

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté des Sciences

**Thèse de Doctorat LMD**

Présenté par : M<sup>r</sup> Reghmit Abdenaceur

**En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT LMD:**

**Filière :** Biotechnologie

**Option :** Biotechnologie

**Thème**

---

**Recherche de certaines souches fongiques antagonistes productrices de molécules bioactives isolées de la rhizosphère de l'olivier et évaluation de leurs potentiels de lutte contre la Verticilliose de l'olivier**

---

**Devant le jury composé de :**

M <sup>r</sup> Riba A.	Professeur U.M.B. de Boumerdes	Président
M <sup>me</sup> Tihar-Benzina F.	Maitre de conférences U.M.B. de Boumerdes	Directrice de thèse
M <sup>r</sup> López Escudero J.	Professeur U.C.R.C.M.B d'Espagne	Codirecteur de thèse
M <sup>me</sup> Oulebsir-Mohand Kaci H.	Professeur U.M.B. de Boumerdes	Examinatrice
M <sup>me</sup> Talbi-Khemili S.	Professeur U.M.B. de Boumerdes	Examinatrice
M <sup>me</sup> Meddad-Hamza A.	Maitre de conférences U.B.M. d'Annaba	Examinatrice
M <sup>me</sup> Sahir-Halouane F.	Professeur U.M.B. de Boumerdes	Invitée

**Année Universitaire: 2021/2022**

## **REMERCIEMENTS**

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de recherche Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCORE) à l'Université de M'hamed Bougara de Boumerdes.

Je remercie en premier lieu Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la volonté, la patience, la force et le courage pour accomplir ce modeste travail et mes chers parents en deuxième lieu pour leur affection inépuisable et leurs précieux conseils et soutien tout au long de mon cursus, qu'ils acceptent l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens vivement à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude à ma directrice de thèse **M<sup>me</sup> Benzina F.** maître de conférences à la faculté des sciences de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de m'avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Elle a toujours su me faire confiance et m'apporter l'aide nécessaire, tant sur le plan scientifique que moral.

Je tiens à remercier tout particulièrement **M<sup>r</sup> López Escudero J,** professeur au Département d'Agronomie, Université de Cordoba, d'Espagne, pour son aide précieuse dans l'identification moléculaire des souches de *Verticillium dahliae*.

Je remercie sincèrement **M<sup>r</sup> Riba A.** Professeur et Doyen de la Faculté des Sciences à l'Université de Boumerdes pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant le jury de cette thèse ; qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Mes profonds remerciements s'adressent aussi aux examinatrices **M<sup>me</sup> Mohand. Kaci H** et **M<sup>me</sup> Khemili S** Professeurs à la Faculté des Sciences **de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes** et **M<sup>me</sup> Meddad-Hamza A. Maître de Conférence** à la faculté de Sciences **Biologiques de l'Université de Annaba** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter l'examen de ce travail aussi, pour votre temps et vos efforts fournis pour lire et discuter mon manuscrit. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement **Mme Sahir-Halouane F.** Professeur à la faculté des Sciences de l'Université M'hamed Bougara de Boumerdes et responsable de la formation doctorale Biotechnologie. Votre présence au sein de notre jury constitue pour moi un grand honneur. Nous vous remercions de votre enseignement, soutien et gentillesse. Qu'il me soit permis de vous présenter à travers ce travail le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude envers le personnel administratif de département de biologie et en particulier **Mr Messaoudene Djamel**, chef de département de biologie pour leurs écoutes et serviabilité.

Mes remerciements vont également à **M<sup>r</sup> Djeziri M.** d'avoir réalisé l'identification de quelques métabolites secondaires par HPLC au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC). Qu'il veuille bien agréer l'expression de mon profond dévouement.

Mes vifs remerciements s'adressent à **M<sup>lle</sup> Oukali Z**, ingénieur du laboratoire VALCORE et tous mes collègues de travail au département de biologie et de Chimie de l'université de Boumerdes.

Ma profonde gratitude s'adresse à **M<sup>me</sup> Behidj N.** professeur à la Faculté des Sciences-Boumerdes et directrice de laboratoire Technologies Douces, Valorisation Physico-Chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité. Merci madame de m'avoir accordé l'accès à votre laboratoire et merci à tous les ingénieurs qui ont mis à ma disposition quelques appareils nécessaires à mes manipulations.

J'exprime un vif remerciement aux doctorants biotechnologues affiliés au laboratoire VALCORE, en particulier **Bouchaaba Y, Hadjouti R, Oukali Z, Benacer A et Ghozali H.**

## *Dédicaces*

Je dédie cette thèse, le fruit de plusieurs années d'études et de sacrifices à Mes très chers parents. Vous m'avez toujours comblé par votre tendresse et affection tout au long de mon parcours. Vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, vous avez toujours été présents à mes côtés. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, veuillez recevoir ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

A mes sœurs et à mon frère Mohamed, à toute ma famille, à tous mes amis, à tous ceux qui me sont chers, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon affection, mon respect, mon amour et ma gratitude.

**REGHMIT ABDENACEUR**

## Table de matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

### Première partie: Synthèse bibliographique

<b>Chapitre I. Etude de la verticilliose de l'olivier</b> .....	<b>5</b>
1. Historique et répartition géographique de la maladie.....	5
2. Distribution de la verticilliose de l'olivier en Algérie.....	5
3. Taxonomie et caractéristiques morphologiques.....	6
4. Symptômes.....	7
4.1. Le dépérissement rapide.....	8
4.2. Le dépérissement lent.....	9
5. Cycle de développement et processus d'infection.....	9
6. Pouvoir pathogène.....	10
7. Facteurs favorisant l'apparition de la verticilliose.....	11
7.1. Fluctuation saisonnière.....	11
7.2. Age et densité des arbres dans le verger.....	12
7.3. Effets de l'irrigation sur la verticilliose.....	12
7.4. Autres facteurs favorisant la dissémination de <i>V. dahliae</i> .....	12
8. Les systèmes de défense de l'olivier contre <i>V. dahliae</i> .....	12
8.1. Le système de défense constitutif et la résistance induite.....	13
8.2. Régénération naturelle.....	13
9. Moyens de lutte contre la verticilliose de l'olivier.....	14
9.1. Mesures de contrôle prises avant la plantation.....	15
9.1.1. Détection précoce de la maladie.....	15
9.1.2. Désinfection du sol.....	15
9.1.3. Pratiques culturales.....	15
9.2. Mesures de contrôle prises après la plantation.....	15
9.2.1. Pratiques culturales.....	15
9.2.2. Utilisation des fongicides chimiques.....	16
9.3. Limites des moyens de luttés préconisés.....	16
10. Les microorganismes antagonistes.....	17
<b>Chapitre II. Le genre <i>Trichoderma</i></b> .....	<b>17</b>
1. Caractéristiques et taxonomie.....	17
2. Identifications macroscopique et microscopique.....	20
3. Croissance et cycle fongique.....	22
4. Ecologie et habitat.....	23
5. <i>Trichoderma</i> : agents de lutte biologique contre les souches phytopathogènes.....	23
6. Modes d'action.....	23
6.1. Mécanismes d'action directs.....	23
6.1.1. Antibiose.....	23
6.1.2. Mycoparasitisme.....	24
6.2. Mécanismes d'action indirects des BCAs.....	26
6.2.1. Compétition.....	26
6.2.2. Induction de la résistance systémique.....	26

7. Métabolites secondaires produits par <i>Trichoderma</i> .....	27
7.1. Peptides non ribosomaux.....	28
7.1.1. Péptaboiles.....	28
7.1.2. Epipolythiodioxypiperazines.....	29
7.1.3. Sidérophores.....	30
7.2. Polykétides.....	31
7.3. Terpènes et terpénoïdes.....	31
7.4. Alcaloïdes.....	32
8. Les biopesticides.....	33
8.1. Avantages des biopesticides.....	34
8.2. Inconvénients des biopesticides.....	34
8.3. Production de biopesticide.....	34

## Deuxième partie: Partie expérimentale

<b>Chapitre I. Isolement, caractérisation des souches fongiques et évaluation du pouvoir antagoniste des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. contre les souches de <i>V. dahliae</i></b> .....	36
<b>1. Matériel et méthodes</b> .....	36
1.1. Prospections et présentation des sites d'étude.....	36
1.2. Prélèvement des branches et des rameaux infectés pour l'isolement de <i>V. dahliae</i> .....	37
1.3. Echantillonnage du sol pour l'obtention de <i>Trichoderma</i> .....	37
1.4. Isolement et purification de <i>V. dahliae</i> .....	37
1.5. Identification des isolats de <i>V. dahliae</i> .....	38
1.5.1. Identification phénotypique.....	38
1.5.1.1. Etudes macroscopiques.....	38
1.5.1.2. Etudes microscopiques.....	38
1.5.2. Identification moléculaire des souches fongiques de <i>Verticillium dahliae</i> .....	39
1.5.2.1. Extraction d'ADN.....	39
1.5.2.2. Amorces de PCR.....	39
1.5.2.3. Réaction PCR.....	40
1.6. Caractérisation physiologique des isolats de <i>Verticillium dahliae</i> .....	40
1.6.1. Influence du milieu de culture.....	41
1.6.2. Influence de la température.....	41
1.6.3. Influence du pH.....	41
1.6.4. Influence de la salinité.....	41
1.6.5. Influence de la lumière.....	42
1.7. Agent antagoniste appartenant au genre <i>Trichoderma</i> .....	42
1.7.1. Isolement des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	42
1.7.2. Identification des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	43
1.7.2.1. Identification morphologique.....	43
1.7.2.2. Identification moléculaire de <i>Trichoderma</i> spp.....	43
1.7.3. Analyse phylogénétique.....	44
1.7.4. Caractérisation physiologique.....	45
1.7.5. Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats de <i>Trichoderma</i> spp....	45
1.7.5.1. Confrontation par contact direct.....	46
1.7.5.2. Confrontation à distance.....	46

1.7.5.3. Test des filtrats de culture des antagonistes testés.....	46
1.7.6. Mesure de la croissance mycélienne.....	47
1.7.7. Effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la germination des conidies de <i>V. dahliae in vitro</i> .....	48
1.7.8. Procédure d'extraction et caractérisation par GC-MS des métabolites secondaires produits par quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	48
1.7.9. Chromatographie sur phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	49
1.7.10. Identification des COVs.....	50
1.7.11. Analyses statistiques.....	50
<b>2. Résultats</b> .....	<b>51</b>
2.1. Prospection sur terrain et état phytosanitaires des vergers prospectés.....	51
2.2. Isolement et caractérisation des isolats fongiques.....	51
2.3. Distribution et abondance relative d'autres champignons telluriques.....	52
2.4. Isolement, identification et caractérisation des isolats de <i>V. dahliae</i> .....	54
2.4.1. Isolement de <i>V. dahliae</i> .....	54
2.4.2. Purification par la culture monosporique.....	54
2.4.3. Identification morphologique des isolats de <i>Verticillium</i> .....	55
2.4.3.1. Etude macroscopique.....	55
2.4.3.2. Etude microscopique.....	55
2.4.4. Identification moléculaire de <i>Verticillium</i> .....	57
2.5. Influence de quelques facteurs physiologiques sur la croissance mycélienne de <i>V. dahliae</i> .....	57
2.5.1. Influence du milieu de culture.....	57
2.5.2. Influence de la température.....	58
2.5.3. Influence du pH.....	59
2.5.4. Influence de la lumière.....	60
2.5.5. Influence de la salinité.....	60
2.6. Caractérisation et identification des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
2.6.1. Caractérisation culturelle des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
2.6.2. Caractérisations microscopique et biométrique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	62
2.6.3. Caractérisation moléculaire.....	65
2.6.4. Caractérisation physiologique.....	66
2.6.4.1. Influence des milieux de culture.....	66
2.6.4.2. Influence de la température.....	67
2.6.4.3. Influence du pH.....	67
2.6.4.4. Influence de la salinité.....	68
2.7. Activité antifongique <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp.....	70
2.7.1. Confrontation directe.....	70
2.7.2. Confrontation indirecte.....	74
2.7.3. Effet des filtrats de <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne des isolats de <i>V. dahliae</i> .....	77
2.8. Effet des filtrats de <i>Trichoderma</i> sur la germination des conidies de l'isolat Vd4.....	81
2.9. Identification des composés volatils produits par <i>Trichoderma</i> spp.....	82
2.9.1. Isolat T14.....	83
2.9.2. Isolats T2 et T9.....	84

2.9.3. Isolat T12.....	89
<b>3. Discussion.....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre II. Screening qualitatif de l'activité enzymatique des isolats de <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>101</b>
<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>101</b>
1.1. Production d'enzymes lytiques et métabolites d'intérêt (CWDE).....	101
1.1.1. Production des chitinases.....	101
1.1.1.1. Préparation de la chitine colloïdale.....	101
1.1.2. Production des protéases.....	102
1.1.3. Production de la $\beta$ -1,3-glucanase.....	102
1.1.4. Production des cellulases.....	102
1.1.5. Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	103
1.2. Etude de l'endophytisme.....	103
1.2.1. Production des pectinases.....	103
1.2.2. Production des amylases.....	103
1.2.3. Production des lipases.....	104
1.3. Dosage des activités enzymatiques.....	104
1.3.1. Activité protéolytique.....	104
1.3.2. Activité Endoglucanase.....	104
1.3.3. Dosage de l'activité chitinolytique.....	105
1.4. Purification partielle des chitinases.....	105
1.4.1. Production des chitinases sur milieu liquide.....	105
1.4.2. La mise en évidence de l'activité antifongique des chitinases.....	106
<b>2. Résultats.....</b>	<b>107</b>
2.1. Enzymes et métabolites d'intérêt dans la lutte biologique.....	107
2.1.1. Production des protéases.....	107
2.1.2. Production des chitinases.....	107
2.1.3. Production des glucanases.....	108
2.1.4. Production des cellulases.....	109
2.1.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	110
2.2. Enzymes liées à l'endophytisme .....	110
2.2.1. Production des amylases.....	110
2.2.2. Production des pectinases.....	111
2.2.3. Production des lipases.....	111
2.3. Relations entre les différentes activités enzymatiques étudiées liées au mode d'action de <i>Trichoderma</i> .....	113
2.4. Détermination des activités enzymatiques des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	114
2.5. Activité antifongique des chitinases <i>in vitro</i> .....	115
<b>3. Discussion.....</b>	<b>116</b>
<b>Chapitre III. Mise en évidence des traits PGPF (Plant Growth Promoting Fungi). .....</b>	<b>119</b>
<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>119</b>
1.1. Solubilisation des phosphates.....	119
1.2. La fixation d'azote.....	119
1.3. Production d'ammoniaque (NH <sub>3</sub> ).....	119
1.4. Production et quantification des sidérophores.....	119

1.4.1. Détection des catécholates.....	120
1.4.2. Détection des hydroxamates.....	120
1.4.3. Détection des carboxylates.....	120
1.5. Production des phytohormones.....	120
1.5.1. L'acide indole acétique (AIA).....	120
1.5.1.1. Extraction et révélation de l'AIA par CCM.....	121
1.5.1.2. Révélation de l'AIA par CCM et lecture.....	121
1.5.1.3. Détection de l'IAA par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	121
1.5.2. Dosage de l'acide gibbérellique.....	122
<b>2. Résultats</b> .....	<b>123</b>
2.1. Solubilisation des phosphates.....	123
2.2. Production de l'ammoniaque par les isolats de <i>Trichoderma</i> .....	123
2.3. Fixation d'azote par les isolats de <i>Trichoderma</i> .....	123
2.4. Mise en évidence de la Production des sidérophores.....	124
2.5. Détection de la nature chimique des sidérophores.....	124
2.6. Production des phytohormones.....	125
2.6.1. Production d'acide gibbérellique.....	125
2.6.2. Production d'acide indole acétique (A.I.A).....	125
2.6.2.1. Détection de la production de l'AIA par chromatographie sur couche mince.....	126
2.6.2.2. Détection de l'AIA par HPLC.....	127
<b>3. Discussion</b> .....	<b>128</b>
<b>Chapitre IV. Essai de protection (<i>in planta</i>) des plants de l'olivier à l'égard de la verticilliose vasculaire</b> .....	<b>131</b>
<b>1. Matériel et méthodes</b> .....	<b>131</b>
1.1. Préparation des plants de l'olivier.....	131
1.2. Préparation de l'inoculum fongique.....	131
1.3. Méthodes d'inoculation.....	131
1.4. Estimation des symptômes.....	132
1.4.1. Indice de rabougrissement.....	132
1.4.2. Indice d'altération foliaire.....	133
1.5. Traitements statistiques.....	134
<b>2. Résultats</b> .....	<b>135</b>
2.1. La mise en évidence du pouvoir pathogène des isolats de <i>V. dahliae in planta</i> .....	135
2.1.1. Résultats de l'indice de rabougrissement.....	137
2.1.2. Résultats de l'indice d'altération foliaire.....	138
2.2. Pouvoir de protection des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. vis-à-vis de <i>V. dahliae in planta</i> .....	139
<b>3. Discussion</b> .....	<b>141</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>144</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>148</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Publications</b>	
<b>Résumés</b>	

## Liste des abréviations

- **ABC:** Agents de biocontrôle
- **ADN:** Acide désoxyribonucléique
- **CCM:** Chromatographie sur couche mince.
- **CMM:** Croissance mycélienne moyenne
- **COV:** Composés volatils
- **CWDE:** Cell Wall Degrading Enzymes/Enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.
- **ETPs:** Epipolythiodioxopiperazines
- **FAO:** Food and Agriculture Organisation/Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- **GC/MS:** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- **HPLC:** Chromatographie en phase liquide à haute performance.
- **IAF:** Indice d'altération foliaire.
- **INPV:** Institut National de la Protection des Végétaux.
- **IR:** Indice de rabougrissement.
- **IS:** Indice de solubilisation.
- **ITS:** Internal Transcribed Spacer/ Espaceur interne transcrit
- **MADR:** Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural.
- **Msc:** Microsclérote.
- **MSs:** Métabolites secondaires
- **MWCO:** Molecular Weight Cut-Off/ Seuil de poids moléculaire
- **NCBI:** National Center of Biotechnology Information/ Centre américain pour les informations biotechnologiques
- **NRPS:** Non ribosomal peptide synthetase
- **Pathotype D:** Pathotype défoliant.
- **Pathotype ND:** Pathotype non défoliant
- **PCR:** Polymerase chain reaction/ Amplification en chaîne par polymérase ou réaction de polymérisation en chaîne.
- **PDA:** Pomme de terre Dextrose Agar.
- **PDB:** Pomme de terre Dextrose Bouillon.
- **PGPF:** Plant Growth Promoting Fungi/Champignons promoteurs de la croissance des plantes.
- **Rf:** Rapport frontal.

- **ROS**: Reactive oxygen species/ Espèces réactives de l'oxygène
- **T**: *Trichoderma*
- **TSA**: Tryptic-soy-agar/ Gélose tryptone soja.
- **Vd**: *Verticillium dahliae*
- **VWO**: Verticillium wilting of olive/ flétrissement vasculaire de l'olivier

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Répartition géographique de la verticilliose de l'olivier dans le monde.....	<b>5</b>
<b>Figure 2.</b> Distribution de la verticilliose d'olivier en Algérie.....	<b>6</b>
<b>Figure 3.</b> Structures reproductives de <i>Verticillium dahliae</i> .....	<b>7</b>
<b>Figure 4.</b> Pathotypes défoliant et non défoliant de <i>V. dahliae</i> .....	<b>8</b>
<b>Figure 5.</b> Symptômes de la verticilliose de l'olivier.....	<b>8</b>
<b>Figure 6.</b> Symptômes du dépérissement lent.....	<b>9</b>
<b>Figure 7.</b> Cycle d'infection de <i>V. dahliae</i> .....	<b>10</b>
<b>Figure 8.</b> Développement de nouveaux rejets à la base du tronc d'un olivier attaqué par la verticilliose.....	<b>14</b>
<b>Figure 9.</b> Historique et développement chronologique du genre <i>Trichoderma</i> .....	<b>19</b>
<b>Figure 10.</b> Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr.....	<b>20</b>
<b>Figure 11.</b> Structure microscopique de <i>Trichoderma</i> sp.....	<b>21</b>
<b>Figure 12.</b> Schéma des principales étapes du cycle de vie de <i>Trichoderma</i> en fonction de l'aspect morphologique de son développement sur substrat solide dans des conditions optimales.....	<b>22</b>
<b>Figure 13.</b> Les différentes étapes d'action par mycoparasitisme du <i>Trichoderma</i> contre <i>Rhizoctonia solani</i> .....	<b>25</b>
<b>Figure 14.</b> Interaction <i>Trichoderma</i> –plante.....	<b>27</b>
<b>Figure 15.</b> Structure de la gliotoxine.....	<b>29</b>
<b>Figure 16.</b> Production des sidérophores par <i>Trichoderma</i> et conversion du Fe <sup>3+</sup> (forme insoluble) en Fe <sup>2+</sup> (forme soluble).....	<b>30</b>
<b>Figure 17.</b> Structure de l'unité de base des terpènes: l'isopentényl diphosphate (IPP).....	<b>31</b>
<b>Figure 18.</b> Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage.....	<b>35</b>
<b>Figure 19.</b> Localisation géographique des vergers prospectés.....	<b>36</b>
<b>Figure 20.</b> Valeurs moyennes des données climatiques (température en °C, pluviométrie en mm et altitude en m) des quatre régions d'étude durant les années de prospection 2018-2019 et 2020.....	<b>46</b>
<b>Figure 21.</b> Techniques utilisées pour l'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>48</b>

