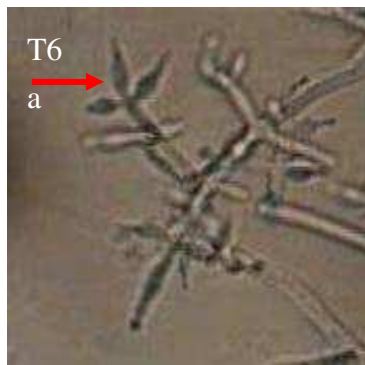
G : 3,2 x 100



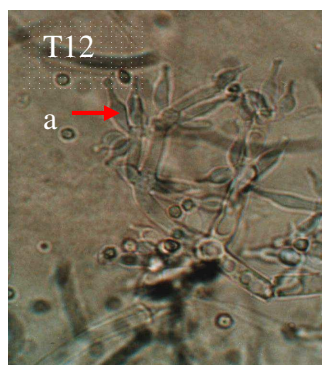
G : 3,2 x 100



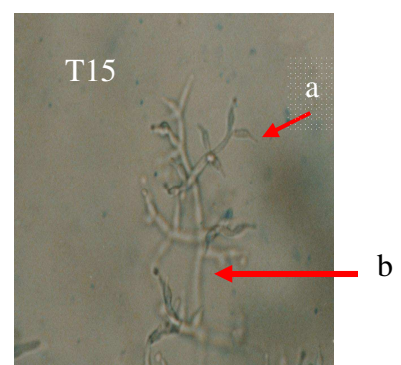
G : 3,2 x 100



G : 3,2 x 100



G: 3,2 x 100



G: 3,2 x 25

Figure 7. Morphologie des isolats de *Trichoderma* spp. avec des conidiophores et des phialides correspondant aux sections *Trichoderma* et *Pachybasum*

a : phialide
b : conidiohore

Tableau 1. Intervalle des dimensions et formes des conidies des isolats de *Trichoderma* spp.

Isolats	Intervalle de mesures (µm)	Forme des conidies
Groupe 1		
T.1	2,6-5,2 x 1,3-3,9	ellipsoïde à cylindrique
T.2	2,6-5,2 x 1,3-2,6	ellipsoïde à cylindrique
T.4	2,6-5,2 x 2,6-5,2	globuleuse
T.5	2,6-5,2 x 1,3-2,6	ellipsoïde à cylindrique
T.8	3,9-5,2 x 2,6-3,9	ellipsoïde à cylindrique
T.9	3,9-5,2 x 2,6-3,9	ellipsoïde cylindrique
T.10	3,9-5,2 x 2,6-3,9	ellipsoïde a cylindrique
T.11	3,9-5,2 x 2,6-3,5	ellipsoïde a cylindrique
T.14	3,9-6,5 x 2,6-3,9	ellipsoïde à cylindrique
T.17	3,9-6,5 x 2,6-3,9	ellipsoïde à cylindrique
Groupe 2		
Sous groupe 1		
	2,6-3,9 x 2,6-3,9	globuleuse
T.6	2,6-3,9 x 2,6-3,9	globuleuse
T.12	2,6-3,9 x 2,6-3,9	globuleuse
T.15	2,6-3,9 x 2,6-3,9	globuleuse
T.16	2,6-3,9 x 2,6-3,9	globuleuse
T.18		
Sous groupe 2		
T.3	3,9-5,2 x 3,9-5,2	globuleuse
T.7	3,9-5,2 x 3,9-5,2	globuleuse
T.13	3,9-5,2 x 3,9-5,2	globuleuse

Basée uniquement sur les caractères morphologiques, l'identification des espèces chez le genre *Trichoderma* est très délicate et reste ainsi incertaine dans certains cas.

2.4. Discussion

A cause de la difficulté dans la description des caractères morphologiques chez les *Trichoderma*, l'identification basée uniquement sur la morphologie des espèces n'est pas suffisante. En effet, des confusions peuvent être faites entre les espèces lorsque des critères uniquement morphologiques sont considérés dans la taxonomie des *Trichoderma* (Lieckfeldt et al., 2001).

Dans notre collection, chez le premier groupe d'isolats, la description générale du conidiophore, ses ramifications ainsi que la disposition des phialides correspond bien à la section *Longibachiatum*. Néanmoins à l'intérieur de la section *Longibrachaitum*, basée sur la morphologie des phialides, il est très délicat de distinguer entre les espèces *T.*

longibrachiatum, *T. citrinoviride* et *T. pseudokoningii*, en particulier entre les deux dernières (Bissett, 1991a). Des variations sont constatées dans la forme et la taille des conidies. L'isolat T4 présente des conidies globuleuses, alors que les isolats T1, T2, T5 présentent des conidies ellipsoïdes à cylindriques avec des intervalles de taille qui chevauchent avec ceux des trois espèces, rendant ainsi l'identification délicate. Le reste des isolats ayant une morphologie du conidiophore et des phialides correspondant à la section *Longibrachiatum*, les isolats T8, T9, T10, T11, T14 et T17 présentent des conidies de grandes tailles qui correspondent à l'intervalle de taille de l'espèce *T. longibrachiatum* décrite par Bissett (1984, 1991a), mais la forme des conidies varie légèrement par rapport à ceux décrit par le même l'auteur. Les cultures étudiées par Bissett (1991a) présentaient des conidies ovales à ellipsoïdes, alors que celles de nos isolats sont ovales à cylindriques. Ainsi l'appartenance de ces derniers isolats à l'espèce *T. longibrachiatum* est à vérifier par des analyses complémentaires.

Chez le deuxième groupe d'isolats, nous avons constaté que la morphologie du conidiophore, ses ramifications, ainsi que celle des phialides et leur disposition peut prêter à des confusions entre des espèces de la section *Pachybasum* ou *Trichoderma*. Leur morphologie peut correspondre aux espèces de *T. atroviride* et *T. aureoviride* de la section *Trichoderma* ou bien même à l'espèce *T. harzianum* de la section *Pachybasum*. Tous les isolats de ce groupe présentent des conidies globuleuses. Les mensurations des conidies subdivisent le groupe en deux sous groupes. Le premier présente des conidies de taille qui varie entre 2,6-3,9 x 2,6-3,9 µm et le deuxième de 3,9-5,2 x 3,9-5,2 µm. Les mensurations des conidies pour les deux sous groupes sont supérieures à ceux décrits par les auteurs concernant *T. harzianum*. Ceux du premier sous groupe chevauchent avec les intervalles de taille de *T. atroviride* (Bissett, 1991b) et *T. aureoviride* (Lieckfeldt et al 2001). Néanmoins la forme des conidies diffère légèrement de celle des isolats étudiés par les auteurs et décrite pour les deux espèces.

La forme des conidies décrite par Samuels et al. (2007) pour les espèces de *Trichoderma* spp. varie légèrement de celle décrite par Bissett (1984, 1991a, 1991b). Selon Bissett (1991b), les conidies de *T. harzianum* sont de forme subglobuleuse à ovoïde ou ellipsoïde, et les conidies de *T. atroviride* sont plus au moins subglobuleuses. Selon Samuels et al. (2007), la forme des conidies des deux espèces de *T. harzianum* et *T. atroviride* varie de globuleuse à subglobuleuse ou de subglobuleuse à ovoïde, montrant ainsi qu'une variabilité de ce caractère (forme des conidies) peut exister à l'intérieur de la même espèce de *Trichoderma* spp.

En effet, des cultures d'isolats appartenant à la même espèce peuvent présenter certaines petites variations concernant les caractères morphologiques tels que observés par Bissett

(1991a) chez les isolats de *T. viride* et *T. koningii* à propos de la morphologie du conidiophore et des phialides.

Selon Druzhinina et Kubicek (2005), l'identité de 50% des espèces de *Trichoderma* spp. déposées dans les collections de cultures, et dont l'identification est basée uniquement sur les caractères morphologiques, est incorrecte. Dans ce contexte, plusieurs exemples peuvent être cités tels que celui de l'espèce *T. atroviride* qui a longuement été confondu dans la littérature avec l'espèce *T. harzianum*. *T. harzianum* a également été confondu avec *T. aureoviride*, et beaucoup d'isolats de *T. aureoviride* ont été renommés comme *T. harzianum* (Lieckfeldt et al., 2001).

2.5. Conclusion

Basée uniquement sur les caractères morphologiques tels que, l'aspect des colonies, la morphologie du conidiophore, ses ramifications, ainsi que la morphologie des phialides et leur mode de groupements, l'identification des espèces chez le genre *Trichoderma* est problématique. Il est difficile de trancher, car ces caractères peuvent présenter de grandes variations à l'intérieur de la même espèce. L'identification de l'espèce avec précision nécessite des analyses complémentaires. Néanmoins, et malgré leur grande plasticité, ces critères morphologiques restent toujours à la base de toute identification.

Chapitre 3.
Identification moléculaire des isolat de
Trichoderma spp.

3.1. Introduction

L'analyse de l'ADN génomique dans les études de la taxonomie des *Trichoderma* a été initiée à partir des années 1990, ce qui a permis la révision de plusieurs taxa du genre *Trichoderma*. Plusieurs auteurs ont révisé la section *Longibrachiatum* Bissett (Kuhls et al., 1996 ; 1997 ; Samuels, 1996 ; Samuels et al., 1998 ; Turner et al., 1997). Ils ont combiné l'utilisation des marqueurs moléculaires notamment l'analyse des séquences ITS1 et ITS2, RAPD, avec les analyses biochimiques (isoenzymes), les caractères phénotypiques, et ont intégré pour la première fois l'analyse des téléomorphes de la section *Longibrachiatum*. Comme résultats, la section *Longibrachiatum* est reconnue comme monophylétique, avec la description de 10 taxa (Fig. 8).

En particulier l'analyse des séquences ITS-1 et ITS-2 a été utilisée dans l'identification moléculaire des *Trichoderma* spp. Néanmoins pour certains taxa, la comparaison des séquences ITS est restée insuffisante. En effet, les deux espèces *T. crassum* (Bissett) et *T. longipile* (Bissett) présentent des séquences ITS identiques. Pourtant ces deux espèces peuvent facilement être distinguées morphologiquement (Bissett, 1991b ; Chaverri et al., 2003). Les trois taxa *T. viride*, *T. koningii* et *T. atroviride* P. Karsten sont indistinguables par leur ITS. Par contre l'analyse des séquences d'une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation EF-1 α permet de distinguer les espèces *T. viride* et *T. koningii*. De ce fait l'analyse des séquences EF-1 α est considérée comme une approche complémentaire à l'identification par les ITS (Druzhinina et Kubicek, 2005).

Grâce à l'utilisation des outils moléculaires, la taxonomie de ce genre a été révisée, et de nouvelles espèces sont reconnues. Ainsi, sept espèces appartenant au genre *Trichoderma* sont identifiées par Bissett et al. (2003) en Asie (Sibérie, Népal, Nord de l'Inde, Taiwan, Cambodge et la Malaisie). Les descriptions sont basées sur des caractères morphologiques et physiologiques, mais aussi sur la position phylogénétique établie à partir de l'analyse en parcimonie des séquences de nucléotides de l'ADNr (ITS-1 et ITS-2) et des séquences partielles du facteur d'élongation de la traduction (EF- 1 α).

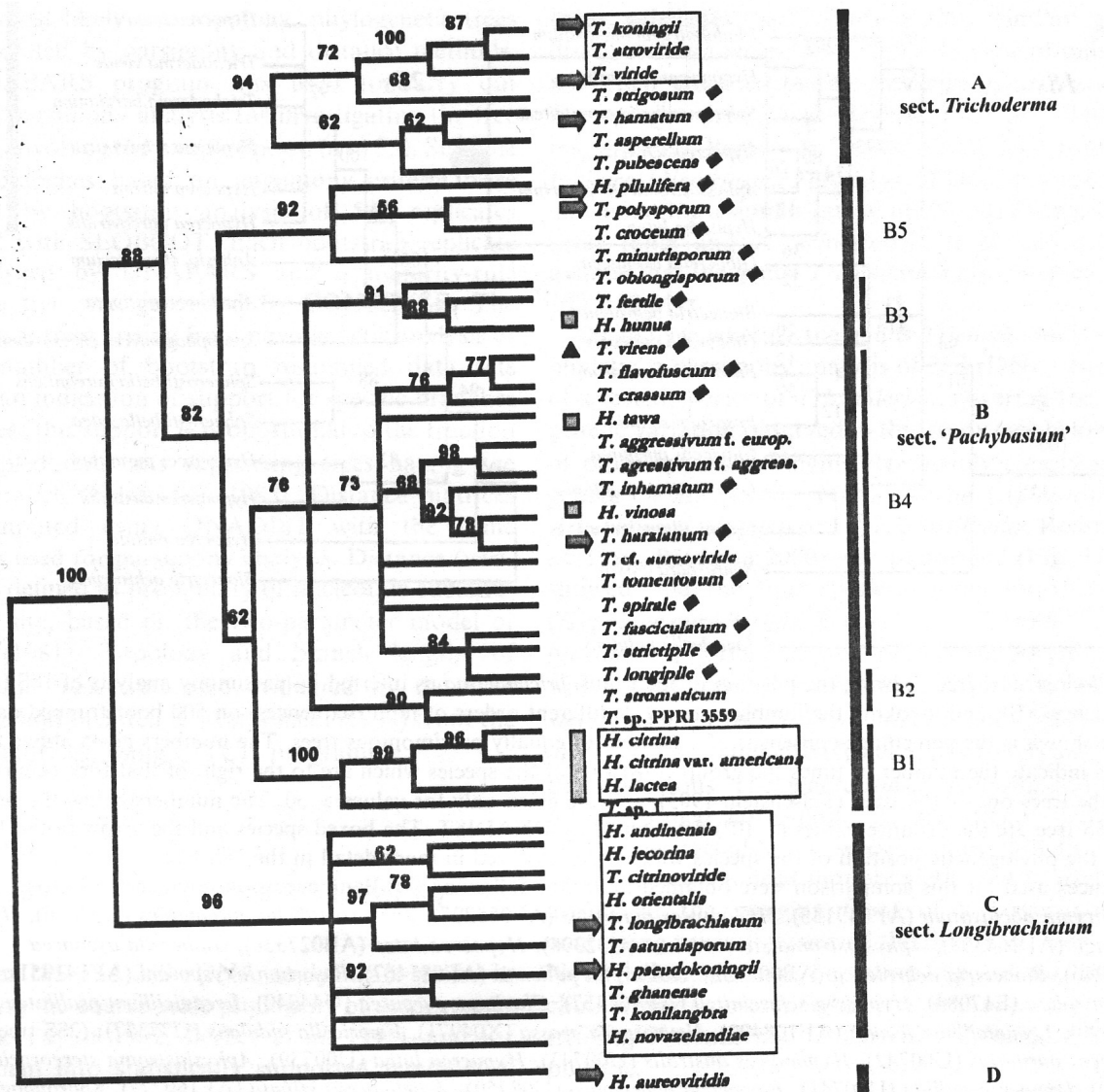


Figure 8. Arbre phylogénétique de 47 espèces de *Trichoderma* obtenu par analyse des séquences ITS-1, ITS-2, 28S, mit SSU DNA, tef1 et ech42 (Kullnig-Gradinger et al., 2002).

Samuels *et al.* (2006) ont décrit deux nouvelles espèces de *Trichoderma* isolées en Amérique du Sud à partir d'arbre de cacao ; *T. theobromicola* Samuels et Evans est isolé en Amazonie (Perou) et *T. paucisporum* Samuels, Suarez et Solis en Equateur. Ces deux espèces sont morphologiquement différentes, mais les analyses des séquences de gènes de la région ITS (ITS-1, 5.8S et ITS2), du gène EF-1 α , du gène actine (*act*), et une partie du gène calmodulin (*cal*) montrent qu'ils sont phylogénétiquement très proches, et se rapprochent des espèces de *Trichoderma* appartenant à la section *Pachybasum*.

Tenant compte de la difficulté taxonomique de certaines espèces de *Trichoderma*, et afin de lever l'ambiguïté sur l'identification morphologique de nos isolats, nous avons réalisé un séquençage du gène de la région ITS et une partie du gène des facteurs d'élongation de la traduction EF-1 α . Les séquences obtenues sont comparées aux séquences des banques génomiques NCBI. La diversité génétique et la recherche de marqueur moléculaire chez les espèces de *Trichoderma* est également étudiée par RAPD.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel fongique

Le matériel fongique utilisé est constitué par les 18 isolats de *Trichoderma* spp. précédemment décrits (Tableau 2)

3.2.2. Extraction de l'ADN

La technique DNeasy Plant Mini KIT (Qiagen, GmbH, Germany) est utilisée pour l'extraction de l'ADN, selon les instructions du fabricant. Le mycélium est obtenu par culture du champignon sur le milieu malt en bouillon (2%) à 25°C sous agitation continue pendant trois jours ; ce mycélium est récupéré par centrifugation à 3500 rpm à 4°C pendant 15 min.

Trois tampons sont utilisés successivement, un tampon de lavage AP1 (contient de la guanidine hydrochloride), un tampon de lavage AP2 (contient de l'acide acétique), et un tampon fixateur de l'ADN AP3. Le mycélium obtenu subit les différentes étapes d'extraction qui sont présentées en annexe 1

3.2.3. Séquençage de la région ITS (ITS-1, ITS-2 et 5,8S)

3.2.3.1. Amplification par PCR

Deux amorces, amorce 1 : NS7 (GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC) et l'amorce 2 : ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) sont utilisées pour amplifier la portion de l'ADN ribosomal qui comprend la séquence ITS1, ITS2 et 5,8S (Fig.9), selon le protocole adopté par le laboratoire de biologie moléculaire de la MUCL.

L'amplification est réalisée dans un volume final de 50 µl constitué de 40 µl de la solution mix [28,5 µl de H₂O, 5 µl de Tampon (100 mM Tris-HCl (pH : 8,3), KCl (500 mM), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de l'amorce1 (10 µM), 1 µl de l'amorce 2 (10 µM), 0.5 µl de Taq polymérase (5U/µl)], et 10 µl de l'ADN (10 ng/µl) dans un thermocycleur de type Master cycler Biometra.

Les échantillons sont soumis à une dénaturation initiale pendant 3 min à 94°C, suivi de 30 cycles dont chaque cycle subit une dénaturation à 94°C pendant 1,5 min, une hybridation à 55°C pendant 1,5 min, une élongation à 72°C pendant 2min, et une extension finale à 72°C pendant 10 min. L'amplification dure au total 3h 27min.

La séparation des fragments de l'ADN amplifié se fait par migration des amplifiats sur un gel d'agarose à 1 %, contenant du bromure d'éthidium (1,5 µg/ml 1XTAE). Pour les échantillons, 5 µl du tampon de charge 1X (0,25 % de Bromophénol, 0,25 % de xylène cyanol, 40 % de sucrose) sont rajoutés à 5 µl des produits de la PCR et déposés dans chaque puit. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le « Fast ruler DNA ladder Middle Range » (0,1–5 kb). La migration est réalisée sous un voltage de 100 volts (200 mA) pendant 18 min.

Après la lecture des résultats de la migration sur gel d'agarose par visualisation au trans-illuminateur à UV, la purification des produits de la PCR est réalisée par le Kit Qiagen (Annexe 1)

3.2.3.2. Séquençage des produits de l'amplification

Le principe repose sur une réaction de polymérisation enzymatique par une ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer dans un milieu réactionnel où se trouvent des desoxynucleotides triphosphates (dNTP) en grand nombre, et une faible proportion de didesoxynucleotides triphosphates (ddNTP). A un moment

totalemment aléatoire, un ddNTP sera incorporé à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase.

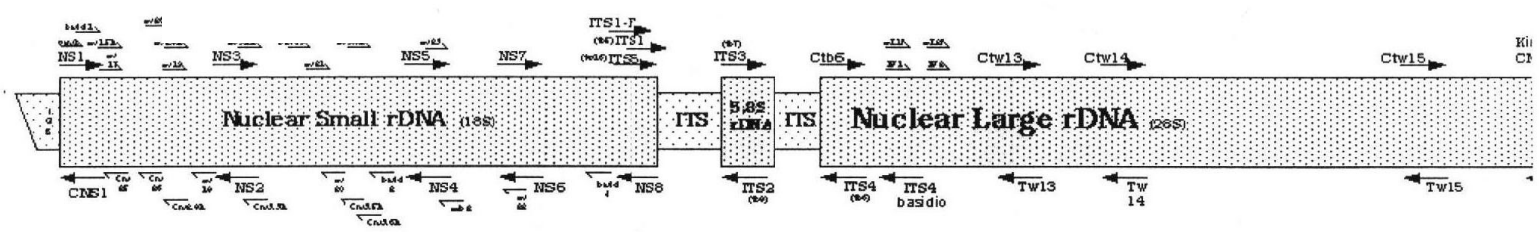


Figure 9. Structure schématique des gènes codants pour les ARN ribosomiques
 (source : www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm)

Cette synthèse s'arrêtera donc à cet endroit, les ddNTP sont des dNTP auxquels le groupement OH en position 3' est éliminé. De ce fait aucun autre nucléotide ne peut incorporer la chaîne d'ADN puisque les ponts 3'-5'-phospho diester ne peuvent pas se former. L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné (Sanger et *al.*, 1977). Trois amorces synthétiques ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC), ITS3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) sont utilisées pour séquencer les fragments ITS1, ITS2 et 5,8S.

Les échantillons à séquencer sont déposés dans une microplaque de 96 puits, et pour chaque isolat, 3 amorces sont utilisées (une amorce par puit, et chaque amorce va servir pour initier le séquençage d'une partie de la région ITS). Trois séquences vont être obtenues, et assemblées grâce au logiciel séquenceur en une seule séquence à la fin de l'opération.

L'opération de séquençage est réalisée dans un volume final de 20 µl, et comporte pour chaque échantillon : 3.5 µl de l'ADN cible, 1 µl de l'amorce (10 µM), 7.5 µl de H₂O, et 8 µl de la solution mix de séquençage. La solution mix contient du fluorochrome pour détecter les pics de l'ADN, des ddNTP, l'enzyme (Taq polymérase) et le tampon. Comme témoin l'ADN PUC 18 fourni avec le Kit Qiagen est composé de : 1 µl de l'ADN, 2 µl de l'amorce, 3,8 µl de H₂O et 8 µl de la solution mix de séquençage.

Après dépôt des échantillons, la microplaque est placée dans l'appareil PCR «PTC-200 MJ research» où la durée de l'amplification est de 3h 03 min. La réaction de séquençage se déroule en 30 cycles (96°C : 20 sec, 50°C : 20 sec et 60°C : 4 min), et se termine par un refroidissement à 4°C. A la fin de l'opération, la réaction de séquençage est arrêtée par l'utilisation d'une solution stop, et l'ADN précipité est purifié (Annexe 2).

3.2.3.3. Analyse automatique des séquences de l'ADN

La microplaque est placée dans la machine (Séquenceur capillaire 2000 XL Beckman Coulter ; un système d'analyse automatique des séquences d'ADN) pendant 15h, où sous l'action d'un haut voltage d'un champ électrique déterminé, l'électrophorèse capillaire permet la migration et la séparation des fragments d'acides nucléiques chargés au travers d'un capillaire. Ces fragments d'acides nucléiques sont marqués au préalable avec quatre

marqueurs spécifiques dont la fluorescence se situe dans la région rouge du spectre. Les fluorescences induites sont collectées par un photomultiplicateur. Le résultat est donné par le séquenceur sous forme de courbe présentant la fluorescence détectée. Chaque pic correspond à une base. Les données brutes sont ensuite analysées par le logiciel CEQ XL version 4.3. Le logiciel séquenceur permet de lier les différentes séquences amplifiées par les différentes amorces pour avoir une séquence unique. L'élimination des bases qui se situent en amont de la séquence ITS-1 est effectuée pour n'avoir que le début du gène. Une comparaison des séquences obtenues par rapport à celle de la banque génomique NCBI permet de déterminer l'espèce selon les séquences ITS.

3.2.4. Séquençage d'un fragment du gène codant pour les facteurs d'élongations

EF-1 α

3.2.4.1. L'amplification par PCR

Deux amorces EF-1T et EF-2T selon le protocole adopté par le laboratoire de biologie moléculaire de la MUCL sont utilisées pour amplifier le fragment EF-1 α du gène du facteur d'élongation de la traduction des protéines (Fig.10) (Druzhinina et Kubicek, 2005).

EF-1T : 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC 3' Forward

EF2-T : 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT 3' reverse.

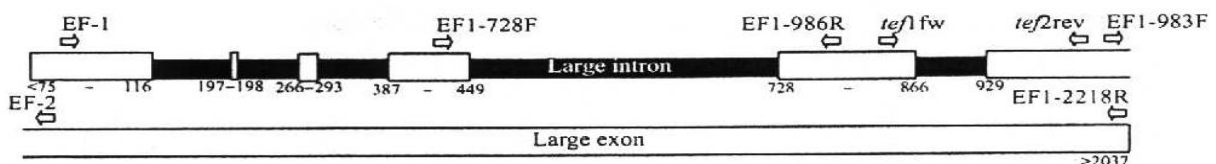


Figure 10. Structure schématique du gène EF-1 α de l'espèce *Hypocrea jecorina*, avec la localisation des amorces utilisées pour son amplification (Druzhinina et Kubicek, 2005).

L'amplification est réalisée dans un volume final de 50 μ l, où pour chaque échantillon à analyser, 10 μ l de l'ADN (10 ng/ μ l) sont rajoutés à 40 μ l de la solution mix comprenant [H₂O: 28,5 μ l, Tampon(100 mM Tris-HCl à pH : 8,3, KCl (500 mM): 5 μ l, MgCl₂ (25 mM) : 3 μ l, dNTP (10 mM) : 1 μ l, amorce1 (10 μ M): 1 μ l, amorce 2 (10 μ M) : 1 μ l, Taq polymérase (5 U/ μ l) : 0,5 μ l]

Le mélange réactionnel placé dans un thermocycleur est soumis à une dénaturation à 92°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles (92°C pendant 30 sec, 52°C pendant 30 sec et 72°C

pendant 1,5 min). Après amplification, la migration des échantillons se fait sur gel d'agarose à 1% (200V, 200 mA) pendant 18 min. La purification des produits de la PCR se fait comme décrit précédemment (Annexe 2).

3.2.4.2. Séquençage des produits de l'amplification

Deux amorces EF-1T et EF-2T sont utilisées pour initier le séquençage des produits purifiés dans chaque direction d'une partie du gène EF-1 α . Une microplaque de 96 puits est utilisée, et pour chaque isolat 2 amorces sont ainsi utilisées (une amorce par puit, chaque amorce va servir pour initier le séquençage d'une partie du gène) pour obtenir deux séquences qui vont être assemblées grâce au logiciel séquenceur en une seule séquence à la fin de l'opération.

Le séquençage se fait dans un volume final de 20 μ l, et comporte pour chaque échantillon: 3,5 μ l de l'ADN, 1 μ l de l'amorce (10 μ M), 7.5 μ l de H₂O, et 8 μ l de la solution mix de séquençage. La solution mix contient du fluorochrome pour détecter les Pic de l'ADN, des ddNTP, et l'enzyme (Taq polymérase et le tampon). Comme témoin l'ADN PUC 18 fourni avec le KIT Qiagen est composé de : 1 μ l de l'ADN, 2 μ l de l'amorce, 3,8 μ l de H₂O, et 8 μ l de la solution mix de séquençage. La réaction de séquençage se déroule en 30 cycles (96°C pendant 20 sec, 50°C pendant 20 sec et 60°C pendant 4 min), et se termine par un refroidissement à 4°C dans un appareil PCR «PTC-200 MJ Research».

L'arrêt de la réaction de séquençage, la précipitation, et le lavage de l'ADN sont réalisés comme décrit précédemment (Annexe 2). La microplaque est ensuite placée dans le séquenceur pour la séparation des fragments amplifiés et la lecture des séquences. Les séquences sont assemblées et corrigées, puis comparées à ceux de la banque génomique (NCBI).

3.2.5. Analyse phylogénétique

L'alignement des séquences est réalisé par le programme Clustal du logiciel MEGA 4, les arbres phylogénétiques sont obtenus par la méthode Neighbor-Joining (NJ) du logiciel MEGA 4. Les supports relatifs des groupes obtenus par NJ sont estimés par l'utilisation de 1000 répliquions de la procédure bootstrap

3.2.6. Utilisation de la RAPD dans la recherche de marqueurs moléculaires et l'étude de la diversité génétique des isolats de *Trichoderma* spp.

La caractérisation des isolats par RAPD est réalisée selon le protocole décrit par Williams et *al.* (1990). L'amplification est réalisée en utilisant 3 types d'amorces du Kit OPA: OPA-1 : (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA-10: (5'-GTGATCGCAG-3') OPA-17: (5'-GACCGCTTGT-3') et le minisatellite M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT3').

L'amplification de l'ADN des isolats de *Trichoderma* spp. par les amorces OPA est réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µl. Pour chaque isolat 4 µl de l'ADN (10 ng/µl) sont rajoutés à 21 µl de la solution mix qui est formée de: H₂O MilliQ stérile (14,2 µl), tampon (2,5 µl : 50 mM KCl 20 mM Tris HCl), MgCl₂ (0,8 µl : 1.5 mM), dNTP (0,5 µl : 0,2 mM), amorce (2,5 µl : 0,75 µg/ml), Taq (0,5 µl : 2,5U). L'amplification se déroule dans un thermocycleur (Perkin Elmer 480) où la première étape est une dénaturation à 94°C pendant 7 min, suivi par 45 cycles à (94°C pendant 1,5 min, 35°C pour 2 min, et 72°C pour 3 min), avec une extension finale à 72°C pour 7 min.

L'amplification avec l'amorce M13 est également réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µl. Ainsi 1,25 µl de l'ADN (10 ng/µl) sont rajoutés à 23,75 µl de la solution mix composée de : H₂O MilliQ (17,75 µl), Tampon (2,5µl : 50 mM KCl 20 mM Tris HCl), MgCl₂ (1,5 µl : 1,5 mM), dNTP (0,5 µl : 0,2 mM) M13 (1 µl : 15 µg/ml), Taq (0,5 µl : 2,5U). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Biometra HM-FING) dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 sec suivie de 35 cycles dont chaque cycle est composé de 20 sec à 94°C, 1min à 50°C, 20 sec à 72°C, avec une élongation finale à 72°C pendant 6 min.

Les produits de l'amplification sont séparés par migration sur gel d'agarose à 1,2 % contenant du bromure d'éthidium 30 µl (1,5 µg /ml 1XTAE). 20 µl des produits de la PCR + 5 µl (Tampon de charge : bleu Bromophénol) sont déposés dans les puits, parallèlement à 5 µl du marqueur DNA ladder mix Fermentas (0,1-10 kb). La migration est réalisée pendant 2h20 min sous un voltage de 60 V (200 mA). Après migration le gel est observé sous un trans-illuminateur à UV et photographié.

La distance génétique entre les isolats est évaluée par le coefficient de similarité de Jaccard à l'aide du logiciel Pcord version 4. La méthode « Average Linkage Method » est utilisée pour générer les dendrogrammes.

3.3. Résultats

3.3.1. Séquençage de la région ITS (ITS-1, 5,8S, ITS-2)

3.3.1.1. Amplification par PCR de la région ITS

L'amplification de la région ITS par les amorces ITS4 et NS7 a généré un fragment unique pour tous les isolats d'une taille de 850 pb environ (Fig.11).

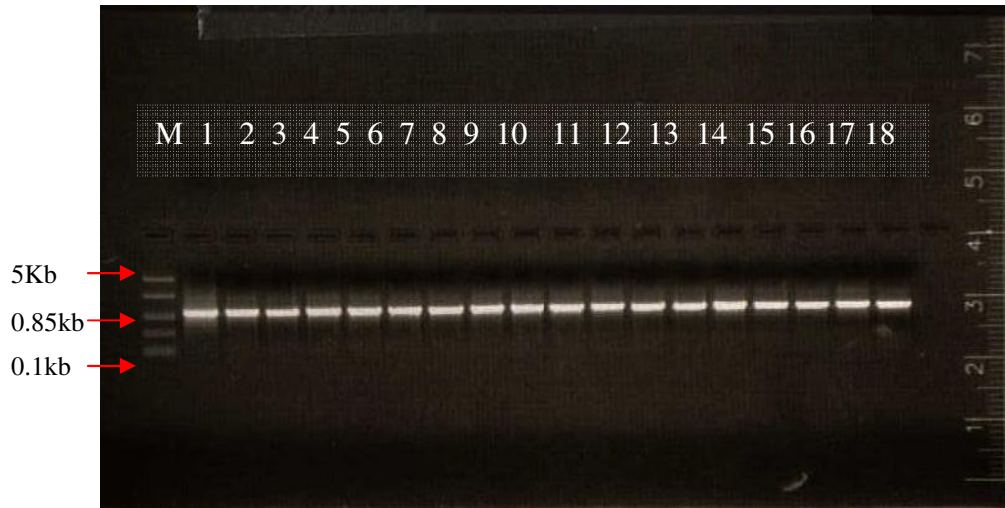


Figure 11. Amplification de la région ITS des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par les amorces NS-7 et ITS-4

3.3.1.2. Analyse des séquences

Le séquençage de la région ITS par l'utilisation des 3 amorces ITS-1, ITS-2 et ITS-3, puis l'assemblage de ces séquences à l'aide du logiciel séquenceur, et l'élimination de la partie en avant de la séquence ITS1 a permis d'obtenir une séquence unique qui représente la région ITS1-5.8S-ITS2 pour chaque isolat de *Trichoderma* spp.

La comparaison de ces séquences (Annexe 3) avec les séquences ITS de la banque génomique NCBI, a montré que les 10 isolats du premier groupe (T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14, et T17), ont présenté des séquences ITS identiques (100 % de similarité) avec 8 séquences ITS des isolats de *T. longibrachiatum* (Z48935, X93932, Z79625, Z9622, AJ230665, Z82911, Z82904, Z82902) et également identiques avec deux séquences de deux isolats de *Hypocrea shweinitzii* (Fr.) Sacc. (X93966 et X93965) téléomorphe de *T. citrinoviride* (*T. citrinoviride* appartient à la section *Longibrachiatum*, cette espèce génétiquement proche de *T. longibrachiatum*).

Il ressort de la comparaison des séquences du deuxième groupe d'isolats que pour le premier sous- groupe, les isolats T6, T15, et T16, ont présenté des séquences identiques avec ceux de la séquence de l'isolat *T. harzianum* (AF194011), de deux séquences de *T.*

aureoviride Rifai (AF194019 et AF194010), et deux séquences de *H. lixii* Pat. téléomorphe de *T. harzianum* (AY 605740 et 605727). Les deux isolats introduits comme étant *T. aureoviride* (AF194019 et AF194010) ont été réidentifiés comme *T. harzianum* (Lieckfield et al., 2001). L'isolat T12 a présenté une séquence identique à 100 % de similarité avec celle de *T.*

harzianum (AY154948) et avec celle de *Hypocrea lixii* (AF443927). L'isolat T18 a présenté une séquence ITS avec 99 % de similarité, se différenciant par une seule pb par rapport aux séquences de *T. harzianum* (AF194011), deux séquences *T. aureoviride* (AF194019 et AF194010), et une séquence *T. inhamatum* Veerkamp et Gams (AF 45550). Les isolats du deuxième sous groupe (T3, T7, et T13) ont présenté des séquences identiques (100 % de similarité) avec la séquence de l'isolat de *T. atroviride* EF417482, et 99 % de similarité avec les séquences des isolats de *T. atroviride* (AF278796, AF278795, AF278794, et Z48817).

L'arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences ITS des 18 isolats de *Trichoderma* spp. (Fig.12), et sur les analyses bootstrap pour 1000 réplifications, en considérant uniquement les valeurs supérieures à 50%, montrent la présence de deux principaux groupes. Le premier groupe est subdivisé en deux sous groupes, le premier sous groupe est supporté par une valeur bootstrap de 98%, comprend les isolats correspondant à la section *Longibrachiatum* selon la description morphologique (T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14, T17). Le deuxième sous groupe supporté par une valeur bootstrap de 75% est subdivisé à son tour en deux sous groupes où dans le premier est rangé l'isolat T12 alors que dans le deuxième supporté par une valeur bootstrap de 63% sont rangés les isolats T6, T15, T16 et T18. Le deuxième groupe d'isolat supporté par une valeur bootstrap de 99% renferme les isolats T3, T7 et T13.

L'arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences ITS, et montrant la position des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références est représenté au niveau de la figure 13. Les analyses bootstrap pour 1000 réplifications, en considérant uniquement les valeurs supérieures à 50%, montrent la présence de deux principaux groupes supportés par des valeurs bootstrap de 100%. Le premier groupe est subdivisé en deux sous groupes, le premier sous groupe est supporté par une valeur bootstrap de 100%, et renferme les 10 isolats correspondant à la section *Longibrachiatum* avec les isolats de l'espèce *T. longibrachiatum* : *T. longibrachiatum* BBA 702255 et *T. longibrachiatum* CIB T29. Dans le deuxième sous groupe sont rangés les isolats de l'espèce *T. harzianum* : *T. harzianum* AF194011 et

T. harzianum NR5555 ; ainsi que les isolats de *H. lixi* (téléomorphe de *T. harzianum*): *H. lixi* AF443927 et *H. lixi* CIBT 136. Les isolats T3, T7 et T13 sont rangés dans le deuxième groupe avec les isolats de *T. atroviride* : *T. atroviride* DAOM 233966, et *T. atroviride* Z 48817, et son téléomorphe *H. atroviridis* : *H. atroviridis* AF 456919 et *H. atroviride* G.J.S 91-87. Ce groupement est supporté par une valeur bootstrap de 100%.