<b>Figure 22.</b> Le protocole d'extraction liquide-liquide des métabolites secondaires à partir des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>50</b>
<b>Figure 23.</b> Photos originales montrant les différents types de symptômes observés dans les oliveraies prospectées.....	<b>51</b>
<b>Figure 24.</b> Provenance des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. et <i>Verticillium dahliae</i> isolés à partir des oliveraies prospectées.....	<b>53</b>
<b>Figure 25.</b> Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des régions oléicoles.....	<b>53</b>
<b>Figure 26.</b> Résultats des cultures pures de <i>Verticillium</i> sp.obtenus à partir des cultures monosporiques sur le milieu PDA.....	<b>54</b>
<b>Figure 27.</b> Morphotypes de <i>Verticillium</i> sp.....	<b>55</b>
<b>Figure 28.</b> Aspect microscopique de <i>Verticillium</i> sp. observé sous microscope optique après coloration au bleu de méthylène.....	<b>56</b>
<b>Figure 29.</b> Gel d'agarose des amplicons PCR générés avec 2 paires d'amorces spécifiques de <i>Verticillium dahliae</i> défoliant et non défoliant.....	<b>57</b>
<b>Figure 30.</b> Influence des milieux de culture sur la croissance mycélienne moyenne des souches de <i>V.dahliae</i> après 7 jours d'incubation.....	<b>58</b>
<b>Figure 31.</b> Influence de la température sur la croissance mycélienne moyenne des souches de <i>V. dahliae</i> après 7 jours d'incubation.....	<b>58</b>
<b>Figure 32.</b> Influence du pH sur la croissance mycélienne moyenne des souches de <i>V.dahliae</i> après 7 jours d'incubation.....	<b>59</b>
<b>Figure 33.</b> Influence des conditions d'éclairément sur la croissance mycélienne moyenne dessouches de <i>V.dahliae</i> après 7 jours d'incubation.....	<b>60</b>
<b>Figure 34.</b> Influence de la salinité sur la croissance mycélienne moyenne des souches de <i>V.dahliae</i> après 7jours d'incubation.....	<b>60</b>
<b>Figure 35.</b> Aspects macroscopique et microscopique de quelques souches de <i>Trichoderma</i> .....	<b>63</b>
<b>Figure 36.</b> Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr des souches T4, T7, T11 et T12 avec certaines souches phylogénétiquement proches (souches validement publiées).....	<b>65</b>
<b>Figure 37.</b> Effet de la température sur la croissance mycélienne des 15 souches de <i>Trichoderma</i> après deux jours d'incubation.....	<b>67</b>
<b>Figure 38.</b> Activité antifongique de quelques espèces de <i>Trichoderma</i> spp. en confrontation directe à l'égard des isolats de <i>V. dahliae</i> après 7 jours d'incubation sur milieu PDA à 28°C.....	<b>72</b>

<b>Figure 39.</b> Modification morphologique affectant le mycélium du <i>V. dahliae</i> (après 7 jours) en confrontation directe.....	<b>73</b>
<b>Figure 40.</b> Confrontation indirecte entre les isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> et les isolats phytopathogènes de <i>V.dahliae</i> .....	<b>76</b>
<b>Figure 41.</b> Effet des filtrats de cultures de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance mycélienne des isolats de <i>V.dahliae</i> .....	<b>80</b>
<b>Figure 42.</b> Inhibition de la croissance mycélienne par la production des métabolites secondaires.....	<b>81</b>
<b>Figure 43.</b> Pourcentage d'inhibition de la germination des spores de l'isolat Vd4.....	<b>82</b>
<b>Figure 44.</b> Action des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la germination des conidies de l'isolat Vd4 en comparaison avec le témoin après 24h d'incubation.....	<b>82</b>
<b>Figure 45.</b> Les diamètres des zones d'hydrolyses de la caséine du lait observés chez les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. après 3 jours d'incubation à 28°C.....	<b>107</b>
<b>Figure 46.</b> Production des chitinases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de la chitine colloïdale après 3jours d'incubation à 28°C.....	<b>108</b>
<b>Figure 47.</b> Production des glucanases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de la farine d'orge après 3 jours incubation à 28°C.....	<b>108</b>
<b>Figure 48.</b> Production des cellulases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de cellulose après 3 jours d'incubation.....	<b>109</b>
<b>Figure 49.</b> Photo qui montre les différentes zones d'hydrolyse observés après production des cellulases, protéases, chitinases et glucanases par les isolats de <i>Trichoderma</i> sur milieu solide.....	<b>109</b>
<b>Figure 50.</b> Production d'HCN par les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>110</b>
<b>Figure 51.</b> Production des amylases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base d'amidon après 3 jours d'incubation.....	<b>110</b>
<b>Figure 52.</b> Production des pectinases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu à base de pectine après 3jours incubation à 28°C.....	<b>111</b>
<b>Figure 53.</b> Formation des précipités de lauréate de Calcium autour des colonies de <i>Trichoderma</i> après 3 jours d'incubation.....	<b>112</b>
<b>Figure 54.</b> Production des pectinases, lipases et amylases enregistrée chez quelques isolats de <i>Trichoderma</i> spp. après 3 jours d'incubation à 28 °C.....	<b>112</b>
<b>Figure 55.</b> Effet des chitinases purifiés partiellement sur la croissance mycélienne des isolats de <i>V.dahliae</i> (Vd3, Vd4, Vd5, Vd9).....	<b>116</b>

<b>Figure 56.</b> Production des phosphatases par les isolats de <i>Trichoderma</i> (en mm) sur milieu Pikovaskey (PVK) additionné de bleu de bromophémol après 3 jours d'incubation à 28°C.....	123
<b>Figure 57.</b> Production de métabolites et d'enzyme qui stimule la croissance végétale.....	124
<b>Figure 58.</b> Production d'AIA par les isolats de <i>Trichoderma</i> sur milieu liquide additionné de tryptophane.....	126
<b>Figure 59.</b> La révélation chimique de l'AIA par le réactif de Salkowski sur plaque de gel de Silice.....	127
<b>Figure 60.</b> Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de référence.....	127
<b>Figure 61.</b> Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de la souche T11.....	128
<b>Figure 62.</b> Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de la souche T12.....	128
<b>Figure 63.</b> Symptômes de flétrissement et de jaunissement des feuilles du lot des plantules d'oliviers inoculés par l'isolat Vd4 et Vd5 après 12 mois d'inoculation.....	135
<b>Figure 64.</b> Aspects macroscopique et microscopique des isolats réisolés à partir des branches des plantules d'olivier inoculés par <i>V.dahalie</i> .....	136
<b>Figure 65.</b> Symptômes observés après inoculation des plantules d'olivier avec les isolats Vd4 et Vd5.....	137
<b>Figure 66.</b> Rabougrissement des plantules d'olivier, après 30 semaines d'inoculation par les deux isolats Vd4 et Vd5.....	138
<b>Figure 67.</b> Comparaison de la croissance axiale entre les lots traités uniquement par les isolats de <i>Trichoderma</i> (T2, T9 et T12) et les lots traités par les différents isolats de <i>Trichoderma</i> en confrontation avec l'isolat Vd4 de <i>V. dahalie</i> après 48 semaines d'inoculation.....	139
<b>Figure 68.</b> Effet de trois isolats <i>T. aureoviridiae</i> (T2), <i>T. harzianum</i> (T9) et <i>T. harzianum</i> (T12) sur l'indice de la verticilliose vasculaire de l'olivier.....	141

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Quelques métabolites secondaires produits par certaines espèces de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>33</b>
<b>Tableau 2.</b> Isolats fongiques phytopathogènes isolés de la rhizosphère de l'olivier.....	<b>53</b>
<b>Tableau 3.</b> Caractérisations morphologique et microscopique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>64</b>
<b>Tableau 4.</b> Effet de milieu de culture sur la croissance mycélienne (mm) des souches de <i>Trichoderma</i> spp. après deux jours d'incubation.....	<b>66</b>
<b>Tableau 5.</b> Effet du pH sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de <i>Trichoderma</i> spp. après deux jours d'incubation.....	<b>68</b>
<b>Tableau 6.</b> Effet de la salinité sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de <i>Trichoderma</i> après deux jours d'incubation.....	<b>69</b>
<b>Tableau 7.</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe des isolats de <i>Trichoderma</i> spp contre <i>V. dahliae</i> .....	<b>71</b>
<b>Tableau 8.</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation indirecte des isolats de <i>Trichoderma</i> spp contre <i>V. dahliae</i> .....	<b>75</b>
<b>Tableau 9.</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>V.dahliae</i> par les filtrats de <i>Trichoderma</i> spp. testés à la concentration 10% sur milieu solide.....	<b>78</b>
<b>Tableau 10.</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>V.dahliae</i> par les filtrats de <i>Trichoderma</i> spp. testés à la concentration 20% sur milieu solide.....	<b>79</b>
<b>Tableau 11.</b> Identification des composés volatiles de l'isolat T14 par GC-MS.....	<b>83</b>
<b>Tableau 12.</b> Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait hexanique de l'isolat T2.....	<b>86</b>
<b>Tableau 13.</b> Métabolites volatiles identifiés par GC/MS dans l'extrait méthanoïque de l'isolat T2.....	<b>87</b>
<b>Tableau 14.</b> Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait hexanique de l'isolat T9.....	<b>88</b>
<b>Tableau 15.</b> Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait méthanoïque de l'isolat T9.....	<b>88</b>
<b>Tableau 16.</b> Identification des composés volatiles de l'isolat T12 par GC-MS.....	<b>89</b>
<b>Tableau 17.</b> Tableau récapitulatif des résultats des différents tests enzymatiques qualitatifs évalués sur milieu solide chez les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. testées capables de produire des enzymes extracellulaires.....	<b>113</b>

<b>Tableau 18.</b> Matrice de corrélation calculée sur le paramètre de la production des trois activités enzymatique.....	<b>114</b>
<b>Tableau 19:</b> Dosage des activités enzymatiques.....	<b>115</b>
<b>Tableau 20.</b> Les différents types de sédirophores produits par les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>125</b>
<b>Tableau 21.</b> Production d'AIA et d'acide gibbérellique par les différents isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>126</b>

---

## **Introduction**

---

### Introduction

La culture de l'olivier (*olea europaea* Linné.) (Oleaceae), remonte à l'antiquité, elle est rustique et d'une longévité qui peut atteindre plusieurs siècles. Son histoire se mêle avec celle du bassin méditerranéen et reste l'arbre sacré et symbole de la paix, de la sagesse et de l'éternité (Pagnol, 1975; Loussert et Brousse, 1978; Robert, 1980; Lopez, 1999).

L'oléiculture est l'une des plus anciennes cultures connus au monde (Fabbri *et al.*, 2009; Kiritsakis et Shahidi, 2017), elle occupe une place privilégiée dans les régions méditerranéens, représentant 98% de la superficie totale cultivée dans le monde (Rallo *et al.*, 2018; FAOSTAT, 2020). Plus de 11 millions d'hectares d'oliviers sont cultivés dans 47 pays, principalement en Espagne (25%), en Tunisie (13%), en Italie (11%), au Maroc (10%) et en Grèce (9%). (FAOSTAT, 2018). Dans ces pays, l'olivier a une grande importance socio-économique (Bachouche et Kellouche, 2012), il est considéré comme un aliment de base du régime alimentaire méditerranéen et une source d'huile et d'olives de table (Haddad *et al.*, 2020; Deghiche-Diab *et al.*, 2021). L'olivier est parmi les principales spéculations présentant des incidences positives sur les plans environnemental, écologique et social. En effet, l'oléiculture joue un rôle essentiel dans la lutte contre l'érosion, la désertification, la restauration des terres agricoles et la régulation de l'exode rural par la création des emplois permanents (Bellahcene, 2004).

L'Algérie a accordé une importance particulière à l'oléiculture. En effet, afin de hisser la filière oléicole au rang des pays producteurs d'olives, un programme de plantation d'environ un million d'hectares a été lancé au cours des années 2009 et 2014 à travers une quinzaine de wilayas. C'est ainsi que la superficie conçue à la culture de l'olivier est passée de 310 644 ha en 2010 à 500 000 ha, en 2018 (FAO Stat, 2017 et M.A.D.R.P, 2018).

Le secteur oléicole national contribue de 17% à la production agricole du pays couvrant ainsi 30% des besoins du pays en huiles végétales alimentaires (Abdelguerfi, 2003; ONFA, 2016). Au cours de l'année 2017/2018, l'Algérie a produit 80 000 tonnes d'olives, elle s'est classée ainsi à la neuvième position mondiale (Douzane *et al.*, 2021).

Par ailleurs, une dégradation des cultures d'oliviers fut perçue à partir de l'année 1990, cette dégradation est majoritairement liée selon les autorités algériennes aux facteurs démographiques, économiques, techniques, phytosanitaires et aux incendies. Cette situation a fragilisé l'olivier et a accentué sa vulnérabilité aux maladies d'origine fongique surtout la verticilliose causée par *Verticillium dahliae* (Benchaabane, 1990; Matallah-Boutiba *et al.*, 1997; Bellahcene *et al.*, 1997, 1998, 2000, 2005).

La verticilliose, a été signalée pour la première fois en Algérie par Benchabane en 1990. Puis par Matallah-Boutiba *et al.* 1997 et Bellahcene *et al.* 1997 suite à des prospections effectuées dans diverses régions notamment en Oranie (Sig) et en Kabylie (Sidi Aich et Cap Djinet) où le taux d'infestation moyen a été estimé à 12% voire même à 30% dans les cas les plus sévères (Bellahcene *et al.*, 1997). Plusieurs cas de dépérissement ont été constatés dans la région centre de l'Algérie sur des oliviers jeunes et âgés suite à des études épidémiologiques réalisées par Benzina *et al.* en 2016 et Merzoug *et al.* en 2018. Le flétrissement verticillien de l'olivier (VWO) est considéré comme le principal facteur limitant de cette culture dans les régions du monde au climat méditerranéen, car il provoque des niveaux élevés de mortalité des arbres et une réduction dans la production d'olives (Montes-Osuna and Mercado-Blanco, 2020; López-Moral *et al.*, 2021).

Deux populations du pathogène sont distinguées chez l'olivier, le pathotype défoliant (D), le plus dévastateur et le pathotype non défoliant (ND). L'agent pathogène est caractérisé par la production de propagules infectieuses connues sous le nom de microsclérotés (MS), qui sont des structures dormantes (López-Escudero et Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Montes-Osuna et Mercado-Blanco, 2020; López-Moral *et al.*, 2021). Les MS peuvent survivre jusqu'à 14 ans dans le sol et infecter une large gamme d'hôtes alternatifs (Trapero *et al.*, 2015).

L'absence des traitements chimiques efficaces rend la lutte contre la verticilliose difficile (López-Moral *et al.*, 2021). De plus, durant les dernières décennies, la prise de conscience des impacts néfastes des pesticides chimiques sur l'environnement et la santé humaine a permis de s'orienter vers la lutte biologique comme une nouvelle approche de lutte pour préserver l'environnement et diminuer l'incidence des maladies phytopathogènes (M'Henni, 2020).

En effet, le contrôle efficace des agents de dépérissement dès l'apparition des symptômes et la gestion de ces maladies constituent un défi surtout dans le cas de la VWO où seules les méthodes prophylactiques s'avèrent intéressantes dans la réduction des dégâts imputés (Bubici et Cirulli, 2012; Gharbi *et al.*, 2014). Face à cette difficulté, le recours à l'utilisation de microorganismes antagonistes et biostimulants inducteurs de défense de la plante hôte semble être l'une des alternatives biologiques les plus prometteuses dans la lutte préventive contre les maladies vasculaires des plantes (López-Moral *et al.*, 2021). Les agents de contrôle biologique (BCA) sont considérés comme une solution encourageante pour contrôler le VWO en plein champ (Markakis *et al.*, 2016). Certains BCA peuvent coloniser les tissus racinaires sans provoquer d'effets néfastes (Di Pietro *et al.*, 2003 ; Montes-Osuna et

Mercado-Blanco, 2020), en offrant à la plante non seulement une protection contre les maladies fongiques, mais également la promotion de sa croissance (Cabanás *et al.*, 2014).

La recherche des microorganismes antagonistes y compris des bactéries, tels que les souches de l'ordre des Bacillales (Tjamos *et al.*, 2004, 2005; Markakis *et al.*, 2016; Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a; Azabou *et al.*, 2020), des Pseudomonadales (Benzina *et al.*, 2016; Ruano-Rosa *et al.*, 2016; Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018b) et des champignons du genre *Trichoderma* spp. a permis de dégager des résultats très satisfaisants contre le VWO (Carrero-Carrón *et al.*, 2016, 2018; Ruano-Rosa *et al.*, 2016; Morán-Diez *et al.*, 2019; Benouzza *et al.*, 2021) et à l'égard de certaines souches phytopathogènes de *Fusarium* spp. (Bekkar *et al.*, 2016; Dendouga *et al.*, 2016; Moutassem *et al.*, 2020).

Le genre *Trichoderma*, comprend plus de 400 espèces. Il a été décrit comme agent de lutte contre de nombreux champignons phytopathogènes du sol. Les espèces de *Trichoderma* peuvent agir par divers mécanismes contre un large éventail de champignons phytopathogènes (Tondje *et al.*, 2007). Ces mécanismes reposent principalement sur la production d'antibiotiques et/ou d'enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les glucanases et les chitinases, ainsi que sur la compétition pour les nutriments et l'activation systémique des réponses de défense des plantes (Shoresh *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012).

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail de thèse, conduit au sein du laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques dont le principal objectif est de mettre l'accent sur les potentialités antagonistes d'une gamme d'isolats de *Trichoderma* sp. connus par leurs propriétés antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae* agent causal de la verticilliose de l'olivier.

Pour atteindre notre objectif, plusieurs aspects ont été traités:

- Le premier aspect concerne l'exploration de la verticilliose dans les régions Nord de l'Algérie à travers les prospections et les échantillonnages réalisés au niveau des foyers infestés.

L'isolement de l'agent causal du dépérissement de l'olivier est suivi par une caractérisation morphologique et physiologique de ce dernier.

- Le deuxième aspect aborde la sélection des souches antagonistes dotée d'activité antifongique vis-à-vis des agents de dépérissement de l'olivier ainsi que l'étude de leurs caractéristiques métaboliques et moléculaires. L'exploration du mode d'action des antagonistes par différentes méthodes de confrontation (directe et à distance) a été précisé.

- Le troisième aspect est consacré au criblage enzymatique et à l'identification des substances bioactives antifongiques et d'autres métabolites qui stimulent la croissance des plantes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). La mise en évidence du pouvoir pathogène du champignon infectieux et l'évaluation de l'activité antagoniste *in planta* ont aussi été conduites.

---

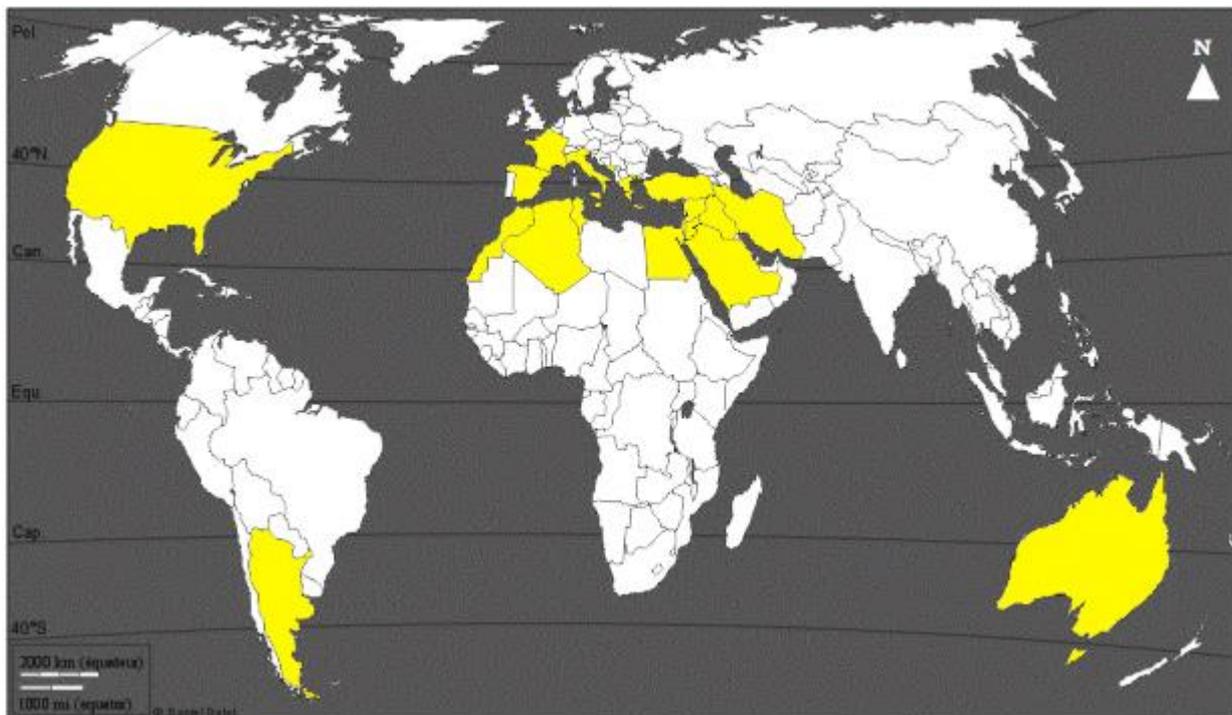
## **1<sup>ère</sup> Partie: Synthèse bibliographique**

---

## Chapitre I. Etude de la verticilliose de l'olivier

### 1. Historique et répartition géographique de la maladie

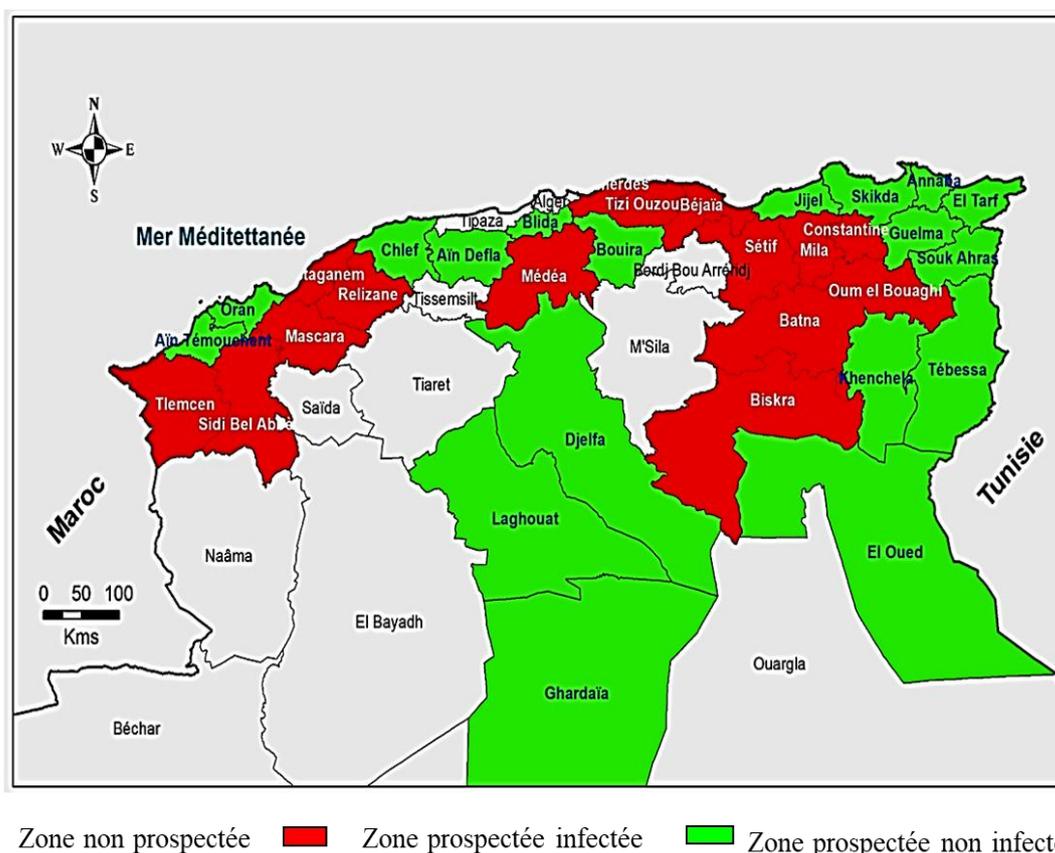
La verticilliose, causée par le champignon *V. dahliae* Kleb, est une maladie vasculaire qui touche l'olivier (López-Escudero et Mercado-Blanco, 2011). Ce champignon est capable d'infecter plus de 400 espèces végétales, y compris les cultures annuelles, les herbacées, les arbustes, ainsi que les arbres fruitiers et ornementaux (Pegg and Brady, 2002). Cette maladie a été signalée pour la première fois en Italie en 1946 (Ruggieri, 1946), puis au Etats-Unis en 1950, ensuite en Grèce en 1952 (Tjamos, 1993) et en Turquie en 1970 (Saydam and Copcu, 1972). En Algérie, la verticilliose de l'olivier a été décelée pour la première fois à Cap Djinet (Boumerdes) et à Sidi Aïch (Bejaia) par Benchaabane en 1990 (Figure 1).



**Figure 1.** Répartition géographique de la verticilliose de l'olivier dans le monde (Tombesi *et al.*, 2007; López Escudero et Mercado-Blanco, 2010; Azabou *et al.*, 2020).

### 2. Distribution de la verticilliose de l'olivier en Algérie

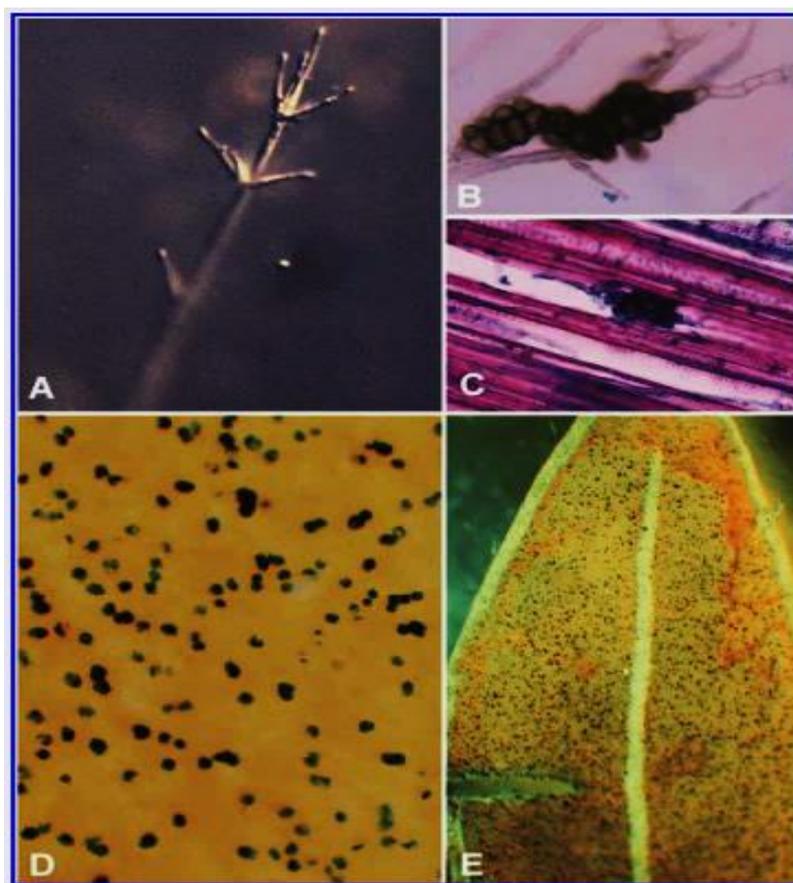
La verticilliose de l'olivier touche plusieurs régions de l'Algérie. Au nord centre, elle a été signalée à Tizi-Ouzou (Tirmitine) (INPV, 2010) et à Médéa (INPV, 2011), au Nord-ouest à Mascara (Mohammadia), à Tlemcen (Matallah-Boutiba *et al.*, 1997; Bellahcene *et al.*, 2000; Abdelguerfi, 2003), à Mostaganem (Sayada et à El Hamadna) (INPV, 2010), à Sidi Bel Abbes (Sfisef) (Bellahcene *et al.*, 2000) et à Relizane (Yellel et El Djamaa) (INPV, 2010). A l'Est, elle a été détectée à Ain M'lila (Oum EL Bouagui) (INPV, 2010), à Mila, à Sétif, à Constantine (Hamma Bouziane), à Batna et à Biskra (INPV, 2011) (Figure 2).



**Figure 2.** Distribution de la verticilliose d'olivier en Algérie (Benchaabane, 1990; Matallah-Boutiba *et al.*, 1997; Bellahcene, 2004; Benchaabane *et al.*, 2010; INPV, 2010 et 2011; Benzina *et al.*, 2016).

### 3. Taxonomie et caractéristiques morphologiques

*V. dahliae* est un champignon haploïde imparfait (Pegg and Brady, 2002). Les analyses phylogénétiques indiquent que ce champignon est phylogénétiquement classé parmi les Ascomycetes, il appartient à la famille des Plectosphaerellaceae, à la sous-classe des Hypocreomycetidae, et à la classe des Sordariomycetes. (Spatafora *et al.*, 2006 ; Zare *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Les espèces de *V. dahliae* produisent des conidies hyalines, regroupées en micro-gouttelettes mucilagineuses à l'extrémité des phialides en forme de flasques, les conidiophores portent des phialides verticillées par groupe de trois, avec des conidies plus ou moins arrondies à leur extrémité (Figure 3A) (Pantou *et al.*, 2005 ; Lola *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2012). Le *V. dahliae* est caractérisé par la production de structure de résistance appelée microsclérotés (agrégats denses fortement mélanisés formés d'hyphes à parois épaisses), ces dernières sont formées par le bourgeonnement latéral des cellules hyphales (15 à 50  $\mu\text{m}$ , occasionnellement jusqu'à 100  $\mu\text{m}$ ), qui peuvent survivre jusqu'à 14 ans le sol (Figure 3D, 3E) (Wilhelm, 1955).



**Figure 3.** Structures reproductives de *Verticillium dahliae*: **A**, conidiophore (les phialides disposées en verticilles et les conidies à l'extrémité des phialides); **B**, microsclérotos allongées caractéristiques du pathotype défoliant du coton et de l'olivier; **C**, microsclérotos formées dans un vaisseau du xylème d'un olivier infecté; **D**, microsclérotos formées dans des feuilles d'olivier tombées d'arbres infectés par le *V. dahliae* défoliant après incubation dans des conditions de forte humidité; et **E**, une feuille d'olivier présentant un grand nombre de microsclérotos (Jimenez-Diaz *et al.*, 2012).

#### 4. Symptômes

Les symptômes de la verticilliose de l'olivier ont été décrits par plusieurs chercheurs (Zachos, 1963; Cirulli, 1975; Blanco López *et al.*, 1984; Triki *et al.*, 2006; Gharbi *et al.*, 2016). La gravité de l'attaque dépend essentiellement du type de pathotype. Le pathotype défoliant (D) entraîne la chute des feuilles et il est plus virulent que le pathotype non défoliant (ND) (Figure 4). Les symptômes caractéristiques produits par la verticilliose sont dus à des lésions vasculaires avec des perturbations circulatoires. Deux types de dépérissements sont observés, le dépérissement rapide appelé aussi « apoplexie » et le dépérissement lent ou également dépérissement chronique.



**Figure 4.** Pathotypes défoliant (A) et non défoliant (B) de *V. dahliae* (Azabou *et al.*, 2020)

#### 4.1. Le dépérissement rapide

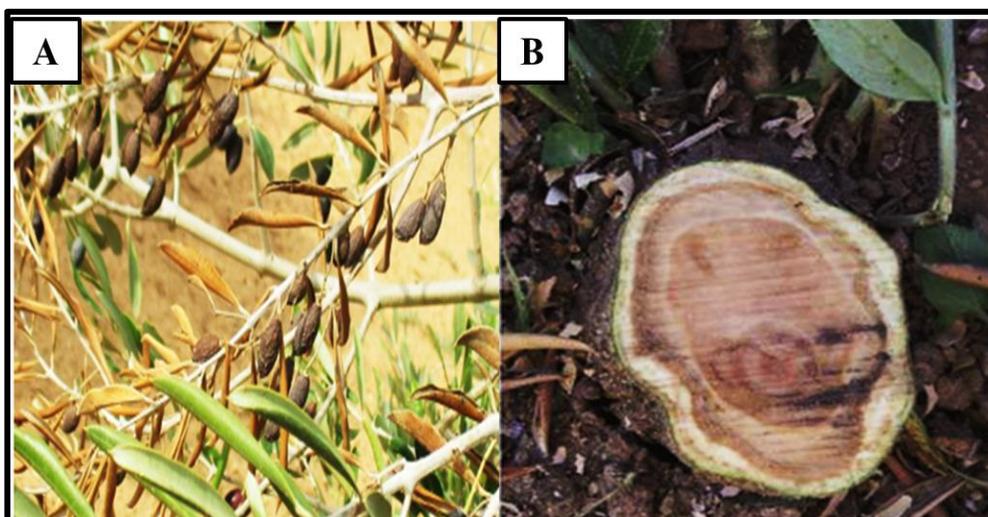
Ce type de dépérissement provoque la mort rapide suite à un dessèchement des branches principales et secondaires. Il s'observe généralement en automne et au début du printemps. Les feuilles deviennent chlorotiques, puis tournent à un brun clair, elles s'enroulent vers la face abaxiale et se dessèchent, tout en restant attachées aux branches (Figure 5A). Les branches périphériques et les rameaux affectés présentent une décoloration bleu violacé de l'écorce (Figure 5B). Ce dépérissement conduit à la mort de l'arbre entier (Figure 5C) qui est parfois précédée par une défoliation partielle, alors que dans d'autres cas, les feuilles se dessèchent et restent attachées aux pousses et aux branches (Blanco-López *et al.*, 1984; Rodríguez-Jurado Bejarano-Alcazar 2007; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).



**Figure 5.** Symptômes de la verticilliose de l'olivier. **A** : Aspect des feuilles d'olivier au début de l'apoplexie (Azabou *et al.*, 2020); **B**: flétrissement sévère de *Verticillium dahliae*; **C**: décoloration bleu violacé de l'écorce dans une branche d'un arbre affecté (Jimenez-Diaz *et al.*, 2012).

#### 4.2. Le dépérissement lent

Le dépérissement lent se produit au printemps, au moment de la floraison et se poursuit jusqu'au début de l'été. Ce type de dépérissement conduit principalement à une momification des fleurs et une nécrose des inflorescences et des feuilles avec une chlorose (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012). Les feuilles symptomatiques tombent souvent. Les symptômes affectant les inflorescences apparaissent généralement avant les symptômes foliaires. L'écorce des branches affectées peut présenter une décoloration rougeâtre. Les fruits qui se forment sur ces branches se dessèchent et se momifient (Figure 6A). Le brunissement du xylème peut être observé sur les sections longitudinales et transversales des rameaux et branches affectés par le syndrome de la verticilliose (Figure 6B) (Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2006; Colella *et al.*, 2008; Benzina *et al.*, 2016).

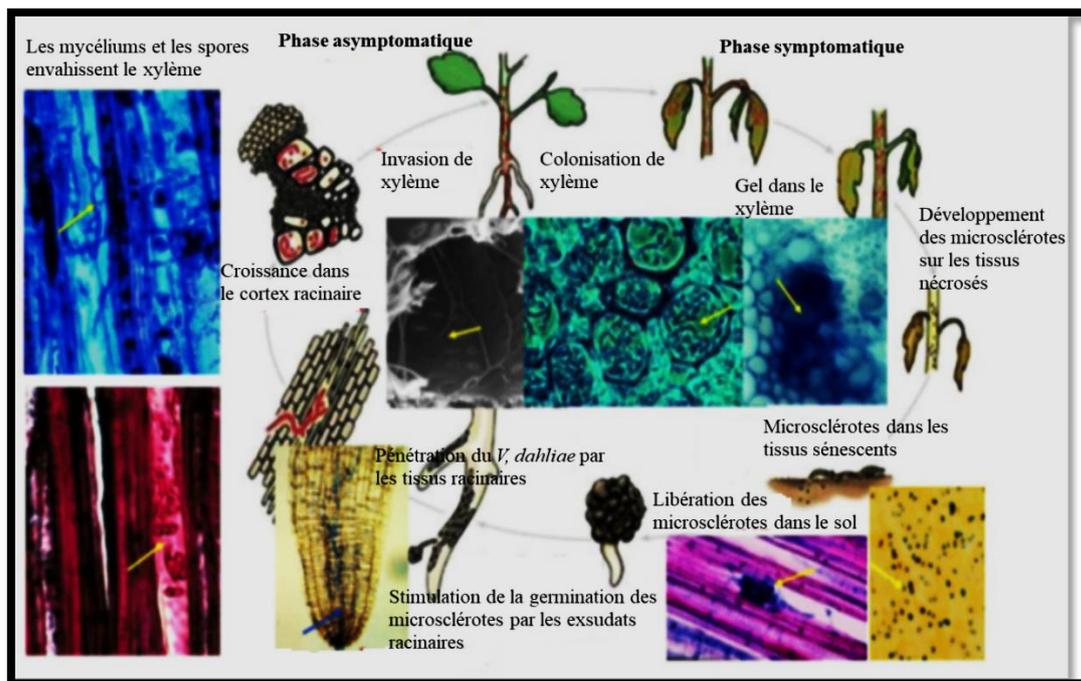


**Figure 6.** Symptômes du dépérissement lent. **A:** Fruits momifiés et attachés aux rameaux malades (Azabou, *et al.*, 2020). **B:** décoloration brun foncé du xylème dans la section transversale d'un tronc affecté par le flétrissement verticillien (Benzina *et al.*, 2016).

#### 5. Cycle de développement et processus d'infection

*Verticillium dahliae* est considéré comme un envahisseur du sol, caractérisé par une phase parasitaire étendue sur le tissu vivant et une phase saprophyte après la mort de la plante (Powelson et Rowe, 1993). La production des microsclérotés (MS) permet la survie de ce champignon dans les conditions environnementales défavorables (Klosterman *et al.*, 2009). La phase parasitaire commence avec la germination des microsclérotés dans le sol. En germant, les hyphes infectieux pénètrent dans les racines à travers les points d'émergence des racines latérales ou à travers des blessures. Les hyphes pénètrent dans la racine colonisant ainsi les cellules épidermiques et le cortex (Klosterman *et al.*, 2009).

Le pathogène produit des conidiophores et des conidies qui peuvent être entraînés par la sève brute vers le haut. L'accumulation des conidies engendre l'obstruction du xylème d'où la réduction de l'approvisionnement en eau des parties aériennes de la plante (Eynck *et al.*, 2007). A la fin du cycle, les tissus sénescents des plantes infectées libèrent les microsclérotés dans le sol (Wheeler et Johnson, 2016) (Figure 7). Ces microsclérotés constituent l'inoculum pour une nouvelle infection.



**Figure 7.** Cycle d'infection de *V. dahliae* (Berlanger et Powelson, 2005)

## 6. Pouvoir pathogène

La caractérisation génomique de *V. dahliae* a accéléré les études visant à identifier les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de ce dernier pour approfondir la connaissance du processus d'infection de ce champignon (Luo *et al.*, 2014). Pendant l'invasion d'une plante, certains gènes des champignons phytopathogènes s'expriment et codent pour la synthèse des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire afin de surmonter les barrières structurales de la plante. Parmi les enzymes synthétisés par *V. dahliae*, on trouve les enzymes qui appartiennent à la famille des pectates liases 11, détectées uniquement chez les champignons vasculaires en permettant leur multiplication dans le xylème (Klosterman *et al.*, 2011).

L'isochorismate mutase est une enzyme synthétisée par le *V. dahliae* après colonisation de la plante, elle module la biosynthèse de l'acide salicylique dans la plante et assure la conversion de l'isochorismate en 2,3-dihydroxybenzoate (Liu *et al.*, 2014).

Le génome de *V. dahliae* comporte environ 120 gènes codant pour des protéines hypothétiques (Klosterman *et al.*, 2011), qui peuvent surmonter le système de défense de la plante comme facteurs de virulence (De Jonge et Thomma, 2009).

Le gène LysM VDAG 05180 de la souche VdLs17 de *V. dahliae* est un effecteur nécessaire au développement de la maladie et à la colonisation de la plante. De plus, de nombreux gènes sont impliqués dans le processus d'infection de *V. dahliae*, parmi lesquels Vta2, VdE-1, VdSSP1, VdSNF1, CPC1, VdThi4, VMK1, VdPKAC1, VdSgel et VdMSF (Santhanam et Thomma, 2013; Liu *et al.*, 2013a,b; Hoppenau *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014).

Vta2 est un activateur transcriptionnel qui contrôle l'infection de la racine de la plante hôte (Tran *et al.*, 2014). Le CPC1 est un régulateur général de la biosynthèse de acides aminés, il permet au champignon de s'adapter aux conditions intracellulaires, quand il pénètre dans la racine (Timpner *et al.*, 2013).

Des études moléculaires ont fourni des informations intéressantes sur le processus de développement des microsclérotés. Le gène VDH1 qui code pour une hydrophobine de classe II (VDH1) a été identifié comme un élément essentiel pour la persistance de *V. dahliae* dans le sol. Ce gène est nécessaire pour le développement et la régulation de microsclérotés, ainsi que pour la tolérance des conidies de phytopathogène à la dessiccation (Klimes et Dobinson, 2006; Klimes *et al.*, 2008). En outre, le rôle du gène VMK 1 qui code pour une MAP kinase a été investigué. En effet, la disruption de ce gène a réduit significativement la virulence des isolats sur la laitue, la tomate et d'autres plantes hôtes. De plus, une faible sporulation accompagnée d'une production des microsclérotés a été observée chez les mutants (Rauyaree *et al.*, 2005).

## 7. Facteurs favorisant l'apparition de la verticilliose

Plusieurs facteurs sont à l'origine de la propagation de la verticilliose au niveau des vergers d'oliviers, ces derniers peuvent être résumés comme suit :

### 7.1. Fluctuation saisonnière

L'incidence et la gravité de la maladie varient en fonction de la saison, elle augmente principalement en hiver et en printemps (Bubici et Cirulli., 2012). Le taux d'isolement le plus élevé du pathogène à partir des arbres malades étaient en printemps et en hiver avec des pourcentages de 45% et de 34% respectivement. Par contre, le taux d'isolement le plus bas est enregistré en automne et en été variant entre 19% et 20% (Levin *et al.*, 2003).

L'humidité du sol et la température sont les principaux facteurs favorisant le développement de *V. dahliae*. L'incidence de la maladie est plus importante dans les oliveraies irriguées. En ce qui concerne la température, la sévérité de l'infection est favorisée au printemps par des températures qui n'excèdent pas 25°C (Hiemstra et Harris, 1998). La dispersion de cet agent pathogène est accentuée par l'installation des cultures intercalaires sensibles à la maladie, telles que la pomme de terre et la tomate (Trabelsi *et al.*, 2017).

### **7.2. Age et densité des arbres dans le verger**

L'âge et la densité des arbres d'oliviers dans le verger sont d'importants facteurs influençant l'apparition de la verticilliose, les jeunes oliviers (âgés de 8 à 12 ans) sont les plus vulnérables (Bubici et Cirulli, 2012). Le pathotype ND est abondant dans les jeunes vergers alors que le pathotype D est plus rencontré dans les vergers âgés (Rodríguez *et al.*, 2009). La forte occurrence de VWO chez les jeunes arbres est due probablement à l'implantation de nouveaux vergers dans des sols auparavant cultivés par des plantes hôtes sensibles.

### **7.3. Effets de l'irrigation sur la verticilliose**

Le développement des racines superficielle est dû principalement à l'irrigation qui favorise le développement du pathogène en créant des zones humides autour des goutteurs (López-Escudero et Blanco-López, 2005). Les conditions humides créées par l'irrigation sont très favorables au développement du pathotype ND. Par ailleurs, le pathotype D semble avoir une distribution restreinte dans ces vergers irrigués (Rodríguez *et al.* 2009).

### **7.4. Autres facteurs favorisant la dissémination de *V. dahliae***

La dispersion des propagules pathogènes sur des courtes distances peut se produire suite à l'irrigation par sillon et par inondation (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979), par les outils de travail du sol et d'élagage (Hiemstra et Harris, 1998) et par le vent (Easton *et al.*, 1969). Par contre la dispersion du champignon sur de longues distances peut se produire par l'utilisation de matériel végétal infecté. Aussi, les pépinières jouent un rôle majeur dans la propagation de la verticilliose quand les symptômes ne sont pas encore observés (Thanassouloupoulos, 1993).

## **8. Les systèmes de défense de l'olivier contre *V. dahliae***

Afin de se défendre contre les maladies fongiques, les plantes développent des mécanismes complexes impliquant des défenses dites constitutives et induites, comme elles peuvent y faire face par le biais de la régénération naturelle.

### **8.1 Le système de défense constitutif et la résistance induite**

Le système de défense constitutif correspond soit aux barrières physiques préexistantes qui limitent l'entrée et la progression du pathogène dans la plante (cuticule, cutine, parois, etc.), soit aux composés antimicrobiens (certaines molécules phénoliques) naturellement présents en l'absence de stress (Wittstock et Gershenzon, 2002).