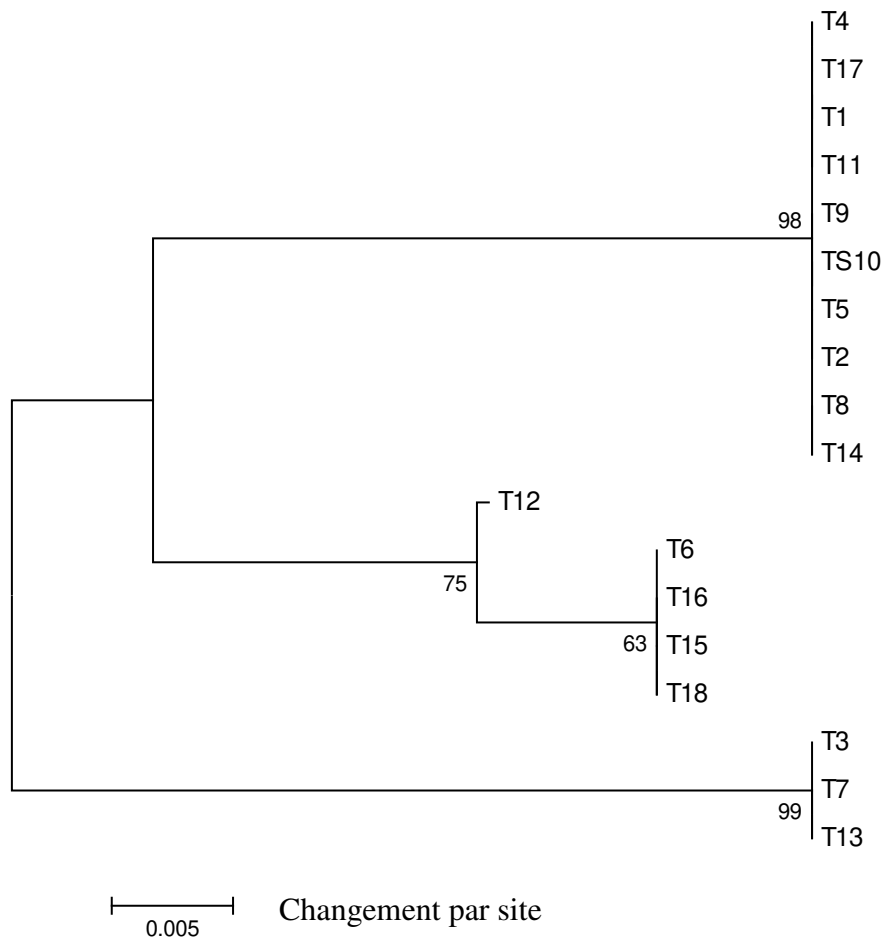


Figure 12 : Relation phylogénétique entre les 18 isolats de *Trichoderma* spp. résultant de l'analyse des séquences de l'ADNr (ITS1-5,8S-ITS2). L'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 4. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 réplifications bootstrap, et il donné uniquement pour les valeurs supérieures à 50%

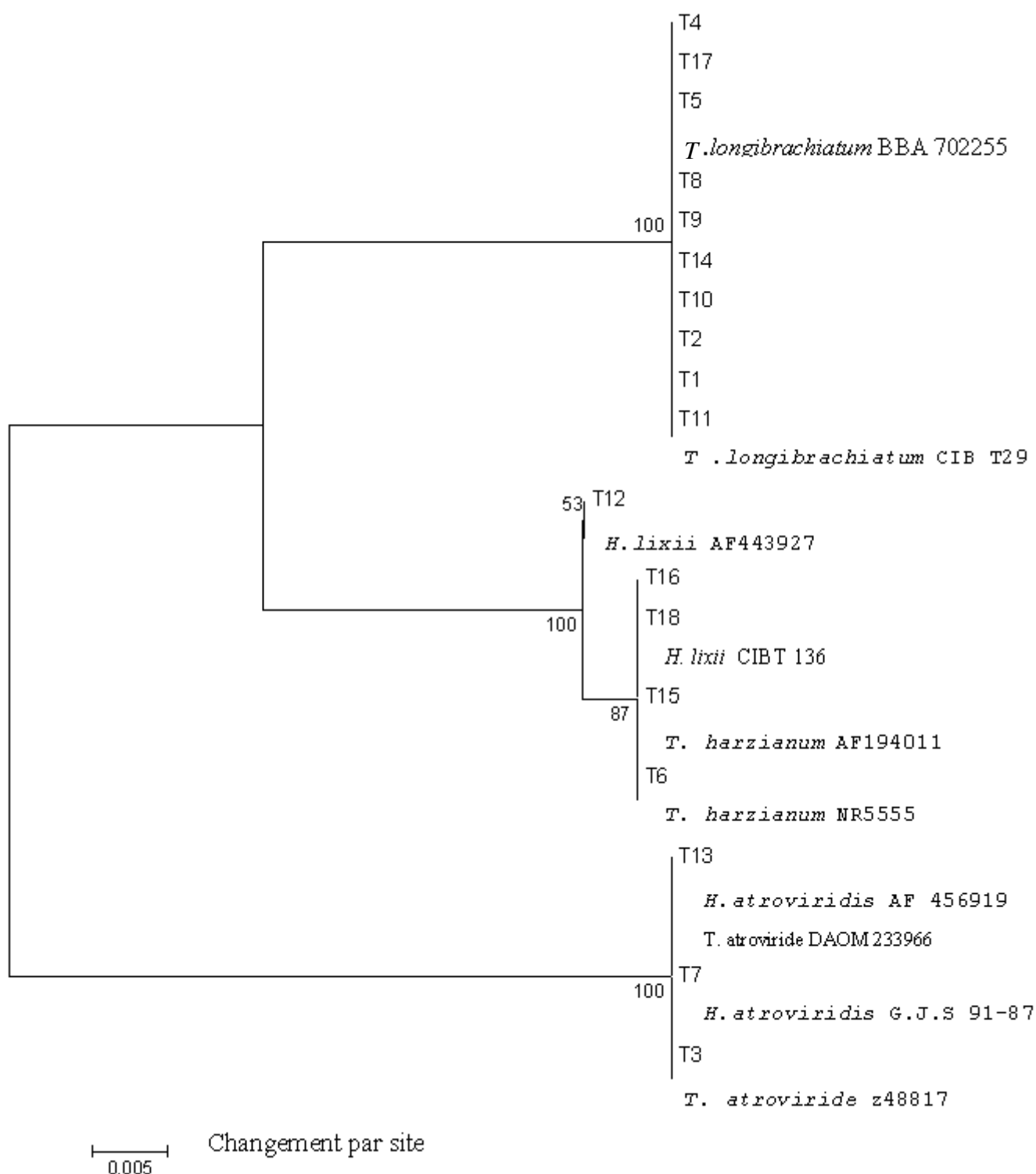


Figure 13 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences ITS, montrant la position des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références. L'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 4. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 répliquions bootstrap, et il donné uniquement pour les valeurs supérieures à 50%

3.3.2. Séquençage du gène EF-1 α

3.3.2.1. Amplification par PCR du gène EF-1 α

L'amplification du gène EF-1 α des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par les amorces EF-1T et EF-2T, a permis l'obtention d'un seul fragment d'environ 850 pb pour tous les isolats (Fig.14).

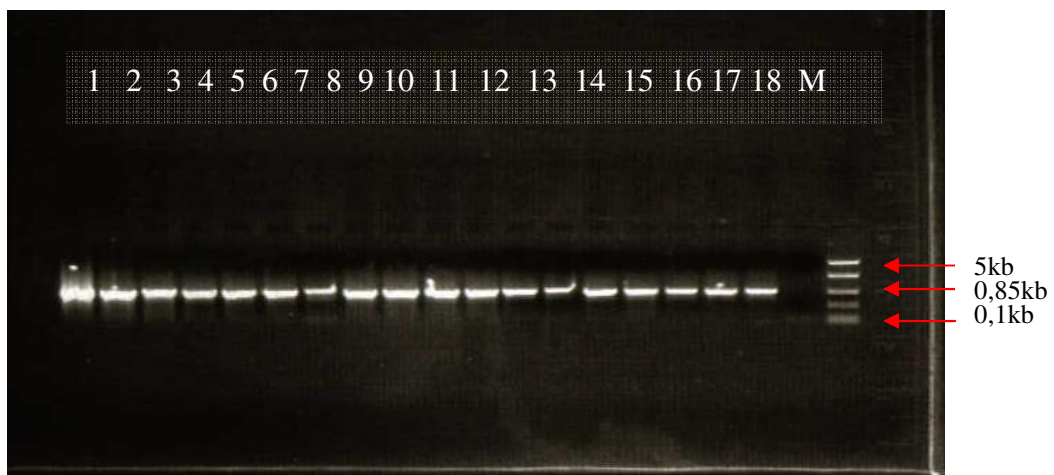


Figure 14. Amplification du gène EF-1 α des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par les amorces EF-1 et EF-2

3.3.2.2. Analyse des séquences

Le séquençage et l'assemblage des deux séquences par le logiciel SEQ a permis d'obtenir une seule séquence pour la partie du gène EF-1 α . La comparaison des séquences obtenues par rapport aux séquences de la banque génomique NCBI permet de relever les similitudes suivantes :

Pour les isolats du premier groupe (T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14 et T17) l'isolat T1 a présenté une séquence EF-1 α avec 100% de similarité avec celle de *T. longibrachiatum* (DQ125467) et 99 % avec celle de *T. longibrachiatum* (AY 865640). Les isolats (T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14, et T17) ont présenté une séquence EF-1 α avec 99 % de similarité avec les séquences de *T. longibrachiatum* (DQ125467, AY 865640) et 98 % de similarité avec *Hypocrea jecorina* Berk et Broome (DQ 025754).

La comparaison des séquences des isolats du deuxième groupe d'isolat (T3, T6, T7, T12, T13, T15, T16 et T18) a permis de montrer que pour le premier sous groupe (T6, T12, T15, T16 et T18), l'isolat T6 a présenté une séquence EF-1 α avec 98 % de similarité (le pourcentage le plus élevé) avec deux séquences de *Hypocrea lixii* (AY605783, AY605770) téléomorphe de *T. harzianum*. L'isolat T12 a présenté une séquence EF-1 α avec 99 % de similarité avec la séquence de *H. lixii* (AY60577) et 98 % avec la séquence *H. lixii* (AY 605788). Les isolats T15, T16, et T18 ont présenté une séquence EF-1 α avec 98 % de similarité (le pourcentage le plus élevé) avec deux séquences de *Hypocrea lixii* (AY605783 et AY605770). Les isolats T7 et T13 du deuxième sous groupe ont présenté des séquences EF- α avec 99 % de similarité avec les séquences *T. atroviride* (AF 348114, AF 456894, AF 456895, AF 456896) et les séquences *Hypocrea atroviridis* Dodd, Lieckfield et Samuels, téléomorphe de *T. atroviride* (AF 456882 et AF 456883).

L'arbre phylogénétique des 18 isolats de *Trichoderma* spp. basé sur l'analyse des séquences EF-1 α (Fig.15), et basée sur les analyses bootstrap pour 1000 répliques, en considérant uniquement les valeurs supérieures à 50%, montrent la présence de deux principaux groupes. Le premier groupe contient deux sous groupes supportés par des valeurs bootstrap de 100%. Le premier sous groupe renferme les isolats correspondant à la section *Longibrachiatum* alors que le deuxième sous groupe comprend les isolats (T6, T12, T15, T16 et T18). Le deuxième groupe est supporté par des valeurs bootstrap de 100% et renferme les isolats T7 et T13.

L'arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences EF-1 α , et montrant la position des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références est représenté au niveau de la figure 16. Les analyses bootstrap pour 1000 répliques, en considérant uniquement les valeurs supérieures à 50%, montrent la présence de deux principaux groupes supportés par des valeurs bootstrap de 99%. Le premier groupe est subdivisé à son tour en deux sous groupes supportés par des valeurs bootstrap de 99%. Dans le premier sous groupe sont rangés les dix isolats correspondants à la section *Longibrachiatum* avec deux isolats de *T. longibrachiatum* : *T. longibrachiatum* DQ125467 et *T. longibrachiatum* ATCC18648, alors que dans le deuxième sous groupe sont rangés les isolats de *T. harzianum* : *T. harzianum* 6950 et *T. harzianum* NR 6883 et son téléomorphe *H. lixii* : *H. lixii* G.J.S 90-22 *H. lixii* AY 605783 avec les cinq isolats (T6, T12, T15, T16 et T18). Le deuxième groupe comprend les isolats de l'espèce *T. atroviride* : *T. atroviride* G.J.S 90-134, *T. atroviride* AF 348114 et son

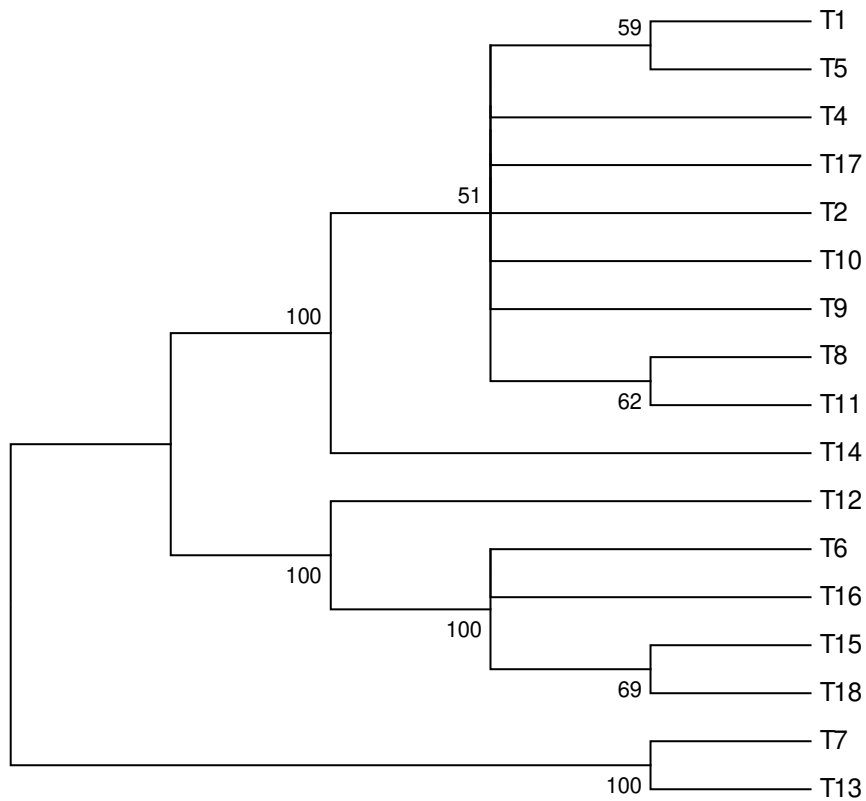
téléomorphe *H. atroviridis* : *H. atroviridis* AF 456882 avec les isolats T7 et T13. Ce groupement est supporté par une valeur bootstrap de 99%

En considérant l'ensemble des caractères de similarité des séquences EF-1 α et ITS, la position phylogénétique des 18 isolats de *Trichoderma* spp. basés sur l'analyse des ITS et du gène EF-1 α par rapport aux isolats de références et des caractères morphologiques, nous pouvons avancer que :

Les isolats T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14 et T17 appartiennent à l'espèce *T. longibrachiatum*

Les isolats T6, T12, T15, T16 et T18 appartiennent à l'espèce *T. harzianum*

Les isolats T3, T7 et T13 appartiennent à l'espèce *T. atroviride*



0.005 Changement par site

Figure 15: Relation phylogénétique entre les 18 isolats de *Trichoderma* spp. résultant de l'analyse des séquences du gène EF-1 α . L'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 4. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 répliquions bootstrap, et il donné uniquement pour les valeurs supérieures à 50%

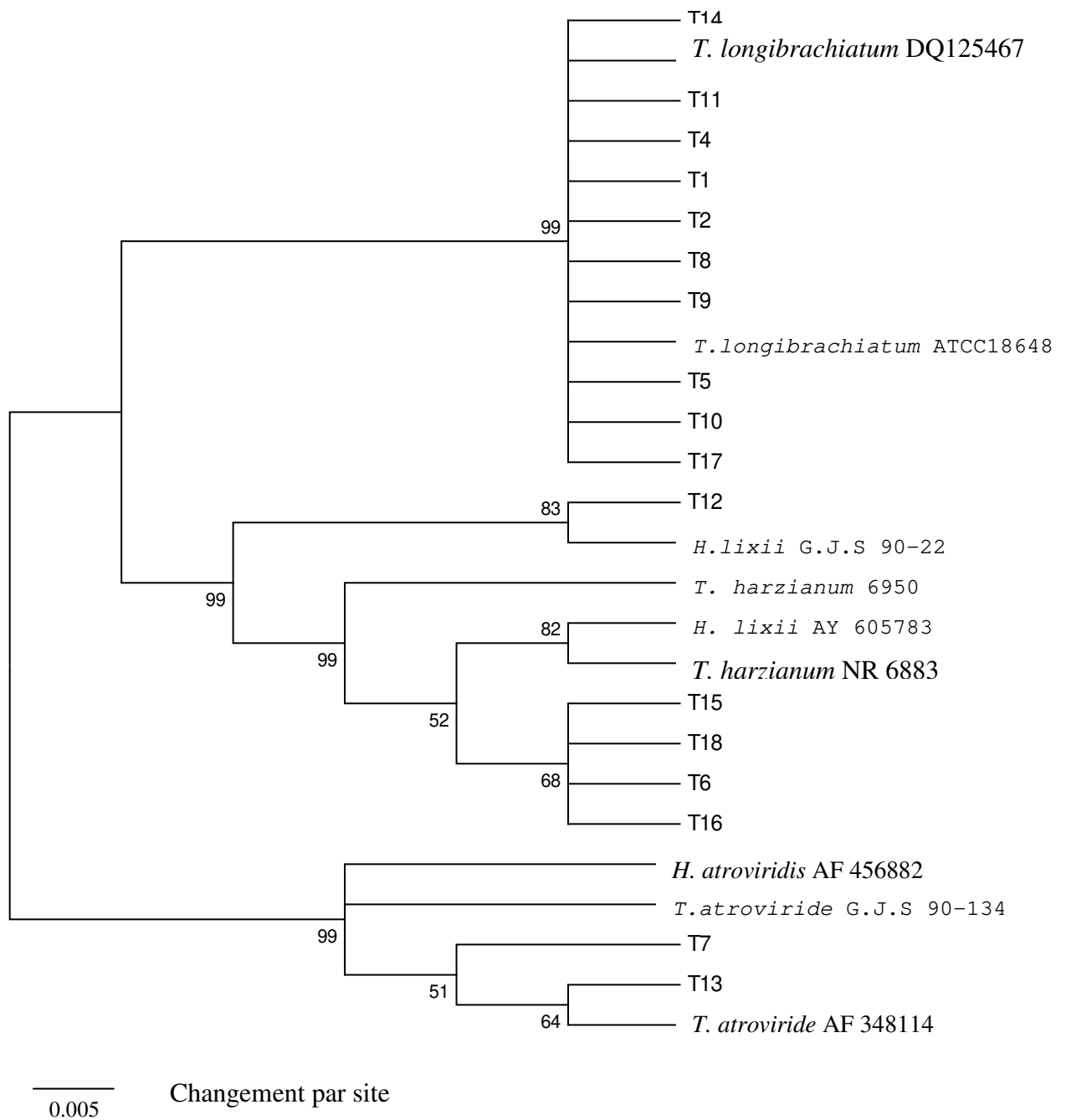


Figure 16. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences EF-1 α , montrant la position des 18 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références. L'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 4. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 répliques bootstrap, et il donné uniquement pour les valeurs supérieures à 50%

3.3.3. Résultats relatifs à la RAPD

L'amplification avec les amorces OPA-1, OPA-10, OPA-17 et le minisatellite M13 a montré un certain polymorphisme inter et intra-spécifique à l'intérieur des 3 espèces : *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride* avec l'existence d'une différence entre les trois espèces, et la présence de marqueurs moléculaires pour les deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* (Fig.17). Avec l'amorce OPA-1 deux bandes sont retrouvées chez tous les isolats de *T. longibrachiatum* (1,2 Kb et 0,8 Kb), mais seule la première existe chez les isolats T15, T16 et T18 de l'espèce *T. harzianum*. L'amplification avec l'amorce OPA-10 a généré deux bandes (0.6 Kb et 0.55 Kb) chez tous les isolats *T. longibrachiatum*, où seule la deuxième (0.55 Kb) est retrouvée également chez les isolats T6, T15, T16 et T18 appartenant à l'espèce *T. harzianum*. Avec cette amorce, une bande de 0.95 Kb est également mise en évidence uniquement chez les trois isolats *T. atroviride*. L'amplification avec l'amorce OPA-17 a mis en évidence une bande de 0.6 Kb qu'on retrouve uniquement chez les dix isolats de *T. longibrachiatum*. L'amplification avec le minisatellite M13 a permis également de distinguer les mêmes isolats au sein des mêmes espèces et a montré un polymorphisme intra spécifique.

L'analyse par RAPD a permis l'obtention de 247 bandes, l'analyse des données par la méthode «Average Linkage Method» sépare les isolats de *Trichoderma* spp. en deux principaux clusters. Le cluster I est subdivisé en deux principaux groupes dont l'un correspond à l'espèce *T. longibrachiatum* avec un pourcentage de similarité entre les isolats qui varie de 31 à 100 %. L'autre correspond à l'espèce *T. harzianum* avec un pourcentage de similarité qui varie entre 42.1 et 87.5 %. L'isolat Th.12 est rangé seul, et possède un pourcentage de similarité inférieur aux autres isolats de *T. harzianum*, et varie entre 11.5 et 30.8 %. Le cluster II correspond à l'espèce *T. atroviride* avec un pourcentage de similarité qui varie de 33.3 à 40 % entre les isolats (Fig.18 ; Tableau 3).

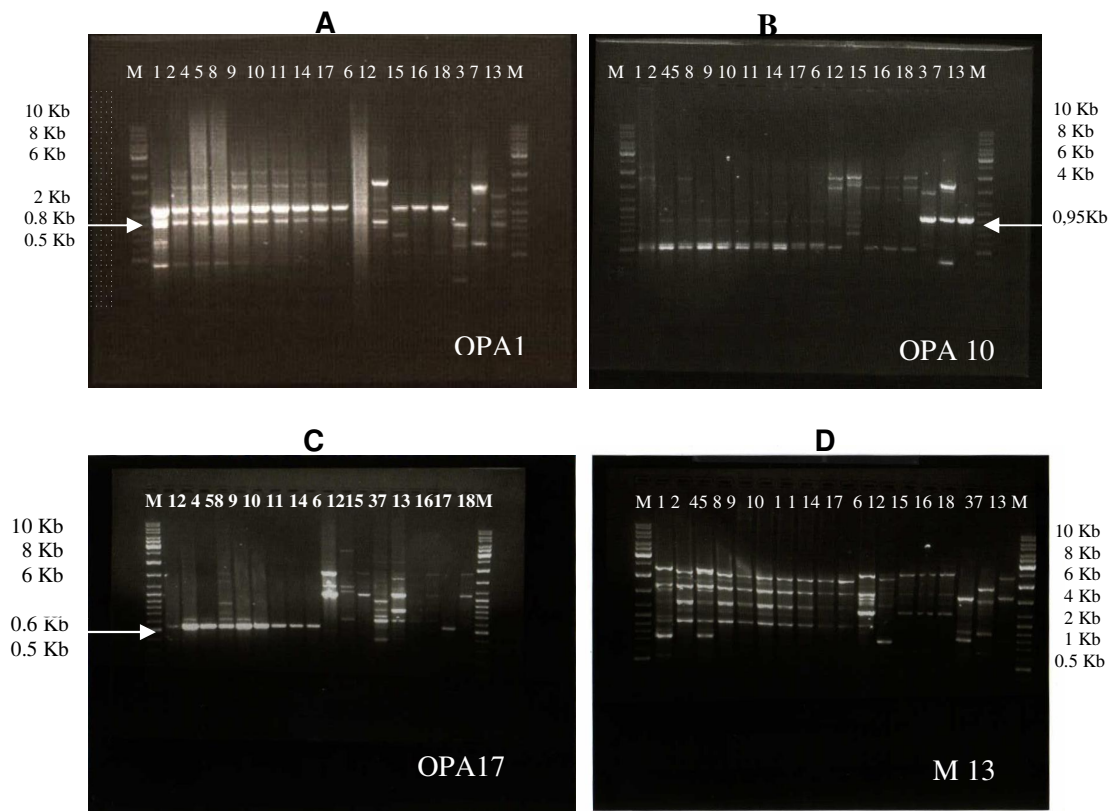


Figure 17. Profil RAPD des 10 isolats de *T. longibrachiatum* (1,2,4,5,8,9,10,11,14, et 17), 5 isolats de *T. harzianum* (6, 12, 15, 16, et 18), et des 3 isolats de *T. atroviride* (3, 7, et 13) généré par les amorces OPA-1(A), OPA-10(B), OPA-17(C) et le minisatellite M13 (D).

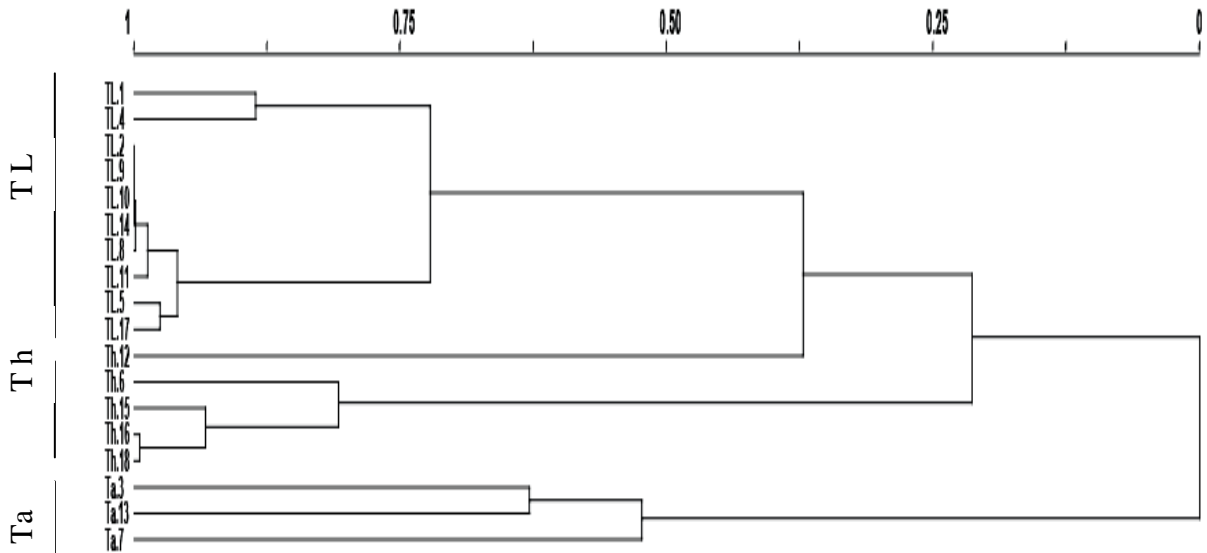


Figure18. Dendrogramme dérivé de l'analyse par RAPD de 10 isolats de *T. longibrachiatum* (TL), 5 isolats de *T. harzianum* (Th) et 3 isolats de *T. atroviride* (Ta) par la combinaison de 4 amorces (OPA-1, OPA-10, OPA-17 et le minisatelite M13). Le dendrogramme est dérivé par «Average Linkage Method». L'échelle correspond au pourcentage de similarité par le coefficient de similarité de Jaccard.

3.4. Discussion

Le séquençage de la région ITS des 18 isolats de *Trichoderma* spp. a montré que les isolats T1, T2, T4, T5, T8, T9, T10, T11, T14 et T17 ont présenté des séquences identiques (100 % de similarité) avec plusieurs séquences des isolats de l'espèce *T. longibrachiatum* et avec deux séquences de *H. scheweinitzii* (téleomorphe de l'espèce *T. citrinoviride* de la section *Longibrachiatum* espèce génétiquement proche de *T. longibrachiatum*). Ces mêmes isolats ont présenté des séquences EF-1 α avec 99% de similarité, le pourcentage le plus élevé avec seulement des séquences EF-1 α des isolats de l'espèce *T. longibrachiatum*.

Les isolats T6, T12, T15 et T16 ont présenté des séquences ITS identiques avec des séquences de *T. harzianum* et son téleomorphe *H. lixii*. L'isolat T18 a présenté une séquence ITS avec le pourcentage de similarité le plus élevé 99 % avec des séquences de *T. harzianum* et de *T. inhamatum*. Les isolats T6, T12, T15, T16 et T18 ont présenté des séquences EF-1 α avec le pourcentage de similarité le plus élevé 99 % et 98 % avec des séquences EF-1 α de *H. lixii* téléomorphe de *T. harzianum*.

Les isolats T3, T7 et T13 ont présenté des séquences identiques (100 % de similarité) avec une seule séquence de *T. atroviride* (EF417782), et 99 % de similarité avec plusieurs séquences de *T. atroviride*. De même, les isolats T7 et T13 ont présenté des séquences EF-1 α avec 99 % de similarité avec des séquences de *T. atroviride* et son téleomorphe *H. atroviridis*.

Il est à noter que les isolats (T6, T15, et T16) ont présenté des séquences ITS identiques avec la séquence d'un isolat initialement considéré comme étant *T. aureoviride* (AF194019 et AF194010) par Fujimori et Okuda puis réidentifié comme étant *T. harzianum* par Lieckfield et al.(2001). Ce repositionnement confirme que l'identification basée uniquement sur les caractères morphologiques est sujette à des erreurs.

En comparaison avec les résultats du séquençage du gène EF-1 α , le séquençage de la région ITS laisse une certaine ambiguïté par la présence d'un pourcentage de similarité de 100 % avec les séquences de deux espèces proches génétiquement pour les isolats étudiés. Le séquençage du gène EF-1 α a clarifié l'appartenance de chaque isolat à une espèce donnée de *Trichoderma* basée sur le pourcentage de similarité le plus élevé avec l'espèce. En effet l'analyse des séquences du gène EF-1 α est considérée comme une analyse complémentaire à l'identification par les ITS comme rapporté par Druzhinina et Kubicek (2005).

Il est important de rappeler que les isolats du deuxième groupe (T3, T6, T7, T12, T13, T15, T16, T18) ont été subdivisés en deux sous groupes selon les mensurations des conidies et la morphologie du conidiophore. Par le séquençage de l'ADN, le 1^{er} sous-groupe d'isolats (T6, T12, T15, T16, et T18) correspond ainsi à l'espèce *T. harzianum* et le deuxième sous-groupe (T3, T7, et T13) à l'espèce *T. atroviride*. En effet selon les auteurs les conidies de *T. harzianum* sont plus petites que celles de *T. atroviride*. Cependant, la taille des conidies dans notre cas ne correspond pas à celle décrite par les auteurs. La forme des conidies est globuleuse chez les isolats de nos deux espèces alors que celle décrite par Bissett (1991b), varie de subglobuleuse à ellipsoïde ou ovale. En revanche, Samuels et al. (1997) ont décrit des conidies avec une forme qui varie de globuleuse à subglobuleuse ou bien de subglobuleuse à ovoïde chez les isolats des deux espèces *T. harzianum* et *T. atroviride*. La forme des conidies de nos isolats (globuleuse) fait partie de ceux décrits par ces derniers auteurs. Les phialides des isolats T3, T7 et T13 de l'espèce *T. atroviride* sont gonflées similaires à ceux de la section *Pachybasum* alors que Bissett (1992), décrit des phialides plutôt minces effilées, ou subulées pour cette espèce.

Les deux espèces *T. harzianum* et *T. atroviride* ont longuement été confondues dans la littérature, et même que des isolats de *T. atroviride* ont été déposés dans les banques génomiques comme *T. harzianum*. Des isolats précédemment identifiés comme du *T. harzianum*, CBS 350.93=CBS 351.93=ATCC 28036, ont été réidentifiés comme *T. atroviride* par Bissett (1992) et Gams et Meyer (1998). Kullnig-Granger et al. (2001), ont trouvé des isolats de *T. atroviride* parmi des isolats antagonistes rapportés dans la littérature comme *T. harzianum* (ATCC 74058, IMI 206040 et ATCC 36042).

De même des isolats identifiés comme *T. harzianum* ont été réidentifiés comme *T. longibrachiatum* par Hermosa et al. (2000), dans une caractérisation moléculaire des isolats de *Trichoderma* identifiés précédemment comme *T. harzianum* par séquençage de la région ITS1 et ITS2.

La caractérisation par amplification avec les amorces OPA et le minisatellite M13 a généré des profils différents entre les isolats appartenant aux trois espèces. La présence d'une diversité génétique intra-spécifique a été également montrée. L'amplification avec certaines amorces a donné des bandes spécifiques pour les deux espèces de *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*, mettant en évidence des marqueurs moléculaires discriminatoires chez les *Trichoderma* spp. par RAPD. Cela permet de confirmer l'identité des espèces de *T.*

longibrachiatum et *T. atroviride* déjà montrée par séquençage de l'ADN. En effet Zimand et al. (1994) ont proposé l'utilisation de la RAPD comme outil moléculaire d'identification des espèces de *Trichoderma* spp. Ils ont pu montrer que quelques isolats avaient un profil similaire à l'intérieur des espèces de *T. harzianum*, et *T. viride*. Par contre aucune similarité n'avait été obtenue pour l'espèce *T. hamatum* (Bon) Bain. Ils ont ainsi conclu à travers leurs travaux que l'analyse RAPD restait insuffisante pour l'identification des espèces.

La corrélation entre les profils RAPD et l'activité antagoniste des espèces de *Trichoderma* spp. fait ressortir des contradictions. Ainsi, Gomez et al. (1997) ont analysé les profils RAPD des isolats de *T. harzianum*, et les ont classé dans différents groupes selon leur capacité antagoniste à l'égard des champignons phytopathogènes. Abassi et al. (1999) ont pu distingué par RAPD la souche *T. hamatum* 382 «biocontrol » des autres isolats de *T. hamatum*, alors que Brando-Goes et al. (2002) avec les mêmes analyses RAPD des isolats de *Trichoderma* spp. antagonistes contre *Rhizoctonia solani*, ont montré une variabilité génétique intra-spécifique. Cependant, les dendrogrammes obtenus n'ont pas montré un classement des isolats selon leur niveau d'antagonisme. Nos résultats obtenus dans cette présente étude n'ont pas montré également un classement des isolats de *Trichoderma* spp. selon leur niveau d'antagonisme contre l'agent du flétrissement fusarien du pois chiche, mais ont permis plutôt de classer les isolats *Trichoderma* spp. selon l'espèce.

3.5. Conclusion

Le séquençage des ITS des 18 isolats de *Trichoderma* spp. a montré que les 10 isolats du premier groupe (T1,T2,T4,T5,T8,T9,T10,T11,T14,T17) ont présenté des séquences identiques avec celles de deux espèces proches génétiquement. Il s'agit de l'espèce *T. longibrachiatum* et l'espèce *H. shweinitzii* téléomorphe de *T. citrinoviride*. Pour les isolats du deuxième groupe, 5 isolats du premier sous groupe ont présenté des séquences identiques avec celles de l'espèce *T. harzianum* et son téléomorphe *H. lixii*, par contre l'isolat T18 a présenté une séquence avec un pourcentage de similarité de 99% avec des séquences des espèces *T. harzianum*, *T. aureoviride* et *T. inhamatum*. Néanmoins, les isolats du deuxième sous groupe ont présenté des séquences identiques seulement avec les séquences de l'espèce *T. atroviride*.

En revanche le séquençage du gène EF-1 α , a montré la présence pour chaque groupe d'isolats du pourcentage de similarité le plus élevé avec une seule espèce. Ainsi les 10 isolats

du premier groupe ont présenté des séquences ayant le pourcentage de similarité le plus élevé (99%) avec les séquences de l'espèce *T. longibrachiatum*. Pour le deuxième groupe d'isolats, les séquences EF-1 α du premier sous groupe (T6, T12, T15, T16 et T18) ont présenté un pourcentage de similarité de 99% avec celles de l'espèce *H. lixii* téléomorphe de *T. harzianum*. De même les isolats du deuxième sous groupe (T3, T7 et T13) ont présenté des séquences avec le pourcentage de similarité le plus élevé avec celles de *T. atroviride* et son téléomorphe *H. atroviridis*. Ainsi le séquençage du gène EF-1 α est complémentaire et confirme les résultats relatifs à l'identification par séquençage des ITS.

Parmi les isolats de *Trichoderma* spp. utilisés dans cette étude, nous constatons que, le séquençage des ITS des isolats de l'espèce *T. Longibrachiatum* et un isolat de l'espèce *T. harzianum* laisse une confusion par la présence d'une similarité importante avec des espèces proche génétiquement. Par contre les trois isolats de l'espèce *T. atroviride* ont présenté des séquences ITS identiques avec des séquences de l'espèce *T. atroviride* uniquement.

Le recours au séquençage de gènes restés hautement conservés chez les champignons, peut lever certaines confusions et clarifier la taxonomie chez les isolats de *Trichoderma* spp. Ainsi pour certains isolats étudiés, si le séquençage de la région ITS laisse encore une certaine ambiguïté, en revanche, le séquençage du gène EF-1 α a clarifié l'appartenance de chaque isolat à une espèce donnée.

L'analyse de l'ADN confirme donc que les caractères morphologiques ont une grande plasticité. En effet, les isolats identifiés comme étant *T. longibrachiatum* par séquençage de l'ADN, ont montré une certaine variabilité dans les dimensions et la forme des conidies. Ceux identifiés comme *T. atroviride* et *T. harzianum* ont également présenté des conidies avec des mensurations de taille qui diffèrent de ceux décrits par les auteurs.

L'amplification de l'ADN par RAPD a mis en évidence d'une part la présence d'une diversité génétique au sein des espèces de *Trichoderma* spp. utilisées et d'autre part la présence de bandes spécifiques des espèces de *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*, montrant ainsi que cet outil est utile dans l'identification des *Trichoderma* spp.

Chapitre 4.
Effet de la température sur le taux de
croissance et les caractères cultureux des
isolats de *Trichoderma* spp.

4.1. Introduction

Les méthodes d'étude basées sur l'aspect cultural et la physiologie prenant en considération le taux de croissance à différentes températures, l'aspect des colonies, la vitesse d'apparition des conidies blanchâtres et verdâtres ainsi que la présence ou l'absence de conidies jaunâtres, de pigment et d'odeur, peuvent constituer une alternative à une identification moléculaire (Chaveri et *al.*, 2003). Cependant ces méthodes restent relativement longues et fastidieuses (Druzhnina et Kubicek, 2005).

Dans cette étude nous avons procédé à une caractérisation culturale qui a porté sur les critères cités précédemment avec une évaluation de la variabilité intra-spécifique.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Matériel fongique et conditions de culture

Au total 18 isolats de l'agent antagoniste *Trichoderma* spp. appartenant aux trois espèces *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride* isolés du sol, de la rhizosphère du pois chiche et à partir de la semence de pois chiche, de la fève et du blé ont été retenus dans cette étude ; l'ensemble de ces isolats ont été précédemment identifiés dans le chapitre 3 (Tableau 4).

Après purification monosporée, les isolats sont conservés à 4°C en tubes inclinés contenant le milieu PDA. Pour les tests réalisés dans cette étude, les isolats sont repiqués sur milieu PDA et incubés à 25 °C sous lumière continue.

4.2.2. Influence de la température sur le taux de croissance et l'aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp.

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer le taux de croissance ainsi que la température optimale de croissance selon le protocole établi par Samuels et *al.* (2002). Deux milieux de culture PDA et SNA (Special Nutrient Agar) sont utilisés, ce dernier pauvre en sucre, est composé de KH₂PO₄: 1g, KNO₃:1g, MgSO₄.7H₂O :0.5g, KCL :0.5g, glucose :0.2g, agar :20g, l'eau distillée : 1000ml (Nirenberg, 1976 in Samuels et *al* 1998). L'influence de la température est évaluée à 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C à l'obscurité. A cet effet

des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre sont ensemencées par des explants de 4 mm de diamètre. Les repiquages des différents isolats de *Trichoderma* sont réalisées à partir de cultures âgées de 4 jours et à raison de trois boîtes pour chaque température ; les explants sont déposés à 1.5 cm de la périphérie de la boîte. Les mesures de la croissance mycélienne sont effectuées après 24h, 48h et 72h d'incubation. Des notations concernant l'aspect des colonies, la sporulation, la diffusion de pigment dans le milieu ainsi que la présence d'odeur dans les cultures sont également notées.