Parmi les mécanismes de défense constitutifs de l'olivier contre *V. dahliae*, on trouve la formation de tyloses qui sont des petites invaginations produites par les cellules parenchymateuse adjacente (Rodríguez-Jurado *et al.*, 1993; Baídez *et al.*, 2007), et la sécrétion de composés phénoliques, qui s'accumulent dans les vaisseaux infectés du xylème et qu'après leur oxydation par les enzymes polyphénoloxidasés, elles donnent la couleur brun foncé au tissu vasculaire. La présence de gels, de tyloses dans le xylème de la plante infectée contribuent à l'occlusion et à la réduction du flux de sève brute, en particulier dans les pétioles, les tiges et les feuilles (Beckman, 1981).

La deuxième ligne de défense est plus complexe, il s'agit de la résistance « induites » où des interactions s'établissent entre l'agent pathogène et la plante. Au final, des mécanismes de défenses, non préexistants, vont se mettre en place et ils permettront de confiner l'agent pathogène au site d'infection. Lorsque les mécanismes de défenses sont contournés par l'agent pathogène, la plante devient sensible et la maladie va se développer: l'interaction est qualifiée de compatible. Dans le cas contraire, l'interaction est incompatible, la plante active rapidement ses défenses et développe une résistance contre l'agression (Walters *et al.*, 2007).

### **8.2 Régénération naturelle**

Une résistance à la VWO a été rapportée chez plusieurs cultivars commerciaux et porte-greffes d'oliviers (Arias-Calderón *et al.*, 2014). Les plantes ligneuses infectées par *V. dahliae* peuvent vaincre la maladie grâce au phénomène de la régénération naturelle observée chez des oliviers infectés naturellement ou même artificiellement inoculés (Bubici et Cirulli, 2012, Hiemstra et Harris, 1998). Chez les oliviers, ce phénomène est caractérisé par une diminution de la sévérité de la maladie et le développement de nouveaux rejets à la base du tronc ou des branches infectés (Figure 8). Ce type de défense est lié aux réactions déployées par l'arbre infecté, telles que la fermeture des vaisseaux du xylème nécrotique, l'inactivation des champignons dans le xylème et l'augmentation de divers composés phénoliques (López-Escudero et Blanco-López, 2005; Markakis *et al.*, 2010).



**Figure 8.** Développement de nouveaux rejets à la base du tronc d'un olivier attaqué par la verticilliose (Azabou *et al.*, 2020).

### **9. Moyens de lutte contre la verticilliose de l'olivier**

L'éradication totale de la verticilliose du sol s'avère très difficile en raison de la persistance des formes de résistance et de conservation dans le sol (microsclérotés). Lorsque les premiers symptômes apparaissent, il est trop tard pour intervenir et contrôler l'évolution du pathogène. Les interventions doivent être basées sur une connaissance précise de l'agent pathogène, de la plante hôte et des facteurs épidémiologiques (Gharbi *et al.*, 2014 ; Trabelsi *et al.*, 2017). Toutefois, il existe plusieurs stratégies possibles pour diminuer l'effet de flétrissement causé par *V. dahliae*. Ces mesures utilisées peuvent être classées comme des méthodes physiques, culturales, améliorantes de la résistance, chimiques et biologiques.

La combinaison de ces mesures de contrôle est nécessaire vue qu'aucune des stratégies adoptés n'a donné une efficacité satisfaisante lorsqu'elle est utilisée séparément (López-Escudero et Mercado-Blanco, 2011). De surcroit, tout programme de contrôle intégré devrait garantir la conservation des cultures. Le recours aux méthodes préventives est la solution la plus efficace pour limiter les dégâts causés par ces attaques (Gharbi *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2017). Des mesures peuvent être prises avant la plantation afin de limiter la propagation de la maladie et d'augmenter l'efficacité de tout programme de gestion intégrée.

## **9.1. Mesures de contrôle prises avant la plantation**

### **9.1.1. Détection précoce de la maladie**

L'utilisation du matériel végétal indemne de l'agent phytopathogène est très importante dans une stratégie de contrôle des agents de dépérissement. Les méthodes de détection traditionnelles basées sur l'isolement des agents pathogènes ont été remplacées par des techniques basées sur la PCR qui sont plus rapides et plus fiables (Triki *et al.*, 2012). L'évaluation de l'inoculum des propagules dans le sol est également importante dans le cadre de contrôle intégré (Gharbi *et al.*, 2016b).

### **9.1.2. Désinfection du sol**

La solarisation est une mesure alternative de désinfection partielle des sols infectés contre les agents pathogènes telluriques ainsi que dans diverses maladies de dépérissement (Pegg et Brady, 2002). Elle consiste à augmenter la température du sol en le couvrant par une feuille de polyéthylène pendant la période estivale d'où l'augmentation de la température interne qui devient défavorable pour le développement des agents pathogènes et même pour le maintien des formes de résistance de ceux-ci (Yadeta et Thomma, 2013). Les champignons telluriques peuvent également être éliminés du sol par injection de la vapeur d'eau chaude dans le sol (Gullino *et al.*, 1999) ou par incinération de la terre (Yadeta et Thomma, 2013).

### **9.1.3. Pratiques culturales**

Ces pratiques visent la réduction de l'inoculum fongique primaire en évitant les précédents culturaux sensibles ou des cultures intercalaires sensibles à la maladie telle que la pomme de terre (Nassraoui, 2006). L'utilisation des cultures d'une bonne vigueur, saines, résistantes, tolérantes ou même faiblement sensibles permet de réduire efficacement les incidences des maladies avec un coût réduit tout en préservant l'environnement (Xu et Nicholson, 2009).

## **9.2. Mesures de contrôle prises après la plantation**

Le contrôle après la plantation vise à prévenir l'évolution de la maladie et à diminuer l'incidence de l'attaque et atténuer le pourcentage des plantes atteintes.

### **9.2.1. Pratiques culturales**

Ces pratiques ont pour objectif d'éviter la propagation des propagules dans les vergers en désinfectant les machines et les outils utilisés. L'élimination par combustion des mauvaises herbes hôtes et des parties des plantes infectées (rameaux, pousses, branches et les feuilles

vertes chutées) qui peuvent constituer des sources d'inoculum d'agents pathogènes (Navas-Cortés *et al.*, 2008).

Cette méthode de contrôle physique peut être utilisée comme mesure de pré-plantation pour lutter contre les pathogènes telluriques, mais elle est appliquée aussi après la plantation des cultures. Paplomatas *et al.*, (1992) soulignent qu' elle peut être combinée avec d'autres mesures curatives telles que la biofumigation.

### **9.2.2. Utilisation des fongicides chimiques**

Les fongicides chimiques sont généralement utilisés pour lutter contre les maladies fongiques mais ils présentent l'inconvénient d'être non-spécifiques. Ils affectent les organismes vivants du sol, la flore et la faune environnante. L'utilisation de fumigants provoque un vide biologique et entraîne l'éradication non seulement de l'agent pathogène visé, mais aussi des micro-organismes bénéfiques, créant ainsi un déséquilibre biologique au niveau du sol en offrant un terrain propice au développement ultérieur de certains agents pathogènes (Gamliel *et al.*, 2000). En effet, le lignosulfonate d'ammonium a été utilisé dans le traitement des sols et il a montré une grande efficacité dans la réduction d'incidence de la verticilliose et la gale commune de la pomme de terre en plein champ (Soltani *et al.*, 2002). Alors que, le sulfate de 8-hydroxyquinoléine employé contre la verticilliose s'est montré efficace pour une courte durée (seulement deux ans) (AbuQamar et AlRaddad, 2001). La pulvérisation de carbendazime sur les troncs et les branches de l'olivier arrête significativement les attaques de *Verticillium dahliae* pendant plusieurs mois (Triki *et al.*, 2006). Le fosétyl-Al et le bénomyl sont efficaces lorsqu'ils sont injectés dans le tronc principal mais, en contre partie, ils bloquent la croissance végétative des plantes (Mulè *et al.*, 2002).

### **9.3. Limites des moyens de luttés préconisés**

Les pratiques culturales classiques réduisent l'impact de l'agent pathogène sans élimination totale de l'inoculum fongique causant la verticilliose. Quant aux méthodes de lutte physique, telles que la stérilisation du sol à la vapeur ou la solarisation, elles sont très coûteuses et nuisibles à la flore bénéfique du sol qui sera affectée par l'action de la haute température (Saremi *et al.*, 2010). L'application des fongicides chimiques, principalement à large spectre, provoque l'inhibition du métabolisme des micro-organismes pathogènes, mais aussi agit sur les organismes bénéfiques présents dans le sol (Tuzun et Kloepper, 1995).

Les fongicides chimiques sont déconseillées, ils génèrent des souches résistantes et des effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine et animale (Khan *et al.*, 2018).

De ce fait, le contrôle biologique apparaît comme une alternative prometteuse pour le contrôle intégré des pathogènes telluriques des oliviers en utilisant des moyens respectueux pour l'environnement (Ongena et Jaques, 2008) y compris l'utilisation des métabolites antifongiques (Pane *et al.*, 2014), des amendements organiques (Papasotiriou *et al.*, 2013), la biofumigation (Neubauer *et al.*, 2014) et de nombreux micro-organismes antagonistes (Angelopoulou *et al.*, 2014).

### 10. Les microorganismes antagonistes

De nombreux micro-organismes sont connus comme agents de biocontrôle contre plusieurs maladies phytopathogènes, notamment *Bacillus* spp, *Paenibacillus* spp, *Pseudomonas fluorescens*, *Lysobacter* spp. et *Trichoderma* spp. Ces micro-organismes offrent une alternative respectueuse de l'environnement pour éviter les dommages causés par les pesticides chimiques (Naing *et al.*, 2014 ; Anees *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2018). *Trichoderma* spp. est connu comme un champignon prometteur pour la gestion des maladies des plantes, en particulier contre les pathogènes du sol (Elad *et al.* 2004). Par conséquent, les espèces de *Trichoderma* spp. sont les plus étudiés et employés comme biopesticides dans le monde (Whipps et Lumsden 2001 ; Singh *et al.* 2013), elles sont capable d'inhiber la croissance de différents agents phytopathogènes par des mécanismes variés dont les principaux sont le parasitisme, l'antibiose et la compétition (Howell, 2003; Vinale *et al.*, 2007).

## Chapitre II. Le genre *Trichoderma*

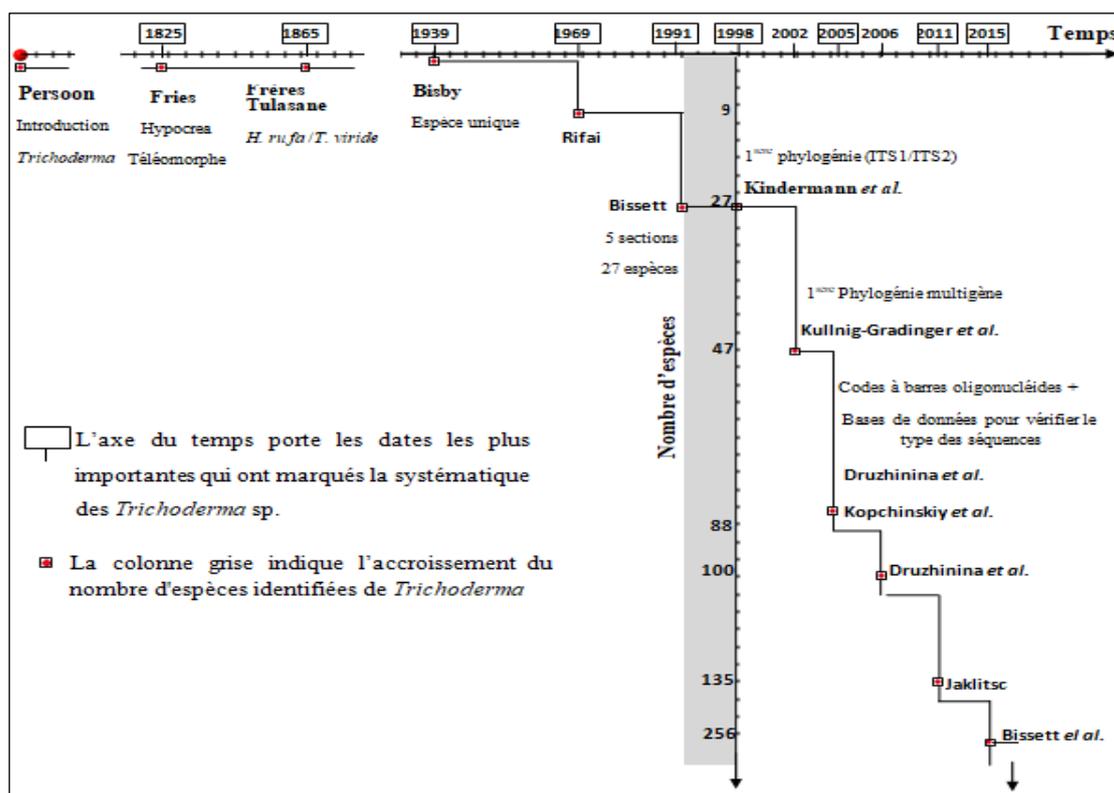
### 1. Caractéristiques et taxonomie

Le genre *Trichoderma* fait partie des Ascomycètes, classe des Sordariomycètes, ordre des *Hypocreales* et à la famille des *Hypocreaceae*. Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons filamenteux saprophytes les plus fréquemment rencontrés dans la rhizosphère sous une forme anamorphe. Les espèces appartenant au genre *Trichoderma* sont considérées comme des antagonistes microbiennes. Leur développement rapide et la production de substances bioactives font des espèces de *Trichoderma* des agents de contrôle biologique de choix pour l'exploitation industrielle en les utilisant comme des antagonistes vis-à-vis d'autres champignons, responsables de maladies foliaires, du sol et des plantes (Harman 2000, Monte et Llobell., 2003, Harman 2006, Schubert *et al.*, 2008, Sharon *et al.*, 2011).

Son activité antagoniste s'exerce indirectement, par compétition pour les nutriments, en modifiant les conditions environnementales ou en promouvant la croissance et les mécanismes défensifs de la plante, par antibiose avec la libération des molécules antifongiques (Vinale *et al.*, 2014), ou directement par mycoparasitisme (Ahmad et Baker., 1987, Howell, 2003). L'activation de chaque mécanisme implique la production de composés et métabolites spécifiques, comme des facteurs stimulateurs de croissance des plantes, des enzymes hydrolytiques comme des cellulases, des protéases, des lipases et des antibiotiques (Lorito 1998, Lorito *et al.*, 1993).

La première tentative de subdivision du genre *Trichoderma* a été réalisée par Rifai (1969) qui a réparti le genre *Trichoderma* en 9 espèces agrégats. 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 9 espèces agrégats décrites par Rifai (1969) sont: *Trichoderma piluliferum* Webster et Rifai, *Trichoderma polysporum* (Link : Fr.) Rifai, *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain, *Trichoderma koningii* Oud, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, *Trichoderma viride* Pers.:Fr.

Une série de révisions des espèces agrégées de Rifai a été effectuée par Bisset (1984; 1991 a, b, c). En 1991, ce dernier a discuté la difficulté à distinguer les espèces agrégées de Rifai. Comme solution et pour faire face au nombre croissant de nouvelles espèces de *Trichoderma*, il a adopté la notion de « section » qui n'a aucun rapport avec les espèces agrégées (Chaverri et Samuels, 2004). Comme il a amélioré le système de classification des espèces de *Trichoderma* en se basant sur des études morphologiques plus détaillées des anamorphes. Il a remplacé les 9 espèces agrégées de *Trichoderma* par cinq sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) comprenant 27 espèces (Druzhinina *et al.*, 2006) (Figure 9).

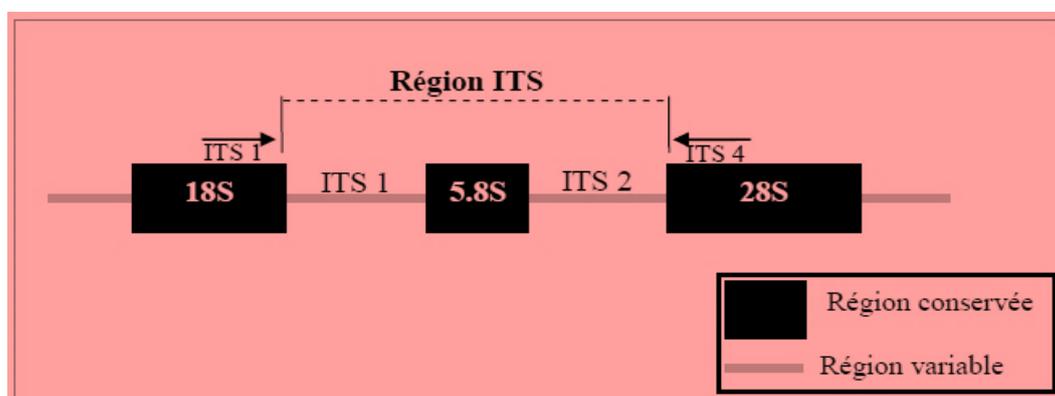


**Figure 9.** Historique et développement chronologique du genre *Trichoderma* (Bekkar *et al.*, 2016).

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. D'autres méthodes taxonomiques supplémentaires à la morphologie ont été utilisées, notamment des études de métabolites secondaires, qui ont montrées une grande diversité dans ce genre (Okuda *et al.*, 1982). Les caractéristiques physiologiques sont également utile pour l'identification (Leuchtman *et al.*, 1996 ; Samuels *et al.*, 1994).

Les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN, ont permis la résolution de la plus fine des entités taxonomiques et surtout la découverte de nombreuses nouvelles espèces de *Trichoderma/Hypocrea*. L'identification moléculaire est basée principalement sur le séquençage de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomal (Kuhls *et al.*, 1996, 1997). La figure 10 représente l'unité de transcription de l'ADNr qui est composée à gauche des gènes 18S et à droite des gènes 28S, au milieu l'ITS1 et l'ITS2 séparés par le gène 5.8S. Kindermann *et al.* (1998) ont tenté la première phylogénie du genre *Trichoderma* sur la base des séquences de la région ITS.

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



**Figure 10.** Schéma d'une unité de transcription de l'ADNr (Singh *et al.*, 2014).

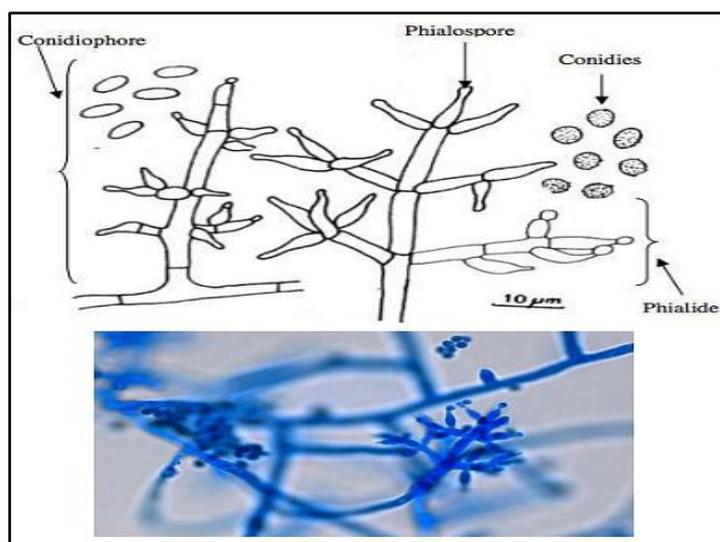
Le développement de nouvelles méthodes et des techniques d'analyse phylogénétique des séquences a permis d'identifier de nombreuses espèces de *Trichoderma* sur la base de gènes multiples. Kullnig-Gradinger *et al.* (2002) ont élaboré la première classification phylogénétique « multigène » de *Trichoderma*, basée sur la région ITS1/ITS2, le gène endochitinasase 42 (ECH42) et le gène du facteur d'élongation de la traduction (*tefl*). Samuels *et al.* (2002) ont utilisé la région ITS de l'ADNr et le gène *tefl* pour étudier la systématique de deux espèces très proches, *T.harzianum* et *T. aggressivum*. Le nombre des espèces d'*Hypocrea* / *Trichoderma* s'affiche à 88 espèces distinctes, dont 14 sont reconnues comme des holomorphes, 49 téléomorphes et 25 anamorphes (Druzhinina et Kubicek, 2005). En 2006, le genre a été composé de plus de 100 espèces définies phylogénétiquement (Druzhinina *et al.*, 2006). Dans la même année, la sous-commission internationale de Taxonomie *Trichoderma/Hypocrea* a répertoriée sur son site <http://www.isth.info/> une liste de 104 espèces *Trichoderma/Hypocrea* (Druzhinina et Kopchinskiy, 2006). Le nombre d'espèces nouvellement décrites a doublé suite au développement des programmes d'identification moléculaire des *Trichoderma/Hypocrea* (Kopchinskiy *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006).

## 2. Identifications macroscopique et microscopique

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 terminent par une ou plusieurs phialides qui sont en forme de flasques ou quilles. Les conidies de *Trichoderma* donnent naissance à un mycélium d'abord blanc. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse (Chabasse *et al.*, 2002). Les conidies se forment typiquement dans un délai d'une semaine, en touffes compactes ou bien légèrement floconneuses de couleurs verdâtres, blanchâtres et parfois jaunâtres (Samuels *et al.*, 2015). Certaines espèces de *Trichoderma* diffusent une pigmentation de couleur jaune sur milieu PDA et d'autres, telle que *T. viride*, produisent une odeur caractéristique ressemblant à l'arôme « de la noix de coco » (Gams et Bissett, 2002; Sharma et Singh, 2014).