Tableau 4. Origine des isolats de *Trichoderma* spp. utilisés

Code	Espèce	Source	Origine
TL.1 (T1)	<i>T. longibrachiatum</i>	Labo. Mycologie	INA
TL.2 (T2)	<i>T. longibrachiatum</i>	Sol	B. Bahri
Ta.3 (T3)	<i>T. atroviride</i>	Sol	B. Bahri
TL.4 (T4)	<i>T. longibrachiatum</i>	Sol	B. Bahri
TL.5 (T5)	<i>T. longibrachiatum</i>	Sol	B. Bahri
Th.6 (T6)	<i>T. harzianum</i>	Sol	INA
Ta.7 (T7)	<i>T. atroviride</i>	Sol	ITGC
TL. 8 (T8)	<i>T. longibrachiatum</i>	Sol	ITGC
TL.9 (T9)	<i>T. longibrachiatum</i>	Rhizosphère du pois chiche	ITGC
TL.10 (T10)	<i>T. longibrachiatum</i>	Rhizosphère du pois chiche	INA
TL.11 (T11)	<i>T. longibrachiatum</i>	Rhizosphère du pois chiche	INA
Th.12 (T12)	<i>T. harzianum</i>	Rhizosphère du pois chiche	INA
Ta.13 (T13)	<i>T. atroviride</i>	Semence de blé	ITGC
TL.14 (T14)	<i>T. longibrachiatum</i>	Semence de blé	ITGC
Th.15 (T15)	<i>T. harzianum</i>	Semence de blé	ITGC
Th.16 (T16)	<i>T. harzianum</i>	Semence de blé	ITGC
TL.17 (T17)	<i>T. longibrachiatum</i>	Semence de fève	ITGC
Th.18 (T18)	<i>T. harzianum</i>	Semence de pois chiche ILC3279	ITGC

TL: *T. longibrachiatum*, Ta : *T. atroviride*, Th : *T. harzianum*

INA: Institut National Agronomique

B. Bahri: Bordj El Bahri

ITGC: Institut Technique des grandes cultures Oued Smar

4.3. Résultats

4.3.1. Effet de la température sur le taux de croissance des isolats de *Trichoderma* spp.

L'effet de la température sur la croissance des isolats appartenant aux trois espèces : *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* ainsi que *T. atroviride*, a montré qu'après 48h d'incubation, les courbes de croissance aux différentes températures sur milieu PDA sont comparables à l'intérieur de la même espèce, mais sont différentes d'une espèce à une autre (Fig. 19).

L'optimum de croissance concernant les isolats appartenant à l'espèce *T. longibrachiatum*, est situé en deux points différents à 25 et à 35°C. Il y a une régression de la croissance à 30°C pour tous les isolats de cette espèce, puis la croissance reprend pour atteindre encore une fois son optimum à 35°C ; au delà de 35°C il y a une régression de cette croissance. Il est également constaté l'existence d'une différence considérable dans la croissance entre les isolats à certaines températures (Fig. 19).

Quant à l'optimum de croissance des 6 isolats appartenant à l'espèce *T. harzianum*, celui-ci est situé entre 25°C et 30°C. Ainsi les isolats Th.6, Th.12, Th.16 et Th.18 ont un optimum qui se situe à 25°C, par contre l'isolat Th.15 a un optimum situé entre 25°C et 30°C. Une diminution de la croissance au delà de 30°C est observée, et cette dernière est nulle à 40°C. La croissance des isolats Th.6 et Th.18 est presque identique, avec l'existence d'une différence entre les isolats restants (Fig. 19).

Enfin les trois isolats appartenant à l'espèce *T. atroviride* ont montré une courbe différente des isolats de *T. longibrachiatum*, mais se rapproche de l'espèce *T. harzianum*. Néanmoins, l'optimum de croissance des trois isolats reste situé entre 25 et 30°C, avec une diminution au delà de 30°C ; la croissance est nulle à 40°C (Fig. 19). Une variation dans la croissance des trois isolats est relevée. Cependant, par rapport à l'espèce *T. harzianum* qui est morphologiquement proche, la croissance est très faible à 35°C, avec un arrêt de la croissance avant le 4^{ème} jour.

Contrairement au milieu PDA, la croissance des isolats appartenant aux trois espèces est plus ralentie sur milieu SNA, et les courbes de croissances ne sont pas discriminatoires des espèces. Chez l'espèce *T. longibrachiatum* les courbes de croissances sont différentes chez tous les isolats, avec un optimum situé à 25° C pour les isolats TL.1, TL.4, et TL.14 ; un

optimum à 30°C pour les deux isolats TL.5 et TL.9, un optimum entre 25 et 30°C pour l'isolat TL.2, un optimum à (25 et 35°C) pour l'isolat TL.11, et enfin un optimum de 35°C

pour les isolats TL.8, TL10, et TL.17. Il est à noter que la croissance des isolats TL.4 et TL.17 est nulle à 15°C (Fig. 19).

L'optimum de croissance des cinq isolats de *T. harzianum* est situé à 25°C, mais les courbes de croissance ne sont pas comparables chez tous les isolats. La croissance des cinq isolats de *T. harzianum* est nulle à 40°C, et celle de l'isolat Th.6 est également nulle à 15°C.

Chez l'espèce *T. atroviride*, l'optimum de croissance des trois isolats est situé à 25°C, avec une croissance nulle à 40°C ; l'isolat Ta.3 a également une croissance nulle à 15°C (Fig.16). La croissance des isolats de *T. atroviride* est plus faible par rapport aux isolats de l'espèce *T. harzianum* située à 35°C, avec un arrêt de la croissance avant le 4^{ème} jour.

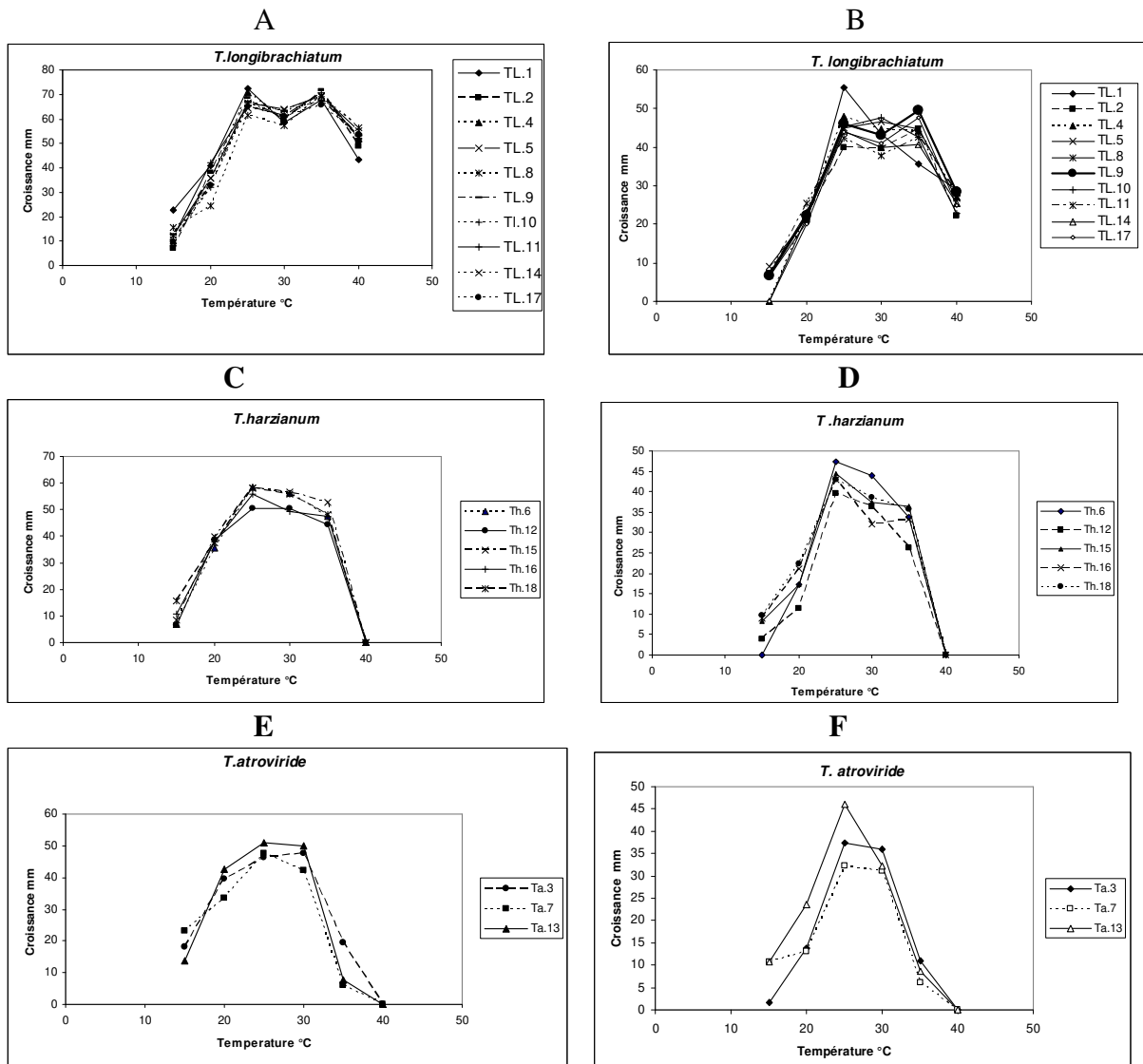


Figure 19. Diamètre des colonies de *T. longibrachiatum* (A, B) *T. harzianum* (C, D), et *T. atroviride* (E, F) après 48h d'incubation à 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C sur le milieu PDA (A, C, E) et SNA (B, D, F)

4.3.2. Influence de la température sur les caractères cultureux des isolats de *Trichoderma* spp.

L'aspect cultural sur milieu PDA des différents isolats appartenant aux trois espèces *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride* incubés à différentes températures, a montré l'existence d'une différence. Chez les trois espèces, les conidies sont en alternance formant des cercles concentriques, avec un mycélium de couleur blanchâtre. Les plus jeunes conidies sont de couleur blanchâtre, et avec l'âge, elles deviennent verdâtres. La différence des isolats pour les trois espèces réside dans les délais d'apparition des conidies blanchâtres et verdâtres, ainsi que la présence de conidies jaunâtres chez certains isolats.

Chez l'espèce *T. longibrachiatum*, la production de spores se fait à toutes les températures testées en cercles concentriques pour tous ses isolats, à l'exception de l'isolat TL.8 dont les conidies apparaissent en touffes, en étant diffuses. Il a été observé chez cette espèce la présence de conidies jaunâtres uniquement pour l'isolat TL1 à 20 et 35°C. Un pigment jaune vert brillant existe chez tous les isolats, lorsqu'ils sont incubés à 20°C, alors que ce pigment est observé à toutes les températures d'incubation pour l'isolat TL.8, ainsi que les isolats TL.1, TL.2 et TL.4, lorsqu'ils sont incubés à 30°C.

Chez l'espèce *T. atroviride*, les conidies jaunâtres sont observées uniquement pour l'isolat Ta.7. Une odeur de noix de coco est présente chez les trois isolats de *T. atroviride* avec absence de pigment diffusant dans le milieu de culture.

Chez l'espèce *T. harzianum*, l'absence de sporulation est notée pour tous les isolats à 15°C, et chez l'isolat Th.16 à toutes les températures testées, jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation. Il est noté une différence entre les isolats concernant la diffusion dans le milieu, d'un pigment jaune orange chez les isolats Th.16 et Th.18, et un pigment marron pour l'isolat Th.12 à 30°C (Tableau 5 ; Fig. 20, 21, 22, 23, 24 et 25).

Comme pour le milieu PDA, chez les isolats des trois espèces, il y a sur milieu SNA formation de conidies qui apparaissent en cercles concentriques, mais la sporulation reste très faible, et le délai d'apparition des conidies blanchâtres et verdâtres est plus long, avec la présence d'un mycélium ras blanc. Il y a absence de conidies jaunâtres chez les isolats des trois espèces. Il y a également absence de pigment chez les isolats de l'espèce *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* à l'exception de l'isolat Th.18 de l'espèce *T. harzianum* où un pigment jaune faible est remarqué. La différence entre les isolats de la même espèce réside dans le délai d'apparition des conidies blanchâtres et verdâtres ainsi que leur absence ou

présence à certaines températures de croissance. Une absence totale de sporulation est notée chez tous les isolats de *T. harzianum* à 15°C, et à toutes les températures testés jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation chez l'isolat Th.16 (Tableau 6 ; Fig. 26, 27, 28, 29, 30 et 31). Aussi bien sur milieu PDA que sur milieu SNA, il a été remarqué que le délai d'apparition des conidies est plus faible à basse température chez les isolats des trois espèces.

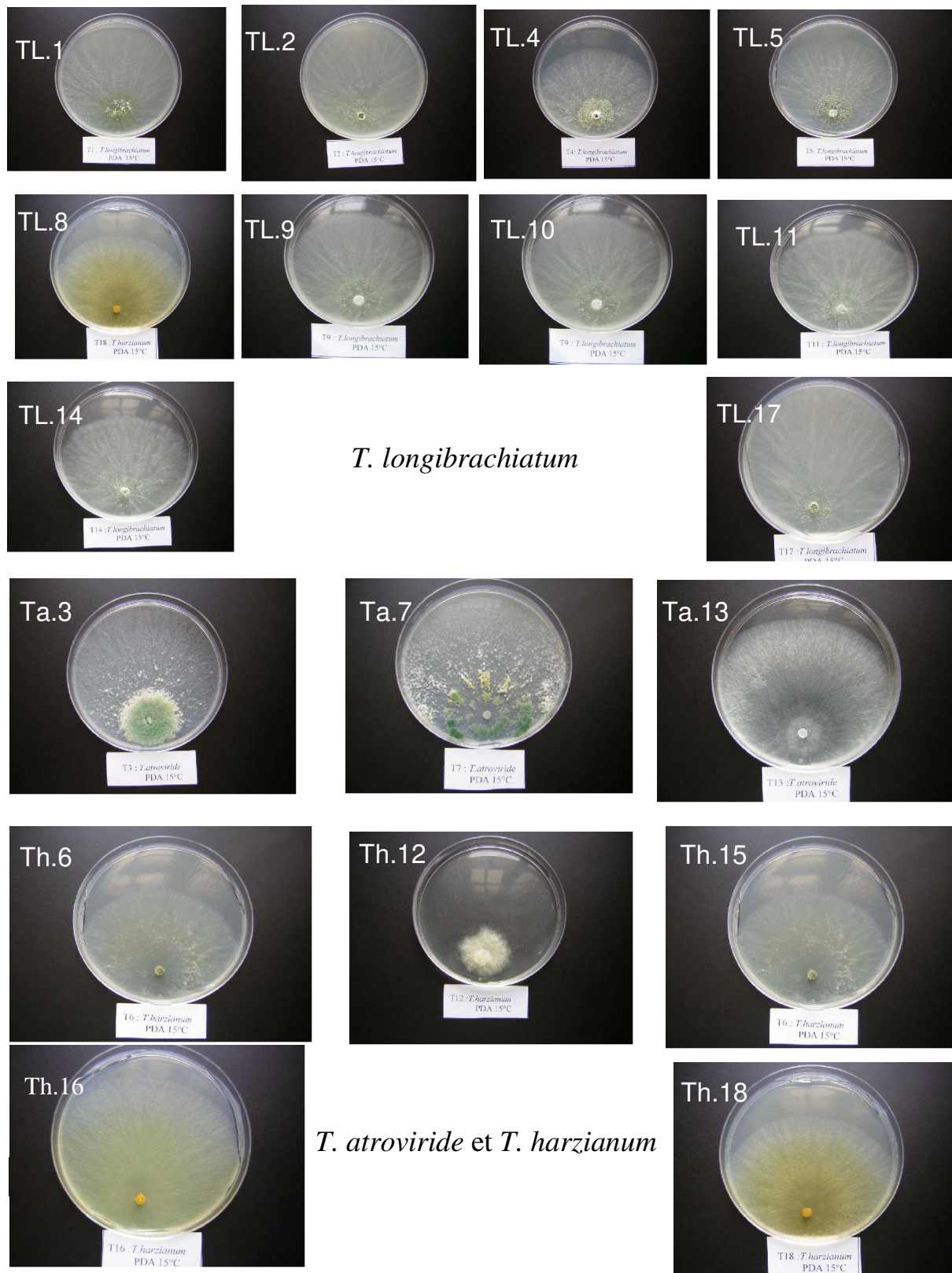


Figure 20. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 15°C sur milieu PDA

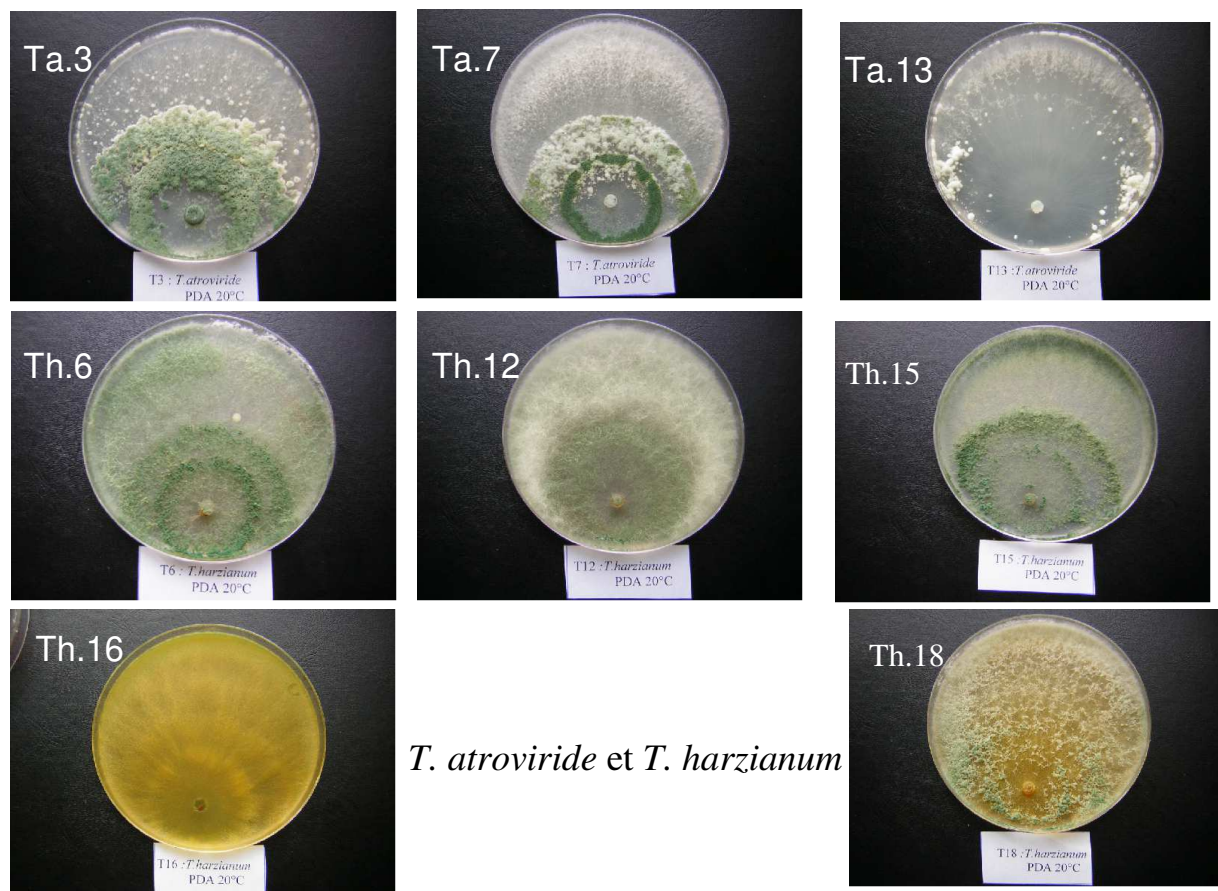
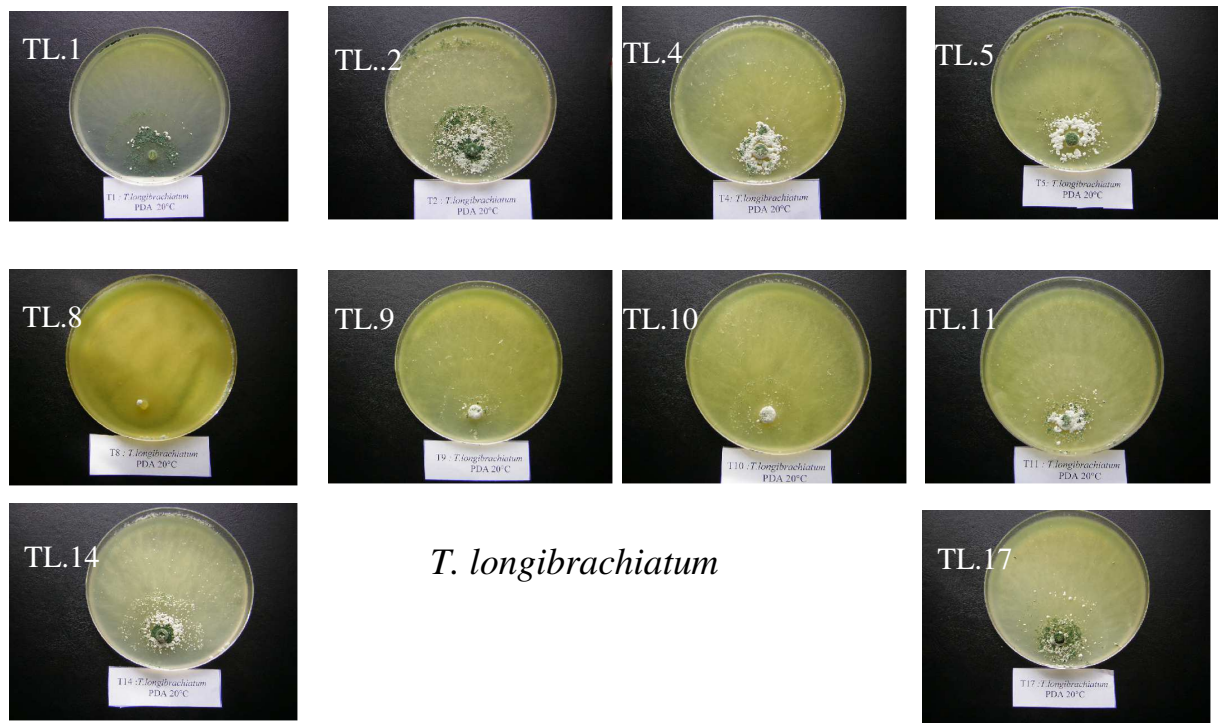


Figure 21. Aspect culturel des isolats de *Trichoderma* spp. à 20°C sur milieu PDA

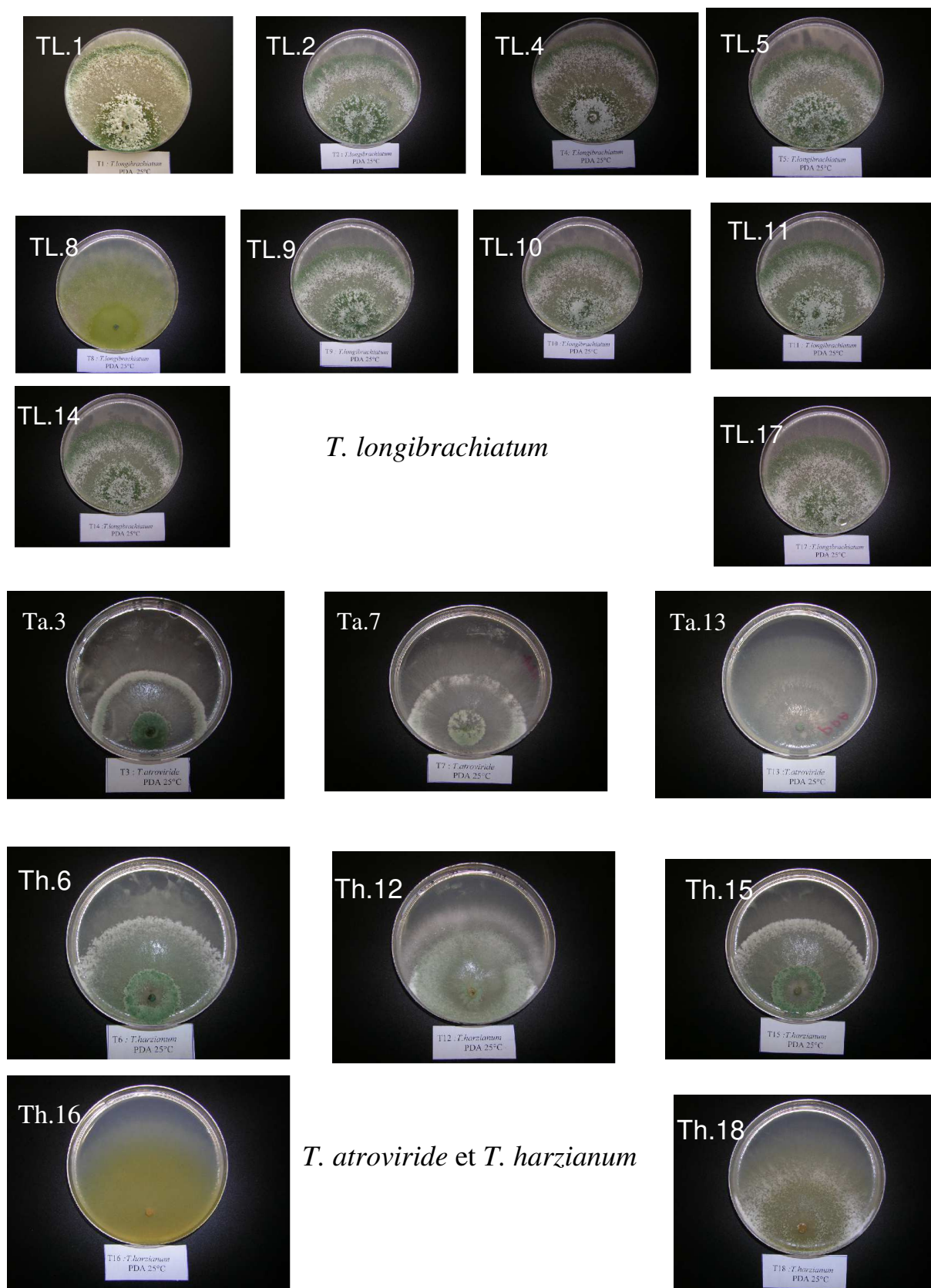
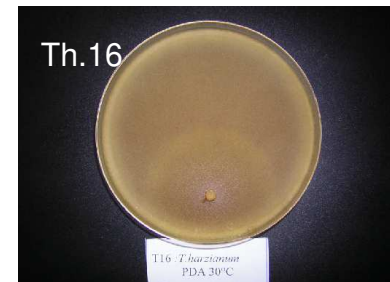
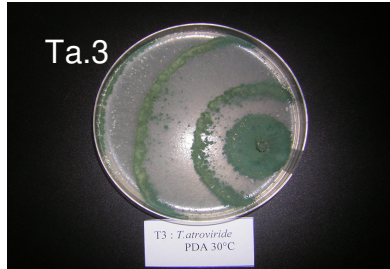


Figure 22. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 25°C sur milieu PDA



T. longibrachiatum



T. atroviride et T. harzianum

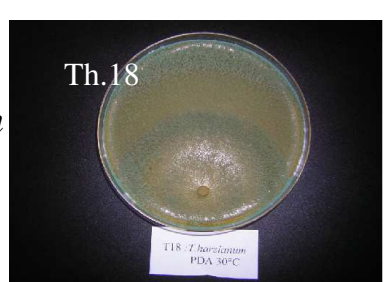


Figure 23. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 30°C sur milieu PDA

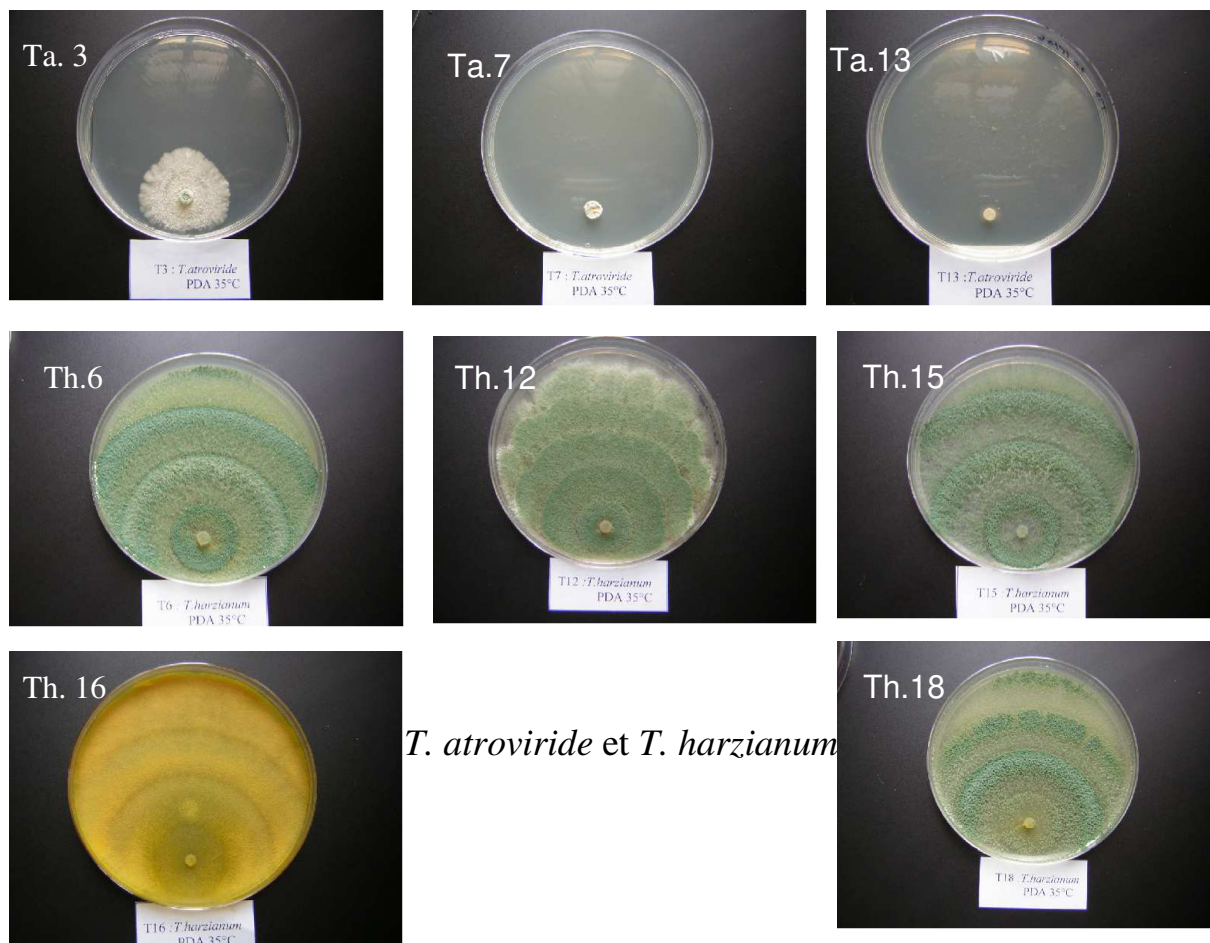
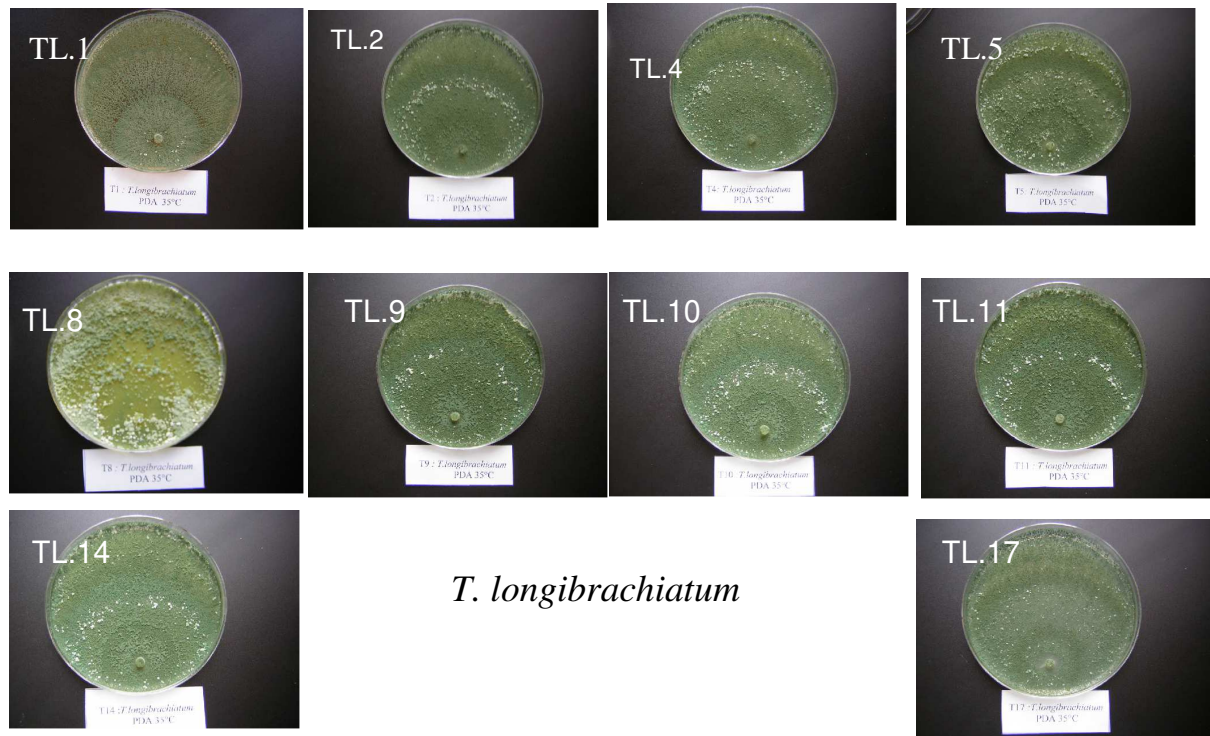
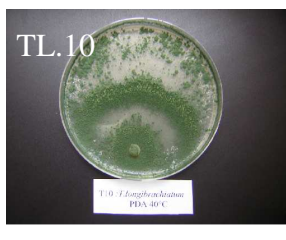
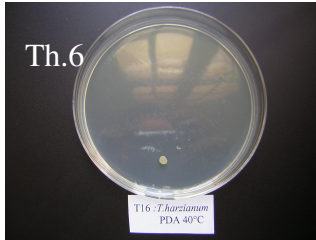
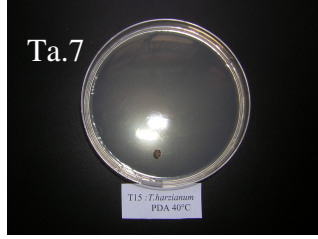


Figure 24. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 35°C sur milieu PDA



T. longibrachiatum



T. harzianum et *T. atroviride*

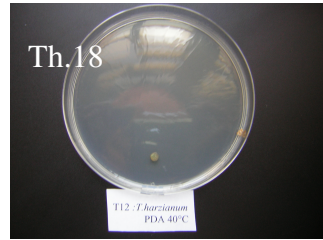


Figure 25. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 40°C sur milieu PDA

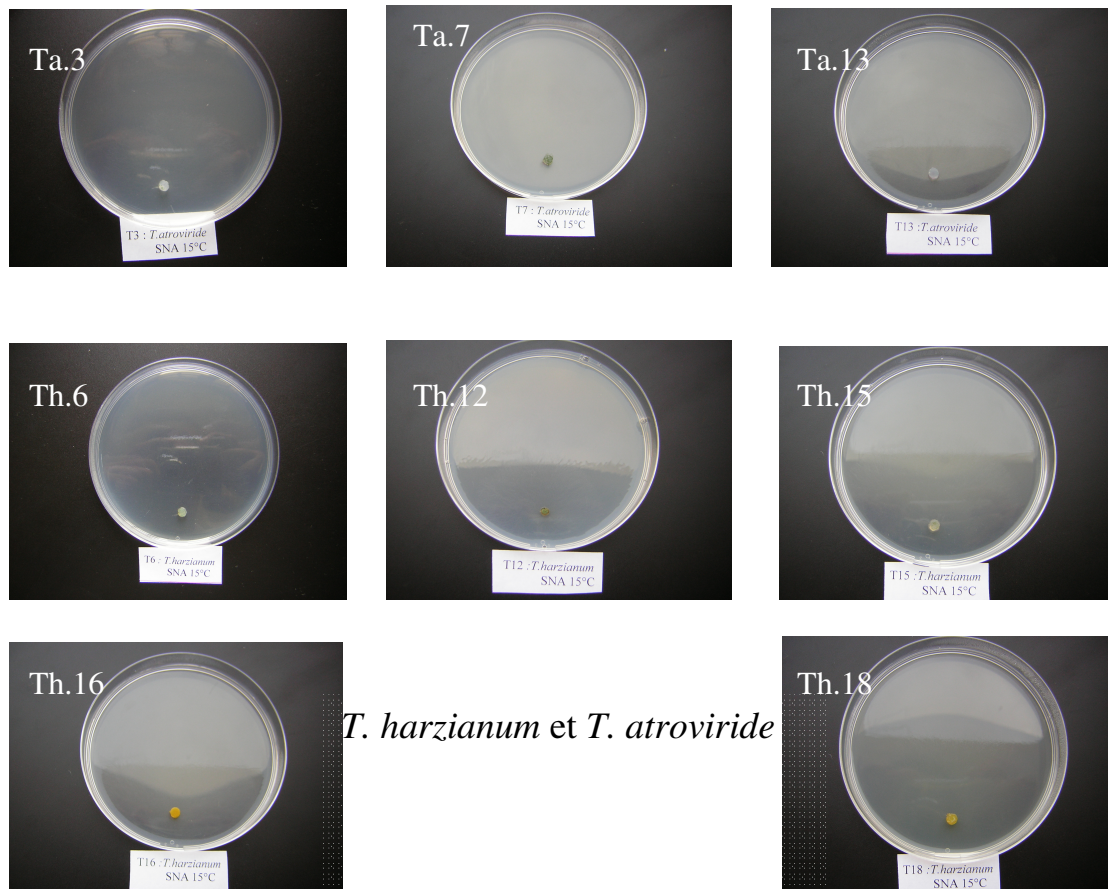
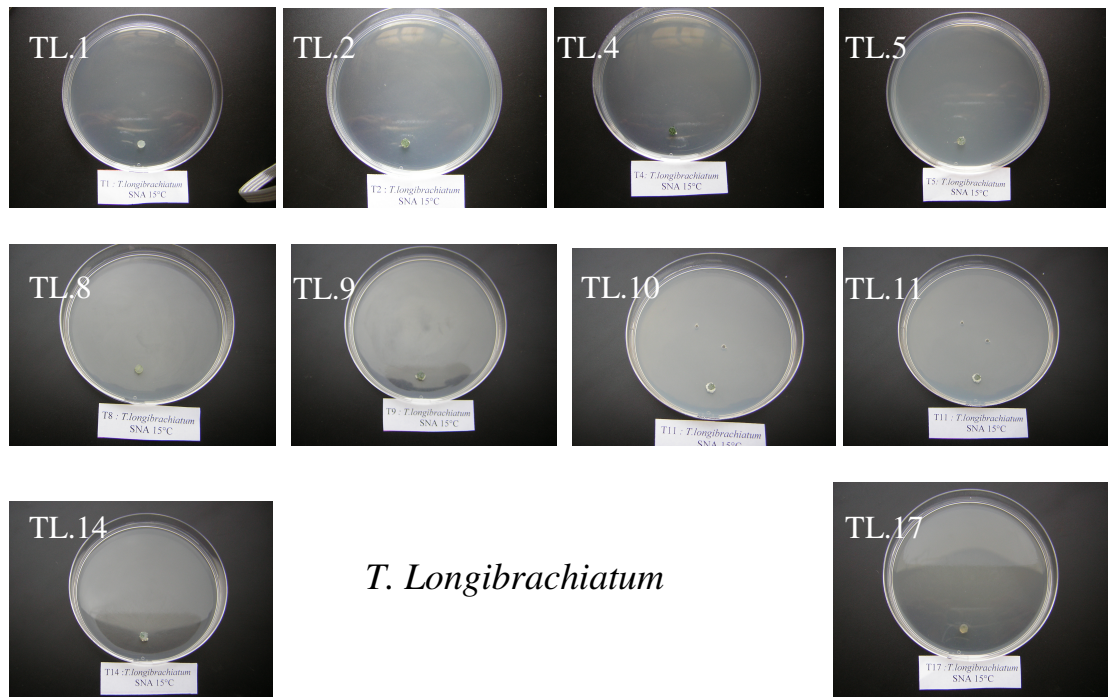