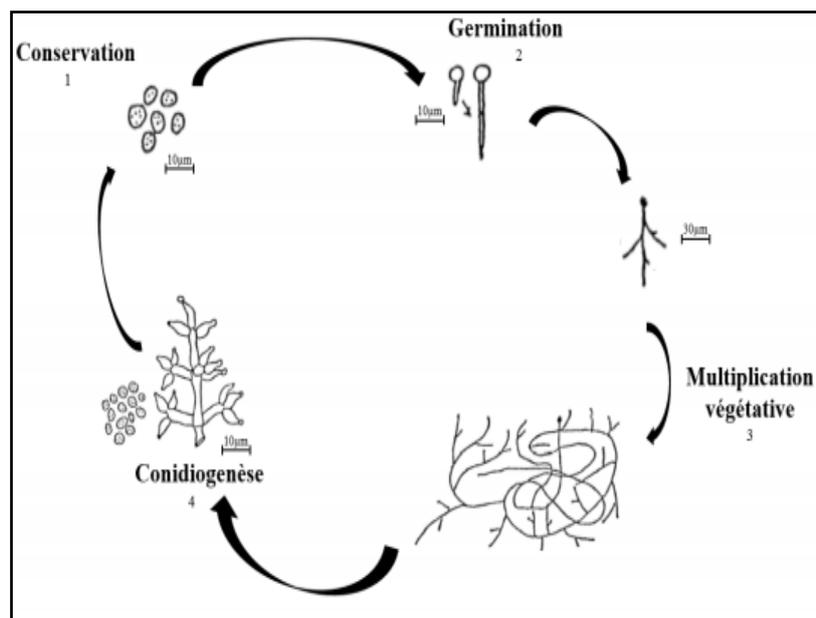
Au microscope optique, les conidies de *T. viride* sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces, les conidies globuleuses sont rares. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes ». Le mycélium est composé d'hyphes septés et ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont fortement ramifiés suivant une structure pyramidale et se terminent par une ou plusieurs phialides qui sont en forme de flasques ou quilles. Les phialides sont fixées à angle droit sur les conidiophores qui à leur tour portent des conidies (Figure 11). Certaines espèces peuvent produire des chlamydospores globuleuses, qui sont intercalaires ou terminales. Ces chlamydospores sont en général unicellulaires mais peuvent être pluricellulaires chez certaines espèces tel que *Trichoderma stromaticum* (Kubicek *et al.*, 2003 ; Samuels *et al.*, 2006; Sharma et Singh, 2014).



**Figure 11.** Structure microscopique de *Trichoderma* sp. (Amira *et al.* 2017)

### 3. Croissance et cycle fongique

Les espèces de *Trichoderma* ne sont pas très sélectifs en ce qui concerne les conditions de croissance abiotiques (Belli *et al.*, 2004). D'après Samuels *et al.* (2015), la température optimale de croissance de la majorité des espèces de *Trichoderma* est comprise entre 25 °C et 30°C. Cependant, certaines espèces poussent bien à 35°C. Cela a servi comme un critère distinctif important entre les espèces morphologiquement similaires. Par exemple, *T. harzianum* peut être distingué des espèces morphologiquement similaires, tels que *T. aggressivum* et *T. atroviride* en les cultivant à 35°C. Après 96 heures d'incubation à 35°C, le diamètre des colonies de *T. aggressivum* et *T. atroviride* ne dépasse les 5 mm, tandis que celui de *T. harzianum* présente une bonne croissance et sporulation (Samuels *et al.*, 2004). La gamme de pH acceptable est très large 1,4–9,8 (Viccini *et al.*, 2007; Zhihui *et al.*, 2008). La production des conidiospores par les champignons filamenteux est une étape importante dans le processus de multiplication végétative. La reproduction chez *Trichoderma* est asexuée et est dite anamorphe. Les conidiospores de 2 à 3µm de diamètre, très volatiles sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. Dans les conditions adéquates, la germination des spores se déroule en deux phases, la phase de gonflement où les conidiospores se gonflent et émettent un tube germinatif, suivi par un développement actif du mycélium (Figure 12). Suite à des phénomènes d'induction et d'inhibition exercés en partie par le milieu de culture il y a initiation de la phase de conidiogénèse qui peut durer plusieurs semaines.



**Figure 12.** Schéma des principales étapes du cycle de vie de *Trichoderma* en fonction de l'aspect morphologique de son développement sur substrat solide dans des conditions optimales (Roussos, 1985).

#### **4. Ecologie et habitat**

*Trichoderma* est le genre le plus répandu dans le sol, il se retrouve dans des habitats très variés, sur le bois et sur les débris des végétaux (Dubos, 1986), ceci peut être attribué à la nature concurrentielle des espèces de *Trichoderma* et à la possibilité de production de divers métabolites (Gams et Bissett, 1998). D'après Kubicek *et al.* (2003). L'abondance des *Trichoderma* spp. dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes et elle est aussi favorisée par la présence de racines dans le sol qu'elles colonisent aisément. En effet, Presque tous les sols tempérés et tropicaux contiennent  $10^1$ - $10^3$  propagules de *Trichoderma*/g du sol (Harman *et al.*, 2004). Dans un sol forestier, il peut représenter jusqu'à 3% du total des propagules fongiques et jusqu'à 1,5% dans le sol des pâturages (Gams et Bissett, 1998).

#### **5. *Trichoderma* : agents de lutte biologique contre les souches phytopathogènes**

Les *Trichoderma* spp. sont considérés aujourd'hui comme des agents efficaces de lutte biologique à l'égard de plusieurs organismes nuisibles. Ils représentent un modèle à étudier en raison de leurs mécanismes d'action.

#### **6. Modes d'action**

Les espèces de *Trichoderma* peuvent agir par divers mécanismes contre un large éventail de champignons phytopathogènes du sol (Tondje *et al.*, 2007). Il s'agit des mécanismes d'action directs (l'antibiose, le mycoparasitisme) et indirects (la compétition et l'induction de la résistance systémique) (Schirmbock *et al.*, 1994).

##### **6.1. Mécanismes d'action directs**

###### **6.1.1. Antibiose**

L'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu chez les espèces de *Trichoderma* qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse exerçant un effet inhibiteur (Vinale *et al.*, 2007), ils interviennent dans la suppression de plusieurs pathogènes telluriques (Rhouma *et al.*, 2018; Boughalleb-M'Hamdi *et al.*, 2018). L'action des métabolites secondaires par antibiose peut entraîner l'altération ou inhibition de la germination, l'inhibition de la croissance mycélienne et/ou la sporulation du pathogène, distorsion des hyphes du pathogène, modification de l'aspect des colonies (Montesinos *et al.*, 2009; Pankhurst et Lynch, 2005).

Les espèces de *Trichoderma* sont capables de produire plusieurs métabolites secondaires appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset, 1998; Reino *et al.*, 2008). Ces antibiotiques, peuvent être classés en trois groupes: des composés volatiles, des composés solubles dans l'eau et les peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991). En effet, les deux premiers groupes d'antibiotiques sont dérivés de plusieurs voies métaboliques. Par contre, le troisième groupe (les peptaïboles) plus important; il regroupe plus de 300 molécules dont 54 molécules sont isolées à partir de *Trichoderma harzianum* (Degenklob *et al.*, 2003; Peptaïbol Database, 2007). Parmi les molécules bioactives agissant par antibiose, on trouve le 6-pentyl-2 $\alpha$ -Pyrone-2-one (6PP), les Koninginins (A, B ,D, E et G), l'acide harzianique, Trichodermine, Harziamine, Trichodermal et l'Harzianolide (Kucuk, et Kivanc, 2004). Certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, sont capables de produire l'antibiotique 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń *et al.*, 2013; Błaszczuk *et al.*, 2014).

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

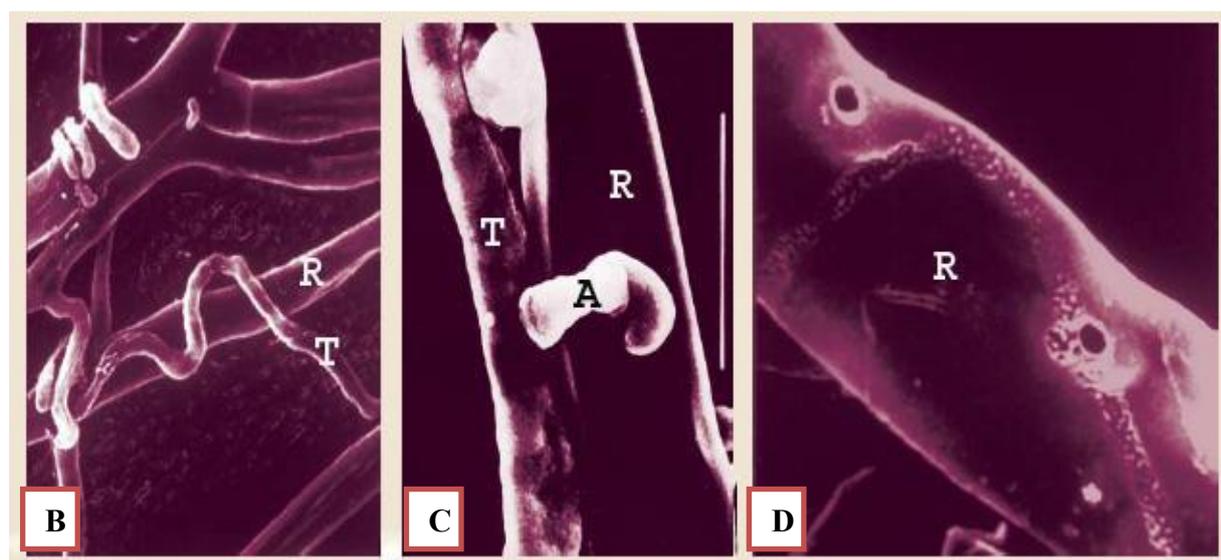
Les *Trichoderma* peuvent aussi secrétés des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antivirales. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique, trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Reino *et al.*, 2008; Andrabi *et al.*, 2011; Chihat *et al.*, 2021).

### 6.1.2. Mycoparasitisme

Durant le mycoparasitisme (Figure 13), les souches de *Trichoderma* reconnaissent le champignon pathogène par l'intermédiaire de petites molécules libérés par ce de dernier, certains molécules sont des fragments peptidiques qui sont libérés par l'action des protéases sécrétés par *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004). Ces molécules peuvent se lier à un récepteur G couplés à une protéine ou à des récepteurs Gpr1 qui se trouvent sur la surface des hyphes de *Trichoderma*.

En effet, cet attachement provoque une cascade de signalisation comprenant les protéines G et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), qui peuvent moduler les activités des facteurs de transcriptions (TFs). Les facteurs TFs ainsi activés, augmentent l'expression constitutive de gènes de régulation qui codent pour la biosynthèse des enzymes de dégradation appelé CWDEs ( $\beta$ -1,6, glucanases,  $\beta$ -1,3, glucanases,  $\alpha$ -1,3, glucanases...), capable d'hydrolyser la paroi cellulaire et libérer des oligomères (Kubicek et al., 2003). A ce stade, *Trichoderma* s'enroule autour du pathogène. L'attachement du *Trichoderma* est médié par la liaison des glucides dans la paroi cellulaire de *Trichoderma* et les lectines du champignon (Inbar et al., 1996). En même temps, le pathogène réagit en formant des métabolites secondaires et les ROS (reactive oxygen species) (Irina et al., 2011).

Les espèces du genre *Trichoderma* sont connues par leurs propriétés mycoparasitiques largement rapportées (Narayanasamy, 2013; Rhouma et al., 2018; Boughalleb-M'Hamdi et al., 2018). On peut notamment citer, l'espèce de *Trichoderma virens* qui est considérée comme mycoparasite agressif vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes fongiques (Narayanasamy, 2013). D'autres espèces telles que *T. asperellum* et *T. spirale* ont un pouvoir mycoparasitaire inhibant complètement la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* (Lorito et al., 1993). D'autres études ont montré le rôle des  $\beta$ -1,6-Glucanases produits par *Trichoderma* spp. dans l'inhibition du *Phytophthora citrophthora* (Druzhinina et al., 2011).



**Figure 13.** Les différentes étapes d'action par mycoparasitisme du *Trichoderma* contre *Rhizoctonia solani*. (A) : structures de type appressoria. (B): *Trichoderma* s'enroule autour des hyphes de *R. solani*. (C): un agrandissement de l'interaction entre *Trichoderma* et *Rhizoctonia* dans lequel on observe des structures de type appressoria. (D): l'hyphe de *R. solani* dont on a retiré l'hyphe de *Trichoderma* montre les pores causés par le mycoparasite au niveau des points de jonction entre les deux hyphes. R: hyphes de *R. solani*. T: hyphes de *Trichoderma* spp. (Harman et al., 2004).

## **6.2. Mécanismes d'action indirects des BCAs**

### **6.2.1. Compétition**

Les souches de *Trichoderma*, ont une capacité de dégradation (Wardle *et al.*, 1993) et de compétition surtout lorsque les nutriments forment un facteur limitant (Simon et Sivasithamparam, 1989). Les souches de *Trichoderma* établissent une zone d'interaction dans la partie cortex des racines est sécrète des molécules tels que les sidérophores qui favorisent l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) et réduisant ainsi la disponibilité du fer pour l'agent pathogène, pour cette raison, la compétition dans le sol entre les microorganismes est considérée comme un mécanisme de contrôle indirecte des pathogènes. (Chet *et al.*, 1997 ; Eisendle *et al.*, 2004). Des études menées par Segarra *et al* (2010) ont montré le rôle important des sidérophores produits par *T. asperellum* dans l'antagonisme contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

### **6.2.2. Induction de la résistance systémique**

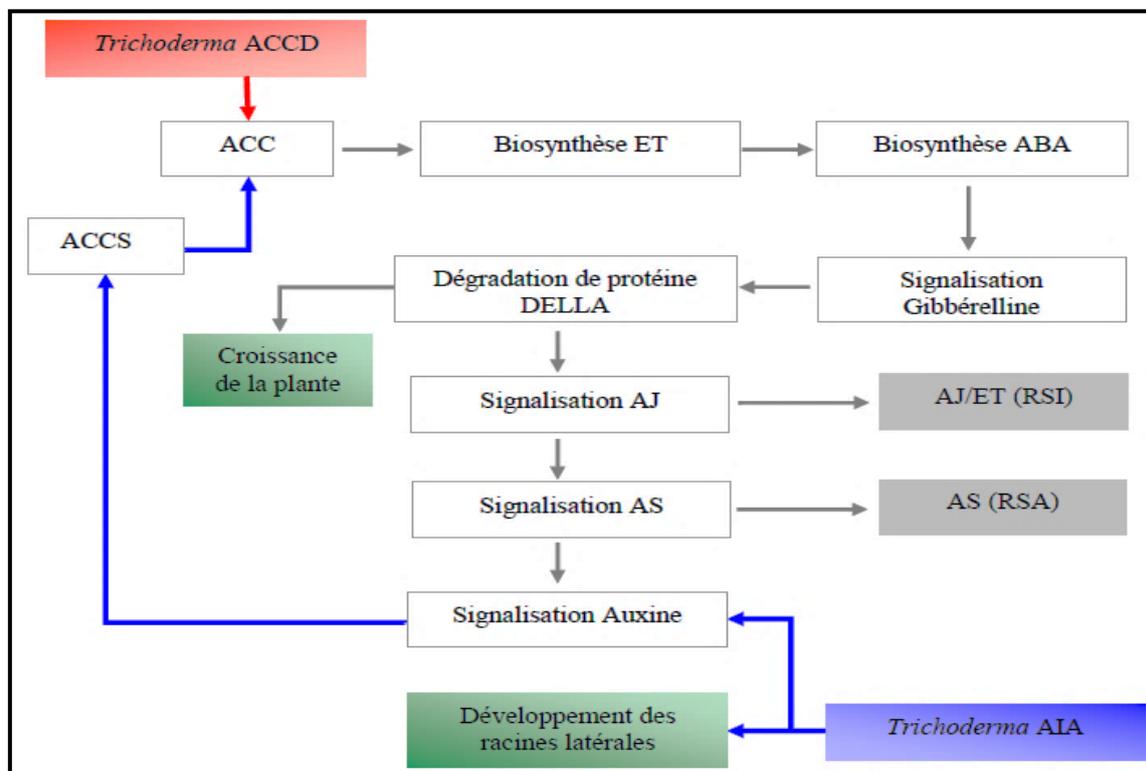
L'induction de la résistance chez la plante hôte fait partie du mécanisme de biocontrôle de *Trichoderma* contre les agents phytopathogènes. Cette résistance est soit localisée ou systémique. La reconnaissance entre la plante et le *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phytoalexines (molécules fongitoxiques) (Howell, 2003; Shores *et al.*, 2005).

Yedidia *et al.* (2000) ont prouvé que l'association de *Trichoderma* avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes.

Les *Trichoderma* sont capables d'éliciter les mécanismes de défense de la plante par la synthèse de l'enzyme ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) et la phytohormone AIA (acide indole-3-acétique) (Figure 14). La biosynthèse de l'éthylène (hormone végétale) augmente en réponse à l'ACC désaminase. En faite, le développement et le système de défense de la plante sont liés entre eux par un réseau de voies de signalisations hormonales dont les acteurs centraux dans la défense sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Viterbo *et al.*, 2010 ; Hermosa *et al.*, 2012).

Des oligosaccharides, des enzymes et d'autres composés de faible poids moléculaire, secrétés par *Trichoderma* induisant la résistance chez les plantes sont identifiés. La xylanase secrétée par plusieurs espèces de *Trichoderma* est capable de déclencher la production d'éthylène et la défense des plantes (Fuchs *et al.*, 1989; Anderson, 1993 ; Yedidia *et al.*, 1999). Les espèces de *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes.

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



**Figure 14.** Interaction *Trichoderma*–plante (Hermosa *et al.*, 2012).

Effets de la production par *Trichoderma* de l'ACC désaminase (ACCD) et acide indole-3-acétique (AIA) sur la plante. **ABA**, acide abscisique; **ACC**, acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique; **ACCS**, ACC synthéase; **ET**, éthylène; **RSI**, résistance systémique induite ; **AJ**, acide jasmonique; **AS**, acide salicylique; **SAR**, résistance systémique acquise.

### 7. Métabolites secondaires produits par *Trichoderma*

Les microorganismes et en particulier les champignons filamenteux constituent un groupe intéressant pour la recherche de nouveaux métabolites secondaires (Binder, 2007 ; Sanchez *et al.*, 2012).

Les métabolites qui sont produits par le genre *Trichoderma* appartiennent à plusieurs classes et sont réparties en cinq familles: les peptides non ribosomiques, les polykétides, les alcaloïdes, les terpènes et les terpénoïdes.

Chaque famille présente des caractéristiques structurales particulières issues de leur voie de biosynthèse. Ces composés sont synthétisés par des complexes enzymatiques, codés en général par des groupes de gènes (Speckbacher et Zeilinger, 2018).

## **7. 1. Peptides non ribosomaux**

Les peptides non ribosomaux (non ribosomal peptide : NRP) constituent l'une des principales familles de métabolites secondaires. Ces molécules sont synthétisées par des complexes enzymatiques multifonctionnels appelés synthétases de peptides non ribosomaux (non ribosomal peptide synthetase : NRPS) qui assemblent différents composés à partir d'une vaste gamme de précurseurs (Mukherjee *et al.*, 2011).

Les NRP peuvent avoir plusieurs fonctions. Parmi les NRP, on trouve la gliotoxine qui est un cyclodipeptide sécrété par *Trichoderma viride* ayant une fonction immunosuppresseur. L'acide dimérumique, un cyclodipeptide produit par *Trichoderma virens* et *Penicillium chrysogenum* et la ferricrocine, un 6-cyclopeptide produit par *Aspergillus nidulans* interviennent en tant que sidérophores. La trichorzine TVB, 18-Acylpeptide sécrétés par *Trichoderma virens* a des activités antifongiques (Von Döhren, 2004). Les principaux métabolites synthétisés par les NRPSs peuvent être classés en péptaboiles, épipolythiodioxypiperazines et sidérophores (Speckbacher et Zeilinger, 2018).

### **7.1.1. Péptaboiles**

Les péptaboiles sont des peptides synthétisés par voie non ribosomiale, dont la plupart sont linéaires, rarement cycliques avec une taille de 0,5 à 2,1 kDa et composés de 4 à 21 résidus (Neumann *et al.*, 2015). Ces métabolites sont caractérisés par l'inclusion d'un acide aminé non protéinogénique en nombre élevé, il s'agit de l'acide aminobutyrique (Neumann *et al.*, 2015; Speckbacher et Zeilinger, 2018).

En se basant sur leurs séquences et structures, ils peuvent être divisés en péptaboiles, lipopéptaboiles, lipoaminopéptaboiles, péptaboiles cycliques et d'autres petites molécules (Speckbacher et Zeilinger, 2018). Les métabolites péptaboiloïques sont produites par plusieurs genres fongiques : *Trichoderma*, *Emericellopsis* et *Gliocladium* (Vey *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2011). Le premier composé découvert de cette classe est l'alaméthicine isolé de *T. viride* (Brewer *et al.*, 1987). Les 80% des péptaboiles produits par les champignons filamenteux proviennent du genre *Trichoderma* telles que les trichorzianines, les harzianines, les trichozines, les trichokindines (*Trichoderma harzianum*) et les trichotoxines (*T. viride*) (Degenkolb *et al.*, 2008; Leclerc *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2015).

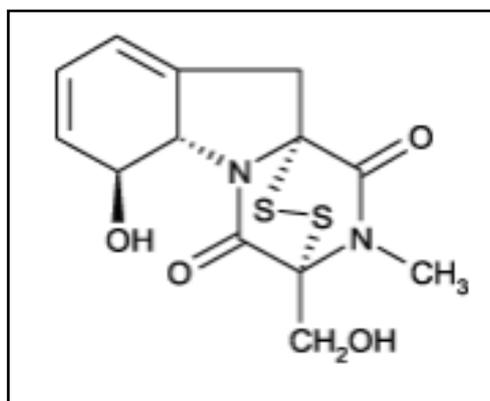
La conformation essentiellement hélicoïdale des peptaibols et leur caractère amphipathique leur confère des propriétés d'insertion dans les membranes cellulaires, ce qui permet la formation des pores ou canaux ioniques voltage-dépendants transmembranaires conduisant à une fuite cytoplasmique (Bortolus *et al.*, 2013).

Plusieurs études suggèrent une implication majeure des péptaboiles dans l'activité antifongique en générale et dans les interactions mycoparasitiques en particulier, pouvant agir en synergie avec des enzymes hydrolytiques pour favoriser le mycoparasitisme des champignons phytopathogènes (Lorito *et al.*, 1996). Parmi les péptaboiles ayant cette activité, les trichokonines produits par *Trichoderma pseudokongii* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2011).

Les métabolites péptaboliqes jouent un rôle dans l'induction de la réaction ISR de la plante en régulant la synthèse de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique (Viterbo *et al.*, 2007).