Figure 26. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 15°C sur milieu SNA

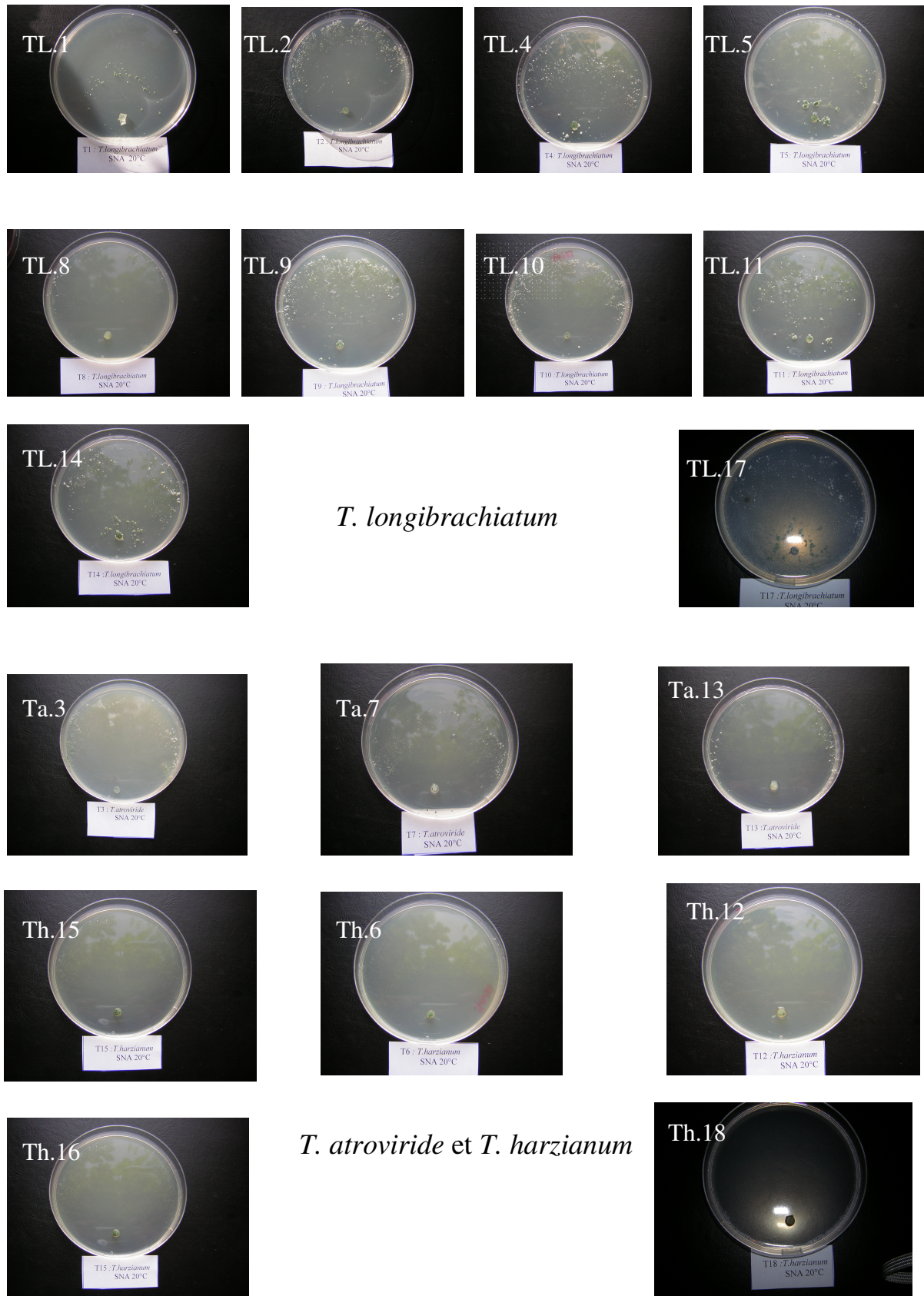


Figure 27. Aspect culturel des isolats de *Trichoderma* spp. à 20°C sur milieu SNA

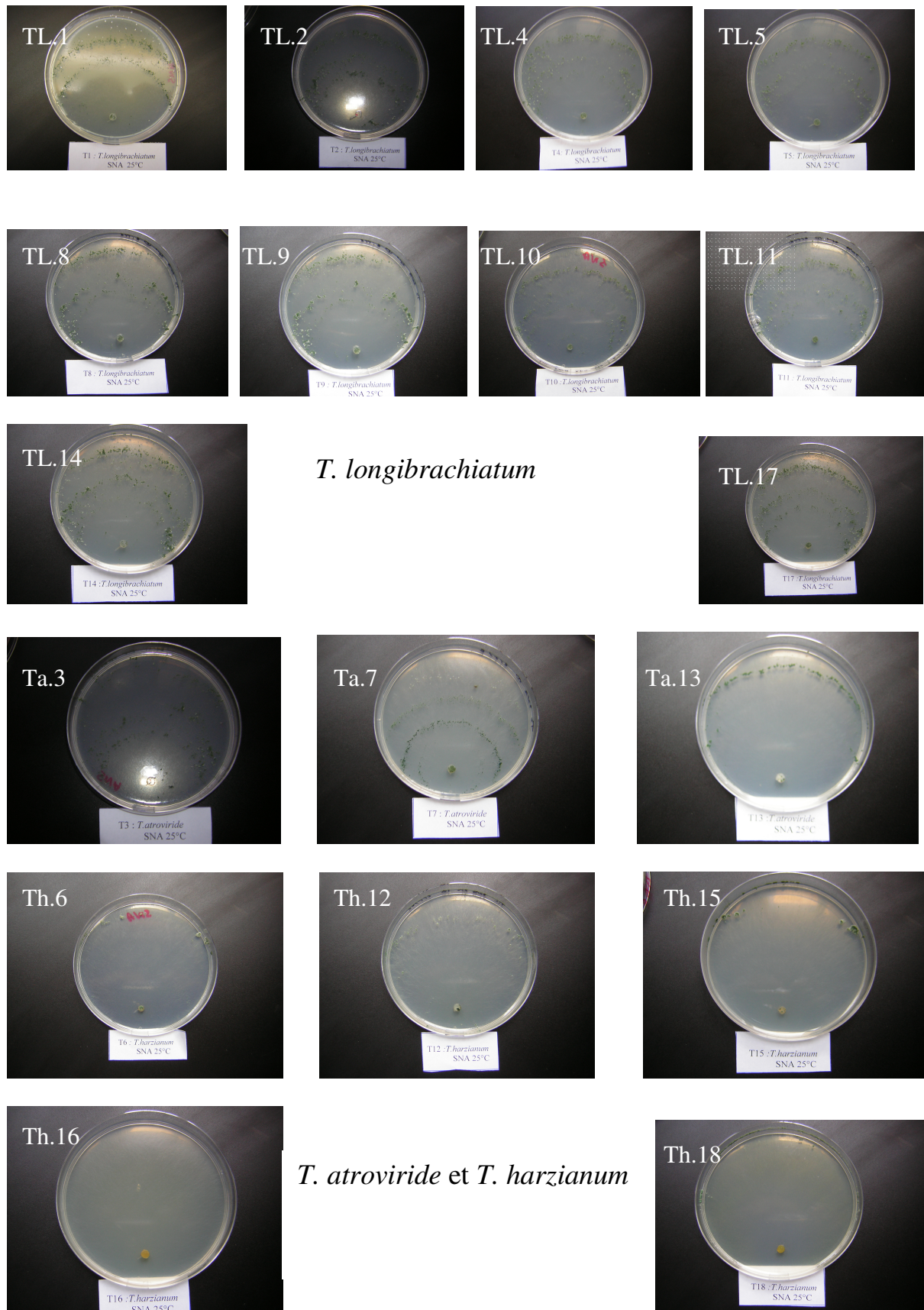


Figure 28. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 25°C sur milieu SNA

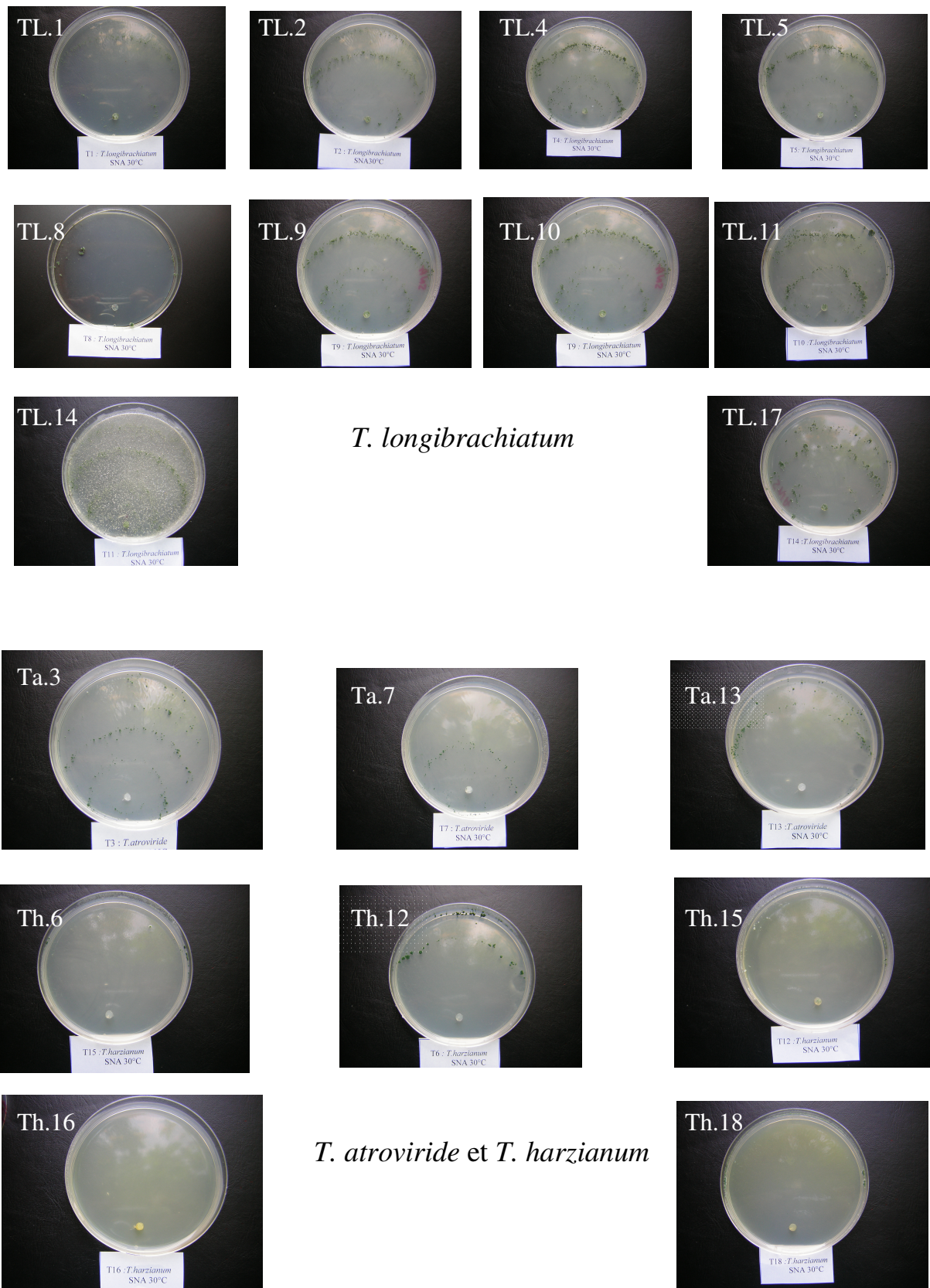


Figure 29. Aspect culturel des isolats de *Trichoderma* spp. à 30°C sur milieu SNA

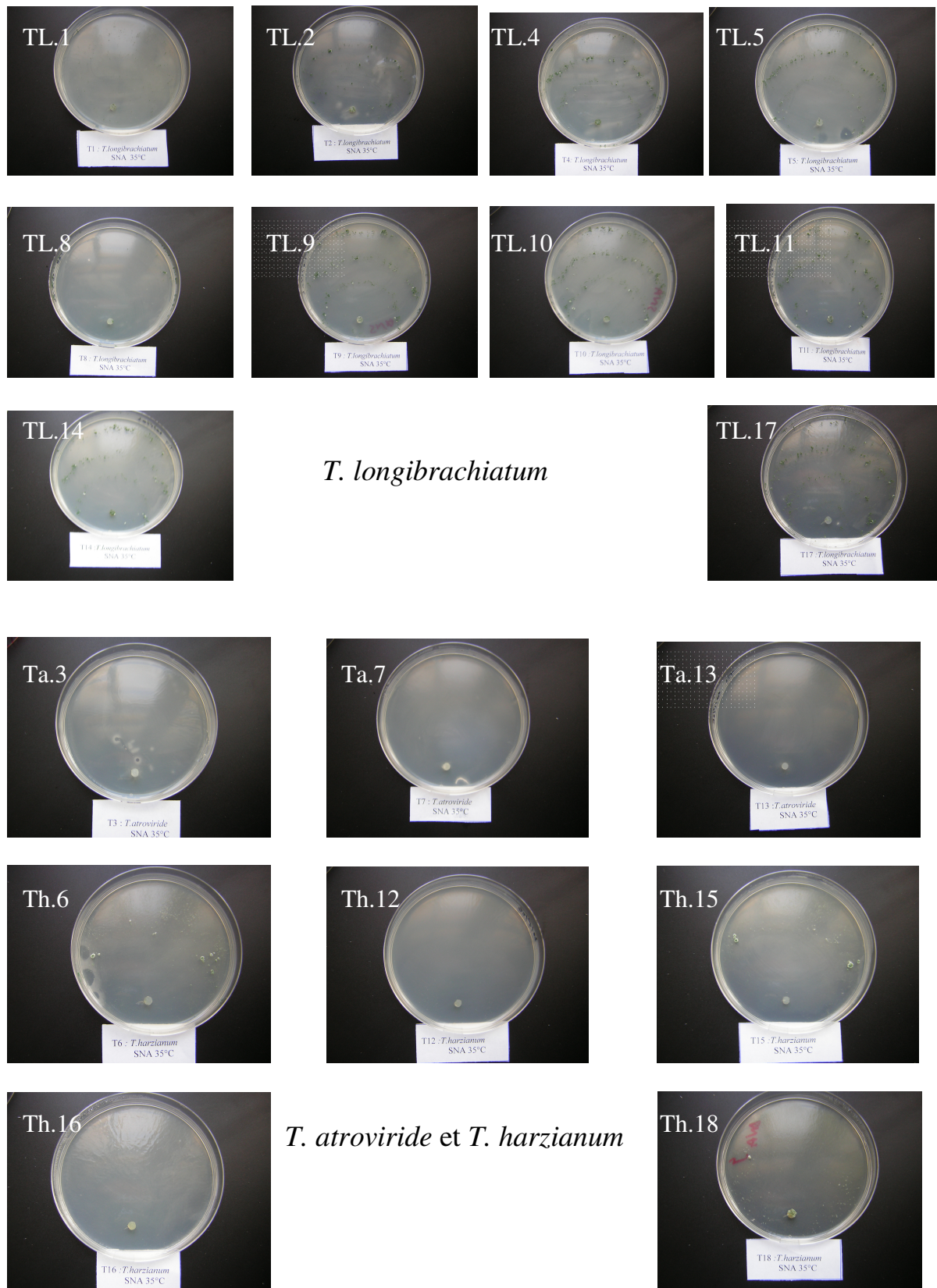
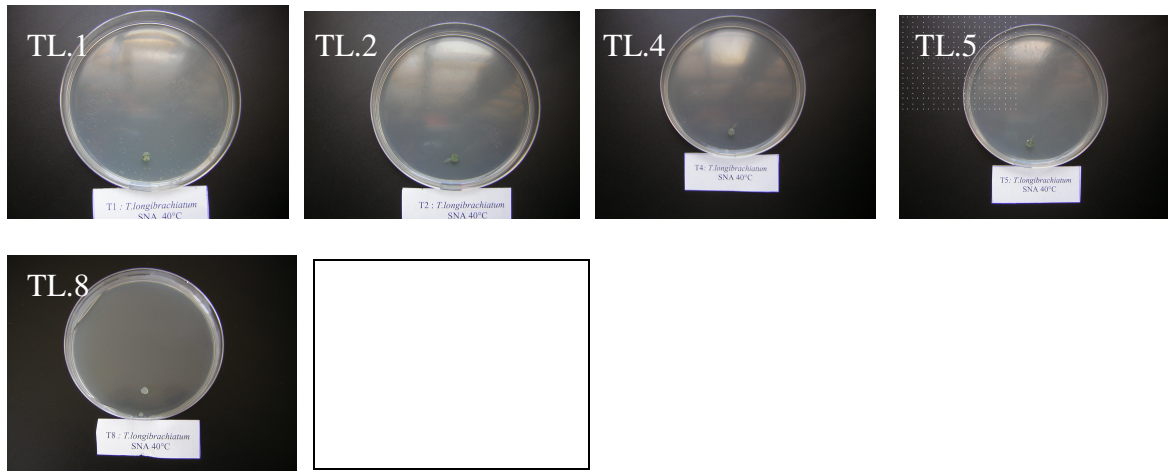


Figure 30. Aspect culturel des isolats de *Trichoderma* spp. à 35°C sur milieu SNA



.....

■

T. longibrachiatum

.....

■

■

.....

■

■

.....

■

T. atroviride et *T. harzianum*

Figure 31. Aspect cultural des isolats de *Trichoderma* spp. à 40°C sur milieu SNA

4.4. Discussion

Une variation intra et inter-spécifique est montrée dans la collection des isolats de *Trichoderma* spp. utilisée dans cette étude, pour les deux caractères étudiés : analyse du taux de croissance et aspects culturels des colonies.

Si les courbes de croissance des isolats de *Trichoderma* spp. aux différentes températures sont discriminatoires de l'espèce sur milieu PDA, elles ne sont pas sur milieu SNA. La croissance de tous les isolats de *Trichoderma* spp. est plus lente sur milieu SNA. Selon Chaverri et al. (2003), la majorité des espèces de *Trichoderma* spp. possèdent des courbes de croissance discriminatoires, avec une croissance plus lente sur milieu SNA. En effet les courbes de croissance des isolats de *T. longibrachiatum* sont complètement différentes de celles des deux espèces de *T. atroviride* et de *T. harzianum*. Ainsi *T. longibrachiatum* pousse à 40°C sur les deux milieux utilisés, alors que la croissance des isolats appartenant aux espèces de *T. atroviride* et de *T. harzianum* est nulle.

Les courbes de croissance des isolats des deux espèces de *T. harzianum* et de *T. atroviride* sont presque identiques sur milieu PDA. Toutefois, une différence est remarquée à 35°C où tous les isolats de *T. harzianum* poussent rapidement, alors que les isolats de *T. atroviride* poussent très faiblement aussi bien sur milieu PDA que sur milieu SNA. Ces comportements sont comparables à ceux observés par Samuels et al. (2002). Ces deux dernières espèces ont longtemps été confondues dans la littérature par leurs caractères culturels proches (Hermosa et al. 2000 ; Dodd et al. 2003). Cependant le taux de croissance à 35°C permet de distinguer l'espèce *T. harzianum* de l'espèce *T. atroviride* (Samuels et al. 1998).

Concernant le pigment jaune vert brillant, caractéristique des espèces appartenant à la section *Longibrachiatum* (Bisset, 1984), il a été observé dans notre étude que ce pigment existait chez tous les isolats de *T. longibrachiatum* lorsqu'ils sont incubés à 20°C sur milieu PDA et absent à 40°C. Exceptionnellement chez l'isolat TL.8, ce pigment est présent à toutes les températures d'incubation, alors que chez les isolats TL1, TL2 et TL4 il est présent également à 30°C. En effet, une relation entre la température d'incubation et la production de pigment avait été rapportée par Chaverri et al. (2004) ; sur milieu SNA ce pigment est absent chez les dix isolats *T. longibrachiatum*.

Chez l'espèce *T. atroviride*, il y a absence de pigment sur le milieu de culture, alors que chez *T. harzianum* un pigment marron est observé pour l'isolat Th.12 à 30°C, avec la présence de pigment jaune orange pour l'isolat Th.16 à toutes les températures, et d'un pigment jaune chez l'isolat Th.18 à 25°C et 35°C sur milieu PDA. Selon Samuels et al. (2002), plusieurs isolats de *T. harzianum* ont tendance à produire un pigment jaune en milieu de culture (28 sur 35 isolats étudiés par les auteurs). Cependant un seul isolat *T. atroviride* produisait un pigment jaune sur l'ensemble des isolats étudiés par les mêmes auteurs.

Au cours de nos travaux, la présence d'une odeur de noix de coco chez les trois isolats appartenant à l'espèce *T. atroviride* cultivés sur milieu PDA est relevée. Cette odeur absente chez les isolats des deux autres espèces est caractéristique de l'antibiotique (antifongique volatil 6-pentyl- α -pyrone) mis en évidence chez *T. atroviride*, et également chez l'espèce proche *T. viride* Pers. :Fr (Dodd et al. 2003 ; Samuels et al. 2002). Cet antibiotique n'a pas été mis en évidence en dehors de la section *Trichoderma* (Dodd et al. 2003).

Il a été remarqué également que les caractères étudiés, telles les courbes de croissance discriminatoires de l'espèce, la présence de pigment jaune vert brillant caractéristique de l'espèce *T. longibrachiatum* et l'odeur de noix de coco (antifongique volatil) chez les isolats *T. atroviride*, sont plus conservées sur milieu PDA que sur milieu SNA.

4.5. Conclusion

A partir de cette étude, nous pouvons conclure que certaines caractères telles que la production de pigments, la présence d'odeur et la différence de la croissance à différentes températures, peuvent être discriminatoires pour les trois espèces étudiées. Le pigment jaune vert brillant caractéristique des espèces appartenant à la section *longibrachiatum* est associé avec tous les isolats *T. longibrachiatum*. L'odeur de noix de coco (caractéristique de l'antibiotique volatil 6-pentyl- α -pyrone) est associée à tous les isolats de *T. atroviride*. Le taux de croissance à 35°C permet de distinguer les deux espèces *T. harzianum* et *T. atroviride* qui ont été longuement confondues. De même, seuls les isolats appartenant à l'espèce *T. longibrachiatum* sont capables de pousser à 40°C.

▪

Chapitre 5.
Etude de l'activité antagoniste des
isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des deux
pathotypes du *Foc*

■

5.1. Introduction

Les *Trichoderma* spp. ont montré un grand potentiel dans la lutte contre les champignons telluriques et aériens sur différentes cultures. Sur plusieurs cultures, le contrôle de *Rhizoctonia solani* agent de fonte de semis et de pourriture racinaire par *T. harzianum* a entraîné une réduction de la maladie de 69 à 74% (Abdelkader, 1997). Egalement *T. harzianum* a diminué l'incidence de la maladie causée par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr sur plusieurs cultures (haricot, tomate, tabac ...), dont le taux de réduction varie de 25 à 100% (Harman *et al.*, 2004a). De Mayer *et al.* (1998) ont montré que le traitement du sol par *T. harzianum* T-39 a conduit à la réduction des symptômes de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur tomate, laitue, poivron, haricot et tabac. Harman *et al.* (2004b) ont observé que le traitement de la semence du maïs par *T. harzianum* T-22 réduisait les symptômes de l'antracnose à la suite d'une inoculation par *Colletotrichum graminicola* (Ges.) Wilson. Contre l'agent du flétrissement fusarien du pois chiche, Hervas *et al.* (1997), ont montré que l'apport de *T. harzianum* (biofongicide commercialisé) dans le sol, réduisait considérablement l'incidence de la maladie ; Dubey *et al.* (2007) ont montré l'efficacité de quelques isolats appartenant aux trois espèces : *T. viride*, *T. harzianum* et *T. virens*.

L'objectif de cette étude est d'évaluer et de comparer *in vitro* et *in planta* l'efficacité de quelques isolats appartenant à trois espèces de l'agent antagoniste *Trichoderma* spp. à savoir *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* dans la lutte contre l'agent du flétrissement fusarien du pois chiche (*Foc*).

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1 Isolement et conditions de culture de l'agent pathogène et des antagonistes

Deux isolats de l'agent pathogène *Foc* sont utilisés, dont un isolat appartenant au pathotype de flétrissement isolé à l'origine à partir des plants de pois chiche de la station ITGC Oued Smar, et un isolat du pathotype responsable de jaunissement, isolé à partir des plants provenant de la station ITGC (Sidi Bel Abbès).

L'agent antagoniste *Trichoderma* spp. utilisé est constitué de 18 isolats appartenant aux trois espèces *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride* isolés du sol, de la rhizosphère du pois chiche et de la semence du pois chiche et du blé, précédemment identifiés et caractérisés.

Les isolats sont conservés à 4°C sous forme de cultures monospores en tubes inclinés contenant le milieu PDA. Lors des tests dans cette étude, les isolats sont repiqués sur milieu PDA et incubés à 25 °C sous lumière continue.

5.2.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué par la variété de pois chiche ILC 3279, connue par sa sensibilité à la fusariose

5.2.3. Activité antagoniste *in vitro*

L'action des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne du *Foc* est réalisée selon deux méthodes : confrontation directe et confrontation indirecte (à distance).

5.2.3.1. Confrontation directe

La technique utilisée est celle décrite par Benhamou et Chet (1996), qui consiste à mettre en confrontation l'agent antagoniste et le *Foc* dans une même boîte de Pétri contenant le milieu PDA, deux explants de 5mm de diamètre des protagonistes prélevés de cultures âgées de 7 jours et sont déposés en même temps selon un axe diamétral à 5 cm et équidistant du centre de la boîte (Fig. 32). Le nombre de répétition est de quatre pour chaque combinaison de *Trichoderma*/*Foc* ; un témoin contenant uniquement le *Foc* est utilisé à raison de quatre boîtes. L'incubation est réalisée à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours. Des notations sur l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies du *Foc* et leur envahissement par les isolats de *Trichoderma* spp. sont

effectuées tous les deux jours. De plus, des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur le mycélium du *Foc*, sont faites à partir de la zone de contact.

Figure 32. Schéma montrant la confrontation à distance entre le *Foc* et *Trichoderma* spp. sur milieu PDA

5.2.3.2. Confrontation à distance sur milieu PDA

Cette méthode décrite par Ibrahim et al. (1996), consiste à repiquer l'antagoniste et l'agent pathogène dans deux boîtes séparées contenant le milieu PDA (explant de 5 mm de diamètre âgé de 7 jours déposé au centre de la boîte). Puis, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma* en bas et le *Foc* en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du parafilm pour éviter les pertes en substances volatiles. Trois répétitions pour chaque isolat de *Trichoderma* sont réalisées. Le témoin est constitué par la superposition de deux boîtes, celle du haut contenant un explant de 5 mm de diamètre du *Foc* alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA, à raison de trois répétitions (Fig. 33). Les boîtes sont mises à incuber à 25°C à l'obscurité. La notation du diamètre moyen des colonies du *Foc* est réalisée après 5 jours.

L'évaluation de l'inhibition exercée par les isolats de *Trichoderma* spp. sur le *Foc* dans les deux méthodes, est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante :

$I (\%) = (1 - C_n / C_0) \times 100$. Où : C_n : diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste (mm). C_0 : diamètre moyen des colonies témoins (mm).

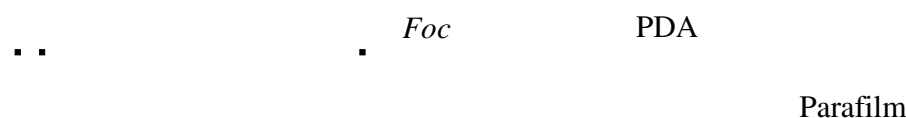


Figure 33. Schéma montrant la confrontation à distance entre le *Foc* et *Trichoderma* spp. sur milieu PDA

5.2.3.3. Effet de l'agent antagoniste sur la sporulation du *Foc*

Ce test est réalisé selon la technique décrite par Ibrahim et al. (1996), qui consiste à prendre des fragments de 5 mm² à partir des boîtes de Pétri où sont réalisées les confrontations directes. Les prélèvements sont effectués au 7^{ème} jour, à une distance de 5 mm du front de confrontation

pour les colonies du *Foc*, et de la périphérie pour les témoins. Les fragments sont mis dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée stérile et après agitation, la concentration en spores est déterminée.

5.2.4. Activité antagoniste *in planta*

L'apport de l'agent antagoniste est réalisé par traitement des graines de pois chiche par une suspension de spores de *Trichoderma* spp. avant le semis dans un sol préalablement inoculé par le *Foc*.

5.2.4.1. Inoculation du sol par le *Foc*

L'inoculation du sol par l'agent pathogène (*Foc*) est réalisée selon la technique décrite par Singh et al. (1979). Elle consiste à ensemercer un substrat constitué d'un mélange de sable tamisé, farine de maïs et l'eau distillée dans les proportions 9 :1 :2 par des explants du *Foc*. Le substrat est réparti dans des sachets autoclavables, puis stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. L'inoculation du substrat stérilisé est effectuée par des explants (5 mm de diamètre) d'une culture de *Foc* âgée de 15 jours cultivée sur milieu PDA, à raison de 5 explants/100g de substrat ; l'incubation est réalisée à 25°C sous lumière continue pendant 15 jours. Durant cette période d'incubation, une agitation des sachets est effectuée tous les 4 à 5 jours, afin de permettre une bonne homogénéisation du champignon. L'inoculum est ensuite incorporé dans le sol à raison de 100 g /Kg de sol (Fig. 34). Les terrines sont recouvertes par du plastique pendant 15 jours pour avoir une bonne colonisation par le *Foc*. Une partie de l'essai est réalisée dans un sol stérilisé et une autre partie dans un sol non stérilisé.

5.2.4.2. Traitement de la semence par les isolats de *Trichoderma* spp.

La technique préconisée est celle décrite par Harman et al.(1989), qui consiste à tremper les grains de pois chiche dans une solution de spores d'une concentration de 10^6 - 10^7 spores/ml et à raison de 1 ml / 4g de semence. Les grains traités sont ensuite incubés pendant 24h à 25°C, puis sont semés à raison de 16 grains par terrines dans un sol préalablement stérilisé et inoculé par

l'agent pathogène (*Foc*) à raison de quatre terrines par isolat de *Trichoderma* spp. Deux types de témoins sont utilisés : un témoin positif avec des grains de pois chiche semés dans un sol inoculé par le *Foc*, et un témoin négatif constitué par des grains de pois chiches semés dans un sol non inoculé par le *Foc*. Les plants de pois chiche sont arrosés une fois par semaine par la solution nutritive de Hoagland.

L'évaluation de la sévérité des symptômes est exprimée selon une échelle de notation à 5 degrés (Landa *et al.* 1997, Hervás *et al.* 1997, Landa *et al.* 2001), allant de 0 à 4, où chaque degré correspond à un pourcentage de feuilles présentant des symptômes de jaunissement ou de flétrissement (0 : aucun symptôme ; 1 : 1 à 33 % de feuilles jaunies ou flétries ; 2 : 34 à 66 % de feuilles jaunies ou flétries ; 3 : 67 à 100 % de feuilles jaunies ou flétries ; 4 : plants morts).

5.2.4.3. Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la stimulation de la croissance du pois chiche

Pour évaluer l'effet des isolats de *Trichoderma* spp sur les paramètres de la croissance végétale, 60 jours après le semis, la hauteur de la tige et le poids frais sont mesurés immédiatement ; le poids sec est estimé après incubation à 60°C pendant 72h. L'évaluation du taux de stimulation des paramètres de croissance par rapport au témoin est calculée selon la formule : $S (\%) = (C/C_0 - 1) \cdot 100$ C : Croissance des plants traités, C0 : Croissance du témoin

5.2.5. Analyse statistique

Les résultats relatifs aux tests *in vitro* et *in vivo* sont interprétés après une analyse de la variance pour un seul facteur, par l'utilisation du logiciel STATGRAPHICS Plus version 5.1. Les différences entre les isolats pour les paramètres étudiés sont comparées par le biais du test LSD de Fisher au seuil de 5% (LSD : least significative difference). La corrélation entre les

différents paramètres étudiés est déterminée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson, en utilisant le logiciel SPSS version 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences)

5.3. Résultats

5.3.1. Action *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance et la sporulation des deux pathotypes du *Foc*.

L'étude de l'activité antagoniste *in vitro*, a montré des taux considérables de réduction de la croissance aussi bien par la confrontation directe que la confrontation indirecte, ainsi que de la sporulation par rapport au témoin. Ces réductions sont obtenues par la confrontation des isolats étudiés avec les deux pathotypes de flétrissement et de jaunissement.

Cette efficacité de réduction de la croissance mycélienne est plus marquée à l'égard du pathotype de jaunissement pour les deux cas de la confrontation, directe et indirecte. L'isolat de *T. atroviride* (Ta.13) a donné le taux de croissance le plus faible pour la confrontation directe et indirecte chez les deux pathotypes. En particulier, chez le pathotype de flétrissement il est enregistré dans la confrontation directe un taux de croissance de 22,23 mm par rapport au témoin ayant atteint 65 mm, et dans la confrontation indirecte 25,66 mm par rapport au témoin qui a atteint 50 mm, ce qui représente des pourcentages de réduction de 65,64 % et 48,66 % respectivement. Chez le pathotype de jaunissement, la réduction est encore plus importante avec un taux de croissance de 9,33 mm par rapport au témoin ayant atteint 60mm, soit un pourcentage de réduction de 84,44 %. Dans la confrontation indirecte, le taux de croissance obtenu est de 12,33 mm par rapport au témoin ayant atteint 58 mm soit un pourcentage de réduction de la croissance de 78,73 %. Une absence totale de la sporulation chez les deux pathotypes est enregistrée avec l'isolat Ta.13.

Les résultats obtenus par cet essai ont montré que l'efficacité des isolats dans la réduction de la croissance et de la sporulation (cas de la confrontation directe) n'est pas associée à une espèce donnée de *Trichoderma* spp. (Tableau 7 et 8). Mais, il est remarqué que dans le cas de la confrontation indirecte, les isolats qui se sont montrés les plus efficaces dans la réduction de la croissance du *Foc* à distance, sont les trois isolats appartenant à l'espèce *T. atroviride*, ainsi que l'isolat Th16 (*T. harzianum*). Le pourcentage de réduction le plus élevé pour le pathotype de flétrissement est obtenu avec l'isolat Ta.13 (48,66 %), suivi de l'isolat Th.16 (39,39 %), ensuite

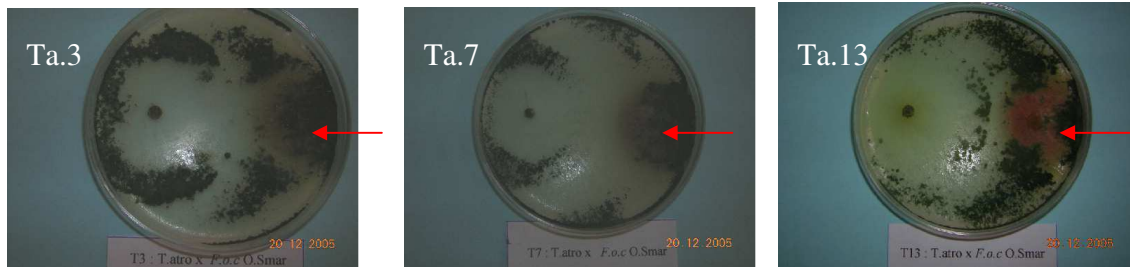
les deux isolats *T. atroviride* (Ta.7 et Ta.3), avec un pourcentage de réduction de 36 %. Chez le pathotype de jaunissement le taux de croissance le plus faible est 12,33 mm et un pourcentage de réduction le plus élevé soit 78,73 %, est obtenu par l'effet de l'isolat Ta.13 de *T. atroviride*, suivi par l'isolat Ta.3 (78,16 %), ensuite l'isolat Ta.7 (64, 24%) ; un pourcentage de réduction de 59,77 % est obtenu avec l'isolat Th.16 de *T. harzianum*.

Ces résultats font ressortir une efficacité plus élevée de ces isolats contre le pathotype de jaunissement. Une variabilité est notée pour le reste des isolats appartenant aux deux espèces *T. harzianum* et *T. longibrachiatum*. (Tableau 7 et 8 ; Fig. 35, 36, 37, 38, 39 et 40).

Les observations microscopiques réalisées à la périphérie des colonies du *Foc* (lors de la confrontation indirecte) montrent l'existence de perturbations au niveau du mycélium des deux pathotypes, se traduisant par la présence de filaments stériles, et un arrêt de la croissance mycélienne (Fig. 41).

Il est à signaler qu'avec les isolats appartenant à l'espèce *T. atroviride*, un recouvrement total de la colonie du *Foc* est noté avec une abondante sporulation dès le 5^{ème} jour de confrontation pour les deux pathotypes de jaunissement et de flétrissement lors de la confrontation directe (Fig.35). Les isolats des deux espèces de *T. longibrachiatum* et de *T. harzianum* n'envahissent pas la colonie du *Foc* même après 4 semaines d'incubation. Une forte sporulation autour de la colonie du *Foc* est notée pour les isolats de *T. longibrachiatum* (Fig. 36). Chez les isolats de *T. harzianum*, une zone de lyse de 2mm de diamètre est notée au contact entre la colonie du *Foc* des deux pathotypes et la colonie de l'isolat Th.16 de *T. harzianum* (Fig. 37).

Les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les différents isolats de *Trichoderma* spp. et les deux pathotypes du *Foc*, montrent l'existence de modifications au niveau du mycélium du pathogène, se traduisant par une lyse et dégradation du mycélium (constatation observée avec l'isolat Th.16). Une transformation en cordons des filaments mycéliens (observée avec l'isolat Ta.7), et un enroulement du mycélium des isolats de *Trichoderma* autour du *Foc* (observé avec les isolats de TL.4, TL.9 et Th.15), alors que chez l'agent antagoniste *Trichoderma* spp., des ramifications excessives du mycélium sont observées (Fig. 42).