### 7.1.2. Epipolythiodioxypiperazines

Les epipolythiodioxypiperazines (ETPs) sont des toxines dérivées d'un noyau Diketopiperazine (DKP). La principale caractéristique des ETP est la présence de ponts di ou polysulfures (Guo *et al.*, 2013). Ces structures rares confèrent à ces molécules leurs toxicités qui se présentent au moins de deux façons, en reliant les protéines vitales par liaison S-cystéines ou par le cycle redox formant des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui peuvent causer des dommages au pathogène. La gliotoxine est parmi les molécules les plus connus appartenant à cette classe (Figure 15), La gliotoxine est produite par plusieurs isolats de *T. virens* Q, cette molécule a un effet fongistatique et une activité antagoniste contre certaines souches de champignons phytopathogènes tel que le *Rhizoctonia* sp. (Guo *et al.*, 2013; Zeilinger *et al.*, 2016).



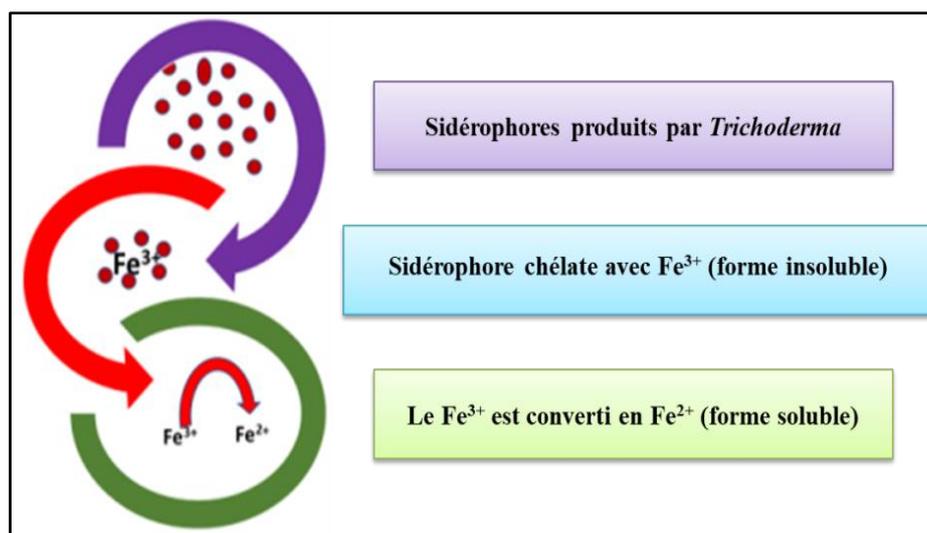
**Figure 15.** Structure de la gliotoxine

### 7.1.3. Sidérophores

Les sidérophores sont des molécules dont les masses moléculaires sont comprises entre 300 et 1300 Da et qui présentent une très forte affinité pour le fer (Drechsel and Jung, 1998; Witter *et al.*, 2000). Ils sont classés selon la fonction chimique impliquée dans la chélation du fer: phénol/catéchol, hydroxamate et acide hydroxycarboxylique.

Les sidérophores sont des chélateurs sécrétés par les microorganismes pour capter le fer lorsqu'ils sont dans un environnement pauvre en fer (Haas, 2003).

Ils jouent un rôle important dans le biocontrôle contre les phytopathogènes par le biais de la compétition en agissant comme des facteurs de virulence contre d'autres microorganismes lors d'une compétition de fer (Budzikiewicz, 2004). Ils interviennent également dans la stimulation de la croissance végétale par la réduction du stress oxydatif. Ainsi, des études menées par Segarra *et al.*, (2010) ont montré le rôle des sidérophores produits par *Trichoderma asperellum* T34 dans le contrôle de *Fusarium oxysporum* avec une réduction de l'infestation de la tomate et une stimulation de la croissance végétale des racines des plantes. D'autres études ont montré le rôle des sidérophores produits par *Trichoderma hamatum* GD12 vis-à-vis de *S. sclerotiorum* et leurs rôles dans la stimulation de la croissance végétale de la laitue (Shaw *et al.*, 2016). Vinale *et al.* (2009) ont isolé à partir de *T. harzianum* l'acide harzianique, qui est un composé N-hétérocyclique dérivé de l'acide tétramique couramment utilisé en lutte biologique (Vinale *et al.*, 2013). Il a été décrit comme un nouveau sidérophore en raison de sa capacité à se lier avec les ions métalliques essentiels tels que  $Fe^{3+}$  (Figure 16).



**Figure 16.** Production des sidérophores par *Trichoderma* et conversion du  $Fe^{3+}$  (forme insoluble) en  $Fe^{2+}$  (forme soluble).

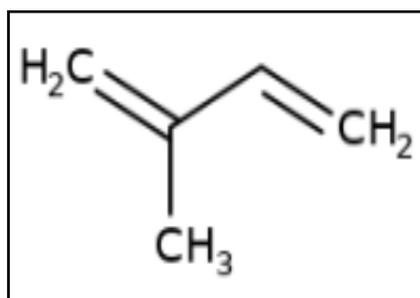
## 7.2. Polykétides

Les polykétides constituent une grande classe de métabolites secondaires avec des structures diverses et des activités biologiques multiples : antifongiques, antiparasitiques et antitumorales (Gaitatzis *et al.*, 2002; Shen, 2003). Les polykétides sont synthétisés par une succession des phases de condensation de groupes acétyle ou malonyle. La classification des polykétides se fait selon leurs structures chimiques, plus particulièrement, selon le nombre d'unités acétates qui les composent, en tri-, tétra-, penta-, hexa- et hépta-kétides (Fujii *et al.*, 2001). Ce groupe comprend des substances à activité antibiotique telles que les tétracyclines et les macrolides, les mycotoxines (aflatoxine), l'acide fusarique et la fumonisine, les pigments bikaverine et fusarubine (Zeilinger *et al.*, 2015). Baker *et al.* (2012) ont présenté une analyse phylogénomique détaillée des gènes PKS de *T. reesei*, *T. virens* et *T. atroviride* révélant que la plupart des PKS appartiennent aux clades de la lovastatine / citrinine ou des fumonisines.

## 7.3. Terpènes et terpénoïdes

Cette famille de métabolites comprend des molécules avec des structures très diverses, des molécules simples avec des structures linéaires et d'autres plus complexes avec des structures cycliques.

Les terpènes sont des hydrocarbures synthétisés à partir d'unités d'isoprène diphosphate (Figure 17) composées de cinq carbones: l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). La synthèse des terpènes est issue de la voie des mévalonates, à partir de deux unités d'acétyl Coenzyme A (acetyl-CoA) (Keller *et al.*, 2005; Christianson, 2008).



**Figure 17.** Structure de l'unité de base des terpènes: l'isopentényl diphosphate (IPP)

Plusieurs terpénoïdes connus sont produits par des champignons ; ils peuvent avoir des activités biologiques très diverses (antibiotiques, antifongiques, antitumorale, phytohormones...) (Speckbacher et Zeilinger, 2018). Les gibbérellines sont des phytohormones produites par plusieurs espèces fongiques qui stimulent la croissance végétale des plantes (croissance des tiges, des pousses et des fruits (Khan *et al.*, 2011). Les trichothécènes sont des mycotoxines qui peuvent avoir plusieurs activités biologiques. Ce sont des métabolites d'intérêt agrochimique et pharmacologique. Parmi les trichothécènes à activité antifongique, on trouve le trichothécène harzianum A produit par *Trichoderma arundinaceum* inhibant la croissance mycélienne de *B. cinerea* et de *R. solani* et induisent une 42 ISR chez la tomate (Malmierca *et al.*, 2012). L'activité anti-oomycète des trichothécènes a été mentionnée vis-à-vis de *Phytophthora nicotianae* (Mondol *et al.*, 2015).

#### 7.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés cycliques caractérisés par la présence d'une fonction basique azotée généralement incluse dans un hétérocycle. Ils renferment un grand nombre de molécules très diverses du point de vue structurale et d'activité biologique (antifongiques, antivirale et antitumorale) (Ziegler et Facchini, 2008; Xu *et al.*, 2014). Les alcaloïdes dérivent principalement des acides aminés qui peuvent être à l'origine d'un ou plusieurs types d'hétérocycles azotés. Ils comprennent principalement les indoles-alcaloïdes qui dérivent du tryptophane et qui comprend un noyau indole. Ces métabolites sont largement produits par les bactéries et les champignons, en particulier les ascomycètes (Xu *et al.*, 2014).

Certains alcaloïdes sont produits par les espèces de *Trichoderma*, à savoir le trichodines A et B (Vinale *et al.*, 2013). L'atrichermodermone A a été isolé également à partir de la souche fongique endophyte *T. atroviride* (Zhou *et al.*, 2017) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Quelques métabolites secondaires produits par certaines espèces de *Trichoderma* spp.

Métabolites secondaires	Groupe	Application	Espèces de <i>Trichoderma</i> spp.	Références
<b>Trichobreols A–C (15–17)</b>	Trichothecene sesquiterpenes	Activité antifongique	<i>T. brevicompectum</i>	Yamazaki <i>et al.</i> , 2020a
<b>Acide harzianique (140)</b>	Composé hétérocyclique azoté	Activité antifongique, promotion de la croissance végétale	<i>T. harzianum</i>	Vinale <i>et al.</i> , 2013
<b>Trichoharzianol (148)</b>	dérivé de décaline	Activité antifongique	<i>T. harzianum</i>	Jeerapong <i>et al.</i> , 2015
<b>Nafuredin C (196)</b>	Lactone	Activité antifongique	<i>T. harzianum</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2020
<b>Viridin</b>	Viridins	Activité antifongique, antinéoplasique, antiathérosclérose	<i>T. viride</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. virens</i>	Marfori <i>et al.</i> (2002), Vinale <i>et al.</i> (2009a, b)
<b>6-pentyl-2H-pyran-2-one</b>	Pyrones	Activité antifongique, promotion de la croissance des plantes, arôme de noix de coco	<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. atroviride</i>	Watts <i>et al.</i> (1988), Brueckner <i>et al.</i> (1984)
<b>T22-azaphilone</b>	Azaphilones	contrôle antimicrobienne	<i>T. harzianum</i>	Vicente <i>et al.</i> (2001)
<b>Koninginin A</b>	Koninginins	Activité antifongique, Regulation de la croissance des plantes	<i>T. koningii</i> , <i>T. harzianum</i>	Dunlop <i>et al.</i> (1989), Cutler and Jacyno (1991)
<b>Cerinolactone</b>	Hydroxy-lactones	promotion de la croissance des plantes	<i>T. cerinum</i>	Garo <i>et al.</i> (2003)
<b>Dermadin</b>	Isocyno	Antibiotique	<i>T. hamatum</i> , <i>T. viride</i> and <i>T. koningii</i>	Fujiwara <i>et al.</i> (1982)

## 8. Les biopesticides

Durant les dernières décennies, l'usage des biopesticides en protection des cultures a connu un regain d'intérêt comme alternative aux pesticides chimiques (Damalas et Koutroubas, 2018). Les biopesticides peuvent être d'origines animale, microbienne ou végétale. (Leng *et al.*, 2011). Leur application très prometteuse est étendue à plusieurs cultures. Toutes fois et malgré l'innombrables avantages de ces bioproduits, quelques inconvénients liées à leurs utilisation ont été évoqués.

### **8.1. Avantages des biopesticides**

Les biopesticides présentent plusieurs avantages :

- Ils sont biodégradables et ne laissent pas de résidus nocifs comme la plupart des produits chimiques,
- Ils sont peu toxiques et basés sur des ressources naturelles,
- Certains produits (comme les champignons endophytes) peuvent avoir des effets complémentaires sur la culture, comme la résistance au stress abiotiques offrant la facilitation de l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Compant *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012).

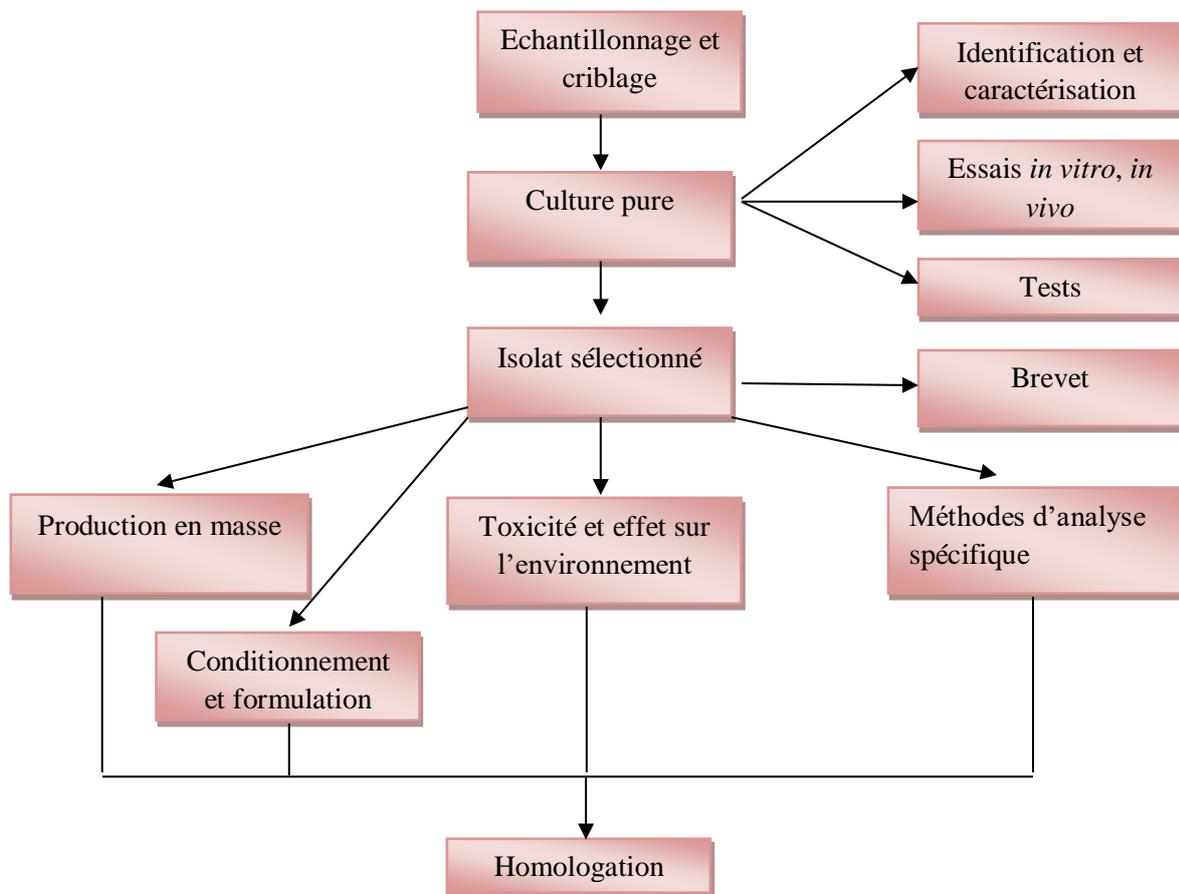
### **8.2. Inconvénients des biopesticides**

Le marché des biopesticides reste toujours limité comparé aux produits chimiques à cause de certains inconvénients :

- Une instabilité de leur activité protectrice qui dépend fortement des conditions biotiques et abiotiques du champ (Shishkoff et McGrath, 2002; Larkin et Fravel, 2002; Mendoza Garcia *et al.*, 2003).
- Une efficacité limitée dans la durée par rapport aux pesticides chimiques (Deravel *et al.*, 2013).
- Une spécificité d'action ciblant un spectre restreint de pathogènes, donc économiquement peu intéressant (Deravel *et al.*, 2013).
- La complexité des procédures d'homologation, de conditionnement et de formulation (Collins et Jacobsen, 2003; Damalas et Koutroubas, 2018).

### **8.3. Production de biopesticide**

La production de biopesticide microbien nécessite le passage par plusieurs étapes (Figure 18). La première étape comporte l'échantillonnage et l'isolement des microorganismes. Ensuite le criblage et la mise en évidence de l'activité antagoniste via une série de tests d'évaluation *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une évaluation de l'efficacité des BCA retenu dans des conditions plus réelles (serre, champs).



**Figure 18.** Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage (Montesinos, 2003).

---

## **2<sup>ème</sup> Partie: Partie Expérimentale**

---

## Chapitre I. Isolement, caractérisation des souches fongiques et évaluation du pouvoir antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. contre les souches de *V. dahliae*.

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Prospections et présentation des sites d'étude

Les prospections ont concerné les oliveraies saines et celles présentant les symptômes typiques de la verticilliose, durant les saisons printemps et automne des années 2018-2019 et 2020. Les sites des prélèvements des échantillons ont concerné les régions centre de l'Algérie; Boumerdes (Merzouga, Keddara, Cap Djenat, Beni Amrane et Corso), Bouira (Bechloul, AL-Assnam, M'chedallah, Lakhdaria), Bejaia (Sidi aich) et Tipaza (Gouraya). Leur situation géographique et leurs données climatiques (altitude, température et précipitation) sont indiquées ci-dessous.

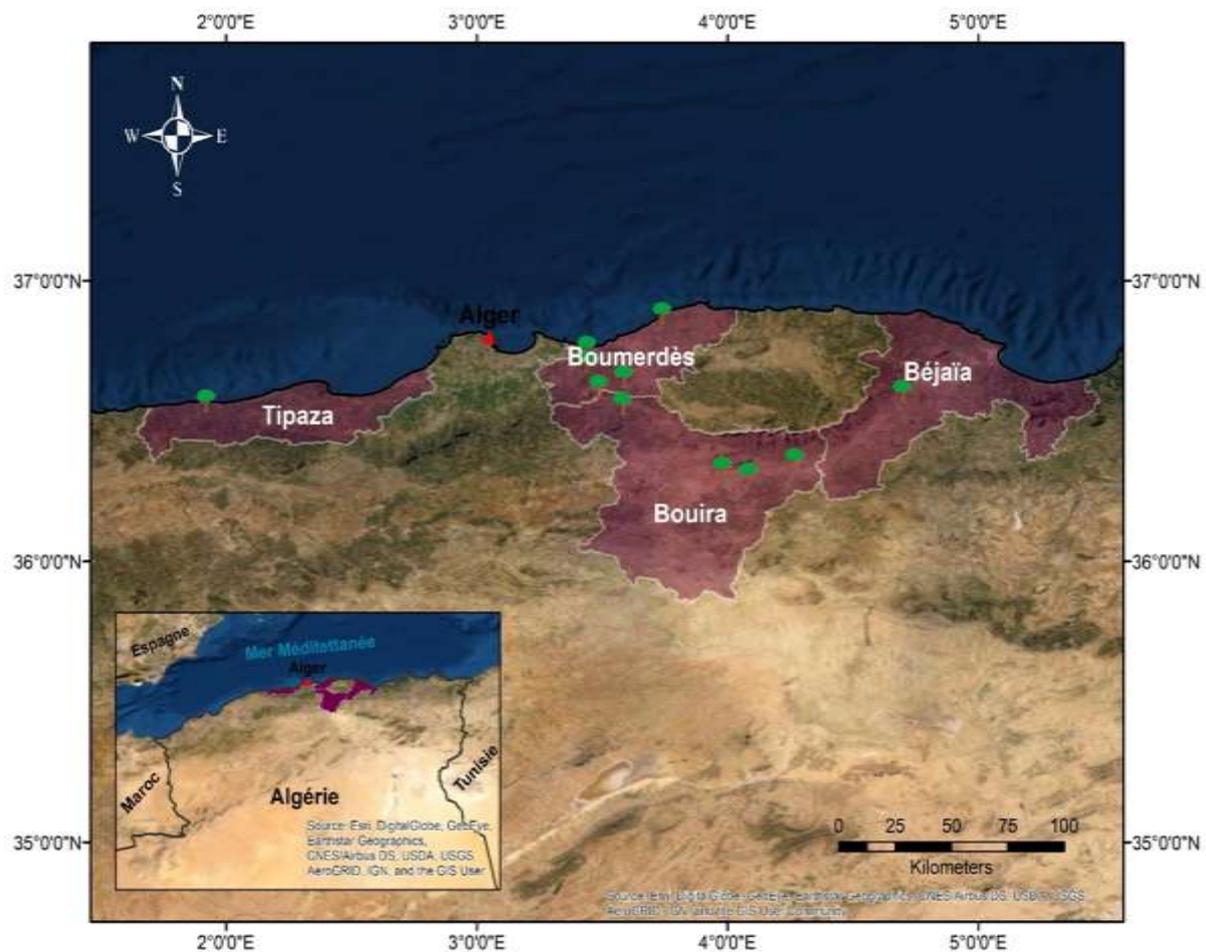
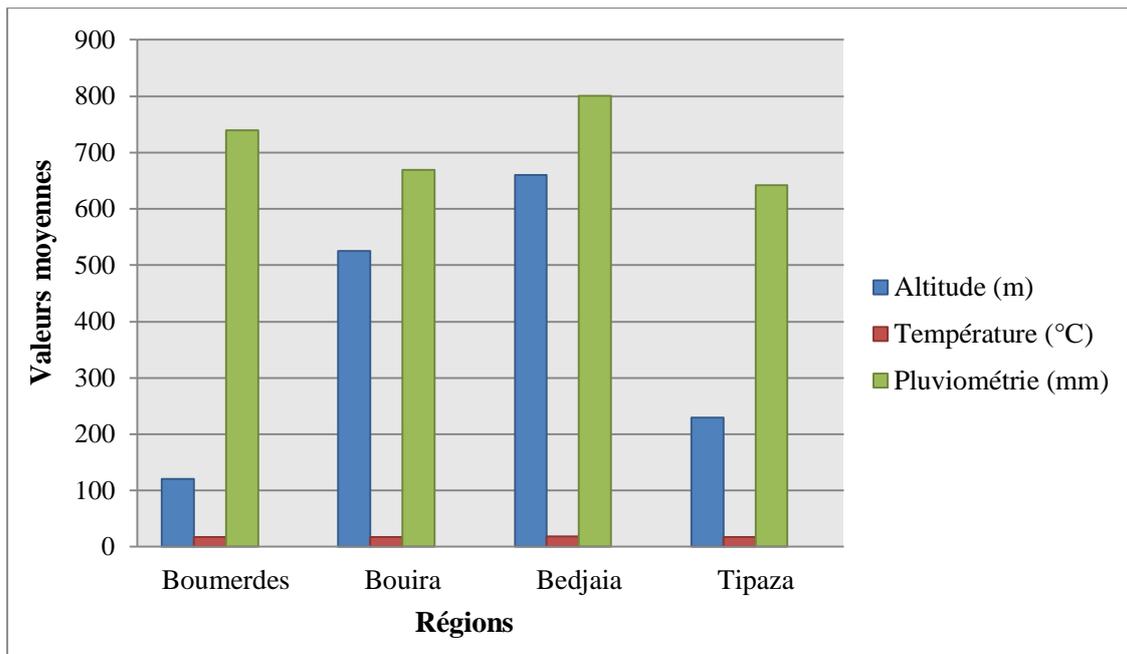


Figure 19. Localisation géographique des vergers prospectés (Photo originale).



**Figure 20.** Valeurs moyennes des données climatiques (température en °C, pluviométrie en mm et altitude en m) des quatre régions d'étude durant les années de prospection 2018-2019 et 2020.

### 1.2. Prélèvement des branches et des rameaux infectés pour l'isolement de *V. dahliae*

L'échantillonnage a été effectué en printemps et en automne où les conditions sont plus appropriées et propices pour l'apparition des symptômes de la verticilliose (Tjamos et Paplomatas, 1987). Les branches et les rameaux d'oliviers présentant les symptômes typiques de la verticilliose ont été découpés à proximité de la zone de transition entre la partie verte et la partie desséchée à l'aide d'un sécateur stérile, puis ils sont collectés dans un sac en plastique stérile et transportés au laboratoire. Les échantillons sont maintenus au frais à une température de 4°C jusqu'au moment d'analyse.

### 1.3. Echantillonnage du sol pour l'obtention de *Trichoderma* spp.

Les échantillons du sol ont été prélevés selon la technique de Pochon et Tradieux (1962). Après avoir écarté les quarante premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de sol a été prélevée à partir de 40 centimètres de profondeur au pied de chaque arbre, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri (écartant les pierres et les débris végétaux), les échantillons sont récupérés dans des sacs en plastiques stériles et transportés immédiatement au laboratoire.

### 1.4. Isolement et purification de *V. dahliae*

Le matériel végétal est soigneusement lavé sous l'eau du robinet, puis les rameaux ont été découpés en petits fragments (0,5cm), les écorces des rameaux ont été enlevées à l'aide

d'une lame stérile, ensuite la surface de chaque rameau est stérilisée par trempage dans l'hypochlorite de sodium à (5%) pendant 3 minutes suivie d'un rinçage abondant (4 fois) avec de l'eau distillée stérile, puis la surface des rameaux découpés a été désinfectée avec l'éthanol (75%) pendant 2 minutes, puis lavée trois fois avec l'eau distillée stérile. Après séchage à l'aide du papier filtre stérile, les fragments ont été placés dans le milieu PDA à raison de 4 à 7 fragments par boîte de Pétri (Gharbi *et al.*, 2014). Afin d'inhiber la croissance bactérienne, un antibiotique, le chloramphénicol a été ajouté au milieu en surfusion à raison de 50mg/l. L'incubation est réalisée à 25°C (Korolev et Katan, 1997; Otadoh *et al.*, 2011). Des repiquages successifs ont été effectués dès l'apparition des jeunes thalles de mycélium afin de se débarrasser d'éventuelle contamination et pour purifier facilement les isolats de *V. dahliae*. Les cultures pures ont été conservées dans des tubes inclinés contenant le milieu PDA à 4°C et par cryconservation sur le milieu PDB/Glycérol (70/30%) à -20°C.

## **1.5. Identification des isolats de *V. dahliae***

### **1.5.1. Identification phénotypique**

L'identification des isolats fongiques est basée sur des études macroscopiques et microscopiques (Belabid, 2003; Martin-Lapierre, 2011; Boutkhal, 2017).

#### **1.5.1.1. Etudes macroscopiques**

Cette étude consiste à observer à l'œil nu ou à la loupe binoculaire certains caractères cultureux sur milieu solide (PDA) tels que:

- L'aspect, le revers et la couleur de la colonie fongique.
- Forme, texture et la vitesse de croissance (recto)
- la présence d'un pigment diffusible dans la gélose.
- La présence ou non de micro et macrosclérotés

#### **1.5.1.2. Etude microscopique**

Les examens microscopiques comprenaient la morphologie des hyphes (cloisonné ou non), du conidiophore et de ses ramifications, ainsi que la morphologie des phialides. Il faut observer aussi les spores, leurs morphologies, la façon dont elles sont rattachées aux filaments ainsi que l'appareil sporifère.

Vue la fragilité des phialides et leurs importances dans la détermination morphologique du genre *Verticillium*, deux méthodes différentes ont été retenues pour effectuer l'étude phénotypique.

### ➤ Méthode du ruban adhésif

Cette technique consiste à couper un morceau de ruban adhésif de 1,5 cm de long en évitant absolument de laisser ses empreintes sur la face adhésive. Appliquer la face adhésive sur la colonie fongique puis poser le ruban sur une lame propre et observer sous le microscope optique aux différents grossissements (Anaissie *et al.*, 2003)

### ➤ Technique de la micro-culture

C'est une technique très utilisée en mycologie, elle a l'avantage de donner une bonne identification car elle facilite l'observation des arrangements spatiaux des conidies sur les conidiophores. Le principe consiste à cultiver le champignon entre lame et lamelle, afin de pouvoir observer la forme de mycélium et de fructification.

Cette méthode consiste à ensemencer aseptiquement une couche mince de milieu PDA déposé entre lame et lamelle. Les lames portant les cultures sont ensuite placées sur un support (généralement des pipettes Pasteur recourbés à la chaleur en forme de V) dans des boîtes de Pétri tapissées avec du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile et incubées à 25°C pendant 24 heures à 48 heures. Cette technique doit être répétée pour les différentes colonies pures. Lorsque le champignon se développera, les préparations sont observées au microscope en présence de bleu de méthylène. L'observation se fait à différents grossissement pour passer ensuite à l'étape de l'identification (Chabasse *et al.*, 2002).

## 1.5.2. Identification moléculaire de *Verticillium dahliae*

### 1.5.2.1. Extraction d'ADN

L'identification moléculaire est effectuée au laboratoire de protection des plantes, département d'agronomie, Université de Cordoba, d'Espagne. L'ADN total est extrait de 100 mg de poudre de mycélium cultivée sur milieu PDL âgé de 7-10 jours par le kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne). La purification de l'ADN est effectuée conformément aux instructions du fabricant. Les suspensions d'ADN obtenues sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

La qualité et la concentration de l'ADN sont déterminées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et aussi par spectrophotomètre (260nm). La concentration finale d'échantillons d'ADN est ajustée à 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Pour toutes les réactions de PCR, 1  $\mu\text{l}$  ADN (10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) est utilisé comme matrice (Russell et Sambrook, 2001).

### 1.5.2.2. Amorces de PCR

Nous avons utilisé les amorces DF (CATGTTGCTCTGTTGACTGG) et DR (GACACG GTATCTTTGCTGAA) pour identifier les souches de *V. dahliae* défoliant et les amorces

NDF(CAGGGGATACTGGTACGAGACG) et NDR (ATGAGTATTGCCGATAAGAACA) pour identifier les souches non-défoliante de la même espèce (Pérez-Artés *et al.*, 2000).

### 1.5.2.3. Réaction PCR

Les tests de PCR sont réalisés selon les protocoles décrits précédemment (Mercado-Blanco *et al.*, 2003; Collado-Romero *et al.*, 2006), en utilisant les amorces spécifiques pour chaque pathotype avec quelques modifications mineures. Toutes les PCR sont réalisées séparément à l'aide de deux paires d'amorces: DF/DR, NDF/NDR, avec un thermocycleur PTC-100 (MJ Research, MN) (Short *et al.*, 2014; Pérez-Artés *et al.*, 2000; de Jonge *et al.*, 2012). Le volume final de chaque PCR est ajusté à 25µl avec les réactifs suivants: 2.5µl de tampon [10 mmol l<sup>-1</sup> de Tris-HCl (pH 8.3), 50 µmol l<sup>-1</sup> de KCl et 10 % v/v Triton X-100], 2.5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol l<sup>-1</sup> de dNTP (CinnaGen Co., Iran), 100 nmol l<sup>-1</sup> de chaque amorce (Primer), 1 U de Taq polymérase ADN (Promega Corp., Madison, WI) et 1µl d'ADN matrice. Chaque réaction est effectuée selon les paramètres de cyclage thermique suivants: étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1min. Les températures d'hybridation des amorces de défoliation et de la non défoliation étaient de 61°C et de 58°C respectivement pendant 1 min; et l'extension à 72°C pendant 1 min.

Le cycle final impliqué comporte une phase de polymérisation pendant 1 min et une phase d'extension pendant 5 min. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur 1% de gel d'agarose dans le tampon tris-1 x acétate-EDTA (TAE) à 85V pendant 60 min. Les Gels sont colorés pendant 15 min dans du bromure d'éthidium (Sigma) (1g ml<sup>-1</sup>) et visualisé sur un transilluminateur UV. Un marqueur moléculaire (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) est additionné sur chaque gel.

## 1.6. Caractérisation physiologique des isolats de *Verticilium dahliae*

La compréhension des modalités d'action d'un agent de lutte biologique nécessite essentiellement la connaissance de la biologie du pathogènes ainsi que les facteurs abiotiques qui favorisent son développement.

Afin d'approfondir notre connaissance sur les différents facteurs qui agissent sur la croissance du pathogène *V. dahliae*, nous avons opté pour une caractérisation physiologique de la collection d'isolats de *V. dahliae* obtenue tels que la composition du milieu, la température, le pH, la salinité et la lumière. Des explants de 6 mm de diamètre sont prélevés à partir des cultures âgées de 7 jours. Les mesures de la croissance mycélienne sont prises après sept jours d'incubation. Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat.

**1.6.1. Influence du milieu de culture**

Dans cette étude, nous avons utilisé deux séries différentes de milieux de culture communément adoptés en phytopathologie. Ils sont représentés par trois milieux organiques : V8, Malt et PDA et deux milieux minéraux : Richard et Czapeck (Annexe 2).

Les disques fongiques de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'emporte-pièce d'une culture âgée de sept jours sont placés au centre des boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture. Les cultures sont incubées à 25°C. Le nombre de répétition est de trois par milieu de culture pour chaque isolat.

**1.6.2. Influence de la température**

Cette étude a été menée pour déterminer la température optimale qui donne un meilleur taux de croissance du phytopathogène selon le protocole établi par Samuels *et al.* (2002).

Les isolats de *V. dahliaie* ont été ensemencés sur le milieu optimal de croissance déjà sélectionné. Les cultures fongiques sont ensuite incubées à différentes températures: 20, 25, 28, 30 et 35°C pendant sept jours. Pour chaque isolat, trois boîtes de Pétri sont ensemencées par milieu de culture.

**1.6.3. Influence du pH**

L'étude a été effectuée dans des boîtes de Pétri sur le milieu optimal de la croissance fongique. Ce milieu a été tamponné avec le tampon phosphate à 0.05 M, puis ajusté à pH 6, 7, 8 et 9. Les solutions tamponnées à différents pH sont préparées selon la méthode de Kamoun (1977) (Annexe 5). Chaque pH est ajusté avec HCl à 1N ou NaOH (1N) à l'aide d'un pH mètre, les tampons sont ensuite ajoutés aux milieux de culture avant leur autoclavage. Des explants mycéliens de 6 mm de diamètre d'une culture âgée de 7 jours de chaque isolat de *V. dahliaie* ont été ensemencés au centre des boîtes de Pétri. Trois répétitions sont effectuées pour chaque isolat, les cultures ont été incubées à 25°C pendant 7 jours.

**1.6.4. Influence de la salinité**

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance mycélienne de *V. dahliaie* a été déterminé par la culture des souches sur milieu contenant des concentrations croissantes en NaCl de (NaCl=2.5 g/l, NaCl=4 g/l, NaCl=8 g/l). L'incubation des boîtes a été faite à 25°C pendant 7 jours. Pour chaque concentration, on a retenu 3 répétitions (Ouazzani Chahdi *et al.*, 2014).

**1.6.5. Influence de la lumière**

Des boîtes de Pétri contenant le milieu optimale de croissance, ont été inoculées avec des disques mycéliens (6mm) de chaque isolats de *V.dahlaie*. Les boîtes ont été mises dans les conditions suivantes :

- une série dans l'obscurité continue
- une série sous un éclairage continu
- une série sous un cycle alternatif de 12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité.

La source lumineuse utilisée pour cet essai est un tube « lumière du jour » (réf. Claude U 40 RS) qui dégage une lumière blanche à une intensité de 400 lux. Les cultures de chaque série sont incubées pendant 7 jours à une température de 25°C (Tlemsani, 2010; Benzina *et al.*, 2016).

**1.7. Agent antagoniste appartenant au genre *Trichoderma* sp.****1.7.1. Isolement des isolats de *Trichoderma* spp.**

L'isolement des champignons du genre *Trichoderma* spp. à partir du sol a été effectué selon deux techniques différentes.

La première technique consiste à sécher une quantité du sol à 30°C et à la broyer dans un mortier stérile, ensuite 0.05g du sol est dispersé dans des boîtes de Pétri stériles auxquels sont ajoutées 1 à 2 gouttes (50µl pour une goutte) d'eau distillée stérile, ensuite 15 ml de milieu PDA (en surfusion) sont coulés sur le sol dispersé. Les boîtes de Pétri sont agitées par des mouvements circulaires lent avant solidification du milieu de culture et incubées à 28°C à l'obscurité (Benouzza, 2012).

La deuxième technique consiste à mettre en suspension 10g du sol dans 90 ml d'eau distillée stérile contenue dans un flacon stérile et homogénéisé pendant 10 minutes. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ . Un volume de 100µl de chaque dilution est étalé à la surface des milieux de culture gélosés. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C et observées quotidiennement durant une semaine (Rapilly, 1968; Elad *et al.*, 1981; Ubalua et Oti, 2007).

Les colonies de *Trichoderma* spp. ont été sélectionnées en fonction de la morphologie de leur conidiophores, phialides et conidies. Les colonies de *Trichoderma* spp. ont d'abord été purifiées par une série de repiquage sur milieu PDA puis par monospore, et incubées à 28°C pendant 7 à 10 jours. Une fois purifiées, les cultures ont été conservées dans des tubes inclinés contenant le milieu PDA à 4°C et par cryconservation sur le milieu PDB/Glycérol (70/30%) à -20°C.

## 1.7.2. Identification des isolats de *Trichoderma* spp.

### 1.7.2.1. Identification morphologique

Des observations macroscopiques et microscopiques ont été effectuées sur des cultures fongiques qui ont poussé sur le milieu PDA à 28°C sous lumière blanche artificielle pendant 3 à 7 jours. Les caractéristiques macroscopiques comprenaient la croissance, la couleur, l'aspect de la colonie et la production de pigment dans le milieu. Les caractéristiques microscopiques comprenaient la morphologie des conidies, du conidiophore et de ses ramifications, ainsi que la morphologie des phialides. La présence de chlamydospores et leur morphologie ont été également prises en considération. Les isolats fongiques ont été attribués au genre *Trichoderma* sp. en fonction des caractères morphologiques décrits par Rifai (1969), Bissett (1991a, b, c), Gams et Bissett (1998) et Samuels et al. (2002).

### 1.7.2.2. Identification moléculaire de *Trichoderma* spp.

Quatre isolats de *Trichoderma* spp. ont fait l'objet d'une identification génotypique, ces isolats ont été choisis sur la base de certains critères de sélection comme leurs activités antagonistes très importantes *in vitro* contre *Verticillium dahliae* et la production d'une gamme très diversifiée de métabolites secondaires d'intérêt. L'identification moléculaire a été réalisée au laboratoire GLS (Gene Life Sciences) à Sidi Bel Abbes (Algérie) selon le protocole décrit ci-dessous.

#### ❖ Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait selon le protocole décrit par Lee et Taylor (1990). Le mycélium de *Trichoderma* spp. a été prélevé après 5 jours de culture dans un milieu PDB (Bouillon Déxtrosé Pomme de terre) (Annexe 2) à l'obscurité à 28°C puis récupéré par centrifugation pendant 15 minutes à 8000 tours/minutes dans une microcentrifugeuse, le surnageant est éliminé. Une quantité de 100µl du tampon d'extraction a été ajouté (200mM tris HCL pH 8,5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Le mycélium a été ensuite broyé avec un broyeur conique, ajusté et homogénéisé par agitation manuelle pendant une minute. Ensuite les échantillons ont été placés d'abord pendant 20 minutes à -20°C. Des volumes de 200µl de tampon d'extraction ont été ajoutés et le mycélium a été à nouveau broyé pendant une minute. Les échantillons ont été placés ensuite pendant 30 minutes à 65°C. Un nouveau volume de 150µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 a été ajouté et les échantillons ont été incubés à -20°C pendant 10 minutes. Le lysat (après 10 minutes à température ambiante) a été centrifugé à pleine vitesse à 4°C pendant 20 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 1,5ml. L'ADN a été précipité par l'ajout de 450µl d'isopropanol glacé. Après 15 minutes à

température ambiante, l'ADN a été mis en pelote à pleine vitesse pendant 30 minutes à 4°C (après avoir éliminé le surnageant de centrifugation). La pelote a été lavée deux fois avec de l'éthanol glacé à 70%, ensuite centrifugée pendant 5 minutes à pleine vitesse (après élimination des surnageants de centrifugation), puis la pelote a été séchée à 65°C pendant 15 minutes à pleine vitesse. L'ADN a été remis en suspension dans 20µl d'eau stérile ultra pure et la qualité de l'ADN a été ensuite contrôlée sur un gel d'agarose.

#### ❖ Amplification de l'ADN par PCR

La PCR a été réalisée par l'amplification de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomale (ADNr). La région (ITS) a été amplifiée en utilisant une paire d'amorces ITS: ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT AA-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTT ATTGATA TGC-3') (Gardes et Bruns 1993). La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µl d'ADN génomique, 5 µl de Tampon de Taq Promega (1X), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2 µl dNTPs (0,2 mM), 1 µl de chaque amorce (10 µM), 1 unité de Taq ADN polymérase et de H<sub>2</sub>O pure et stérile pour compléter jusqu'à 25µl. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur Bio-Rad C1000 en suivant les conditions suivantes: une dénaturation initiale à 95°C pendant 1 min, suivie de 35 cycles consistant chacun en une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes. Le cycle PCR a été terminé par une étape d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 7 min. Les fragments amplifiés ont été purifiés à l'aide d'un kit de purification d'ADN à partir du gel NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), puis, séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) à 90V et un marqueur d'ADN d'un poids moléculaire de 1KB a été utilisé comme témoin.

#### 1.7.3. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée avec l'utilisation du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 6.0 (2013). Les séquences obtenues ont été comparées à des séquences type strains sur la base de données du logiciel Blast (basic local alignment search tool), du site NCBI (National Centre Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>), Ensuite, l'alignement des séquences a été effectué par le programme clustal W.W et l'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode de Neighbor-Joining (NJ).

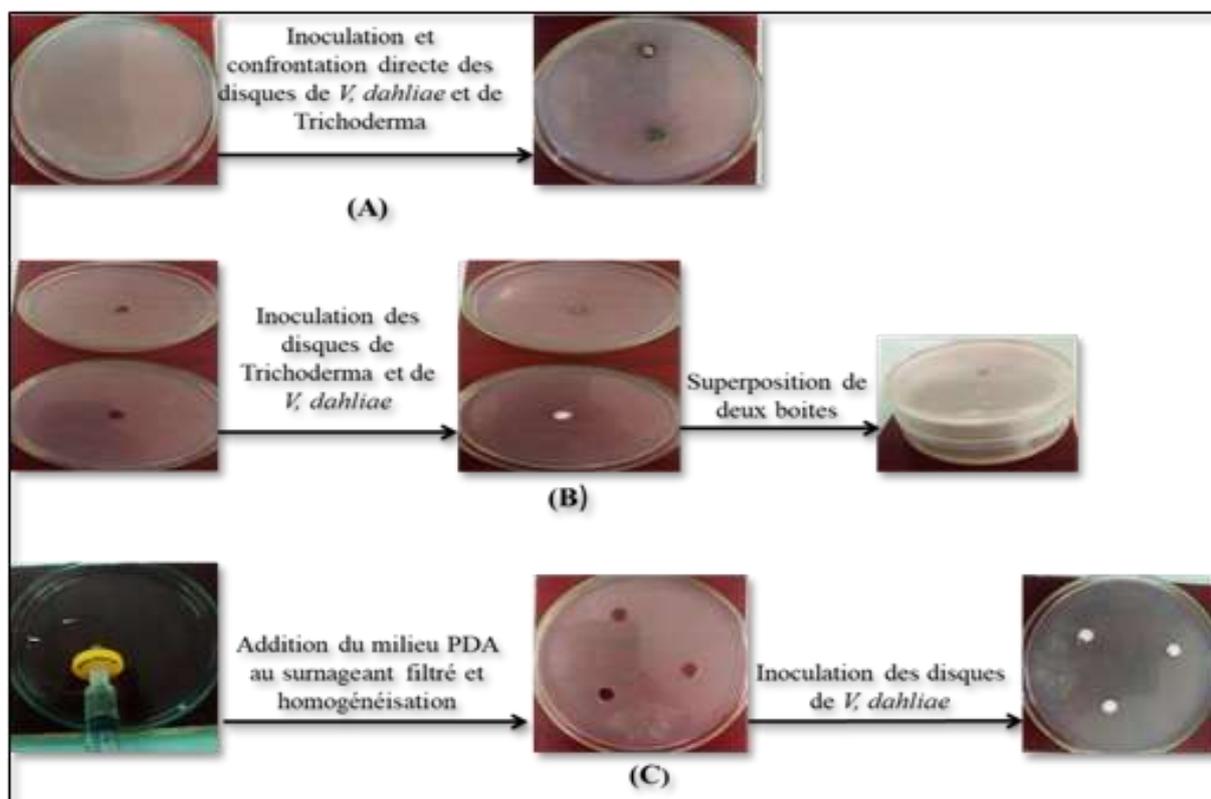
Toutes les séquences ainsi identifiées, ont été déposées sur la base de données nucléotidique internationale NCBI GenBank où un numéro d'accèsion a été attribué à chaque séquence.