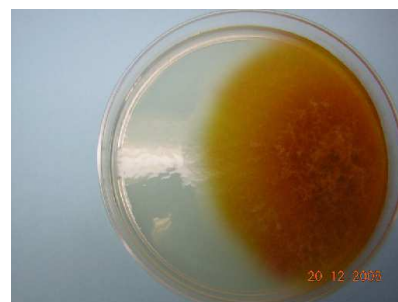
a. Confrontation au pathotype de flétrissement

.....

b. Confrontation au pathotype de jaunissement

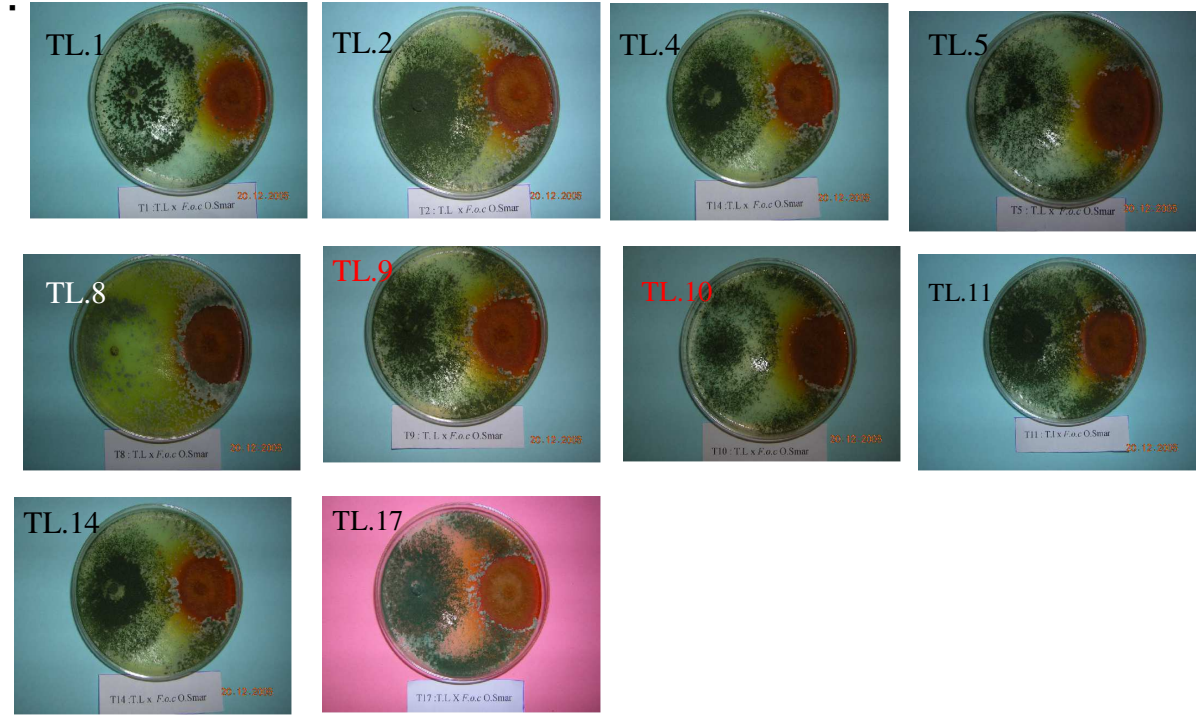
..

Témoin : Pathotype de jaunissement



ment

Figure 35. Confrontation directe des isolats de *T. atroviride* à l'égard des deux pathotypes du *Foc*. Envahissement total des colonies du *Foc* par *T. atroviride*

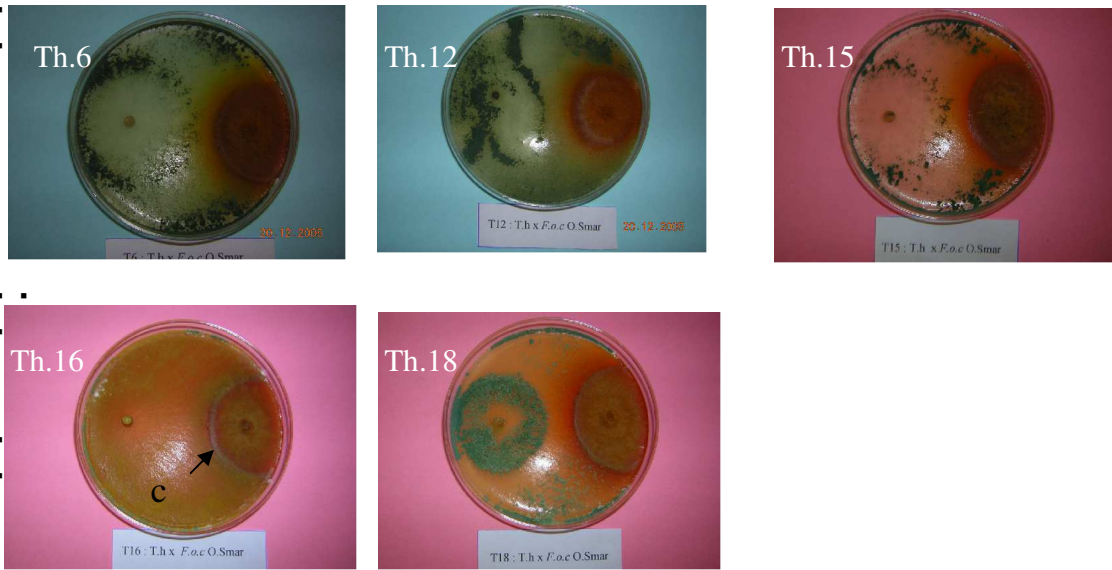


a. Confrontation au pathotype de flétrissement

.....

b. Confrontation au pathotype de jaunissement

Figure 36. Confrontation directe des isolats de *T. longibachiatum* à l'égard des deux pathotypes du *Foc*.



a. Confrontation au pathotype de flétrissement

.....

....

b. Confrontation au pathotype de jaunissement

Figure 37. Confrontation directe des isolats de *T. harzianum* à l'égard des deux pathotypes du *Foc*
 c : Zone de lyse dans la zone de contact entre les colonies de l'isolat Th.6 et les deux pathotypes de *Foc*.



.....

.....

.....

a. Confrontation au pathotype de flétrissement

.....

b. Confrontation au pathotype de jaunissement

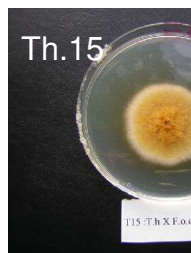
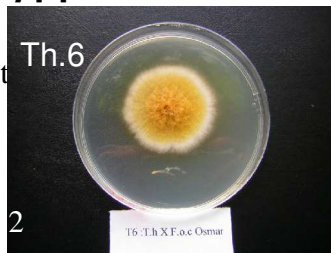
Témoin : Pathotype de flétrissement

Témoin : Pathotype de jaunissement

Figure 38. Confrontation indirecte des isolats de *T. atroviride* à l'égard des deux pathotypes du *Foc*. F : *Foc*, T : *Trichoderma*.

SHAPE * MERGEFORMAT

a. confrontation au pathotype de flétrissement

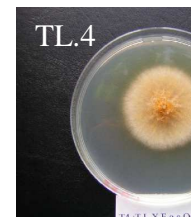
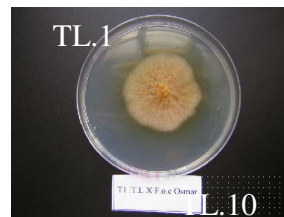


b. confrontation au pathotype de jaunissement



Figure 39. Confrontation indirecte des isolats de *T. atroviride* avec les pathotypes du *Foc*.

SHAPE
a. Confrontation au pathotype de flétrissement



b. Confrontation au pathotype de jaunissement

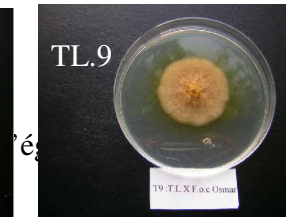
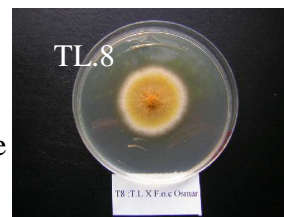
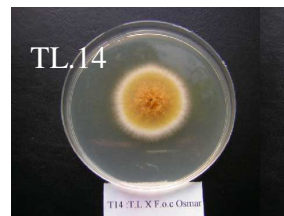


Figure 40. Confrontation indirecte des isolats de *T. atroviride* avec les pathotypes du *Foc*.



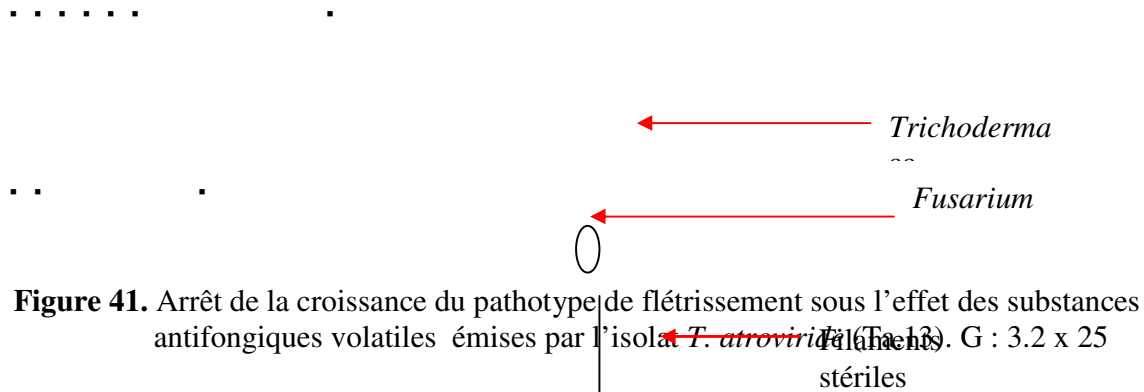


Figure 41. Arrêt de la croissance du pathotype de flétrissement sous l'effet des substances antifongiques volatiles émises par l'isolat *T. atroviride* (T.13). G : 3.2 x 25 stériles

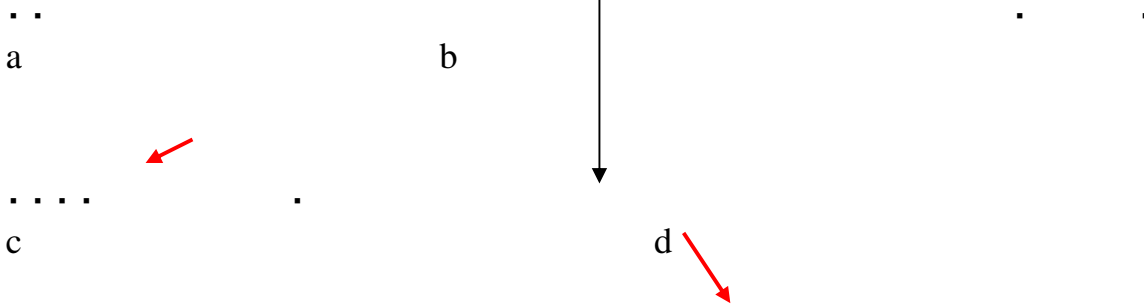


Figure 42. Modifications morphologiques affectant le mycélium du *Foc* (G : 3.2 x 25).

- a : Enroulement du mycélium de *Trichoderma* autour du *Foc*
- b : Transformation en cordons du mycélium du *Foc* sous l'effet du contact avec celui du *Trichoderma*
- c : modification morphologique affectant le mycélium
- d : zone de lyse

Tableau 7. Effet des isolats de *Trichoderma* spp sur la croissance et la sporulation du pathotype de flétrissement

<i>Trichoderma</i> Spp	Confrontation directe		Confrontation indirecte		Sporulation	
	Diamètre de la colonie (mm)	% de réduction	Diamètre de la colonie	% de réduction	Concentration Spore/ml 10^4	% de réduction

TL.1	25,66 b	60,51	46,33 g	09,33	08,33 cd	65,28
TL.2	26,66 bc	58,97	40,66 cde	18,66	08,00 cd	66,66
TL.4	31,00 ef	52,31	41,33 cdef	17,33	05,00 bc	79,17
TL.5	28,00 bcd	56,92	44,66 fg	10,66	05,00 bc	79,16
TL.8	33,00 f	49,23	40,66 cde	18,66	03,33 b	86,11
TL.9	33,00 f	49,23	40,33 cde	19,33	01,00 ab	95,83
TL.10	31,00 ef	52,31	42,00 def	16,66	02,00 ab	91,67
TL.11	31,33 ef	51,79	38,00 c	24,00	02,00 ab	91,66
TL.14	33,33 f	48,71	41,66 def	16,66	02,33 ab	90,27
TL.17	33,00 f	49,23	43,00efg	14,00	00,66 a	97,22
Th.6	30,66 def	52,82	44,33 fg	11,33	01,33 ab	94,44
Th.12	33,00 f	49,29	42,33 def	15,33	02,00 ab	91,67
Th.15	33,33 f	48,71	41,66 def	17,33	01,66 ab	93,05
Th.16	31,00 ef	52,31	30,33 b	39,33	00,33 a	98,61
Th.18	33,33 f	48,71	39,00 cd	22,00	10,00 d	58,33
Ta.3	29,00 cde	55,60	32,00 b	36,00	02,66 b	88,89
Ta.7	28,66 cde	55,89	32,00 b	36,00	03,33 b	86,11
Ta.13	22,23 a	65,64	25,66 a	48,66	00,00 a	100
Témoïn	65,00 g	-	50,00 h	-	24,00e	-

Les valeurs qui sont suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test LSD de Fisher au seuil de 5%.

Tableau 8. Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance et la sporulation du pathotype de jaunissement

<i>Trichoderma</i>	<u>Confrontation directe</u>	<u>Confrontation indirecte</u>	<u>Sporulation</u>
--------------------	------------------------------	--------------------------------	--------------------

spp.	Diamètre de la colonie (mm)	% de réduction	Diamètre de la colonie mm	% réduction	Concentration Spore/ml 10 ⁴	% de réduction
TL.1	18,66 cdef	68,89	42,33 ghi	27,01	13,66 f	72,66
TL.2	15,33 bc	74,44	40,33 efgh	30,45	11,33 def	77,33
TL.4	14,66 bc	75,50	37,30 def	35,63	10,66 def	78,66
TL.5	13,33 ab	77,77	43,00 hi	25,86	08,00 bcdef	84,00
TL.8	16,33 bcde	72,77	29,33 d	49,42	10,66 def	78,66
TL.9	15,00 bc	75,00	41,33 fghi	28,73	05,66 abcd	88,66
TL.10	22,00 f	63,33	36,33 de	37,35	05,66 abcd	88,66
TL.11	13,00 ab	78,33	44,66 ij	22,98	09,33 cdef	81,33
TL.14	19,66 ef	67,22	29,33 d	50,00.	05,66 abcd	88,66
TL.17	18,00 cdef	70,00	38,33 efgh	33,90	06,66 bcde	86,66
Th.6	16,66 bcde	72,22	27,33 cd	52,87	05,33 abcd	89,33
Th.12	22,00 f	63,88	48,00 j	17,24	06,00 abcde	88,00
Th.15	20,33 f	66,11	35,00 e	39,65	12,00 ef	76,00
Th.16	18,00 cde f	69,99	23,33 c	59,77	03,33 abc	93,33
Th.18	17,00 cdef	71,66	26,33 cd	54,59	36,66 g	26,66
Ta.3	14,0066 bc	75,55	12,66 a	78,16	08,33 bcdef	83,33
Ta.7	15,66 bcd	73,89	19,00 b	67,24	02,33 ab	95,33
Ta.13	09,33 a	84,44	12,33 a	78,73	00 a	100
T	60,00 g	-	58,00 k	-	50,00 e	-

Les valeurs qui sont suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test LSD de Fisher au seuil de 5%.

5.3.2. Corrélation entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur les paramètres étudiés *in vitro*.

Les relations qui peuvent exister entre les différents paramètres étudiés *in vitro* sont calculées par le coefficient de corrélation de Pearson. Sur les 6 coefficients de corrélation calculés sur l'effet des 18 isolats de *Trichoderma* spp. contre les deux pathotypes du *Foc*, aucune corrélation n'est statistiquement significative au seuil de 5 % ($P < 0.05$) pour les paramètres étudiés : confrontation directe et confrontation indirecte, confrontation directe et la sporulation, confrontation indirecte et la sporulation,

Cependant des corrélations positives sont notées entre l'efficacité des isolats dans les deux cas de la confrontation directe et indirecte des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des deux pathotypes de flétrissement et de jaunissement. Ainsi, un coefficient de corrélation positive $r = 0,57$ au seuil de 5 % est enregistré entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. dans l'inhibition de la croissance du pathotype de flétrissement et celui de jaunissement dans la confrontation directe. Egalement dans la confrontation indirecte un coefficient de corrélation positive $r = 0,77$ au seuil de 1% est obtenu entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. dans l'inhibition de la croissance du pathotype de flétrissement et celui de jaunissement.

Concernant l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance et la sporulation du pathotype de flétrissement et de celui du jaunissement, un coefficient positive $r = 0,77$ au seuil de 1% est obtenu.

5.3.3. Action des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des deux pathotypes du *Foc* *in planta*

5.3.3.1 Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur le développement de la maladie

L'évaluation de l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la protection des plants de pois chiche contre la maladie, est évaluée au 60^{ème} jour après le semis. L'indice de maladie des plants traités par les différents isolats de *Trichoderma* spp. est nettement plus faible, par rapport au témoin non traité (Fig. 43).

Le pathotype de flétrissement a montré l'indice de maladie le plus faible (0,45) et le pourcentage de réduction de l'indice de maladie le plus élevé 83,92 % par l'isolat *T. atroviride* (Ta.3) dans le sol stérilisé. Les deux autres isolats (Ta.7 et Ta.13) de *T. atroviride* ont donné des indices de maladie de 0.50 et 0.60, et des pourcentages de réduction de

• •
 • •

Figure 43. Symptômes de jaunissement (a) et flétrissement (b) induits par les deux pathotypes du *Foc*

82,14 % et 78,57 % respectivement. Avec l'isolat *T. harzianum* (T16) un indice de maladie de 0.76 et un pourcentage de réduction de 73,21 % sont enregistrés par rapport au témoin qui a présenté un indice de 2,8.

Pour le même pathotype dans le sol non stérilisé, les trois isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13) et l'isolat de *T. harzianum* (Th.16) se sont montrés les plus efficaces dans la réduction de la maladie. En effet les indices de maladies sont respectivement de 0.40, 0.45, 0,50 et 0,75 et les pourcentages de réduction sont de 81,48 %, 79,16 %, 76,85 % et 65,27 % pour les isolats Ta.3, Ta.7, Ta.13 et Th.16 respectivement. Comparés aux plants témoins et traités, les indices de maladies et les pourcentages de réduction restent légèrement inférieurs dans le sol non stérilisé que dans le sol stérilisé (Tableau 9).

Chez le pathotype de jaunissement, également les isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13) et l'isolat *T. harzianum* (Th.16) sont plus efficaces dans la réduction de l'indice de maladie. Cependant, ces indices sont légèrement plus faibles dans un sol non stérilisé aussi bien pour les plants témoins que pour les plants traités. L'indice de maladie le plus faible 0,46 est obtenu avec l'isolat Ta.7 dans un sol stérilisé et 0,3 dans un sol non stérilisé avec des pourcentages de réductions respectifs de 77 % et 77,44 %. Concernant la réduction de l'indice de maladie, une différence est notée dans l'efficacité des isolats entre le sol stérilisé et le sol non stérilisé. Ainsi, l'isolat Ta. 3 a induit un taux de réduction de 62,5 % dans le sol stérilisé et une réduction de 54,89 % dans un sol non stérilisé. Il a été noté pour l'isolat Ta.13 un taux de réduction presque identique de 62,5 % dans un sol stérilisé et 62,4 % dans un sol non stérilisé.

Néanmoins pour l'isolat de *T. harzianum* (Th.16), un pourcentage de réduction légèrement plus important est enregistré dans le sol non stérilisé 54,89 % par rapport au sol stérilisé au niveau duquel le pourcentage de réduction est de 53,50 %.

L'ensemble des résultats obtenus avec le pathotype de jaunissement montrent que l'isolat Ta.3 est plus efficace dans un sol stérilisé, l'isolat de *T. harzianum* (Th.16) est plus efficace dans un sol non stérilisé, alors que les deux isolats Ta.7 et Ta.13 ont pratiquement la même efficacité dans les deux types de sol (Tableau 10).

Nous avons constaté que pour la majorité des isolats de *Trichoderma* spp., les pourcentages de réduction de l'indice de maladie sont plus importants dans un sol stérilisé et que leur efficacité est plus marquée contre le pathotype de flétrissement. L'action des isolats appartenant aux deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. harzianum* contre les deux pathotypes du *Foc* sur l'incidence de la maladie est variable et indépendante de l'espèce, montrant ainsi l'existence d'une certaine variabilité dans l'activité antagoniste *in vivo* à l'intérieur de ces dernières (Tableau 9 et 10).

Tableau 9. Effet des isolats de *Trichoderma* spp sur l'indice de maladie du pathotype de flétrissement

<i>Trichoderma</i> spp.	Sol stérilisé		Sol non stérilisé	
	IM	% de réduction De IM	IM	% de réduction de IM
TL.1	01,44 bc	48,57	01,20 cde	44,00
TL.2	01,90 d	32,14	01,60 f	25,92
TL.4	01,41 bc	49,64	01,30 de	39,81
TL.5	01,35b	51,78	01,35 e	37,50
TL.8	01,48 bc	47,50	01,20 cde	44,00
TL.9	01,27 b	54,64	01,25 cd	49,07
TL.10	01,75 cd	37,50	01,40 ef	35,18
TL.11	01,34 b	52,14	01,05 c	51,38
TL.14	01,45 bc	48,21	01,20 cde	44,44
TL.17	02,31 e	17,50	02,05 g	05,09
Th.6	01,34 b	52,14	01,25 cd	49,07
Th.12	01,21 b	52,78	01,25cd	49,07
Th.15	01,30 b	53,57	01,05 c	51,13
Th.16	00,75 a	73,21	00,75 b	65,27
Th.18	02,50 ef	10,71	02,10 g	02,78
Ta.3	00,45 a	83,92	00,40 a	81,48
Ta.7	00,50 a	82,14	00,45 a	79,16

Ta.13	00,60 a	78,57	00,50 a	76,85
T+	02,80 f	-	02,16 g	-

Les indices de maladies suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD de Fisher au seuil de 5%.

Tableau 10. Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie du pathotype de jaunissement

<i>Trichoderma</i> spp.	<u>Sol stérilisé</u>		<u>Sol non stérilisé</u>	
	IM	% de réduction De IM	I M	% de réduction de IM
TL.1	01,45 e	27,00	01,05 efg	21,05
TL.2	01,46 e	27,00	01,10 fg	17,29
TL.4	01,14 cd	43,00	00,90 def	32,33
TL.5	01,13 cd	43,50	00,95 def	28,57
TL.8	01,00 cd	50,00	00,95 def	32,33
TL.9	01,10 cd	45,00	00,96 def	27,31
TL.10	01,64 ef	18,00	10,20 gh	09,77
TL.11	01,00 cd	50,00	00,80 cd	39,85
TL.14	01,20 d	40,00	00,85 de	36,09
TL.17	01,50 e	25,00	01,10 fg	17,29
Th.6	01,58 ef	21,00	01,20 gh	09,77
Th.12	01,21 d	39,50	00,98 def	26,31

Th.15	01,00 cd	50,00	00,80 cd	39,85
Th.16	00,93 bc	53,50	00,60 bc	54,89
Th.18	01,75 f	12,50	01,25 gh	06,01
Ta.3	00,75 b	62,50	00,60 bc	54,89
Ta.7	00,46 a	77,00	00,30 a	77,44
Ta.13	00,75 b	62,50	00,50 ab	62,40
T+	02,00 g		01,33 h	

Les chiffres suivis des mêmes lettres pour chaque paramètre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD au seuil de 5%.

5.3.3.2. Corrélation entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie des pathotypes de flétrissement et de jaunissement

Les coefficients de corrélation des indices de maladie montre l'existence d'une corrélation positive dans les cas suivants :

1- Un coefficient $r=0,97$ au seuil de 1 % existe entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie du pathotype de flétrissement dans le sol stérilisé et l'indice de maladie du même pathotype dans le sol non stérilisé

2- Un coefficient de corrélation $r=0,99$ au seuil de 1 %. est obtenu entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie du pathotype de jaunissement dans le sol stérilisé et l'indice de maladie du même pathotype dans le sol non stérilisé.

3- Un coefficient de corrélation $r=0,85$ au seuil de 1 % existe entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie du pathotype de flétrissement et l'indice de maladie du pathotype de jaunissement dans le sol stérilisé.

4- Un coefficient de corrélation $r=0,87$ au seuil 1 % existe entre l'effet des isolats *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie du pathotype de flétrissement et l'indice de maladie du pathotype de jaunissement dans le sol non stérilisé.

5.3.3.3. Analyse comparative de l'efficacité des isolats de *Trichoderma* spp. *in planta* et *in vitro*.

Parmi les 12 coefficients de corrélation calculés pour l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie, la sporulation et la croissance dans le cas de la confrontation directe et indirecte, seuls 4 coefficients sont statistiquement significatifs.

Un coefficient de corrélation positive $r=0,64$ au seuil de 1 % est obtenu entre l'indice de maladie du pathotype de flétrissement dans un sol stérilisé et la croissance mycélienne lors de la confrontation indirecte.

Un coefficient de corrélation $r=0,68$ au seuil 1% est obtenu entre l'indice de maladie du pathotype de flétrissement dans un sol non stérilisé et la croissance mycélienne lors de la confrontation indirecte

Un coefficient de corrélation positive $r=0,58$ au seuil de 5% est obtenu entre l'indice de maladie du pathotype de jaunissement dans un sol non stérilisé et la croissance mycélienne lors de la confrontation indirecte.

Un coefficient de corrélation $r=0,47$ au seuil de 5% est obtenu entre l'indice de maladie du pathotype de jaunissement dans un sol stérilisé et la sporulation

5.3.3.4. Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la stimulation de la croissance végétale du pois chiche.

L'évaluation de l'effet des isolats de *Trichoderma* spp sur la croissance du pois chiche est évaluée 60 jours après le semis sur des plants traités par les isolats de *Trichoderma* spp. et inoculés par les deux pathotypes du *Foc*.

Chez les plants de pois chiche inoculés par le pathotype de flétrissement dans un sol stérilisé, certains isolats de *Trichoderma* spp. ont induit une augmentation significative de la hauteur de la tige par rapport au témoin ; c'est le cas des isolats de *T. longibrachiatum* (TL.4, TL.5, TL.8), de *T. harzianum* (T.h.6, Th.16 et T.h 18), et les isolats de *T. atroviride* (T a.3 et Ta.7). L'isolat qui a donné le taux de stimulation le plus élevé (18,85 %) est l'isolat TL.4. Par contre d'autres isolats n'ont montré aucun effet positif sur la hauteur de la tige. Cependant, tous les isolats de *Trichoderma* ont induit un effet positif sur le poids frais et le poids sec des plants traités qui sont significativement supérieurs au témoin. Le taux de stimulation le plus élevé est obtenu avec l'isolat TL.5, avec un taux de 80,89 % pour le poids frais et 94,11 % pour le poids sec.

Dans un sol non stérilisé et pour les plants inoculés avec le pathotype de flétrissement, certains isolats ont induit une croissance significativement supérieure au témoin tels que les isolats de *T. longibrachiatum* (TL.1, TL.2, TL.4, TL.9, TL.17), les isolats de *T. harzianum* (Th.6 et Th.18), et les isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13). L'isolat qui a montré le taux d'augmentation de la hauteur de tige le plus élevé est l'isolat TL.5, avec un taux de stimulation de 25,8 %. La plupart des isolats ont également induit un effet positif sur le poids frais et le poids sec qui sont significativement supérieurs au témoin. En particulier l'isolat TL.10 a provoqué le taux de stimulation le plus élevé, avec un taux de stimulation de 70,03 % pour le poids frais et 84.61 % pour le poids sec (Tab.11 et 12).

L'ensemble des mesures de croissance effectuées sur les plants inoculés par le pathotype de jaunissement, ont montré que certains isolats ont un effet significativement supérieur au témoin concernant les trois paramètres de croissance : hauteur de la tige, poids frais ainsi que poids sec. Par contre pour d'autres isolats la différence n'est pas statistiquement significative par rapport au témoin (Tab. 13 et 14) ; l'isolat *T. longibrachiatum* (TL.9) a induit les taux de stimulation les plus élevés, soit 29,12 % pour la hauteur de la tige, 55,29 % pour le poids frais et 63,15 % pour le poids sec dans un sol stérilisé. Dans un sol non stérilisé, c'est l'isolat TL.9 qui s'est montré le plus efficace en induisant une augmentation de 40,80 % de la hauteur de la tige, 63,33 % du poids frais et 96,72 % du poids sec.

Tableau 11. Effet des isolats de *Trichoderma* spp sur la croissance du pois chiche.
(Pathotype de flétrissement dans le sol stérilisé)

<i>Trichoderma</i> spp.	HT cm	S (%)	Poids frais	S (%)	Poids sec	S (%)
TL1	33,57 abcde	05,66	06,15 cd	52,60	01,34 cdef	57,64
TL.2	33,81 abcde	06,42	06,98de	73,20	01,28 bcde	50,58
TL.4	37,76 fg	18,85	05,77 bc	43,17	01,36 cdef	60,00
TL.5	35,08 cdef	10,41	07,29 e	80,89	01,65 g	94,11
TL.8	35,71defg	12,40	05,71 bc	41,68	01,48 fg	74,11
TL.9	35,60defg	12,05	07,11 e	76,42	01,55 fg	82,35
TL.10	33,29abcd	04,78	06,74d	67,24	01,48 efg	74,11
TL.11	32,75abc	03,08	05,43bc	34,73	01,19bcd	40,00
TL.14	33,77abcde	06,29	05,16 b	28,03	01,05 ab	02,00
TL.17	33,75 abcde	06,23	05,63 bc	39,70	01,21 bcde	42,35
Th.6	34,85 bcdef	09,69	05,63 b	39,70	01,18 bcd	38,42
Th.12	32,39ab	01,95	05,44 bc	34,98	01,32 cdef	42,35
Th.15	33,17abcd	04,40	05,17b	28,28	01,13 abc	32,94
Th.16	36,68 fg	15,45	05,84 bc	44,91	01,26 bcde	48,23
Th.18	35,92 efg	13,06	05,18 b	28,53	01,24 bcde	45,88
Ta.3	35,70 defg	12,37	05,52 bc	36,97	01,27 bcde	49,41
Ta.7	36,90 fg	16,14	05,82 bc	44,41	01,37 cdef	61,17
Ta.13	32,40 ab	01,98	05,44 bc	34,90	01,42 defg	67,05
T+	31,77 a	-	04,03 a	-	00,85 a	-

HT: hauteur de la tige ; S (%) pourcentage de stimulation

Les chiffres suivis des mêmes lettres pour chaque paramètre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD au seuil de 5 %.

Tableau 12. Effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance du pois chiche (Pathotype de fletrissement dans le sol non stérilisé)

<i>Trichoderma</i> spp.	HT cm	S(%)	Poids frais	S (%)	Poids sec	S (%)
T+	29,70 a		02,87 a		00,65 a	
TL.1	34,35 cdefg	15,65	04,16 cdef	44,94	00,95 cdef	46.15
TL.2	35,36 efg	19,05	04,18 cdef	45,64	01,01 ef	55.38
TL.4	33,43 bcdef	12,55	04,26 cdef	48,43	01,13 fg	73.84
TL.5	37,38 g	25,80	04,65 fg	62,02	00,89 bcde	36.92
TL.8	32,05 abcd	07,91	04,09 cdef	42,50	00,72 ab	10.76
TL.9	35,95 efg	21,04	04,05 cdef	41,11	00,78 abc	20.00
TL.10	32,63 abcde	09,86	04,88 g	70,03	01,20 g	84.61
TL.11	32,51 abcde	09,46	04,03 cdef	40,41	00,81 abcd	24.61
TL.14	30,74 ab	03,50	03,55 abc	23,69	00,78 abcd	02.00
TL.17	32,95 bcdef	10,94	04,50 efg	56,79	00,96 def	47.69
Th.6	33,32 bcdef	12,10	04,00 cdef	39,37	00,91 cde	40.00
Th.12	32,33 abcde	08,85	03,98 cdef	39,37	00,89 bcde	36.92
Th.15	31,45 abc	05,85	04,42 efg	54,00	00,95 cdef	46.15
Th.16	31,37 abc	05,62	03,95 cde	37,60	00,86 bcde	32.30
Th.18	29,72 a	00,06	03,15 ab	09,75	00,71 ab	09.23
Ta.3	36,47 fg	22,79	04,16 cdef	44,94	00,87 bcde	33.84
Ta. 7	34,07 defg	14,71	03,85 bcde	34,14	00,85 bcde	30.76
Ta.13	33,19 bcdef	11,75	03,56 abcd	24,07	00,81 abcd	24.61

HT: hauteur de la tige ; S (%) pourcentage de stimulation

Les chiffres suivis des mêmes lettres pour chaque paramètre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD au seuil de 5%.

Tableau 13. Effet des isolats de *Trichoderma* spp sur la croissance du pois chicpe (Pathotype de jaunissement dans le sol stérilisé).

<i>Trichoderma</i> spp.	HT cm	S(%)	Poids frais	S (%)	Poids sec	S (%)
T+	32,38 a		04,25 a		01,14 a	
TL.1	35,20 bc	08,70	05,32 abcd	25,17	01,55 bcdef	35,96
TL.2	34,22 ab	05,68	05,10 abc	20,00	01,40 abc	22,80
TL.4	35,49 ab	09,60	05,53 abcd	30,11	01,38 abc	21,05
TL.5	35,45 bcd	09,48	05,02 ab	18,11	01,52 abcde	33,33
TL.8	39,01 ef	20,47	05,35 abc	25,88	01,64 bcdefg	43,85
TL.9	41,81 f	29,12	06,60 de	55,29	01,86 defg	63,15
TL.10	41,23 ef	27,33	06,06 bcde	42,58	01,49 abcd	30,70
TL.11	40,30 ef	24,45	06,31 bcde	48,47	01,90 efg	66,66
TL.14	35,00 bc	08,09	05,46 abcd	28,47	01,40 abc	22,80
TL.17	34,36 ab	06,11	05,32 abcd	25,17	01,95 fg	71,05
Th.6	37,33 de	15,28	06,08 bcde	43,05	01,38 abc	21,05
Th.12	37,33 cde	15,28	06,40 cde	50,58	01,55 bcdef	35,96
Th.15	32,47 a	00,27	06,26 bcde	47,29	01,63 bcdefg	42,98
Th.16	33,91 ab	04,72	05,71 bcd	34,35	01,22 ab	07,01
Th.18	33,77 ab	04,29	06,47 cde	52,23	01,44 abc	26,31
Ta.3	35,00 bc	08,04	05,13 abc	20,70	01,38 abc	21,05
Ta.7	37,23 cde	14,97	05,50 abc	29,41	01,78 cdefg	56,14
Ta.13	34,07 ab	05,12	05,10 abc	20,00	01,39 abc	21,92

HT: hauteur de la tige ; S (%) pourcentage de stimulation

Les chiffres suivis des mêmes lettres pour chaque paramètre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD au seuil de 5%.

Tableau 14. Effet des isolats de *Trichoderma* spp sur la croissance du pois chiche
(Pathotype de jaunissement dans le sol non stérilisé).

• <i>Trichoderma</i> spp.	HT cm	S(%)	Poids frais	S (%)	Poids sec	S (%)
T+	24,67 a		03,60 a		01,22 a	
TL.1	33,25 bcd	34,77	03,85 a	06,94	01,37 abc	12,29
TL.2	31,44 b	27,44	04,02 a	11,66	01,34 abc	09,83
TL.4	33,02 bcd	33,84	05,34 bcde	48,33	01,61 abc	31,96
TL.5	31,56 b	27,92	05,27 bcde	46,38	01,37 abc	12,29
TL.8	31,45 b	27,48	04,76 b	32,22	01,44 abc	18,03
TL.9	40,80 f	65,38	05,88 e	63,33	02,40 d	96,72
TL.10	32,95 bc	33,56	05,64 cde	56,66	01,45 abc	18,85
TL.11	35,34 de	43,25	05,22 bcde	45,00	01,54 abc	26,22
TL.14	32,64 bc	32,30	05,39 bcde	49,72	01,82 cd	49,18
TL.17	39,33 f	59,42	05,84 de	62,22	01,32 ab	08,19
Th.6	33,36 bcd	35,22	05,12 bc	42,22	01,51 abc	23,77
Th.12	34,37 cd	39,31	04,78 b	32,77	01,55 abc	27,04
Th.15	34,28 cd	38,95	04,96 b	37,77	01,49 abc	22,13
Th.16	36,95 e	49,77	05,12 bc	42,22	01,63 abc	33,60
Th.18	34,23 cd	38,75	05,23 bcde	45,27	01,40 abc	14,75
Ta.3	32,46 bc	31,57	04,74 b	31,66	01,50 abc	22,95
Ta.7	32,15 bc	30,32	05,40 bcde	50,00	01,75 abc	43,44
• Ta.13	32,05 bc	29,91	05,17 bcd	43,61	01,75 abc	43,44

HT: hauteur de la tige ; S (%) pourcentage de stimulation

Les chiffres suivis des mêmes lettres pour chaque paramètre ne sont pas statistiquement différents selon le test LSD au seuil de 5 %.

5.3.3.5. Corrélation entre l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de maladie et les paramètres de croissance du pois chiche.

Sur les 6 coefficients de corrélation calculés pour l'effet des 18 isolats de *Trichoderma* spp. sur la réduction de l'indice de maladie et la stimulation de la croissance végétale aucune corrélation statistiquement significative n'est observée. De même aucune corrélation statistiquement significative n'est observée concernant l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. et les différents paramètres de croissance (hauteur de la tige poids frais et poids sec).

5.4. Discussion

La confrontation directe entre les isolats de *Trichoderma* spp. et l'agent pathogène (*Foc*) a mis en évidence des réductions significatives de la croissance du *Foc* par rapport au témoin, et ce avec tous les isolats utilisés . Le pourcentage de réduction le plus élevé est obtenu avec l'isolat de *T. atroviride* (Ta.13). Ainsi, un pourcentage de 84.44 % est obtenu avec le pathotype de jaunissement et de 65.64 % avec le pathotype de flétrissement. Il est à noter que l'efficacité des isolats est indépendante de l'espèce. Avec les isolats appartenant à l'espèce *T. atroviride* dès le 5^{ème} jour de confrontation, l'agent antagoniste envahit complètement la colonie du *Foc* et sporule par-dessus des deux pathotypes, montrant ainsi un pouvoir hautement parasitaire à l'égard du pathogène ; cette constatation a été observée avec l'espèce *T. atroviride* à l'égard de *Rhizoctonia solani* (Brunner et al., 2005).

Dans notre cas cet effet antagoniste n'est pas observé avec les espèces de *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*, où pour la première espèce, une sporulation abondante est notée autour de la colonie du *Foc*, et pour la deuxième espèce une zone de lyse (2mm) est observée au niveau de la zone de contact avec l'isolat de *T. harzianum* (Th.16). Benhamou et Chet (1993) ont observé des zones de lyse entre *T. harzianum* et *R. solani*, et ont expliqué ces constatations par la production d'enzymes lytiques plutôt que par la production de substances inhibitrices de la croissance.

Les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact ont révélé l'existence d'altération au niveau du mycélium du *Foc*, se traduisant par une lyse, une

transformation des filaments mycéliens en cordons et un enroulement du mycélium de *Trichoderma* spp. autour de celui du *Foc*. Une constatation comparable est observée par Hibar et al. (2005) avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Javis et Schoem où *T. harzianum* s'est montré capable de s'enrouler autour du mycélium du pathogène, de provoquer une lyse importante du mycélium, et une transformation des filaments mycéliens en cordons.

Lu et al. (2004) ont observé ces mêmes types d'enroulements du mycélium de *T. atroviride* autour du mycélium de *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum* Trow, dans des confrontations directes *in vitro*. Aussi, des ramifications excessives du mycélium de *T. atroviride* qui apparaissent être une réponse active à la présence de l'agent pathogène, sont également observées. Dans le même sens, Elad et al. (1982) avaient signalé l'enroulement du mycélium de *T. hamatum* (Bon.) Bain sur celui de *R. solani* avec une dégradation partielle de ce dernier. Ils ont aussi observé une lyse du mycélium de *Sclerotium rolfsii* Sacc en présence de *T. harzianum*.

Benhamou et Chet (1993) ont observé une altération du mycélium de *R. solani* causée par *T. harzianum*, se traduisant par des enroulements des hyphes de l'agent antagoniste sur ceux de l'agent pathogène, suivi d'une perte du contenu du mycélium et une dégradation de ce dernier. Benhamou et Chet (1996) ont cité une altération du mycélium de *Sclerotium rolfsii* en présence de *T. harzianum*; cette altération se traduisait par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme.

Des résultats similaires sont obtenus par Cherif et al. (1996) avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en présence de *Trichoderma* spp., où des zones de lyses et de dégradation des conidies et du mycélium du pathogène avec des enroulements d'hyphes sont observés. Ils ont observé également que les hyphes perdent leur turgescence et deviennent transparents, indiquant une perte du contenu cellulaire. De même, Howell (2003) a signalé que *T. lignorum* (Tode) Harz était capable de s'enrouler sur le mycélium de *R. solani* causant une dissolution du cytoplasme du pathogène.

Dans la confrontation indirecte, caractérisé par une absence de contact directe entre l'agent antagoniste et le *Foc*, les *Trichoderma* spp. agissent seulement par la production de substances antifongiques volatiles. Une réduction significative de la croissance avec tous les isolats par rapport au témoin est notée. Les taux de réduction les plus importants sont notés avec les trois isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13) et l'isolat *T. harzianum* (Th.16). Chez les trois isolats de *T. atroviride*, une odeur de noix de coco est présente en culture sur milieu PDA. Selon

Dodd et al. (2003), Samuels et al. (2002), cette odeur est caractéristique de l'antifongique volatil 6-pentyl- α -pyrone rencontré uniquement chez l'espèce *T. atroviride* et *T. viride* de la section *Trichoderma*. Oliver et Germain (1983) ont également rapporté la production d'antibiotiques volatils chez des isolats appartenant à l'espèce *T. harzianum*.

Parallèlement à la diminution de la croissance mycélienne, des réductions importantes de la sporulation sous l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sont observées. Avec l'isolat *T. atroviride* (T.a 13), une absence totale de la sporulation est notée. Des résultats similaires ont été rapportés par Biles et Hill (1998) dans des essais contre *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib) Drechs. ex Dastur, par l'utilisation d'un isolat de *T. harzianum*, entraînant des réductions de la sporulation qui varie entre 47 à 83 %.

L'essai *in vivo* par traitement de la semence du pois chiche avec les agents antagonistes a conduit à une réduction significative de l'indice de maladie avec tous les isolats par rapport au témoin non traité, et ceci aussi bien dans le sol stérilisé que le sol non stérilisé. Les taux de réduction les plus élevés sont obtenus avec les isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7, Ta.13) et l'isolat de *T. harzianum* (Th.16).

Lors de la confrontation directe, les isolats de *T. atroviride* ont montré un pouvoir hautement parasitaire (mycoparasitisme) contre le *Foc*, par leur capacité à envahir les colonies du *Foc* et à sporuler au dessus. Ces mêmes isolats sont doués d'une grande capacité à inhiber la croissance lors de la confrontation indirecte. Une corrélation significativement positive existe entre l'efficacité des isolats de *Trichoderma* spp. dans la réduction de l'indice de maladie et l'inhibition de la croissance dans la confrontation indirecte sous l'effet des substances antifongiques volatiles.

Cette constatation laisse suggérer que l'activité antagoniste de nos isolats contre le *Foc* peut être due en partie à ces substances antifongiques volatiles. En effet, l'activité de lutte biologique de *T. atroviride* est due en partie à la production des endochitinases (Mach et al., 1999 ; Kullnig et al., 2000), à la production d'antibiotiques (antifongiques), comprenant les antibiotiques aromatiques pyrones (Keszeler et al., 2000), les peptides (Oh et al, 2000) , et à l'induction des mécanismes de la résistance chez la plante (Brunner et al., 2005).

T. atroviride a montré une bonne efficacité dans la lutte biologique contre le *Rhizoctonia solani* sur pomme de terre en plein champ (Mc Beath et al., 1995), et également une bonne

protection contre *Fusarium graminearum* Shwab., lorsqu'il est appliqué par traitement de la semence du blé (Roberti et al., 2000). Récemment, les capacités de lutte biologique de cette espèce ont été montrées contre *Cryphonectria parasitica* (Murril) Barr, l'agent du chancre du châtaignier, et qui a presque provoqué son extinction en Amérique (Dodd et al., 2003). Il est de même pour *T. harzianum*, dont plusieurs travaux ont montré son efficacité comme agent de lutte biologique. Selon Hervas et al. (1997), l'apport de *T. harzianum* (biofongicide commercialisé) dans le sol, réduit considérablement l'incidence de

la fusariose du pois chiche. Récemment Dubey et al. (2007) ont rapporté une réduction importante de la fusariose du pois chiche sous serre par application sur la semence d'isolats appartenant à l'espèce *T. harzianum*.

En effet, le traitement de la semence par des agents antagonistes leur permet d'envahir les racines et la rhizosphère. Ainsi, sont présents au contact de l'agent pathogène, et développent leurs capacités inhibitrices, à travers la production de composés antifongiques, l'hyperparasitisme ou par la compétition à coloniser la rhizosphère (Dandurand et Knudsen, 1993). Des études ont montré que le traitement de la semence ou du sol par les agents antagonistes appartenant au genre *Trichoderma* peut aboutir à une activation des mécanismes de la résistance induite de la plante (Brunner et al., 2005 ; Harman et al., 2004a). Certains isolats de *Trichoderma* spp. peuvent coloniser uniquement quelques sites localisés au niveau des racines (Metcalf et Wilson, 2001), mais d'autres peuvent coloniser la surface entière des racines pour plusieurs semaines (Thrane et al., 1997) ou mois (Harman, 2000).

La pénétration des hyphes de *Trichoderma* spp. à l'intérieur des tissus des racines est limitée souvent à la première ou la deuxième couche des cellules. L'invasion des cellules radiculaires externes par les isolats de *Trichoderma* spp. peut aboutir à une induction d'une résistance systémique chez la plante (Harman et al., 2004a). Différentes autres études ont montré que la colonisation des racines par les *Trichoderma* spp. aboutit à une augmentation de certaines enzymes reliées aux défenses de la plante, comprenant, peroxydases, chitinases, β 1-3 glucanases (Howel et al., 2000). Le changement dans le métabolisme peut aboutir à une accumulation des composés antimicrobiens. Plusieurs isolats de *T. virens* Miller, Giddens et Foster, de *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt et Nirenberg, de *T. atroviride* et de *T. harzianum* provoquent

des changements métaboliques dans la plante qui augmente la résistance à de nombreux agents pathogènes (Harman et *al.*, 2004a).

Pour l'ensemble des isolats étudiés, l'activité antagoniste est plus importante dans le sol stérilisé que dans le sol non stérilisé ; des constatations similaires ont été rapportées par plusieurs auteurs. Ils ont montré que le développement de *T. harzianum* est plus élevé quand les semences traitées sont semées dans un sol stérilisé. La limitation de la colonisation du sol non stérilisé serait due à l'incapacité de *T. harzianum* à concurrencer la microflore du sol dans l'occupation de l'espace. La présence de populations inhibitrices de l'activité antagoniste et de la croissance de l'agent introduit, tel que *Pseudomonas* sp, qui produit des métabolites toxiques contre *Trichoderma* spp. et qui peut également limiter leur activité antagoniste (Bae et Knudsen, 2000). Néanmoins, quelques populations telluriques peuvent stimuler l'activité antagoniste des *Trichoderma* spp., comme certains insectes du sol qui stimulent la colonisation des sclérotés par les *Trichoderma* spp. (Garcia-Garza et *al.*, 1997).

Parallèlement à la protection des plants contre la maladie, une stimulation de la croissance végétale des plants de pois chiche est notée. Des constatations similaires ont été rapportées par Kleifdet et Chet (1989) qui ont expliqué cette stimulation par des régulateurs de croissance produits par l'agent antagoniste. Selon Harman et *al.* (2004a), les champignons bénéfiques tels que les *Trichoderma* spp. peuvent stimuler la croissance des plantes par l'augmentation de l'accessibilité des éléments nutritifs, par une efficacité dans l'utilisation de l'azote, et par la solubilisation des éléments nutritifs dans le sol. Altomar et *al.* (1999) ont montré que *T. harzianum* 1295-27 solubilisait le phosphate et les micro-éléments impliqués dans la stimulation de la croissance végétale.

Rudresh et *al.* (2005) ont évalué la capacité de 9 isolats de *Trichoderma* spp. à solubiliser le phosphate insoluble *in vitro* et *in vivo*, et ils ont trouvé que l'inoculation de *Trichoderma* spp. ait une augmentation de la croissance et des paramètres du rendement du pois chiche comparativement aux témoins non inoculés. Chez les *Trichoderma* spp. des métabolites secondaires tels que l'harzianolide (HAR) et le 6-pentyl- α -pyrone (6PP) augmentent significativement la croissance des plantules de tomate (Vinale et *al.*, 2007).

Les bases génétiques et moléculaires de ces effets ne sont pas connues. En colonisant les racines, les *Trichoderma* spp. augmentent la croissance des racines et de la plante entière,

développant une relation symbiotique, plutôt que du parasitisme avec les plantes (Harman *et al.*, 2004a).

Les résultats obtenus montrent que les isolats les plus efficaces dans la stimulation de la croissance végétale appartiennent à l'espèce *T. longibrachiatum*, alors que les isolats les plus efficaces dans la réduction de l'indice de maladie sont les trois isolats de *T. atroviride* et l'isolat de *T. harzianum* (Th.16). Aucune corrélation significative n'existe entre la capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à protéger les plants contre la maladie et la stimulation de la croissance végétale

5.5. Conclusion

L'efficacité *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp a été montrée par une réduction de la croissance, et de la sporulation des deux pathotypes de *Foc*, où l'isolat *T. atroviride* (Ta.13) s'est montré le plus efficace. Dans la confrontation indirecte, une réduction de la croissance sous l'effet de substances antifongiques volatiles est notée, plus importante chez

les trois isolats de *T. atroviride* et l'isolat *T. harzianum* (Th.16) contre les deux pathotypes du *Foc*.

Ces résultats sont confirmés par l'essai *in vivo* qui a montré une réduction de l'indice de maladie contre ces deux pathotypes en apportant l'agent antagoniste par traitement de la semence. Les trois isolats de *T. atroviride* et l'isolat de *T. harzianum* (Th.16) se sont avérés les plus efficaces dans la réduction de l'incidence de la maladie. Ce comportement nous permet d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une relation étroite entre la production des substances antifongiques volatiles et l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. dans la protection des plants contre la fusariose du pois chiche.

Les trois isolats de *T. atroviride* ont l'aptitude *in vitro* d'envahir les colonies du *Foc* et de sporuler dessus, montrant ainsi leur pouvoir hautement mycoparasitaire contre ce pathogène. L'isolat de *T. harzianum* (Th.16) provoque une zone de lyse au contact de la colonie du *Foc*, expliquée par la production d'enzymes lytiques qui dégradent les hyphes fongiques de l'agent pathogène.

Les isolats de *Trichoderma* spp ont montré un effet positif sur les paramètres de croissance dans le sol stérilisé et non stérilisé, avec l'existence d'une certaine différence dans l'efficacité des isolats entre les deux types de sol, et une variabilité dans leur efficacité concernant les paramètres de croissance. Il est important de noter que les taux de stimulation les plus élevés sont conférés par les isolats de l'espèce *T. longibrachiatum* concernant ces mêmes paramètres de croissance.

■

Chapitre 6.

Analyse des activités chitinolytiques et glucanolytiques chez les isolats de *Trichoderma* spp.

■

6.1. Introduction

Les espèces de *Trichoderma* spp. sont des agents potentiels utilisés en lutte biologique contre les agents phytopathogènes ; parmi les mécanismes proposés pour leur activité antagoniste, le mycoparasitisme est souvent rapporté (Harman et *al.*, 1993 ; Lorito et *al.*, 1993). Il est présumé que ce processus complexe nécessite la production d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire fongique (Chet, 1987). Les *Trichoderma* spp. sont connues pour être des producteurs efficaces de « polysascharides lyases », de protéases, et de lipases. Tous ces enzymes peuvent être impliqués dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (Harman et *al.*, 1993). Parmi les enzymes les plus communément rapportées dans le mycoparasitisme, sont ceux qui dégradent la chitine et les enzymes glucanolytiques. Néanmoins, actuellement, il devient de plus en plus évident que l'activité antagoniste est le résultat de différentes activités cellulaires et non de l'hydrolyse enzymatique seule.

La chitine, est un polysaccharide de structure linéaire, dont les sous- unités N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) sont liées par des ponts β -(1,4) glucosidiques « **β linked (1-4) of N-acetyl-D-glucosamine** » (Fig. 44). Ce polysaccharide est l'un des polymères les plus abondants dans la biosphère. La chitine peut affecter la morphologie, le développement, la nutrition, la santé, la reproduction et l'interaction d'un grand nombre d'espèces végétales et d'organismes importants en agriculture (Lorito, 1997). Absente chez les végétaux, la chitine est présente dans les parois fongiques et les structures exosquelettiques des invertébrés. Elle est impliquée dans les mécanismes de division cellulaire notamment la division cellulaire chez les levures (Saguez et *al*, 2007). Les enzymes chitinolytiques sont rencontrées dans tous les règnes, les protistes, les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés et les vertébrés, y compris les êtres humains.

La dégradation enzymatique de la chitine est impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que l'autolyse, la morphogénèse, la nutrition ; elle joue un rôle dans les relations entre les organismes comprenant : les interactions plantes- champignons, insectes- champignons, et champignons- champignons (Lorito, 1998). Chez les végétaux, les chitinases font partie de nombreuses protéines de défense, et dont l'expression est augmentée suite à une attaque virale, bactérienne, fongique ou par un insecte. L'exploitation des propriétés des chitinases permet de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les ravageurs et les agents phytopathogènes des cultures.

Selon les recommandations de la nomenclature des enzymes (Webb, 1992), tous les enzymes capables de catalyser la dégradation de la chitine ou les oligomères de chitine par hydrolyse de la liaison β 1,4 N-acetyl-B-glucosamine sont définis comme enzymes chitinolytiques, et sont différenciés selon les produits finaux de la réaction.

La chitobiosidase (chitin 1,4 β -chitobiosidase) est une nouvelle appellation d'une exochitinase déjà décrite par Sahai et Manocha (1993) in Harman et *al*. (1993). Cette enzyme coupe la chitine et les oligomères de chitine [GlcNAc]_{>3} progressivement à partir de l'extrémité non réductrice, et libérant uniquement (GlcNAc)₂. Le terme chitobiosidase n'est pas reconnu officiellement par un nombre EC conformément à la nomenclature des enzymes cellulolytiques, telles la cellulose β 1,4 cellobiosidase (EC 3.2.1.91) (Webb, 1992). Les chitobiosidases de *Trichoderma* spp. qui ont été caractérisées, sont différentes des autres enzymes chitinolytiques

par la spécificité des substrats, les séquences en acides aminés, l'activité antifongique, les propriétés sérologiques et d'autres caractéristiques (Harman et *al.*, 1993 ; Lorito et *al.*, 1993).

La Glucosaminidase (N-acetyl- β -glucosaminidase) ou β -acetylhexoseaminidase (EC.3.2.1.52) est définie par Lorito (1998) comme étant une exochitinase qui libère des unités monomériques (N-acetyl glucosamine). Cette enzyme nécessite pour son activité au moins un dimère de chitine.

L'Endochitinase (EC 3. 2.1 .14) correspond à la définition de la chitinase selon la nomenclature des enzymes (Webb, 1992). Cette enzyme coupe la chitine et les chito-oligomères pour libérer un mélange de produits terminaux solubles de faibles poids moléculaires, de différentes tailles avec le diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ comme produit principal ; l'enzyme ne peut pas libérer des unités monomériques.

Plusieurs enzymes peuvent contribuer dans la libération de la molécule de chitine à partir de l'hôte, et ainsi induire l'ensemble du complexe chitinolytique (Kubicek et *al.*, 2001).

Liaison B (1-4) glucosidique

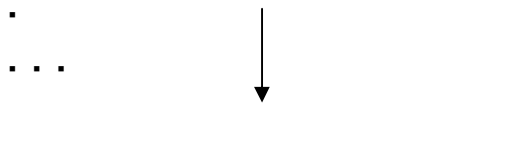


Figure 44. La molécule de chitine

Les β glucanes, constituent la classe la plus abondante de polysaccharides. Ce sont des polymères formés de résidus de D-glucose liés par des ponts glucosidiques (Fig. 45). De composition chimique variés, ces polymères peuvent être relativement simples, lorsque ils sont composés de macromolécules linéaires, dont les liens entre les résidus glucidiques sont tous du même type. Par contre, ils sont plus complexes quand la chaîne de glucose qui constitue le squelette du glucane, possédant des embranchements latéraux, dont la charnière est assurée par des liens de types différents, soit β (1,4), β (1,3) ou β (1,6)-glucidiques (Fayad, 1997). Les β glucanes sont la principale composante de la paroi cellulaire des levures et des champignons, par conséquent, ils sont responsables de la structure et de la rigidité de la cellule.

Figure 45. La molécule β (1-3) glucane

Les β -glucanes peuvent être hydrolysées de façon partielle ou complète par une gamme de variétés d'enzymes. Il existe différents β -glucanases, chacune attaquant un type de lien β -glucosidique particulier. De façon générale, une β (1,3)glucanase scinde les liens β (1,3) d'un polymère, une β (1,6)glucanase coupe les liens β (1,6). On peut classer ces β -glucanases selon leur mode d'action sur le substrat et selon les produits générés suite à l'hydrolyse. Elles peuvent être de deux types, soit exo ou endo-glucanolytiques ; une exo- β -glucanase agit aux extrémités non réductrices des chaînes des polymères, tandis qu'une endo- β -glucanase coupe au hasard les liens β à l'intérieur de la chaîne de glucoses. Par ailleurs, l'action d'une exoglucanase ne génère que des petites molécules, monomères et dimères comme produits finaux de l'hydrolyse, alors qu'une endoglucanase libère des oligomères de tailles variées (Reese, 1977), et de taille plus grande.

Dans la littérature, il est rapporté que certains β -glucanases sont capables d'attaquer plus d'un type de lien β d'un glucane. C'est le cas de la β (1,3)-glucanase, qui en plus de l'hydrolyse des ponts β (1,3), scinde les liens β (1,6). La présence d'exo-enzymes, montrant une action sur des liens mixtes, a été vérifiée chez plusieurs espèces : *Cryptococcus albidus* (Sato) Skinner (Meyer et Phaff, 1977), *Fabospora fragilis* et *Hansenula anomalia* (Abd-EL-Al et Phaff, 1968). Les systèmes β -glucanolytiques sont très complexes et caractérisés par une grande diversité (Fayad, 1997).

Chez les plantes, les chitinases et les $\beta(1,3)$ glucanases ont été décrites comme étant des protéines liées aux réactions de défense, en réponse à l'invasion des agents pathogènes (Bowles, 1990).

L'objectif de cette étude est l'analyse de la production des enzymes chitinolytiques, (Chitobiosidase et Glucosaminidase) ainsi que de l'enzyme glucanolytique $\beta(1,3)$ glucanase (Glucanase) chez les différents isolats des trois espèces de *Trichoderma* spp. précédemment isolées, identifiées et caractérisées pour lesquelles l'activité antagoniste contre l'agent du flétrissement fusarien est mise en évidence. De même, une approche de l'étude des mécanismes d'induction de répression de ces complexes enzymatiques est envisagée, et ceci par la culture de ces isolats sur des milieux de cultures avec différentes sources de carbone (chitine, glucose, saccharose, glycérol). La recherche d'une corrélation entre les activités enzymatiques *in vitro* et les capacités antagonistes des isolats de *Trichoderma* spp. est également ciblée.

6.2. Matériel et méthodes

6.2.1. Matériel fongique

Les isolats utilisés au cours de notre essai sont les 18 isolats de *Trichoderma* spp. précédemment isolés et caractérisés, à savoir 10 isolats de *T. longibrachiatum*, 5 isolats de *T. harzianum* et 3 isolats de *T. atroviride*.

6.2.2. Milieux de culture utilisés pour la production d'enzymes

La recherche et la mise en évidence des activités enzymatiques sont réalisées par la culture des isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu liquide. Il s'agit du milieu minéral SM (milieu synthétique), dont la composition est la suivante : (KH_2PO_4 : 0.68g, K_2HPO_4 : 0.87g, NH_4NO_3 : 1g, CaCl_2 : 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2g, MnSO_4 : 2mg, FeSO_4 : 2mg, ZnSO_4 : 2mg, KCl : 0.2g). Le pH du milieu est ajusté à 6 avec HCl 1N. Les isolats de *Trichoderma* spp. sont cultivés sur le milieu SM, auquel nous ajoutons la chitine, le glucose, le saccharose ou le glycérol, selon les proportions : (SM + 1% chitine), (SM + saccharose 1%), (SM + glucose 9%) et (SM + glycérol 2%).

Les milieux de cultures sont répartis dans des flacons contenant 150 ml du milieu de culture additionné du substrat approprié et stérilisés à 120°C pendant 20 min. Chaque flacon estensemencé à l'aide d'un volume de 30 µl d'une concentration de 10⁹ spores/ml ou 50 µl d'une concentration de 10⁸ spores/ml. Les flacons sont soumis à une agitation continue durant trois jours, à température ambiante du laboratoire, ensuite une filtration est réalisée. Le filtrat de culture est soumis à une concentration sous vide jusqu'à 1/10 de son volume initial à 40°C par le biais d'un rotavapor. Ensuite une dialyse est réalisée pour éliminer les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 10 Kd . La dialyse est opérée à 4°C durant 48h contre de l'eau distillée avec changement d'eau après 24h d'incubation.

Après dialyse, nous avons procédé à l'analyse des activités enzymatiques des différents isolats. Dans une première étape, nous avons réalisé le dosage des protéines totales des filtrats de cultures et dans une deuxième étape le dosage des activités chitinolytiques et glucanolytiques.

6.2.3. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des filtrats de culture est réalisé par la méthode de Bradford (1976). Au préalable, une courbe étalon est réalisée pour des solutions protéiques de concentration connues (Annexe 2). La détermination des protéines totales est réalisée dans 200 µl de filtrat de culture pour les 18 isolats de *Trichoderma* spp. sur les différents milieux de culture.

6.2.4. L'analyse de l'activité enzymatique

L'analyse de l'activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp. est faite dans un mélange réactionnel composé de : 30µl de filtrat de culture, 30 µl du substrat d'enzyme, et 30 µl du Tampon Phosphate (PH : 6,7) ; pour le témoin le filtrat de culture est remplacé par l'eau distillée stérile.

Les substrats d'enzymes utilisées sont :

Le P-Nitrophenyl –B-D-N, N' diacetyl chitobiose pour la chitobiosidase

Le P-Nitrophenyl-B-D-N-acetyl glucosamine pour la glucosaminidase

Le P-Nitrophenyl –B-D-N-glucopyranoside pour la glucanase

0,03 g de chaque substrat sont dissous dans 10 ml du tampon phosphate potassium 0,05 M pH 6.7.

Pour chaque milieu, les filtrats de culture doivent contenir la même concentration en protéine totale pour comparer l'activité enzymatique des différents isolats. Ainsi, pour chaque milieu des calculs sont réalisés afin d'avoir la même concentration en protéine totale (Annexe 3).

L'incubation pour la Glucanase est réalisée à 37°C pendant 2h, tandis que pour la chitobiosidase et la glucosaminidase, elle est réalisée à 50°C pendant 15 min. Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 30 µl de la solution Stop (Na₂CO₃ 0.4 M) dans chaque puit. L'activité enzymatique est mesurée par la libération du P- nitrophenol à partir de ces substrats. La lecture est effectuée à 410 nm dans un lecteur de plaque de microtitration. L'activité enzymatique est exprimée en n Katals (n moles de nitrophénol libérés par seconde et par millilitre d'enzyme).

6. 3. Résultats

Le dosage des protéines totales dans les quatre milieux de cultures a donné des valeurs différentes pour l'ensemble des isolats. Ces valeurs diffèrent selon les isolats et le milieu de culture (Annexe 2). Pour comparer l'activité enzymatique, les filtrats de culture pour chaque milieu doivent contenir la même concentration en protéine totale, ainsi, pour chaque milieu des calculs sont réalisés (Annexe 2).

6.3.1. Mise en évidence des activités chitobiosidase, glucosaminidase et glucanase sur milieu SM + chitine.

Les résultats relatifs à l'analyse de l'activité des trois enzymes sur le milieu SM + chitine ont montré que les valeurs de l'absorbance à 410 nm variaient selon les isolats étudiés (Tableau 15).

Chitobiosidase.

L'activité enzymatique la plus importante est enregistrée chez l'isolat TL.10 de l'espèce *T. longibrachiatum*, pour la même espèce une absence totale d'activité est notée avec les isolats (TL.2, TL.9 et TL.14) néanmoins une faible activité chez l'isolat TL.17. Une bonne activité enzymatique caractérise les trois isolats de l'espèce *T. atroviride*, plus importante pour l'isolat Ta.13. Chez l'espèce *T. harzianum*, une bonne activité enzymatique est notée avec les isolats Th.6 et Th.12, mais avec une faible activité pour les isolats Th.15 Th.16 et Th.18.

Glucosaminidase.

La plus grande activité glucosaminidase est enregistrée chez l'isolat Th.16 de l'espèce *T. harzianum*, alors qu'une faible activité est notée pour les isolats Th.12 et Th.15, ainsi qu'une absence d'activité avec les isolats Th.6 et Th.18. L'isolat TL.14 de l'espèce *T. longibrachiatum* a montré une bonne activité glucosaminidase, alors que les isolats TL.4, TL.11 et TL.17 ont montré une très faible activité enzymatique. En revanche, une absence d'activité est notée chez le reste des isolats de cette même espèce. Pour l'espèce *T. atroviride*, l'isolat Ta.13 a montré une bonne activité glucosaminidase, une faible activité chez l'isolat Ta.3 et une absence d'activité glucosaminidase est notée avec l'isolat Ta.7.

Glucanase.

La présence de cette activité enzymatique chez les isolats des trois espèces de *Trichoderma* spp. est notée. La plus grande activité enzymatique est enregistrée avec l'isolat Th.15 de l'espèce *T. harzianum* suivie de l'isolat TL.17 de l'espèce *T. longibrachiatum*.

Tableau 15. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + Chitine

<i>Trichoderma</i> spp	Absorbance à 410 nm		
	Chitobiosidase	glucosaminidase	glucanase
Témoin	0,000	0,035	0,000
TL.1	0,088*	0,003	0,033*
TL.2	0,000	0,000	0,052*
Ta.3	0,055*	0,062*	0,019*

TL.4	0,024*	0,047*	0,023*
TL.5	0,042*	0,000	0,022*
Th.6	0,111*	0,000	0,015*
Ta.7	0,068*	0,026	0,035*
TL.8	0,064*	0,000	0,030*
TL.9	0,000	0,000	0,028*
TL.10	0,134*	0,000	0,016*
TL.11	0,042*	0,055*	0,094*
Th.12	0,082*	0,061*	0,070*
Ta.13	0,112*	0,092*	0,026*
TL.14	0,000	0,104*	0,019*
Th.15	0,013*	0,046*	0,230*
Th.16	0,014*	0,108*	0,029*
TL.17	0,001*	0,054*	0,102*
Th.18	0,004*	0,000	0,044*

*Les valeurs suivies d'une étoile représentent celles qui sont supérieures au seuil de détection et correspondent ainsi à la présence d'une activité enzymatique

Enzyme	Moyenne des témoins X	Ecart type ET	Seuil de détection > X+ 3 ET
Chitobiosidase	0,000	0,000	0,000
Glucosaminidase	0,035	0,005	0,005
Glucanase	0,000	0,000	0,000

6.3.2. Mise en évidence des activités chitobiosidase, glucosaminidase et glucanase sur milieu SM + glucose.

Les résultats obtenus montrent que les activités enzymatiques étudiées varient selon les espèces et les isolats étudiés (Tableau 16).

Chitobiosidase.

La plus grande activité enzymatique est enregistrée chez l'isolat TL.14 de l'espèce *T. longibrachiatum*, une bonne activité est également remarquée pour les isolats TL.8 et TL.9 de la même espèce, une faible activité avec les isolats (TL.2, TL.4 TL.5, TL.10, TL.11), et une absence d'activité enzymatique chez les isolats TL 1 et TL 17. Concernant les isolats de l'espèce *T. atroviride*, une bonne activité enzymatique est enregistrée pour l'isolat Ta.13, une faible activité enzymatique chez l'isolat Ta.7, et une absence d'activité avec l'isolat Ta.3. Chez l'espèce *T. harzianum*, la plus grande activité est notée pour l'isolat Th.6, avec une présence d'activité chez le reste des isolats, à l'exception de l'isolat Th.12 pour lequel aucune activité chitobiosidase n'est détectée.

Glucosaminidase.

Une bonne activité enzymatique est observée chez la majorité des isolats de l'espèce *T. longibrachiatum* où la plus grande activité est notée pour l'isolat TL.11. En revanche, une absence d'activité est notée avec les isolats TL1 et TL2 de l'espèce *T. longibrachiatum*. Chez *T. atroviride*, une absence d'activité est notée avec l'isolat Ta.3, alors qu'une bonne activité est détectée pour les deux isolats Ta.7 et Ta.13. Enfin une activité enzymatique glucosaminidase est notée chez tous les isolats de *T. harzianum* mais faiblement détectée avec l'isolat Th.6.

Glucanase.

Une absence de cette activité enzymatique est notée chez les isolats des trois espèces étudiées en présence du glucose comme source de carbone.

Tableau 16. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + glucose

Isolats	Absorbance à 410 nm		
	Chitobiosidase	glucosaminidase	glucanase
Témoin	0,000	0,000	0,025
TL.1	0,000	0,000	0,003
TL.2	0,004*	0,000	0,000
Ta.3	0,000	0,000	0,015
TL.4	0,005*	0,050*	0,020
TL.5	0,003*	0,033*	0,022
Th.6	0,053*	0,010*	0,010
Ta.7	0,008*	0,078*	0,010
TL.8	0,044*	0,071*	0,022
TL.9	0,056*	0,071*	0,013
TL.10	0,004*	0,038*	0,013
TL.11	0,005*	0,088*	0,036
Th.12	0,000	0,079*	0,036
Ta.13	0,053*	0,063*	0,013
TL.14	0,063*	0,084*	0,027
Th.15	0,031*	0,066*	0,010
Th.16	0,020*	0,029*	0,008
TL.17	0,000	0,065*	0,008
Th.18	0,034*	0,045*	0,008

*Les valeurs suivies d'une étoile représentent celles qui sont supérieures au seuil de détection et correspondent ainsi à la présence d'une activité enzymatique.

Enzyme	Moyenne des témoins	Ecart type	Seuil de détection
	X	ET	X + 3ET
Chitobiosidase	0,000	0,000	0,000
Glucosaminidase	0,000	0,000	0,000
Glucanase	0,025	0,005	0,040

6.3.3. Mise en évidence des activités chitobiosidase, glucosaminidase et glucanase sur milieu SM+Saccharose.

Les résultats du tableau 17 montrent une absence d'activité chitobiosidase chez la majorité des isolats des trois espèces, à l'exception des deux isolats Th.16 de l'espèce *T. harzianum* et TL.17 de l'espèce *T. longibrachiatum*, alors qu'une variabilité intra-spécifique est notée pour les deux enzymes glucosaminidase et glucanase.

Chitobiosidase.

L'activité chitobiosidase est absente chez les isolats des trois espèces *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride*, à l'exception des deux isolats Th.16 de l'espèce *T. harzianum* et TL.17 de l'espèce *T. longibrachiatum* où une très faible activité est notée.

Glucosaminidase.

La plus grande activité glucosaminidase est observée chez l'isolat TL.8 de l'espèce *T. longibrachiatum*. Chez la même espèce, cette activité est présente pour les deux isolats TL.11 et TL.14 et elle est absente avec le reste des isolats. Chez l'espèce *T. atroviride* cette activité est notée pour les deux isolats Ta.3 et Ta.7, mais elle est absente avec l'isolat Ta.13. Enfin chez l'espèce *T. harzianum*, à l'exception de l'isolat Th.16, tous les isolats ont montré une activité glucosaminidase en présence du saccharose, comme source de carbone.

Glucanase.

La plus grande activité enzymatique est enregistrée chez l'isolat TL.11 de l'espèce *T. longibrachiatum*. Une bonne activité est également notée pour l'isolat TL.8, alors qu'une faible activité est notée avec les isolats TL.4, TL.10, TL.14 et TL.17 ; cette activité est absente chez les isolats TL.1, TL.2, TL.5, et TL.9. Pour l'espèce *T. atroviride*, nous notons une bonne activité glucanase avec l'isolat Ta.13, une faible activité chez l'isolat Ta.7, et une absence d'activité est enregistrée pour l'isolat Ta.3. Chez l'espèce *T. harzianum*, une faible activité est enregistrée pour l'ensemble des isolats avec une absence totale d'activité avec l'isolat Th.16.

Tableau 17. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + saccharose

<i>Trichoderma</i> spp.	Absorbance 410 nm		
	Chitobiosidase	glucosaminidase	glucanase
Témoin	0,015	0,008	0,003
TL.1	0,000	0,007	0,005
TL.2	0,000	0,000	0,000
Ta.3	0,015	0,024*	0,004
TL.4	0,018	0,013	0,010*
TL.5	0,003	0,008	0,006
Th.6	0,006	0,022*	0,022*
Ta.7	0,009	0,037*	0,010*
TL.8	0,017	0,048*	0,030*
TL.9	0,008	0,000	0,003
TL.10	0,024	0,003	0,020*
TL.11	0,018	0,025*	0,044*
Th.12	0,019	0,021*	0,013*
Ta.13	0,021	0,010	0,024*
TL.14	0,023	0,040*	0,013*
Th.15	0,014	0,018*	0,007*
Th.16	0,033*	0,014	0,006
TL.17	0,033*	0,013	0,007*
Th.18	0,007	0,015*	0,012*

*Les valeurs suivies d'une étoile représentent celles qui sont supérieures au seuil de détection et correspondent ainsi à la présence d'une activité enzymatique.

Enzyme Moyenne des témoins Ecart type Seuil de détection

	X	ET	X+ 3ET
Chitobiosidase :	0,015	0,005	0,030
Glucosaminidase :	0,008	0,002	0,014
Glucanase :	0,003	0,001	0,006

6.3.4. Mise en évidence des activités chitobiosidase, glucosaminidase et glucanase sur milieu SM + glycérol.

Les résultats du tableau 18 montrent une absence d'activité chitobiosidase chez les isolats des trois espèces. Une absence d'activité glucanase est également enregistrée pour les isolats de l'espèce *T. harzianum*. Une variabilité intra-spécifique est notée pour l'activité glucosaminidase.

Chitobiosidase.

L'utilisation du glycérol comme source de carbone, n'a montré aucune activité enzymatique chez les isolats des trois espèces.

Glucosaminidase.

L'isolat Th.16 de l'espèce *T. harzianum* a montré la plus grande activité enzymatique, une faible activité est notée chez l'isolat Th.12 de la même espèce ; cette activité enzymatique est absente avec les isolats Th.6, Th.15 et Th.18. Une bonne activité enzymatique est notée chez l'isolat TL.11 de l'espèce *T. longibrachiatum*, une faible activité enzymatique pour les isolats TL.4, TL.8, TL.9 et TL.10, et une absence d'activité avec les isolats TL.1, TL.2, TL.5, TL.14 et TL.17. Chez l'espèce *T. atroviride*, une bonne activité est notée pour l'isolat Ta.7, une faible activité avec l'isolat Ta.3 et une absence d'activité chez l'isolat Ta.13.

Glucanase.

Chez l'espèce *T. longibrachiatum*, une absence d'activité est notée pour la majorité des isolats à l'exception des deux isolats TL.10 et TL.14. Chez l'espèce *T. atroviride*, une bonne activité est notée pour l'isolat Ta.13, une faible activité avec l'isolat Ta.7 et une absence d'activité chez

l'isolat Ta.3. Pour l'espèce *T. harzianum*, une absence d'activité est enregistrée chez tous les isolats.

Tableau 18. Présentation des activités enzymatiques sur milieu SM + glycérol

<i>Trichoderma</i> spp.	Absorbance à 410 nm		
	chitobiosidase	glucosaminidase	glucanase
Témoin	0,148	0,054	0,015
TL.1	0,125	0,030	0,015
TL.2	0,067	0,000	0,000
Ta.3	0,090	0,094*	0,010
TL.4	0,123	0,077*	0,008
TL.5	0,095	0,037	0,010
Th.6	0,068	0,000	0,008
Ta.7	0,103	0,116*	0,042*
TL.8	0,047	0,077*	0,022
TL.9	0,018	0,077*	0,008
TL.10	0,060	0,080*	0,033*
TL.11	0,065	0,117*	0,027
Th.12	0,000	0,077*	0,026
Ta.13	0,008	0,019	0,199*
TL.14	0,028	0,000	0,041*
Th.15	0,020	0,055	0,030

Th.16	0,031	0,118*	0,030
TL.17	0,075	0,000	0,009
Th.18	0,048	0,053	0,000

*Les valeurs suivies d'une étoile représentent celles qui sont supérieures au seuil de détection et correspondent ainsi à la présence d'une activité enzymatique.

Enzyme	Moyenne des témoins X	Ecart type ET	Seuil de détection X + 3ET
Chitobiosidase :	0.148	0.012	0.182
Glucosaminidase	0.054	0.004	0.066
Glucanase :	0.015	0.005	0.030

6.3.5. Corrélation entre l'activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu SM+chitine et la réduction de l'indice de maladie *in planta*.

Les coefficients de corrélation entre l'activité enzymatiques des deux enzymes chitinolytiques (la chitobiosidase et la glucosaminidase), la glucanase et la réduction de l'indice de maladie des deux pathotypes *Foc* n'ont montré aucune corrélation statistiquement significative au seuil de 5% ($P < 0.05$).

6.4. Discussion

Les différents dosages enzymatiques effectués après croissance des isolats en présence de chitine comme source de carbone ont montré une induction de la production des enzymes chitinolytiques (chitobiosidase, glucosaminidase) et également gluconolytique (glucanase), chez l'ensemble des isolats appartenant aux trois espèces étudiées. Néanmoins, une variabilité intra-spécifique existe entre les isolats.

En effet, un niveau élevé de l'induction d'enzymes chitinolytiques extracellulaires est souvent obtenu lorsque des isolats appartenant au genre *Trichoderma* sont cultivés sur un milieu contenant comme seule source de carbone, de la chitine pure, des parois cellulaires fongiques ou du mycélium. En plus des enzymes chitinolytiques, une production importante de la glucanase β (1,3)-glucosidase est également enregistrée (Tronsmo et al., 1993).

Les travaux de Kubicek et *al.* (2001) ont montré que la production des enzymes chitinolytiques était hautement influencée par la composition du milieu. Ainsi, en milieu sans chitine, une faible quantité d'enzyme chitinolytique est constamment produite (Tronsmo et *al.*, 1993). D'autres travaux ont montré que des enzymes chitinolytiques sont produits en absence de la chitine ou tout au moins des traces de quantités d'enzymes 102-kDa N-acetyl β -D-glucosamine, 42-kDa endochitinase et la 33-kDa endochitinase sont produites de manière constitutive (Inbar et Chet, 1995 ; Margolles-Clarck et *al.*, 1996 ; Carosolio et *al.*, 1999).

Selon d'autres auteurs Harman et *al.* (1993) ; Lorito et *al.* (1994a) ; Kubicek et *al.* (2001), aucune, sinon une induction plus faible d'enzymes chitinolytiques est notée en présence des composés tels que le chitosane, la cellulose, la chitine non purifiée ou la laminarine, indiquant plutôt une induction spécifique *in vitro*. Par contre, selon Tronsmo et *al.* (1993), le chitosane induit une forte production d'enzymes chitinolytiques.

En présence de la chitine comme source de carbone, les isolats doués d'une grande activité antagoniste *in vivo*, tels *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13), ont montré une bonne activité chitobiosidase, alors que l'isolat *T. harzianum* (Th.16) s'est caractérisé par une faible activité en chitobiosidase et une bonne activité en glucosaminidase. La plus grande activité en chitobiosidase est détectée chez l'isolat *T. longibrachiatum* (TL.10) qui n'avait pas manifesté une efficacité *in vivo* dans la protection des plants de pois chiche contre la fusariose. Les seuls isolats avec une bonne activité enzymatique glucosaminidase sont l'isolat Th.16 doué d'une bonne activité antagoniste *in vivo* et l'isolat TL.14 qui est moins efficace. Pour la glucanase, les trois isolats de *T. atroviride* ainsi que l'isolat Th.16 ont montré une faible activité enzymatique.

Le calcul du coefficient de corrélation de Pearson n'a montré aucune corrélation significative entre l'activité enzymatique des trois enzymes étudiées et le pouvoir antagoniste *in vivo*.

Il n'en demeure que pas moins de plusieurs travaux ont montré l'implication directe des enzymes chitinolytiques dans ce type d'antagonisme. Nous citons l'augmentation de l'activité chitinolytique chez *T. harzianum* rapportée par Haran et *al.* (1993) ; Limon et *al.* (1996) entraînant parallèlement l'augmentation de sa capacité antagoniste *in vitro*. De même Di Pietro et *al.* (1993) ; Lorito et *al.* (1994b) rapportent une activité inhibitrice des enzymes chitinolytiques purifiées contre un grand nombre de champignons phytopathogènes. Par ailleurs, un gène d'un isolat *T. harzianum* codant pour l'enzyme chitinolytique (chit 42) exprimée chez *E. coli* confère une activité biocontrôle à la bactérie. En plus, il a été montré par Garcia et *al.* (1994) que du

mycélium autoclavé induisait un haut niveau de la transcription du gène de l'endochitinase chit 42 chez des isolats de *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp. mycoparasites, mais pas chez des isolats des mêmes espèces qui ne sont pas mycoparasites

L'étude des différentes sources de carbone utilisées (le glucose, le saccharose et le glycérol) sur l'induction et la répression des enzymes chitinolytiques et glucanolytiques, a montré que d'une part les deux enzymes chitinolytiques étudiées (la chitobiosidase et la glucosaminidase) n'ont pas le même mécanisme d'induction, et d'autre part, une différence dans le mécanisme d'induction de la même enzyme (glucanase) peut exister entre les trois espèces étudiées, à savoir *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *T. atroviride*. En plus, une variabilité intra-spécifique existe dans l'activité enzymatique.

En présence du glucose, la glucanase est inhibée chez les trois espèces de *Trichoderma* spp. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus chez *Neurospora crassa* Shear et Dodge où chez cette espèce, le glucose empêche la production des deux β -glucanases $\beta(1-3)$ et $\beta(1-6)$ glucanases. Par contre, en cas de privation de carbone, la répression est levée et les β -glucanases sont produites en quantités significatives (Rey del et al., 1979 in Fayad, 1997). Ce type de contrôle est également exercé sur les $\beta(1-3)$ glucanases pour d'autres microorganismes, tels *Penicillium italicum* Stoll (Santos et al., 1978), et celles des bactéries, *Streptomyces* sp. et *Bacillus circulans* (Lilley et Ball, 1974 ; Rosa et al., 1984). A l'opposé chez *T. viride* et *Saccharomyces cerevisiae* Meyeer, les β glucanases sont produites pendant toute la période de croissance et ce, en présence de glucose, de telle sorte que l'activité spécifique augmente continuellement (Rey del et al., 1979 in Fayad, 1997).

La production des β -glucanases peut être inductible, semi-constitutive ou constitutive (Fayad, 1997). Chez plusieurs espèces microbiennes, la synthèse des β -glucanases se voit réprimée par l'abondance de diverses sources de carbone ou tout autre composé permettant une croissance active du mycélium.

Quant aux deux autres enzymes chitinolytiques (chitobiosidase et glucosaminidase), il est noté une variabilité intras-spécifique, en présence du glucose. Cette variabilité varie d'une absence à une faible ou une bonne activité. Selon Lorito (1998), des différences peuvent exister probablement entre des isolats de la même espèce, mais, qui évoluent dans différents habitats développant des exigences nutritionnelles et antagonistes différentes.

IL est également remarqué que la production de la chitobiosidase est inhibée par le saccharose chez les trois espèces étudiées de *Trichoderma* spp., alors que la glucosaminidase est plutôt induite chez les trois espèces, avec une certaine variabilité dans l'activité. Les deux enzymes chitinolytiques n'ont pas le même mécanisme d'induction, puisque la chitobiosidase est inhibée par le saccharose, alors que la glucosaminidase est induite. Avec le glycérol comme seule source de carbone, la production de la chitobiosidase est inhibée chez les trois espèces, tandis que la glucosaminidase est produite chez les trois espèces avec une variabilité selon les isolats. Concernant la gluconase, la production de cette enzyme est inhibée par le glycérol chez l'espèce *T. harzianum*, et elle est induite chez les deux autres espèces *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*.

Des différences dans les conditions d'induction des enzymes chez les isolats de *Trichoderma* ssp. ont été rapportées dans plusieurs travaux. Durant l'action mycoparasitaire de *T. harzianum* en confrontation dans les boîtes gélosées avec des champignons phytopathogènes, la production des différentes chitinases, particulièrement la 102-kDa, la 73-kDa N-acetyl-B-D-glucosaminidases et la 42-kDa endochitinase, est affectée différemment si *T. harzianum* est confronté avec différents champignons phytopathogènes (Inbar et Chet, 1995 ; Haran et al., 1996).

Ces données sont appuyées par l'analyse de l'expression des gènes. L'expression du gène *nag1* de l'enzyme (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) chez *T. atroviride* est induite par les parois cellulaires fongiques de *B. cinerea*, ainsi que par des produits commerciaux, tels le monomère de chitine N-acetyl glucosamine, l'oligomère di-N-acetyl chitobiose, et le tri-N-acetylchitotriose (Mach et al., 1999). Par contre, l'expression du gène de l'enzyme *ech 42* (endochitinase) de *T. atroviride* est déclenchée durant la culture sur les parois cellulaires fongiques, mais n'est jamais déclenchée par les produits de dégradation de la chitine citée (Margolles-Clarck et al., 1996 ; Carosolio et al., 1999 ; Mach et al., 1999). En revanche chez *T. harzianum* cette enzyme *ech 42* est induite par le N-acetyl glucosamine (Garcia et al., 1994 ; Schicker et al., 1998).

Cependant, selon plusieurs auteurs (De la Cruz et al., 1993 ; Ulhoa et Peberdy, 1991 ; Peter-bauer et al., 1996), la majorité des enzymes chitinolytiques ne sont pas produites ou inhibées en présence du glucose, du sucrose, ainsi que les produits chitinolytiques finaux.

Les enzymes chitinolytiques peuvent être produites en absence d'une source de carbone dans le milieu de culture ou sous des conditions de stress. En effet, le gène codant pour l'enzyme

endochitinase ech 42 de *T. atroviride* est remarquablement exprimé après un manque prolongé en source de carbone (Margolles-Clarck *et al.*, 1996 ; Mach *et al.*, 1999). En plus la transcription du gène ech-42 est déclenchée par certaines conditions de stress physiologiques, température voisine de 4°C, haute pression osmotique, l'addition de l'éthanol (Mach *et al.*, 1999), ainsi que par l'induction de la sporulation par la lumière (Carosolio *et al.*, 1994).

Il est intéressant de savoir que l'expression du gène chit 33 de *T. harzianum* induite par le N-acetyl-B-D-glucosamine, est également déclenchée par le manque ou l'épuisement en carbone, le manque d'azote et le stress physiologique (Kubicek *et al.*, 2001), suggérant que la régulation par des stress peut être un phénomène impliqué dans l'expression des gènes des chitinases de *Trichoderma* spp.

6.5. Conclusion

Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de la chitine, une induction des enzymes chitinolytiques ainsi que de la β -glucosidase est notée chez les trois espèces. L'étude de l'effet des différents substrats utilisés sur l'induction et la répression a montré que les deux enzymes chitinolytiques (chitobiosidase et glucosaminidase) n'ont pas le même mécanisme d'induction.

Ainsi, la chitobiosidase est induite par la chitine et le glucose alors qu'elle est inhibée par le saccharose et le glycérol chez les isolats des trois espèces, avec toutefois une variabilité intra-spécifique dans l'activité enzymatique. La glucosaminidase est induite par la chitine, le glucose, le saccharose et le glycérol chez les isolats des trois espèces. La glucanase est induite par la chitine, le saccharose et inhibée par le glucose chez les trois espèces, alors qu'en présence du glycérol, la glucanase est inhibée chez l'espèce *T. harzianum* et induite chez les deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* avec toujours une variabilité intra-spécifique.

L'existence d'une différence dans le mécanisme d'induction de la même enzyme (glucanase) entre les trois espèces étudiées est également montrée. Le glycérol induit la glucanase chez *T. harzianum* et l'inhibe chez *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*.

La comparaison de l'activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu SM + chitine et l'activité antagoniste *in vivo*, a montré qu'une bonne activité enzymatique *in vitro* n'est pas obligatoirement associée à une bonne activité antagoniste.

Pour confirmer l'implication directe des espèces de *Trichoderma* spp. dans l'activité antagoniste, il est nécessaire de purifier, caractériser les enzymes concernées et d'évaluer leur

activité *in vitro* sur la germination des spores, la croissance fongique et la lyse du mycélium. L'intérêt dans le cas de notre étude doit s'orienter vers les isolats qui se sont montrés les plus efficaces dans la protection du pois chiche contre la fusariose (Ta.3, Ta.7, Ta.13 et Th.16).

.

Conclusion générale et perspectives

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est l'une des plus importantes légumineuses alimentaires cultivées dans le monde ; il occupe la 3^{ème} place après le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.) (Sharma et al., 1994). En Algérie, le pois chiche est la seconde légumineuse alimentaire après la fève (Hamadache et Ait Abdallah, 1998).

En alimentation humaine, le pois chiche est une excellente source de protéines pour les populations pauvres avec une teneur de 25.3 % - 28.9 % du poids du grain, riche également en fibres, en glucides complexes, en vitamines et en minéraux (Muehlbauer et Tullu, 1997 ; MacMichael, 2001) ; il est utilisé aussi dans l'alimentation animale.

Cultivé essentiellement dans les zones littorales et les plaines intérieures, la situation du pois chiche en Algérie n'est pas encourageante à cause des faibles productions et rendements enregistrés ces dernières années. Ceci est dû essentiellement aux mauvaises conditions

climatiques, à la non maîtrise de l'itinéraire technique et des conditions phytosanitaires (Bouznad et al., 1998). L'Algérie est l'un des principaux importateurs du pois chiche dans le monde, elle occupe la 6^{ème} place après l'Inde, le Pakistan, l'Espagne, le Bangladesh et les AEU (Mac Michael, 2004).

Le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (*Foc*) est considéré comme étant la maladie transmise par le sol la plus importante sur pois chiche à travers le monde. Les attaques par le *Foc* peuvent détruire complètement la culture, quand les conditions sont favorables au développement de la maladie (Anjaih et al., 2003 ; Halila et Strange, 1996 ; Navas-Cortes et al., 2000a). Les pertes annuelles de rendement ont atteint 10 % en Inde (Mayer et al., 1997), 12 à 15 % en Espagne (Landa et al., 2004), 40 % en Tunisie (Navas-Cortés et al., 2000b) et de 10-50 % au Pakistan (Khan et al., 2001).

En Algérie, cette maladie rapportée pour la première fois par Bouznad et al.(1990) est considérée parmi les maladies les plus importantes sur pois chiche où des prospections réalisées dans les différentes régions du pays, ont révélé la forte présence de cette maladie. Dans le Nord Ouest du pays 20- 45 % des champs prospectés sont affectés par la fusariose du pois chiche (Maatougi, 1996). Selon Sayoud et al.(1999) la maladie reste assez localisée, surtout dans le Nord-Est du pays, avec des attaques sévères notamment dans la région de Guelma et Skikda (Bellah et al., 2003). Récemment Bekkar et al. (2007) ont étudié l'incidence et la gravité de la maladie dans trois régions du Nord-Ouest Algérien, à savoir Mascara, Sidi Bel-Abbès et Ain Temouchent.

Parmi les moyens de lutte, la rotation culturale, la solarisation du sol, l'utilisation de semence indemne de *Foc*, l'élimination des débris végétaux infestés, le traitement de la semence par les fongicides sont employés contre le *Foc*, dont le succès est limité (Haware et al., 1996 ; Trapero-Casas et Jiminez-Diaz, 1985). Le moyen de lutte le plus efficace et économique contre cette maladie est l'utilisation de cultivars résistants. Cependant, cette méthode est limitée par la grande variabilité pathologique du *Foc*.

La lutte biologique offre des potentialités de contrôle des maladies où certains agents antagonistes sont capables de contrôler des maladies contre lesquelles aucun moyen de lutte chimique ou résistance de l'hôte n'existe, et avec moins de contraintes environnementales que les pesticides (Hanson et Howell, 2002). Ces dernières années la lutte biologique par l'utilisation

d'agents antagonistes fongiques et bactériens a été envisagée contre le *Foc*. Ainsi des isolats de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., et des isolats non pathogènes de *F. oxysporum* isolés à partir de la rhizosphère du pois chiche, ont montré leur efficacité dans la suppression de la fusariose du pois chiche sous des conditions contrôlées. Par conséquent, la lutte biologique pourrait offrir des potentialités pour la suppression de la fusariose en plein champ, particulièrement lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des cultivars partiellement résistants et un choix adéquat de la date de semis (Landa et al., 2004).

L'objectif de notre étude est la recherche d'agents antagonistes du *Foc*. Nous avons ciblé des isolats appartenant au genre *Trichoderma*, suite à des travaux antérieurs qui ont montré que les isolats de ce genre sont efficaces dans la réduction de l'incidence de la maladie lorsque les graines de pois chiche sont traitées avec une suspension de spores de *Trichoderma* spp. avant le semis dans un sol préalablement infesté par le *Foc* (Kaci et Oussaid, 1999 ; Zikhouni, 2005 ; Benkraouche, 2006). Ainsi l'isolement de l'agent antagoniste est effectué à partir du sol et de la rhizosphère des plants de pois chiche.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à une étude taxonomique des espèces de *Trichoderma* spp. utilisées dans cette étude. L'appartenance des isolats au genre *Trichoderma* et la détermination des espèces est basée sur les caractéristiques morphologiques décrites par Rifai (1969) ; Bissett (1984 ; 1991a,b,c). Cependant, la détermination des espèces chez ce genre est délicate à cause de la grande similitude qui peut exister entre elles. Les caractéristiques morphologiques sont douées d'une grande plasticité et la taxonomie basée uniquement sur les critères morphologiques chez le genre *Trichoderma* n'est pas suffisante. Ainsi, nous avons envisagé d'approcher cet aspect par un séquençage de gènes, notamment le gène de la région ITS (ITS-1, 5.8 et ITS-2), et une partie du gène codant pour les facteurs d'élongation de la traduction des protéines EF-1 α (Elongation Factor) pour clarifier l'identité de nos isolats *Trichoderma* spp. Une étude de la diversité génétique inter-spécifique et intra-spécifique des isolats de *Trichoderma* spp. par RAPD est également réalisée. L'identification des espèces de *Trichoderma* spp. par cet outil est également recherchée.

Après, la confirmation de l'identité de l'espèce des isolats de *Trichoderma* spp., nous avons réalisé une étude qui a porté sur le taux de croissance et l'aspect cultural à différentes températures, la sporulation ainsi que la production de pigments en milieu de culture chez les

isolats. La variabilité de ces caractères chez les espèces de *Trichoderma* spp. est également étudiée, car certains de ces caractères peuvent être utiles dans l'identification.

Parmi les aspects étudiées, l'évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. *in vitro* et *in vivo* à l'égard de deux isolats du *Foc*. Le premier appartient au pathotype responsable du jaunissement, et le second appartient au pathotype responsable du flétrissement. Les paramètres étudiés *in vitro* concernent l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance (confrontation directe et indirecte), et la sporulation. L'efficacité *in planta* des isolats de *Trichoderma* spp. dans la protection des plants contre la fusariose du pois chiche est évaluée par des traitements de la semence du pois chiche à l'aide d'une suspension de spores avant le semis dans un sol préalablement infesté par le *Foc*. L'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la stimulation de la croissance végétale est également recherchée par une évaluation du taux de stimulation des différents paramètres de croissance.

Plusieurs auteurs ont rapporté le rôle des enzymes chitinolytiques et glucanolytiques comme déterminants des mécanismes de l'activité antagoniste chez les *Trichoderma* spp. L'analyse de ces enzymes est réalisée par l'étude de l'effet de plusieurs substrats sur l'induction et la répression des deux enzymes chitinolytiques (chitobiosidase et glucosaminidase) et glucanolytique (glucanase). La variabilité interspécifique et intra spécifique des isolats étudiés concernant la production de ces enzymes sont également étudiées. Dans cette étude, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre la production d'enzyme et la capacité antagoniste des *Trichoderma* spp.

Références bibliographiques

Abassi, P. A., Miller, S. A., Meulia, T., Hoitink, H. A. J. and Kim, J. M. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost amended potting mixes by using molecular markers. Applied and Environmental Microbiology 65: 5421-5426

Abd-El-Al, A.T. and Phaff, H. J. 1968. Exo-p-glucanases in Yeast. Biochem Journal 109: 347-360.

Abdelkader, M. M. 1997. Field application of *Trichoderma harzianum* as biocide for control of bean root rot disease. Egyptian Journal of Phytopathology 25 (1-2): 19-25.

Altomare, C., Norvell, W. A., Bjorkman, T. and Harman, G. E. 1999. Solubilisation of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology 65: 2926-2933.

Anjaih, V., Cornelis, P. and Koedam, N. 2003. Effect of genotype and root colonization in biological control of Fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aureoginosa* PNAI. Canadian Journal of Microbiology 49: 85-91.

Bae, Y. and Knudsen, G. 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. Applied and Environmental Microbiology 66: 810-915.

Bekkar, A. A., Belabid, L., Bellahcene, M. et Bouznad, Z. 2007. Le flétrissement vasculaire du pois chiche dans le Nord-ouest algérien : Importance et pouvoir pathogène de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Colloque international sur les Biotechnologies. Quelles Biotechnologies pour les pays du sud, 24-25 novembre 2007, Oran, Algérie.

Bellah, F., Khaldoun, A. and Kaouani, A. 2003. Sélection pour la résistance du pois chiche à la maladie du flétrissement causée par *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceris*. Céréaliculture 40 : 12-24.

Benhamou, N. and Chet, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83: 1062-1071.

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.

Benkraouche, S. 2006. Etude *in vitro* et *in vivo* de l'activité antagoniste de quelques souches des espèces *Trichoderma atroviride* P. Karsten, *Trichoderma harzianum* Rifai et *Trichoderma longibrachiatum* Rifai contre l'agent du flétrissement du pois chiche *Fusarium oxysporum* Schlechtend. : Fr.f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato. Mémoire Ingénieur Agronome, INA. El-Harrach. 80 p.

Biles, C. L. and Hill, J. P. 1988. Effect of *Trichoderma harzianum* on sporulation of *Cochliobolus sativus* on excised wheat seedling leaves. Phytopathology 78: 656-659

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec.nov. Canadian Journal of Botany 62: 924-931.

Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany 69: 2357-2372.

Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany 69: 2373-2417.

Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany 69: 2418-2420.

Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany 70: 639-641.

Bissett, J., Szakacs, G., Ann Nolan, C., Druzhinina, I., Gradinger, C and Kubicek, C. P. 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. Canadian Journal of Botany 81: 570-586.

Bouznad, Z., Corbiere, R., Labdi, M. et Spire, D. 1998. Apport des techniques biochimiques et moléculaires pour la caractérisation des champignons pathogènes des légumineuses à grosses graines, dans les pays du pourtour méditerranéen. pp 103-127. *in* : les légumineuses alimentaires méditerranéennes. Renne (France), 20-22 février. Ed. INRA (Les colloques de l'INRA n° 88).

Bouznad, Z., Solh, M., Labdi, M., Rouibah, M. and Tebbal, H. 1990. Preliminary results on the causes of wilt and root rot of chickpea in Algeria. In the 8th congress of the mediterranean phytopathological union pp 345-346. Agadir-Morocco

Bouznad, Z., Solh, M., Rouibah, M., Si Hassan, A. and Stasaid, A. 1992. Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* in Algeria: characterization of some strains genetic resistance. 1er Conférence Européenne sur les protéagineux. pp 371-372.

Bowls, D. J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. Annual Review of Biochem 59: 873-907.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal of Biochem 72: 248-254.

Brando-Goes, L., Lima da Costa, A. B., Loupes de Carvalho Freire, L. and Tinti de oliveira, N. 2002. Random amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism against *Rhizoctonia solani*. Brazilian Archives of Biology and Technology 45(2): 20-27

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P. and Mach, R. L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Applied and Environmental Microbiology 71: 3957-3965.

Carosolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrea-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech 42, in mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology 65: 929-935.

Carosolio, C., Gutierrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M. and Heretra-Estrella, A. 1994. Characterization of ech 42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proceedings of National Academy of Sciences USA 91: 10903-10907

Carstens, M., Vivier, M. A. and Pretorius, I. S. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. Transgenic Research 12: 497-508.

Chaveri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E. and Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia 95(6): 1100-1140.

Chaverri, P. and Samuels, J. G. 2004. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreacea): Species with green ascospores. Study in mycology 11(1-2): 1-119

Chérif, M. and Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80: 1406-1414.

Cherif, M., Omri, N. et Boubaker, A. 1996. Etude sur les champignons antagonistes *Gliocladium*, *Trichoderma* et *Pythium oligandrum*. Actes des 3^{èmes} journées Nationales. sur les acquis de la Recherche Agro-Vétérinaire Halieut.-Nabeul- 29/11- 1/12/1996. pp 104-110.

Chet, I. 1987. *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil born pathogenic fungi. In: Chet I. (eds). Innovative approaches to plant disease control, pp137-160. Wiley, New York.

Correll, J. C. 1991. The relationship between forma specialis, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81:1061-1064.

Dandurand, L. M. and Knudsen, G. R. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. Phytopathology 83: 265-270

De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A. and Llobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry 206: 859-867.

De Mayer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. and Holte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104: 279-286.

Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M. and Harman, G. E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308-313.

Dodd, S. L., Lieckfeldt, E. and Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.

Doi, Y., Abe, Y. and Sugiyama, J. 1987. *Trichoderma* Sect. Saturnisporum, sect. nov. and *Trichoderma ghanense* sp. Nov. *Bulletin of the National Science Museum Series B (Tokyo)* 4: 19-26.

Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang Univ. SCI.* 6B (2):100-112.

Dubey, S. C., Suresh, M. and Birendra, S. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt *Biological Control* 40: 118-127.

Dubos, B. 1986. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) Pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers. (pourriture grise de la vigne). pp 35-49. in : L'emploi d'ennemis naturels dans la production des cultures. Versailles, 10 janvier 1985. Ed. INRA (Les colloques de l'INRA, n° 34).

Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.

Emani, C., Garcia, J., Lopata-Finch, E., Pozo, M. J., Uribe, P., Kim, D. J., Sunilkumar, G., Cook, D. R., Kener-Ley, C. M. and Rathore, K. S. 2003. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1:321-336.

Fayad, K. P. 1997. La $\beta(1,6)$ -Glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14, un actinomycète antagoniste à *Phytophthora* spp. : Production, Purification et Caractérisation. Mémoire en vue de l'obtention de grade de maître ès sciences (M.Sc). Faculté des sciences- Université de Sherbrooke-Quebec-Canada.

Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman G. E., Kubicek C. P. (eds) *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 1, Basic biology, taxonomy and genetic, pp 1-33. Taylor and Francis Ltd, London, UK.

Gams, W. and Meyer, W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia* 90: 904-915.

Garcia, I., Lora, J. M., de la Cruz, J., Binetz, T., Llobell, A. and Pintor-Toro, J. A. 1994. Cloning and characterization of a chitinase (chit42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 27: 83-89.

Gomez, I., Chet, I. and Herreastrela, A. 1997. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Molecular and General Genetic*. 256: 127-135.

Gracia-Garza, J. A., Bailey, B. A., Paulitz, C., Lumsden, R. D., Releder, R. D. and Roberts, D. P. 1997. Effect of sclerotial damage of *Sclerotinia sclerotiorum* on the mycoparasitic activity of *Trichoderma hamatum*. *Biocontrol Science and Technology* 7: 410-413.

Halila, H. M. and Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathological Mediterranean* 35: 67-74.

Hamadache, A. et Ait Abdallah, F. 1998. Lutte contre les adventices en culture de pois chiche d'hiver: un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce. *Céréaliculture* 33 : 7-12.

Hanson, L. E. and Howell, C. R. 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of proplaste fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. *Mycological Research*. 1063 : 321-328.

Haran, S., Shickler, H., Oppenheim, A. and chet, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.

Haran, S., Shickler, H., Pe'er, S., Logemann, S., Oppenheim, A. and Chet, I. 1993. Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. *Biological Control* 3: 101-108.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease* 84: 377-393.

Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A. and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318

Harman, G. E., Howell, C. R., Vitebro, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004a. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews/Microbiology* 2: 43-56.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A. and Chen, J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo 17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147-153.

Harman, G. E., Taylor, G. and Starz, T. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. *Plant Disease* 73: 631-637.

Haware, M. P., Nene, Y. L. and Natarajan, M. 1996. The survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in the soil in the absence of the chickpea. *Phytopathological Mediterranean* 35: 9-12.

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1890-1898.

Hervás, A., Landa, B., Datnoff, L., Trapéro-Casas, J. L. and Jiménez-Díaz, R. M. 1997. Use of commercial and indigenous microorganisms to control Fusarium wilt of chickpea. In: 10th congress of Mediterranean Phytopathological Union. Montpellier, pp 709-711.

Hibar, K., Daami-Ramadi, M., Khiareddine, H. et El Mahjoub, M., 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnology Agronomy Society and Environnement* 9: 163-171.

Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman G. E., Kubiceck C.P. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2, Enzymes, biological control and commercial application, pp.129-151. Taylor and Francis Ltd, London, UK.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. and Puckhaber, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.

Howell, C. R., Stipanovic, R. D. and Lumsden, R. D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology* 3: 435-441.

Ibrahim, I. A. M., Ragab, M. M., Sahab, A. F. and Mougy, N. S. M. 1996. Biocontrol of tomato root and wilt. *Egyptian Journal of Phytopathology* 24(1-2): 45-56.

Inbar, J. and Chet, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141: 2823-2829.

Itho, Y., Takahashi, S., Takizawa, H., Nikaidou, N., Tanaka, H., Nishihashi, H., Watanabe, T. and Nishi-Zawa, Y. 2003. Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 847-855.

Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G. and Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Genes genealogies support *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathology* 51: 72-77.

Jiménez-Gasco, M. M., Navas-Cortés, J. A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2004. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95-104.

Jiménez-Gasco, M. D. M., Pérez-Artés, E. and Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology* 107: 237-248.

Kaci, Z. et Ousaïd, Y. 1999. Essai de lutte biologique contre la fusariose de pois chiche par l'utilisation de quelques isolats de *Trichoderma* spp. Mémoire Ingénieur Agronome, INA. El-Harrach. 78 p.

Kelly, A. G., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. and Jiménez-Díaz, R. M. 1994. Utilisation of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes infecting chickpea. *Phytopathology* 84: 1293-1298.

Keszler, A., Forgács, E., Kotai, L., Vizcaino, J. A., Monte, E. and Garcia-Acha, I. 2000. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Sciences* 38: 421-424

Khan, I. A., Alam, S. S. and Jabbar, A. 2001. Standardization of medium for the production of maximum phytotoxic activity by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4: 1374-1376.

Kleifdet, O. and Chet, H. 1989. *Trichoderma harzianum* interaction with plant and effect on growth response. *Plant soil* 144: 267-272.

Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. and Lorito, M. 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant pathology* 83: 11-23.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Böner, T., Meyer, W. and Kubicek, C. P. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89: 442-460.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T. and Kubicek, C. P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online USA* 93: 7755-7760.

Kullnig-Gradinger, C., Krupica, T., Woo, S. L., Rey, M., Benitez, T., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* 105(6): 770-772.

Kullnig-Gradinger, C., March, R. L., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a

prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech 42 gene expression before mycoparasitic contact. Applied and Environmental Microbiology 66: 2232-2234.

Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycological Research 106(7): 757-767.

Landa, B. B., Hervas A., Bettiol, W. and Jiménez-Díaz, R. M. 1997. Antagonistic activity of bacteria from chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Phytoparasitica 25: 305-318.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Hervás, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. Phytopathology 91: 807-816.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2004. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. Phytopathology 94: 946-960.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Gasco, M. M., Katan, J., Retig, B. and Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. Plant Disease 90: 365-374.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C. M., Kubicek, C. P., Samuels, G. J. and Borner, T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. Mycological Research 33: 313-322.

Lilley, G. and Ball, A. T. 1974. The production of P(1,3)-glucanase by thermophilic species of *Streptomyces*. Journal of general Microbiology 83: 123- 133.

Limon, M., Llobell, A., Pintor-Toro, J. and Binitez, T. 1996. Over expression of chitinase by *Trichoderma harzianum* strains used as biocontrol fungi. In R.A.A. Muzzareli (eds), chitin Enzymologie II. Atec, Grottammare (AP), Italy, pp.245-252.

Lo, C.T., Nelson, E. B., Hayes, C. K. and Harman, G. E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phyloplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88: 129-136.

Lorito, M. 1997. Chitin in agriculture. Carbohydrates in Europe 19: 24-29.

Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol 2. Enzymes, biological control and commercial application, pp. 73-99. Taylor and Francis, London UK.

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C. P. 1996b. Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology 178: 6382-6385.

Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. and Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.

Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994a. Purification, characterization and synergistic activity of glucan 1,3- β -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398-405.

Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Straus, J., Peterbauer, C. K. and Kubicek, C. P. 1996a. Mycoparasitic interaction relieves binding of cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequence of ech 42 (endochitinase-encoding) gene of *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 93: 14868-14872.

Lorito, M., Peterbauer, C. K., Hayes, C. K., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994b. Synergistic combination of cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140: 623-629.

Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. and Scala, F. 1996 c. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbes Interactions* 9: 206-213

Maatougui, M. E. H., Bouznad, Z. and Labdi, M. 1996. Chickpea in Algérie. In N.P., Saxena, M.C., Johansen, C., Virmani, S. M., and Harris, H.(eds). A chapter from adaptation of chickpea in the west Asia and North Africa region pp 89-99.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. and Jansson, J. K. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3073-3081.

MacMichael, G. 2001. Pois chiches : situation et perspectives. *Bulletin bimensuel* Vol. 14 N° 3. 4p.

MacMichael, G. 2004. Pois chiches : situation et perspectives. *Bulletin bimensuel* Vol. 17 N° 15. 4p.

Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kullning, C. M., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride*(*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1858-1863.

Margolles-Clarck, E., Harman, G. E. and Penttila, M. 1996. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the cbb1 promoter of *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2152-2155.

Mayer, M. S., Tullu, A., Simon, C. J., Kumar, J., Kaiser, W. J., Kraft, J. M. and Muehlbauer, F. J. 1997. Development of a DNA marker for *Fusarium* wilt resistance in chickpea. *Crop Sciences* 37: 1625-1629

McBeath, J. H., Carpenter, E. and Sun, M. 1995. Evaluation of *Trichoderma atroviride* in controlling *Rhizoctonia solani* of potato under potato field conditions in Montana. *Phytopathology* 85:1153. (Abstract)

Metcalf, D. A. and Wilson, C. R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma Koningii*. *Plant Pathology* 50: 249-257.

Meyer, M. T. and Phaff, H. J. 1977. Survey of a (1,3)-glucanase activity among yeasts. *Journal of Bacteriology* 131: 702-706.

Migheli, Q., Gonzalez-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A. and Ramon-vidal, D. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4- endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* 88: 673-677.

Muehlbauer, F. J. and Tullu, A. 1997. *Cicer arietinum*. • HYPERLINK
"http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/chickpea.html"
• www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/chickpea.html •

Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. E. and Seaby, D. A. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. *Microbiology* 140: 769-777.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B. and Jiménez-Díaz, R. M. 2000b. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivar. *European Journal of Plant Pathology* 106: 135-146.

Navas-Cortés, J. A., Hau, B. and Jiménez-Díaz, R. M. 2000a. Yield losses in chickpeas in relation to development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology* 90: 1269-1278.

Oh, S. U., Lee, S. J., Kim, J. H. and Yoo, I. D. 2000. Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B, and C from *Trichoderma atroviride*. *Tetrahedron Letters* 41: 61-64.

Olivier, J. M. et Germain, R. 1983. Etude des antibiotiques volatils des *Trichoderma*. In : Les antagonismes microbiens mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. 24^{ème} colloque de la société française de phytopathologie, Bordeaux (26-28 mai) 1983. Ed. INRA, pp, 17-34

Pérez-Artés, E., Roncero, M. I. G. and Jiménez-Díaz, R. M. 1995. Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Journal of Phytopathology* 143: 105-109.

Peter-bauer, C., Lorito, M., Hayes, C. K., Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1996. Molecular cloning and expression of nag1 (N-acetyl -B-D-glucosaminidase-encoding gene from *Trichoderma harzianum* P1. *Current Genetics* 29: 812-820.

Rapilly, F. 1968. Les techniques de mycologie en phytopathologie végétale. Annales Epiphyties INRA. Paris. Vol. 19 N° hors série. 102 p.

Reese, E. T. 1977. Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Recent Advances in Phytochemistry* 11: 3 1 1-367.

Rehner, S. A. and Samuels, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625-634.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.

Roberti, R., Flori, P., Pisi, A., Brunelli, A. and Cesari, A. 2000. Evaluation of biological seed treatment of wheat for the control of seed- born *Fusarium culmorum*. *Journal of Plant Disease and Protection* 107: 484-493.

Rosa, E., Nebreda, A. R. and Villa, T. G. 1984. Synthesis and regulation of *Bacillus circulans* WL- 12 (1,3)-gluctuase. *Journal of general Microbiology* 130: 2483-2487.

Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I. and Piche, Y. 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86: 434-443.

Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K. and Prasad, R. D. 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* 51: 217-222.

Saguez, J., Vincent, C., Laberche, J. C. and Giordaneno, P. 2007. Pourquoi les inhibiteurs de chitinases peuvent être considérés comme de nouveaux moyens de lutte contre les aphides. *Le Botaniste* 27(3/4) : 23-31.

Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma* : a Review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100 (8): 923-935.

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlenry, L. A. and Petrin, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:146-170.

Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F. and McCray, E. B. 2007. *Trichoderma* online : // nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Trichoderma/ndex.cfm.

Samuels, G. J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. and Kubicek, C. P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. *Study in Mycology* 41: 1-52.

Samuels, G. J., Suarez, C., Solis, C., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismail, A. and Evans, H. C. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological research* 110: 381-392.

Sharma, P. C., Winter, P., Büniger, T., Hüttel, B. and Kahl, G. 1994. Expanding the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea. pp175-198. *in*: DNA markers and breeding for resistance to *Aschochyta* Blight in chickpea. Proceeding of the symposium on Application of DNA fingerprinting for crop improvement: Marker assisted selection of chickpea sustainable agriculture in the dry area .Udupa, S. M., and Weigand (eds). 11-12 april 1994, ICARDA, Aleppo, Syria.

Sanger, F., Nicklen, S. and Chase, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl USA* 74 (12): 5463-5467.

Santos, T. , Sanchez, M. , Villanueva, J. R. and Nombela, C. 1978. Regulation of the p (1 - 3)-glucanase system in *Penicillium italicum*: glucose repression of the various enzymes. *Journal of Bacteriology* 133: 465-471.

Sayoud, R., Ezzahiri, B. et Bouznad, Z. 1999. Les maladies des légumineuses alimentaires. *in*: les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. Guide pratique. 64 p.

Schickler, H., Haran, S., Oppenheim, A. and Chet, I. 1998. Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer N-acetylglucosamine. *Mycological Research* 102: 1224-1226.

Singh, U. P., Pathak, K. K., khare, M. N. and Singh, R. B. 1979. Effect of leaf extract of garlic on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Sclerotinia sclerotiorum* and on gram seeds. *Mycologia* 71: 556-564.

Stasz, T. E., Nixon, K., Harman, G. E., Weeden, N. and Kutler, G. A. 1989. Evaluation of phonetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isosyme polymorphism. *Mycologia* 81: 391-403.

Terakakawa, T., Takaya, N., Horiuchi, H., Koike, M. and Takagi, M. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 16: 439-443.

Thrane, C., Tronsmo, A. and Jensen, D. F. 1997. Endo-1, 3 β glucanase and cellulose from *Trichoderma harzianum* purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103: 331-344

Trapero-Casas, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 1985: Fungal wilt and root rot disease of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75: 1146-1151.

Tronsmo, A., Klemsdal, S. S., Hayes, C. K., Lorito, M. and Harman, G. E. 1993. The role of hydrolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* in biological control of plant diseases In P. Suomeins and T. Reinikainen (eds). *Trichoderma reesei* Cellulases and Other hydrolases. pp 159-168.

Turner, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubicek, C. P. and Böner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* section *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89: 442-460.

Ulhoa, C. J. and Peberdy, J. F. 1991b. Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology* 137: 2163-2169.

Vinale, F., Ghisalberti, E. M., Marra, R., Scala, F., Barbetti, M., Woo, S. L., Ritieni, A., Ferracane, R., Sivasithamparam, K. and Lorito, M. 2007. Role of *Trichoderma* secondary metabolites in plant growth promotion and in activation of plant defence genes. XIII International Congress on Molecular Plant-Microbes Interactions. July 21-27, 2007, Sorrento, Italy. Book of Abstracts pp398.

Webb, E. C. 1992. Enzyme Nomenclature. Academic Press, San Diego, 863.

Webster, J. and Lomas, N. 1964. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridine ? *Transactions of the British Mycological Society* 47: 535-540.

Williams, J. G. K., Kubelik, A., Livak, K. J., Rajalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Woo, S. L., Noviello, C. and Lorito, M. 1998. Sources of molecular variability and applications in characterization of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. In Y. Couteaudier and J. Jackson (eds). *Molecular Variability of fungal pathogens*. pp 187-207.

Zikhouni, L., 2005. Etude de l'efficacité des techniques d'incorporation de quelques isolats de l'agent antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* Rifai et *Trichoderma harzianum* Rifai dans la lutte contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padw.) Matuo et K. Sato. agent du flétrissement fusarien du pois chiche. Mémoire Ingénieur Agronome, INA. El-Harrach. 96 p.

Zimand, G., Valansky, L., Elad, Y., Chet, I. and Manulis, S. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98(5): 531-534.

▪

▪ *Annexes*

Annexe 1

Extraction de l'ADN

- Broyer à sec (faible quantité l'ordre de mg) du mycélium à 6000 rpm /30 secondes deux fois dans un broyeur (Magna A Lyser)
- Rajouter 400 μ l du tampon AP1 à 100 mg du mycélium frais dans chaque tube et mélanger
- Rajouter 4 μ l de Rnase dans chaque tube
- Rajouter 130 μ l du tampon AP2 dans chaque tube, et après agitation placer les tubes pendant 5 min dans un bloc froid (glace).
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min
- Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf (1.5ml) en deux fois
- Rajouter 1.5 du volume (800 μ l) du tampon AP3 (tampon fixateur de l'ADN sur la résine)

- Mélanger et prendre 700 µl du tube et les mettre dans la colonne qui contient une résine échangeuse d'ions
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1min
- Vider le tube collecteur ; l'ADN est retenu sur la résine de la colonne
- Reprendre le reste du volume d'ADN à centrifuger à 8000 rpm pendant 1minute
- Mettre les colonnes sur d'autres tubes et rajouter 500µl du tampon AP2 dans chaque tube
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1min
- Vider le tube collecteur
- Rajouter 500 µl du tampon de lavage (AP1)
- Centrifuger à 13.000 rpm pendant 2 min
- Fixer la colonne sur un autre tube Eppendorf (1.5 ml)
- Rajouter 150 µl de l'eau biomoléculaire (Sigma) filtrée sur un filtre à 0.1µm
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 2 min et récupérer l'ADN élué (concentré) soit 150 µl

La concentration de l'ADN est évaluée par spectrophotométrie, et des dilutions sont réalisées afin d'obtenir la concentration adéquate pour l'amplification (10 ng/ µl)

Annexe 2

2.1. Purification des Produits de la PCR des ITS et des EF: La purification est réalisée selon la méthode des Kit Qiagen

Principe : le principe de la méthode est la fixation de l'ADN (utilisé pour le séquençage) sur la résine (colonne) et l'élimination des résidus de la PCR.

- Rajouter 250 µl de la solution Binding Buffer à 45µl des produits de la PCR restant (Binding buffer : solution fixatrice de l'ADN sur la membrane)
- Centrifuger pendant trois minutes à 12.000 rpm
- Transférer les colonnes sur des tubes Eppendorf de 1,5 ml pour éluer l'ADN à l'intérieur
- Rajouter 50 µl de l'eau biomoléculaire pour éluer l'ADN au milieu de la membrane
- Centrifuger pendant une minute à 10.000 rpm pour l'élution de l'ADN
- Récupération des produits de la PCR purifié dans le tube et jeter la colonne

2.2. Arrêt de la réaction de séquençage :

La réaction de séquençage est arrêtée à l'aide de la solution stop, pour stopper l'action des enzymes dans le Mix. Ainsi 5 µl constitué de 2 µl de Na₂EDTA (EDTA dissodique 0,5 M)+ 2 µl de Sodium acetate 3M (NaOAc) + 1 µl de glycogène (20 ng/ml), sont rajoutés dans chaque puit.

2.3. Précipitation de l'ADN :

- 60 µl de l'éthanol absolu 95 %, sont rajoutés dans chaque puit, ensuite la microplaque est scellée avec une feuille d'aluminium autocollant.
- Vortexer quelques secondes et mettre à -20°C durant 10 min pour précipiter l'ADN.
- Centrifuger la microplaque durant 30 minutes à 2550 rpm à 4°C
- Après centrifugation, éliminer l'éthanol 95 % en retournant la microplaque sur du papier Torq.

2.4. Purification de l'ADN :

- lavage avec de l'éthanol à 70 %, en mettant 200 µl d'éthanol 70 % glacial dans chaque puit de la microplaque, centrifuger pendant 5 minutes à 2550 rpm à 4°C
- Après centrifugation, éliminer l'éthanol 70% en retournant la microplaque sur du papier « Torq ».
- Le lavage à l'éthanol 70 % est répété deux fois.
- Réaliser une courte centrifugation à l'envers des plaques à 300 rpm à 4°C sur du papier « Torq » pendant quelques secondes.
- La plaque est introduite dans un speed-vac pendant 10 min pour évaporer l'éthanol.
- 40 µl de la solution SLS (Simple loading solution) (formamide) sont rajoutés pour suspendre le culot d'ADN.
- Une goutte de l'huile minérale est rajoutée dans chaque puit pour empêcher l'évaporation des échantillons.

Annexe 3

Les ITS

ITS01

```
TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCCTCCGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAA
```

TS02

```
TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
```

TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTCGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG

ITS03

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATAACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGG
GACCAACCAAACCTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAA
AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGAC
CTCGGGAGCCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGC
GCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

ITS04

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAAACCTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGTTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTCGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTA

ITS05

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAAACCTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGTTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTCGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG

ITS06

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGACCAAGGCGCCCGCCGGAG
GACCAACCAAACCTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCT
CGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGG
GTCGGCGTTCGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA

GCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCC
AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAA

ITS07

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATAACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGG
GACCAACCAAACCTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAA
AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGAC
CTCGGGAGCCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTCTGC
GCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

ITS08

CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCG
GAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCT
GAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTG
GCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGGCCACA
GCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAATAAGCGGAGGANN

ITS09

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTA

ITS10

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAAA

ITS11

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCG CAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTTCGGGCTCCCGTTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAAA

ITS12

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCG GACCAAGGCGCCCCGCCGGAG
GACCAACCAAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTC
GTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGG
TCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTTCTGCCCGCA
GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCC
AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAA

ITS13

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCAATGTGAACCATAACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCAGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGA ACCAGGCGCCCGCCGGAGG
GACCAACCAAACTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAA
AATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGAC
CTCGGGAGCCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGC
GCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCG

ITS14

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCG CAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTTCGGGCTCCCGTTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCCGAAATACAGT
GGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCAC
AGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAAA

ITS15

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCGGAG
GACCAACCAAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCT
CGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGG
GTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA
GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCC
AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAA

ITS16

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCGGAG
GACCAACCAAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCT
CGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGG
GTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA
GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCC
AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
AGGAA

ITS17

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTCCCCGGGCGCGTTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCC
GGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGTTCGCGGTCTGTTTTATTTTTGCTC
TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCGCCCCGAAATACAGTGG
CGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGCCACAG
CCGTAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTGACCTCGGATCAGGTAG

ITS18

TTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCGGAG
GACCAACCAAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCT
CGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGG
TCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA
CCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCA

ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAA
GGAA

Les factures d'élongations

EF01

TATCGTACGTACTTTCCCCTCCCGTCGGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTAACCA
TTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACTGACTT
TGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGCTTTCAGTCCACG
TCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACTGGTC
ACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTGAGA
TCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCCCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTTCCT
ACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCAGCAA
ACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCCTCATCAACCTTCCAAC
AGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCA
AGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCT
GGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTATTGCATC
ATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCA

EF02

AATCAATTGTCTGCGTTATCGTACGTACTTTCCACCTCCCGTCTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAG
GAACATTGTGCTAACCATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCCG
AACACAAAATACTGACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACA
CCGAGACTTTCAGTCCACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAAC
GTTGCCTTGCAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTC
GAGAAGGTAAGCTTGAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCCCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTT
CACCACCCCGCTTTCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTTCGGGTTTTAGT
GGGGATGCACCTCCAGCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCT
TGCGTATCAACCTTCCAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCCGA
ACTCGGCATAGGGTTCCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGT
ATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTT
GATCCCGTGCACCTATTGCATCATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCC
CGGCAAAATCC

EF04

TTATCGTACGTACTTTCCCCTCCCGTCGTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTAGCTAA
CCATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACTG
ACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTCAGTC
CACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACT
GGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTT
GAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCCCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTTC
TCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCA
GCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCCTCATCAACCTTC
CAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGGTT
CCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATT
GCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTCA
TTGCATCATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCA

EF05

GTATCGTACGTAGCTTTCCACCTCCCCTCGGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTA
ACCATTTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACT
GACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTTCAG
TCCACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGA
CTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGC
TTGAGATCCCCTCAATTTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTT
TCTCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTC
CAGCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCT
TCCAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGG
TTCCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACAT
TGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTC
ATTGCATCATCGCCACAACAATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCAC

EF06

TTATCGTACGTACAATCCTGTTCCCTACTGTCGGCATCATTGCCGGTCTGATTCTCAAACACTTGTGCT
AACCATTGCCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAAATGAGATCGATCGAACACAATACTGA
CTTGCTATAACAGCCACGTGACTCCGAAAGTCGACCACCGTAAGTTGCGCCCTTGTCTCCGATATC
AAACATCGTTTGATGCGGGACACCTATTCTTGAACACAGGGCTAACCATGCATAATACAGACCGGTCA
CTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCTGACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACT
GATTTTCGCTCGATTCTTCTCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTC
GACAATTTTTTATCACCCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTTTGCTGTGCTT
GGTTTTTGTGTTTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCCCTGCTTTTTTCTGCTTCACTCTCACTTCTCCTCG
TCATCATTCAACGTGCTCTGCGTCTTTGGTCAATCAGCGACGCTAACCACTTTTACATCAATAGTGAAG
CCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTGGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAG
CGTGGTATCACCATTGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGT
AAGTCTTCACTAAGTTCATGCTGCAATTGCGGACCAGTGATAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGC
CCCGGTCAAATAG

EF07

GTGTGCAATACCTCTAACCCCTTCGTCAGCGGCATTACTCTCTGCCGTTGACACTGCTGTGTATGACATTT
TGCTGACCATCATCGTCTAGGGGTTCGTATTTCTCCATCAGACAGCTTTTCGATCGACTCCAATACTGACT
TGCTACAACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCAGTGAGTAACTCCCAATCCCTCGAGCCCTA
CAGCCATCGACTCTGTGCGTCCGGCGGGAGGTATTATCATCATCATGAACGCATCCAGCTGACATTTTC
CCAACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATTGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGA
AGGTGAGCTCATTTCTGCTTTTTCACTCCGCTCCCTGAGCACAATCGTGCCCGACAATTCTGTCCTCAGT
CTTGTCATTTTTTTTCTCGCAGCATCACACCCCGCTTACCTGTCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAA
TTTTCTGGCGGCCTTGCTTGGCTTTTGTGTTTGTGTTGGCTGCAACCCCGCTATC
GCCACTGTCCCGTCCCAACGAATTGACTCAATTGCATCGTCTTCTCCATCTCTGTTGTGGTTCATTGTG
CTAATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAGCTCGGCAAGGGTCTTTTCAAGTATGCGTGGGTTCT
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTC
CCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTCGTTTTTCTCATTGATACTTGGAGACCAAGATTTCAT
AACGTGCCGCTCTGTAGACGCT

EF08

GTAATCAGTACGTACTTTCCCTCCCCTCGTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTA
ACCATTTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACT
GACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTTCAG

TCCACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGA
CTGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGC
TTGAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTT
TCTCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTGTTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTC
CAGCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCT
TCCAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGG
TTCCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACAT
TGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTC
ATTGCATCATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGTGCCAC

EF09

GTAATCGTACGTACTTTCCCTCCCGTCTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTAA
CCATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACTG
ACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTCAGTC
CACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACT
GGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTT
GAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTTC
TCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTGTTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCA
GCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCTTC
CAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGGTT
CCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATT
GCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTCA
TTGCATCATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCC

EF10

CGTAATCGTACGTACTTTCCCTCCCGTCTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTAA
CCATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACTG
ACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTCAGTC
CACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACT
GAGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTT
GAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTTC
TCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTGTTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCA
GCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCTTC
CAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGGTT
CCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATT
GCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTCA
TTGCATCATCGCCACGAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCC

EF11

CGTAATCGTACGTACTTTCCCTCCCGTCTGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTA
ACCATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACACAAAATACT
GACTTTGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGACTTTCAG
TCCACGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGA
CTGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGC
TTGAGATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTT
TCTCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTGTTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTC
CAGCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCT
TCCAACAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCATAGGG
TTCCTTCAAGTACGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACAT
TGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCACCTC

ATTGCATCATCGCCACAACAACATACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCACGGGTCAAATACN
T

EF12

TCGTCGTAATCGTACGTATTATCCCTTCTTCACGTTGGCATCAGTCGCCGCTCTGATTTCCAAACACTTG
TGCTAACTACCACCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAATGAGATCGATCGAACACAGTA
CTGACTTGCTACAACAGCCACGTGACTCCGGAAAGTCGACCACCGTGAGTTACACCCTCTTCTCCTGC
TACCGATATCAAATGTCGTTTGATACGGGACATCTACTCTTTGAACACAGGGCTAACCATTTATCATA
AGACCGGTCACTTGAATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGT
AAGCTTCAACTCATCTTCGCCCAACTCTTCTCCACATTCAATTGTGCCGACAATTCTGCAGAGAATT
TTCGTGTCGACAATTTTTTCATCACCCCGCTTTGCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTGC
TGTCGTTTGGTTTTAGTGGGGTTTTCTGTGCACCCCACTAGCTCACTACTTTTTTCTGCTTCGCTTTCAC
TTCCAGCCATCATTCAACGTGCTCTGTGTCATCACTTTAGCGATGCTAACCCTTTCCATCAATAGG
AAGCCGCTCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCG
TGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCAT
TGGTATGTTCTTCCATCAATTTACACAGCGATTACAAGCCAGTGATAACAAGCAATTACAGACGCT
CCCGGCCCGCCAAATACNT

EF13

GTAAAGTAGCGCAATCGTCAGCGGCATTCTCTCTGCCGTTGACACTGCTGTGTATGACATTTTGCTGAC
CGTCATCATCTAGGGGTTCGTATTTCTCCATCAGACAGCTTTCGATCGACTTCAATACTGACTTGCTACA
ACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCAGTGAGTAACTCCCAATTCCTCGAGCCCTGCTGCCAT
CGATTCTATCGGTCGGCGCGGGGTATCATCATGAACGCATCCAGCTGACATTTCTCAATAGACTG
GTCACCTGATCTACCAGTGCGGTGGTATTGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTGAGCTCA
TTTCTGCTTTTTACTCCGCTTCTGAGCACCATCGTGCCCGACAATTCTGTCTCAGTCTTGTCAATTTT
CCTTCGAGCATCACACCCCGCTTCTGTCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTGGCTGCCT
TGCTTGTCTTTTAGTGGGGTGCCAACTTTTTGTTGGTGTCAACCCCGCTATCGCCACTGTCCCTCTGTC
CCAACGAATTGTAATCGTCAATTGCATCGTCTTCTGCCTCCATCTGTGTGGTTCATTGTGCTAATCA
TGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAA
GCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGT
ACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGCTGTTCCTCATTGACACTTGGAGACCATCATTCAAACGTGC
CGCTCTACATACGCTCCTC

EF14

TATCGTACGTACTTTCCCTCCCGTCGGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTAACCA
TTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAAACAGATCGGCCGAACAAAAACTGACTT
TGCTGCGACAGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGCTTTCAGTCCACG
TCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACTGGTC
ACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTGAGA
TCCCTTCAATTTTCGACGATTTCTGTGCCTCTGCCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTCTCCT
ACCCCTCCTTTGGGGCAGCCAAATTTTTTTGTTGCGTTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCAGCAA
ACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTTCGTCATCAACCTTCCAAC
AGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCA
GTACGCGTGGGTTCTGACAGCTCAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGA
AGTTCGAGACTCCCAAGTACTAGTCACGTCATTGGTATGTTGATCCCGTGCCTCATGCATCATCGCCA
CAACAACATA

EF15

GTATCGTACGTACAATCCTGTTCCCTCACGTCGGCATCATTCGCCGGTCTGATTCTCAAACACTTGTGCTA
ACCATTCCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAATGAGATCGATCGAACACAATACTGAC
TTGCTATAACAGCCACGTCGACTCCGGAAAGTCGACCACCGTAAGTTGCGCCCTCTTGCTCCGATATCA
AACATCGTTTGATGCGGGACACCTATTCTTGAACACAGGGCTAACCATGCATAATACAGACCGGTCAC
TTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTG
ATTTTCGCCTCGATTCTTCCTCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCG
ACAATTTTTCATCACCCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCTGTCGTTG
GTTTTAGTGGGGTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCCCTGCTTTTTCTGCTTCACTCTCACTTCCCTCGT
CATCATTCAACGTGCTCTGCGTCTTTGGTCATTACAGCGACGCTAACCACTTTTACATCAATAGTGAAGC
CGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGC
GTGGTATCACCATTGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTA
AGTCTTCACTAAGTTCATGCTGCAATTGCGGACCAGTGCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCA
CCG

EF16

GTAATCGTACGTACAATCCTGTTCCCTCACGTCGGCATCATTCGCCGGTCTGATTCTCAAACACTTGTGCT
AACCATTCCTTACTAGGGGTGCGTATATCCATCAATCATCTTGAATGAGATCGATCGAACACAATACT
GACTTGCTATAACAGCCACGTCGAACATCCGGAAAGTCGACCACCGTAAGTTGCGCCCTCTTGCTCCGA
TATCAAACATCGTTTGATGCGGGACACCTATTCTTGAACACAGGGCTAACCATGCATAATACAGACCG
GTCACCTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTC
AACTGATTTTCGCCTCGATTCTTCCTCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCG
TGTCGACAATTTTTCATCACCCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTTGTGTC
GTTTGGTTTTAGTGGGGTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCCCTGCTTTTTCTGCTTCACTCTCACTTC
CTCGTCATCATTCAACGTGCTCTGCGTCTTTGGTCATTACAGCGACGCTAACCACTTTTACATCAATAGGA
AGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTG
AGCGTGGTATCACCATTGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTG
GTAAGTCTTCACTAAGTTCATGCTGCAATTGCGGACCAGTGCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCC

EF17

GTTATCGTACGTACTTTCCCTCCCGTCGGCCTCATCTGCCGGTCTGATTTCAAGGAACATTGTGCTAAC
CATTGTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAAAAATCATCTTGAACAGATCGGCCGAACACAAAATACTGA
CTTTGCTGCGACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACCGTGAGTAAACACCGAGCTTTCAGTCCA
CGTCAAGCTACGGCCTGCGCGTGGCGTCTCTGCGATGAACATGCCAGCTAACGTTGCCTTGCAGACTGG
TCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTGA
GATCCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTCTCTGCCAACATCTTTTTTTTACCACCCCGCTTTCTCC
TACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCAGCA
AACCCTATCCTCTGCCGCCCTCTGCTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCCTCATCAACCTTCAA
CAGTCTGCGCAGCAATGCTAATCATTTTCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTC
AAGTACGCGTGGGTCTGA

EF18

ATCGTACGTACAATCCTGTTCCCTCACGTCGGCATCATTCGCCGGTCTGATTCTCAAACACTTGTGCTAAC
CATTGCCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAATGAGATCGATCGAACACAATACTGACTT
GCTATAACAGCCACGTCGACTCCGGAAAGTCGACCACCGTAAGTTGCGCCCTCTTGCTCCGATATCAAA
CATCGTTTGATGCGGGACACCTATTCTTGAACACAGGGCTAACCATGCATAATACAGACCGGTCACCTG
ATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTGATTT
TCGCCTCGATTCTTCCTCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCGACAA
TTTTTCATCACCCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCTGTCGTTGGTTT
TTAGTGGGGTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCCCTGCTTTTTCTGCTTCACTCTCACTTCCCTCGTCATC
ATTCAACGTGCTCTGCGTCTTTGGTCATTACAGCGACGCTAACCACTTTTACATCAATAGTGAAGCCGCC
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGG
TATCACCATTGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTAAGTC

TTCACTAAGTTCATGCTGCAATTGCGGACCAGTGCATAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGTGCCACC
G

Annexe. 4

4.1. Préparation du réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg du bleu de Coomassie G250 dans 50ml d'éthanol à 95%, rajouter ensuite 100 ml d'acide phosphorique à 85%, ensuite compléter la solution avec de l'eau distillée froide à 1000 ml.

4.2. Courbe étalon du dosage des protéines :

Une solution de départ de BSA de 1mg/ml est utilisée, ensuite des volumes de 5µl, 10, 15, 20, 25, 30, 40 sont pris à partir de cette solution. Pour chaque volume, on ajuste jusqu'à 200µl avec de l'eau distillée stérile, et on rajoute 2ml du réactif de Bradford ; après agitation la lecture est réalisée à 595nm

SBA µl	5	15	20	25	30	40
SBA µg	5	15	20	25	30	40
H2O µl	195	185	180	175	170	160
Réactif de Bradford	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
Absorbance	0,460	0,780	0,862	0,902	0,917	0,958

Courbe etalon

.....

Y= 0,0317X

Courbe étalon du dosage des protéines totales

4. 3. Détermination des concentrations en protéines totales des filtrats de cultures des 18 isolats *Trichoderma* spp. sur les différents milieux de cultures

Densité optique (DO)

la détermination de la concentration en protéines totales est réalisée dans 200 µl du filtrat de culture auquel sont rajoutés 2ml du réactif de Bradford

Concentration en protéine totale (µg) des filtrats de cultures

Concentration en protéine
(µg)

Milieu Isolats	SM + glucose	SM+ Saccharose	SM+ chitine	SM+ glycerol
TL.1	1.42	0.03	0.03	0.03
TL.2	1.14	0.03	0.41	0.63
Ta.3	0.03	0.03	0.35	0.54
TL.4	0.03	0.03	0.95	1.26
TL.5	2.02	0.28	0.79	2.30
Th.6	0.98	1.92	0.82	1.83
Ta.7	0.03	1.70	0.03	1.61
TL.8	1.26	0.03	0.88	0.95
TL.9	0.54	0.79	0.98	1.36
TL.10	2.11	0.03	0.95	0.79
TL.11	0.76	1.29	0.03	1.23
Th.12	1.23	1.07	0.03	1.92
Ta.13	3.44	12.74	1.77	9.75
TL.14	2.21	1.61	2.27	4.23
Th.15	1.61	0.32	0.09	3.34
Th.16	1.77	1.58	0.63	6.69
TL.17	1.89	1.80	0.03	1.20
Th.18	1.80	0.60	1.23	2.84

PT : Protéine totale SM : milieu synthétique

Les filtrats de culture pour chaque milieu doivent contenir la même concentration en protéine totale, ainsi pour chaque milieu des calculs sont réalisés.

SM + glucose

Souches	FC	Substrat de l'enzyme	Tampon
---------	----	----------------------	--------

TL.1	(11,50µl FC + 18,50µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.2	(14,20 µl FC + 15,80 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.3	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.4	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.5	(8 µl FC + 22 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.6	(16,50µl FC + 13,50 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.7	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.8	(12,90 µl FC + 17,10 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.9	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.10	(7,70 µl FC + 22,30 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.11	(21,40µl FC+ 8,60 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.12	(10,80 µl FC + 19,20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.13	(4,70 µl FC + 25,30 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.14	(7,50 µl FC + 22,50 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.15	(10 µl FC + 20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.16	(9,20 µl FC + 20,80 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.17	(8,60 µl FC + 21,40 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.18	(9 µl FC + 21 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl

SM + Saccharose

Isolats	FC	Substrat de l'enzyme	Tampon
TL.1	30µl FC	30 µl	30 µl
TL.2	30 µl FC	30 µl	30 µl

Ta.3	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.4	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.5	30 µl FC	30 µl	30 µl
Th.6	(4,4 µl FC + 25,6 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.7	(5 µl FC + 25 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.8	30 µl	30 µl	30 µl
TL.9	(10,65 µl FC+ 19,35 µl)	30 µl	30 µl
TL.10	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.11	(6,5µl FC+ 23,5 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.12	(7,85 µl FC + 22,15 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.13	(1 µl FC + 29 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.14	(5,20 µl FC + 24,8 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.15	(26,3 µl FC + 3,7 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.16	(5,32 µl FC + 24,68 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.17	(4,70 µl FC + 25,3 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.18	(14 µl FC + 16 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl

SM+ Chitine

Isolats	FC	Substrat de l'enzyme	Tampon
TL.1	30µl FC	30 µl	30 µl
TL.2	(25,65 FC + 4,35 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.3	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.4	(13,80 µl FC + 16,20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.5	(13,30 µl FC + 16,70 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.6	(12,80 µl FC + 17,20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.7	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.8	(12 µl FC + 18 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.9	(10,70 µl FC+ 19,30 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.10	(11 µl FC + 19 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.11	30µl FC	30 µl	30 µl
Th.12	30 µl FC	30 µl	30 µl
Ta.13	(6 µl FC + 24 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.14	(4,60 µl FC + 25,40 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.15	30 µl	30 µl	30 µl
Th.16	(16,70 µl FC + 13,30 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.17	30µl FC	30 µl	30 µl
• Th.18	(8,50 µl FC + 21,50 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl

SM + glycerol

Isolats	FC	Substrat de l'enzyme	Tampon
---------	----	----------------------	--------

TL.1	30µl FC	30 µl	30 µl
TL.2	(25,8 FC + 4,2 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.3	30 µl FC	30 µl	30 µl
TL.4	(12,90 µl FC + 17,10 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.5	(7 µl FC + 23 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.6	(8,80 µl FC + 21,20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.7	(10 µl FC + 20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.8	(17,10 µl FC + 12,90 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.9	(12 µl FC+ 20 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.10	(18,75 µl FC + 11,25 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.11	(13,20 µl FC + 16,80 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.12	(8,45 µl FC + 21,55 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Ta.13	(1,7 µl FC + 28,3 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.14	(3,83 µl FC + 26,17 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.15	(4,85 µl + 25,15 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.16	(2,40 µl FC + 27,60 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
TL.17	(13,50 µl FC + 16,50 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl
Th.18	(5,70 µl FC + 24,30 µl H ₂ O)	30 µl	30 µl

RESUME

Le flétrissement fusarien causé par *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (*Foc*) est considéré comme étant la maladie transmise par le sol, la plus importante sur pois chiche à travers le monde. Le moyen de lutte le plus efficace et économique contre cette maladie est l'utilisation de cultivars résistants. Cependant, cette méthode est limitée par la grande variabilité pathologique du *Foc*. L'objectif de cette étude est la recherche d'agents antagonistes du *Foc*. Nous avons ciblé des isolats appartenant au genre *Trichoderma*. Le genre *Trichoderma* avait été introduit à l'origine par Persoon en 1794, mais la taxonomie et l'identification de ses espèces est restée incertaine jusqu'à ces dernières années. Les caractéristiques morphologiques sont douées d'une grande plasticité et la taxonomie basée uniquement sur les critères morphologiques chez le genre *Trichoderma* n'est pas suffisante.

Le recours au séquençage de gènes restés hautement conservés chez les champignons, peut lever certaines confusions et clarifier la taxonomie chez les isolats de *Trichoderma* spp. Ainsi pour certains isolats étudiés, si le séquençage de la région ITS (ITS1, 5.8 et ITS2) laisse encore une certaine ambiguïté, en revanche, le séquençage du gène EF-1 α a clarifié l'appartenance de chaque isolat à une espèce donnée. L'amplification de l'ADN par RAPD a mis en évidence d'une part la présence d'une diversité génétique au sein des espèces de *Trichoderma* spp. utilisées et d'autre part la présence de bandes spécifiques des espèces de *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*, montrant ainsi que cet outil est utile dans l'identification des *Trichoderma* spp. L'étude et la comparaison de l'efficacité des isolats appartenants aux espèces antagonistes *T. atroviride*, *T. harzianum* et *T. longibrachiatum* *in vitro* et *in vivo* contre le *Foc*, a montré que *in vitro* une réduction significative de la croissance et de la sporulation du *Foc* est obtenue sous l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. par rapport au témoin. Le traitement de la semence par les isolats de *Trichoderma* spp. avant le semis dans un sol préalablement infesté par le *Foc* a abouti à une réduction significative de l'indice de maladie par rapport au témoin non traité. L'indice de maladie le plus faible est obtenu avec l'isolat *T. atroviride* (Ta.3), avec un pourcentage de réduction de 83.92 % de l'indice de maladie par rapport au témoin contre le pathotype de flétrissement. Les isolats les plus efficaces dans la protection des plants de pois chiche contre la maladie sont les trois isolats de l'espèce *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7, et Ta.13) ainsi que l'isolat *T. harzianum* (Th.16). Parallèlement à la réduction de l'incidence de la maladie, une stimulation de la croissance végétale du pois chiche est observée concernant la hauteur de la tige, le poids frais et le poids sec de la partie aérienne sous l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. utilisés. Les résultats relatifs à l'analyse et l'évaluation de la production de deux enzymes chitinolytique, la glucosaminidase et la chitobiosidase et d'une enzyme glucanolytique, la glucanase chez l'ensemble des 18 isolats de *Trichoderma* spp. dont l'activité antagoniste a été mise en évidence contre le *Foc* ont montré que les enzymes chitinolytiques étudiées (glucosaminidase et chitobiosidase) n'ont pas le même mécanisme d'induction, et peuvent être induites et inhibées différemment, où le même produit peut induire l'une et inhiber l'autre. Ainsi, la chitobiosidase est inhibée par le saccharose et le glycérol alors que la glucosaminidase est induite. L'existence d'une différence dans le mécanisme d'induction de la même enzyme (glucanase) entre les trois espèces étudiées est également montrée. Le glycérol induit la glucanase chez *T. harzianum* et l'inhibe chez *T. longibrachiatum* et *T. atroviride*. Une variabilité dans la production des enzymes étudiées avait été démontrée au sein des isolats appartenant à la même espèce. La comparaison de l'activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu SM + chitine avec l'activité antagoniste *in vivo*, a montré que une bonne activité enzymatique *in vitro* n'est pas obligatoirement associée à une bonne activité antagoniste.

Abstract

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (*Foc*) is regarded as the most important soil-borne disease of chickpea (*Cicer arietinum* L.) throughout the world. The most practical and cost-efficient method for management of Fusarium wilt of chickpea is the use of resistant cultivar, the effectiveness of which is limited by the occurrence of different races and pathotypes in *Foc*. The objective of this study is the search of antagonistic agent against the *Foc*. We have target isolates belonging to the genus *Trichoderma*. Although originally introduced by Persoon in 1794, the taxonomy and identification of *Trichoderma* remained problematic until relatively recently. Classical approaches based on the use of morphological criteria are, as in several other fungi, difficult to apply to *Trichoderma*, due to the plasticity of characters. Molecular tools used for identification based on the sequencing of genes allowed raising ambiguity and solving confusion in the taxonomy of *Trichoderma*. Thus for some isolates used in this study if with ITS rDNA (ITS1-5,8S-ITS2) sequencing confusion is remained, partial sequences of the protein-coding gene translation elongation factor (*EF-1 α*) resolve the species identity. Amplification of *Trichoderma* spp. DNA isolates by RAPD exhibits different DNA banding patterns among the three species. The presence of an intra-specific genetic diversity was also shown. In our study the RAPD primers used amplified DNA fragments that are diagnostic for *T. longibrachiatum* and *T. atroviride* species. The RAPD technique appears to be a useful diagnostic tool for the identification of *Trichoderma* species. Study and comparison of efficiency of the antagonist species *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* against *Fusarium* wilt were carried out using *in-vitro* and *in-vivo* based bioassay. Significant decrease of both growth and conidia production of the pathogen are obtained compared to the control. The seed treatment by *Trichoderma* spp. isolate before sowing in a soil already infested by the pathogen led to a significant decrease of disease severity compared to the untreated control. The weakest index of disease severity is obtained with the *T. atroviride* isolate (Ta.13), which cause 83.92 % reduction compared to the control. The most effective isolates in protection chickpea seedlings against the disease were the three strains of *T. atroviride* species (Ta.3, Ta.7, and Ta.13) as well as the isolate *T. harzianum* (Th.16). Reduction of disease severity obtained was associated with an increase of the vegetal growth including the stem height as well as the plant fresh and dry weight. Results relating to the analysis and the evaluation of the production of two enzymes chitinolytic (glucosaminidase, the chitobiosidase) and of a glucanolytic enzyme (glucanase) of the 18 isolates of *Trichoderma* spp. of which the activity was shown against the *Foc*, showed that enzymes chitinolytic studied (glucosaminidase and chitobiosidase) didn't exhibit the same mechanism of induction, where the same product can induce the first and inhibit second. So, the chitobiosidase is inhibited by sucrose and glycerol while the glucosaminidase is induced. The existence of a difference in the induction mechanism of the same enzyme (glucanase) between the three species studied is also shown. The glycerol induces the glucanase of *T. harzianum* and inhibits the same enzyme production of *T. longibrachiatum* and *T. atroviride*. Furthermore variability in the production of the studied enzymes had been shown within isolates belonging to the same species. The comparison of enzymatic activity of *Trichoderma* spp. isolates SM+ chitin medium with antagonist activity *in vivo*, showed that none relationship exist between a good activity enzymatic *in vitro* and a good antagonist activity.

الملخص

يعتبر مرض ذبول الحمص المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* Schlechtend. : Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (*Foc*) من أهم الأمراض المتنقلة عن طريق التربة و التي تصيب نبات الحمص في العالم. الي يومنا هذا يبقى استعمال الأصناف المقاومة من أهم الطرق الناجعة و الاقتصادية لمكافحة المرض، لكن محدوديتها تكمن في التنوع الكبير للقدرة الامراضية للفطر المسبب للمرض. الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن عزل فطرية ذات فعالية في مكافحة الحويبة لمرض ذبول الحمص. في هذا البحث صوبنا اهتمامنا نحو العزل المنتمية إلى جنس *Trichoderma*. على الرغم من تعريفه في الأصل من طرف Persoon عام 1794، إلا أن التصنيف وتحديد النوع عند جنس تريكودرما *Trichoderma* ظل إشكالا قائما بحد ذاته حتى وقت قريب نسبيا. استخدام المعايير الكلاسيكية الشكلية والمرفولوجية يصعب تطبيقها لتحديد النوع بدقة، كما هو الحال عند العديد من الفطريات ، نظرا لمرونة هذه الخصائص. استعمال أدوات البيولوجية الجزيئية المستخدمة لتحديد النوع على أساس تحديد تسلسل DNA لبعض المورثات، سمح برفع الغموض وحل الالتباس في تصنيف بعض أنواع الجنس *Trichoderma* . بالنسبة لبعض للعزل المستعملة في هذه الدراسة، تحديد تسلسل DNA لمورثة ITS rDNA (ITS1-5,8S-ITS2) لم يرفع الالتباس، بينما تحديد تسلسل DNA لجزء من جين بروتين عامل استطالة الترجمة (α - 1 EF) مكن من رفع الالتباس. كما أن عملية تضخيم DNA بواسطة تقنية RAPD بينت من جهة وجود تنوع وراثيا داخل النوع الواحد وفيما بين الأنواع ومن جهة أخرى وجود عصابات DNA - RAPD marker خاصة بالنوعين *T. atroviride* و *T. longibrachiatum* . من خلال النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة يبدو أن تقنية RAPD مفيدة في التعرف على أنواع جنس *Trichoderma*. دراسة و مقارنة فعالية عزل *T. atroviride*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* تجاه الفطر المسبب للمرض تمت في المخبر و في البيت الزجاجي. النتائج المتحصل عليها في المخبر، بينت تقليل معتبر في إنتاج الأبواغ و النمو مقارنة مع الشاهد. أما في البيت الزجاجي فمعالجة البذور بمستحضر *Trichoderma* قبل زرعها في تربة محقونة مسبقا بالفطر الممرض أدى الي تقليل محسوس في شدة الإصابة بالمرض. أضعف مؤشر لشدة المرض تحصلنا عليه بواسطة العزلة *T. atroviride* (Ta.13) و التي أعطت نسبة تخفيض في شدة الإصابة قدرت ب 83.92 % مقارنة مع الشاهد. كما أن أكثر العزل فعالية في حماية نبات الحمص ضد المرض هي العزل الثلاث لنوع *T. atroviride* (Ta.3، Ta.7 و Ta.13)، وكذا العزلة (Th.16) *T. harzianum*. التقليل المحسوس في شدة المرض كان مرتبطا بزيادة في نمو نبات الحمص مس كلا من الطول فضلا عن الوزن الطازج والجاف. النتائج المتعلقة بتحليل وتقييم إنتاج اثنين من الإنزيمات (chitinolytic) glucosaminidase و chitobiosidase و glucanase) أظهر أن الإنزيمات chitinolytique (glucosaminidase و chitobiosidase) ليس لها نفس آلية التحفيز، حيث يمكن أن تؤدي نفس المادة الي تحفيز الأول و تثبيط الثاني. بحيث يمنع كل من السكروز الغليسيرول إنتاج Chitobiosidase بينما يحفز إنتاج glucosaminidase. كما يقوم الغليسيرول بتحفيز إنتاج إنزيم glucanase عند *T. harzianum* و منع إنتاجها عند *T. atroviride* و *longibrachiatum* . أضف إلى ذلك فقد بينت هذه الدراسة تنوع في إنتاج الإنزيمات المدروسة بين العزل المنتمية لنفس النوع. إن مقارنة فعالية الإنزيمات المدروسة بوجود الكيتين مع القدرة التضادية لعزل *Trichoderma* بينت أنه لا يوجد هناك ارتباط قوي بين فعالية الإنزيمات و القدرة التضادية لهذه العزل.