#### 1.7.4. Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique a été réalisée pour déterminer l'optimum de la croissance mycélienne. Pour connaître les milieux de culture les plus favorables au développement des isolats de *Trichoderma* spp. trois milieux organiques (PDA, OGA, Sabouraud), un milieu semi organique (Waksman) et un milieu minéral (Czapeck) ont été testés. En plus de la recherche de milieu de culture adéquat à la croissance de *Trichoderma* spp. d'autres paramètres ont été évalués tels que la température (20, 25, 28, 30, 35°C), la tolérance aux différentes concentrations de sel (NaCl) (0,12. 0,5. 0,85. 1 M) et le pH, Pour ce dernier test, le milieu PDA est tamponné à différents pH ( de 4 jusqu'à 8) avec un intervalle de 1 par l'addition des solutions  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  (0.1 M).

#### 1.7.5. Etude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp.

L'effet antagoniste de tous les isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des isolats phytopathogènes de *V. dahliae* a été évalué sur le milieu PDA par des tests de confrontation direct et à distance ainsi que l'effet des filtrats de culture (Figure 21). Cette étude avait pour but de sélectionner les isolats les plus antagonistes sur la base des effets inhibiteurs.



**Figure 21.** Techniques utilisées pour l'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. (Photos originales): (A) Confrontation directe, (B) Confrontation indirecte, (C) Les étapes des tests de filtrats de culture sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae*.

### 1.7.5.1. Confrontation directe

La technique utilisée pour l'évaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. est celle utilisée par Hajieghrari *et al.* (2008), De la Cruz-Quiroz *et al.* (2018) et Bedine Boat *et al.* (2020). Cette méthode consiste à déposer diamétralement dans des boîtes de Pétri contenant 15ml de milieu PDA, deux explants opposés de 6mm de diamètre provenant des cultures de colonie de *V. dahliae* et de *Trichoderma* spp. (pathogène et antagoniste). Les explants sont placés suivant un axe diamétral à 4 cm de distance et à équidistance du centre de la boîte (Figure 21). Le pourcentage d'inhibition est calculé après 7 jours d'incubation selon la formule

$$\%I = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

**I (%)** représente l'inhibition moyenne de la croissance mycélienne,

**R1** est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de l'agent antagoniste.

**R2** est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de l'agent antagoniste.

### 1.7.5.2. Confrontation à distance

La technique utilisée pour l'évaluation de l'effet des substances volatiles est celle adoptée par Camporta (1985), Fiddman et Rossall (1993), Hibar *et al.* (2005), Gaigole *et al.* (2011) et Ruangwong *et al.* (2021).

Cette technique consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées; par la suite, un assemblage des deux boîtes portant les disques de *Trichoderma* spp. et *V. dahliae* a été réalisé (Figure 21). La jonction des deux boîtes a été assurée par une bande des couches de parafilm de façon à éviter toute contamination et toute perte de substances volatiles. Les conditions de culture sont identiques à celle de la confrontation par contact direct. Le témoin a été préparé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de *V. dahliae*, alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA. Les boîtes sont incubés pendant 6 jours à 28°C et à l'obscurité (Akrami *et al.*, 2011). Toutes les combinaisons entre les deux isolats de *V. dahliae* et les isolats de *Trichoderma* spp. en triplicata.

### 1.7.5.3. Test des filtrats de culture des antagonistes testés

Les isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés également pour leur potentiel de production de métabolites antifongiques, des cultures liquides ont été préparées pour chaque isolat dans le but d'étudier l'effet des substances secrétées sur la croissance des isolats de *V. dahliae*. La méthode adoptée consiste à incorporer des filtrats de culture d'espèces antagonistes dans un milieu de culture inoculé ultérieurement avec des disques de *Verticillium dahliae* (Jamdar *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2017). En effet, une concentration sporale de 10<sup>7</sup> spores/ml a été préparée dans des Erlenmeyers contenant 150 ml

du milieu de culture liquide PDB à partir des cultures solides de *Trichoderma* spp. dans des conditions aseptiques. La croissance fongique et la production des métabolites secondaires ont été réalisées sous agitation continue et à l'obscurité à raison de 150 tours/min à la température 28°C pendant sept jours. Un filtrat témoin a été également préparé, suivant le même protocole, à partir d'un milieu PDB non inoculé par les agents antagonistes (Lepengue *et al.*, 2009). Les cultures liquides préparées ont été soumises à une centrifugation pendant 10 minutes à une vitesse de 9500 tours/min (Dennis et Webster, 1971). Puis, les surnageants ont été filtrés à travers un filtre millipore de 0,22µm de diamètre dans le but de récupérer les métabolites secondaires produits par les isolats de *Trichoderma* spp. (El-Katatny et Emam 2012; Lepengue *et al.*, 2009). Deux doses croissantes du filtrat de culture ont été préparées (10% et 20%), les filtrats sont incorporés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (15 ml) en surfusion, le mélange a été homogénéisé par des mouvements circulaires des boîtes de Pétri. Après solidification, trois disques de 6 mm de diamètre de chaque agent pathogène ont été placés sur le milieu d'une façon équidistante (Abdel-Sater, 2001; Mishra, 2010) (Figure 21). Ces cultures ont été par la suite incubées à l'obscurité à 25°C (Mishra, 2010). Dans les cultures témoins, des quantités identiques de milieu PDB ont été utilisées au lieu des filtrats des cultures des antagonistes.

L'évaluation de l'effet de ces antagonistes ainsi que la mesure du diamètre moyen de colonies a été effectuée après chevauchement des colonies témoins. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par les isolats de *Trichoderma* ont été calculés selon la formule.

$$\%I = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

**I** (%) représente l'inhibition moyenne de la croissance mycélienne,

**R1** est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de l'agent antagoniste.

**R2** est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de l'agent antagoniste.

### 1.7.6. Mesure de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée par la mesure des diamètres moyens de la colonie mycélienne à l'aide d'une règle graduée (Rapilly, 1968). Elle est déterminée selon la formule suivante :

$$L = \frac{D-d}{2}$$

**L** : Croissance mycélienne (mm)

**D** : diamètre moyen de la colonie (mm)

**d** : diamètre du disque mycélien initial (mm).

### 1.7.7. Effet des filtrats de culture de *Trichoderma* sur la germination des conidies de *V. dahlia* *in vitro*

La germination des conidies constitue une phase importante dans le cycle infectieux des champignons phytopathogènes. L'action *in vitro* des filtrats de culture de 15 isolats de *Trichoderma* a été évaluée sur la germination des spores d'un isolat de *V. dahlia* selon la méthode de Bekkar (2015). Les différents isolats de *Trichoderma* spp. ont été cultivés séparément sur le milieu PDB pendant 7 jours sous agitation. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 9500 rpm pendant 10 mn. Le surnageant recueilli a été filtré à travers un filtre millipore de 0,22µm de diamètre. Le filtrat de chaque antagoniste a été ajouté aseptiquement, à l'aide d'une seringue stérile, au milieu PDB pour obtenir une concentration de 50% (v/v). A partir des cultures jeunes de l'isolat de *V. dahlia*, les fragments mycéliens ont été récoltés dans de l'eau distillée stérile. La suspension fongique a été agitée afin de libérer les conidies des conidiophores. Cette dernière a été filtrée à travers un papier filtre stérile afin d'éliminer les fragments mycéliens puis ajustée à 10<sup>3</sup> spores/ml. Une quantité de 0,2 ml de cette suspension a étéensemencée dans le milieu PDB à laquelle le filtrat a été ajouté. La préparation du lot témoin est réalisée dans les mêmes conditions mais sans addition du filtrat. Les cultures ont été incubées à 28°C. Pour chaque filtrat, trois répétitions ont été réalisées. Après 24 h, le comptage des spores, germées ou non, a été effectué sur un total de 150 spores et le pourcentage d'inhibition de la germination des conidies (IG) du pathogène a été déterminé en utilisant la formule suivante (Chandrakala *et al.*, 2012):

$$IG (\%) = (N_0 - N_c / N_0) \times 100$$

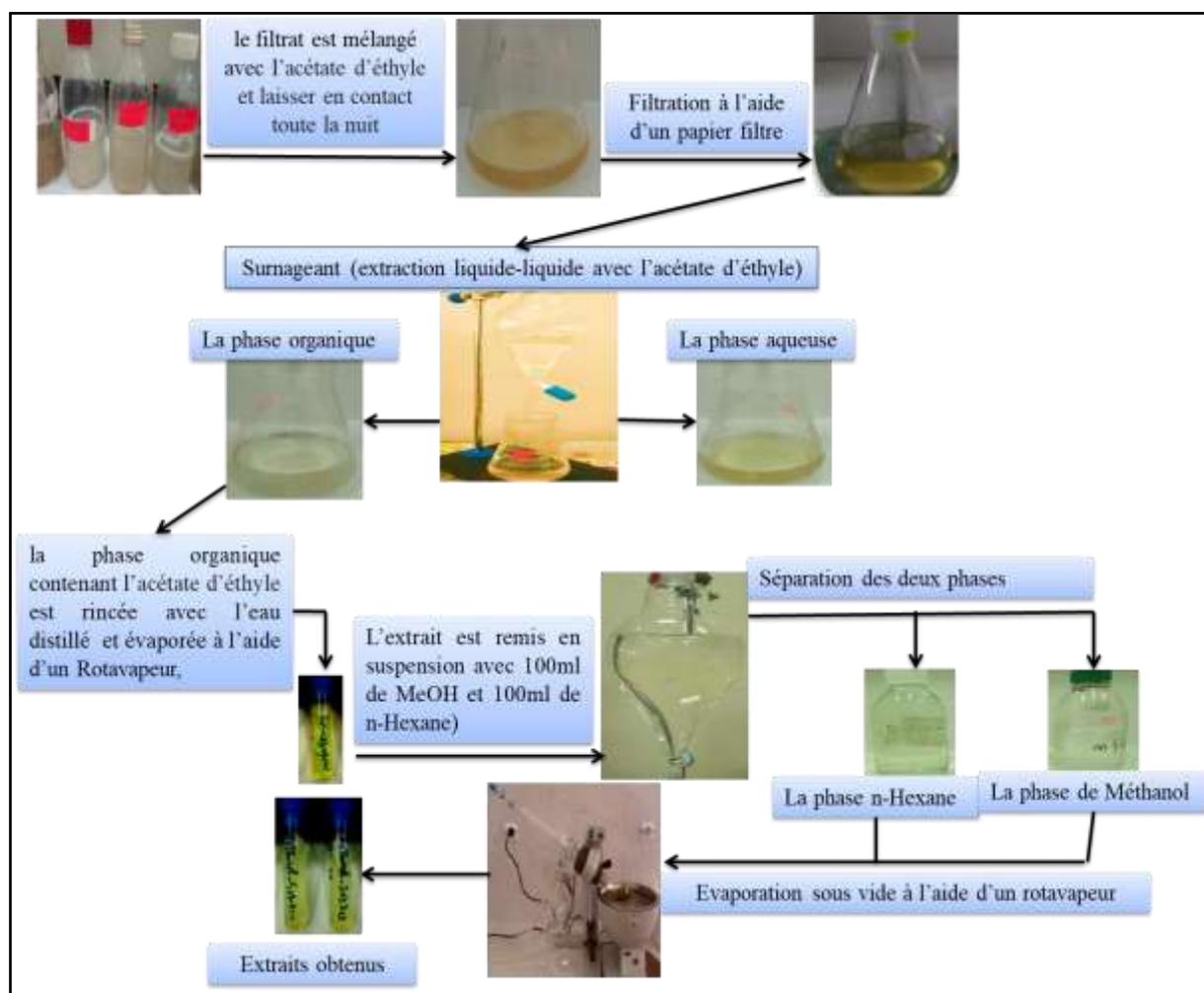
**N<sub>c</sub>** : nombre de conidies germées en présence de filtrat

**N<sub>0</sub>** : nombre de conidies germées dans le milieu de culture sans filtrat (Besri et Diatta, 1985).

### 1.7.8. Procédure d'extraction et caractérisation par GC-MS des métabolites secondaires produits par quelques isolats de *Trichoderma* spp.

Après fermentation dans le milieu PDB, comme décrit précédemment, le filtrat de chaque souche a été mélangé avec 225ml d'acétate d'éthyle et laissé en contact toute la nuit, le mélange ainsi obtenu a été filtré à l'aide du papier filtre stérile. Les mycéliums ont été éliminés et le filtrat contenant la phase aqueuse et la phase organique ont été décantés dans une ampoule de décantation pour séparer les deux phases. Par la suite; la phase organique contenant l'acétate d'éthyle a été rincée trois fois avec l'eau distillée et évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur) à 45°C, puis l'extrait d'acétate d'éthyle a été remis en suspension dans 100 ml de méthanol et n-hexane.

Enfin, les deux phases organiques résultantes ont été séparées et évaporées sous vide à l'aide d'un Rotavapeur (Figure 22). Les extraits obtenus ont fait l'objet d'une analyse GC-MS pour identifier la structure chimique des différents métabolites volatiles produits.



**Figure 22.** Le protocole d'extraction liquide-liquide des métabolites secondaires à partir des filtrats de culture de *Trichoderma* spp. (Photos originales).

### 1.7.9. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard Agilent 6890 plus) couplé à un détecteur sélectif de masse (Hewlett Packard Agilent 5973). Après chaque prélèvement, la fibre SPME a été placée dans l'injecteur du GC où les composés ont été désorbés via un mode splitless pulsé dans un HS-liner de 1.5mm. La séparation des COVs a été réalisée sur une colonne HP-5MS (Agilent Technologies, États-Unis ; long 30 m \*D int 0.25 mm \* épaisseur film 0.25µm). Les composés ont été élués vers la colonne par l'hélium à flux constant de débit 1.5 ml/min, Ensuite, le programme des températures est appliqué: 60°C pendant 1 minutes, 10°C/min jusqu'à 300°C, et pour finir, isotherme pendant 5 min.

Le spectromètre de masse est exploité en mode impact électronique (EI) à 70eV, à une température source de 230°C, de type quadripôle de température 150°C, scannant des masses variant de 30 à 550 TIC.

#### **1.7.10. Identification des COVs**

Les données brutes de la GC-MS sont obtenues sous forme de chromatogramme. L'identification des COVs se réalise en comparant les temps de rétention et les masses spectrales avec les bases de données NIST02.L. Les résultats ainsi obtenus sont présentés sous forme de fichier .txt où, pour chaque détection, trois noms de molécules sont proposés avec les détails du temps de rétention, de l'aire sous la courbe, de la référence et d'un coefficient de certitude.

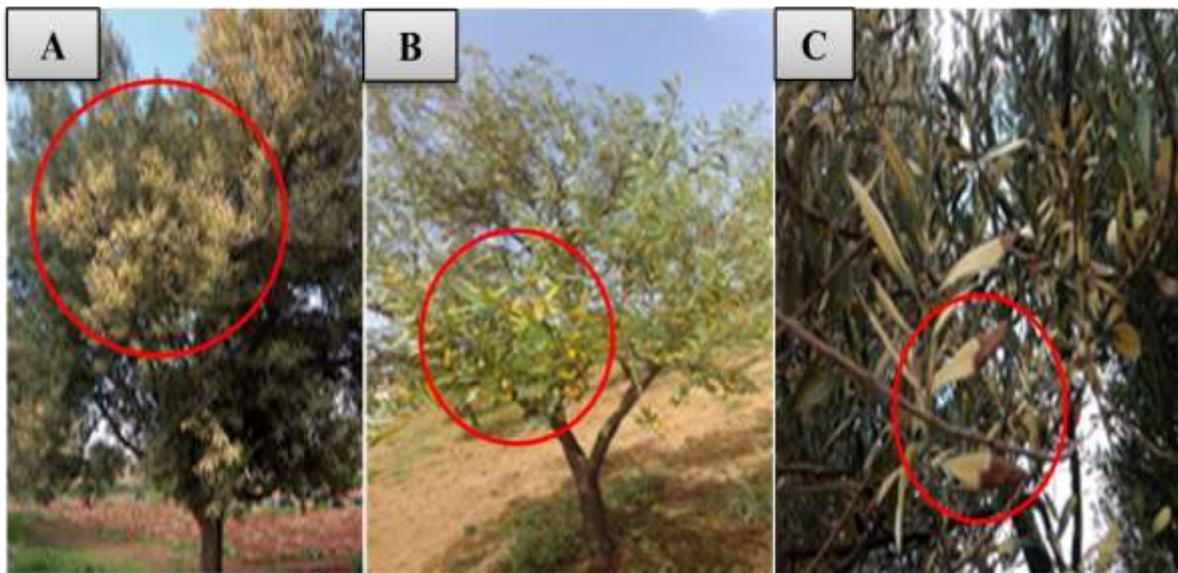
#### **1.7.11. Analyses statistiques**

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS, la version 25. Une analyse de la variance (ANOVA) des résultats relatifs aux tests *in vitro* a été réalisée, les moyennes ont été classées par le test LSD lorsque les différences sont significatives (au seuil de 5%). De plus, les différences significatives entre les moyennes des tests de confrontation directe et indirecte ont été déterminées par un test de Student (t).

## 2. Résultats

### 2.1. Prospection sur terrain et état phytosanitaires des vergers prospectés

L'échantillonnage a été réalisé au cours de l'année 2018-2021, les prospections ont été effectuées dans des régions oléicoles au nord algérien présentant des symptômes de dépérissement typiques de la verticilliose. Dans les différents vergers prospectés, les oliveraies étaient plus au moins touchées par des maladies parasitaires, trois maladies ont été recensées dont deux sont d'origine fongique à savoir la verticilliose et la tavelure et une maladie d'origine bactérienne, il s'agit de la tuberculose de l'olivier avec des fréquences d'infection de 40,47%. 11,11% et 22,22% respectivement. Un insecte ravageur (le psylle de l'olivier) *Euphyllura olivina* a été recensé dans la plus part des vergers prospectés avec une fréquence d'infection de 25,93% (Figure 23).

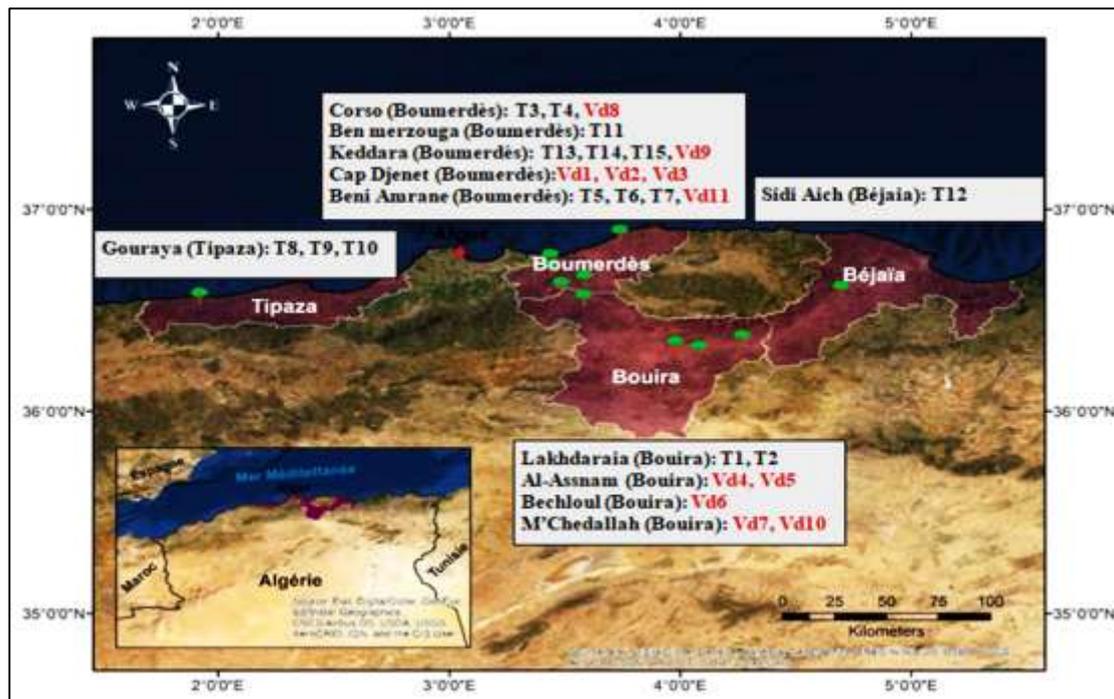


**Figure 23.** Photos originales montrant les différents types de symptômes observés dans les oliveraies prospectées. (A): arbre d'olivier atteint de la verticilliose non défoliante. (B): arbres d'oliviers atteints de la verticilliose vasculaire défoliante. (C): Nécrose partiel à l'extrémité des feuilles desséchées de couleur marron.

### 2.2. Isolement et caractérisation des isolats fongiques

L'isolement a été réalisé à partir de la rhizosphère de l'olivier, plusieurs repiquages successifs sont réalisés suivie par une purification à l'aide de la culture monosporique pour obtenir une culture pure exempté de contaminants. La caractérisation macroscopique et microscopique des moisissures a permis d'identifier 187 isolats fongiques isolés dont 20 souches fongiques appartenant au genre *Trichoderma* spp., ces isolats de *Trichoderma* spp. proviennent des sols rhizosphériques prélevés des vergers sains des quatre régions prospectées. Le pourcentage d'abondance des isolats de *Trichoderma* spp. varié d'une région à une autre: 9 isolats de *Trichoderma* spp. ont été isolés à partir des sols rhizosphériques issus de la

région de Boumerdes, soit 4,81% de la collection obtenue, 6 isolats provient de la région de Bouira, soit 3.20 % et 2.14 % à Tipaza (4 isolats). Par contre, la région de Bejaia ne représente que 0.53% de la collection. Les genres fongiques les plus abondants sont: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Mucor* et *Rhizomucor*. La distribution géographique des isolats fongiques appartenant aux genres recherchés (*Trichoderma* spp. et *Verticillium dahlaie*) sont représentés dans la figure ci-dessous. L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs d'identification de Botton (1990), Samson *et al.* (1981) ainsi que celles de Collier *et al.* (1998).

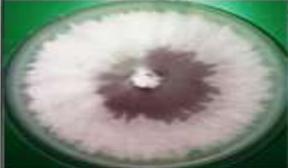


**Figure 24.** Provenance des isolats de *Trichoderma* spp. et *Verticillium dahlaie* isolés à partir des oliveraies prospectées (Photo originale).

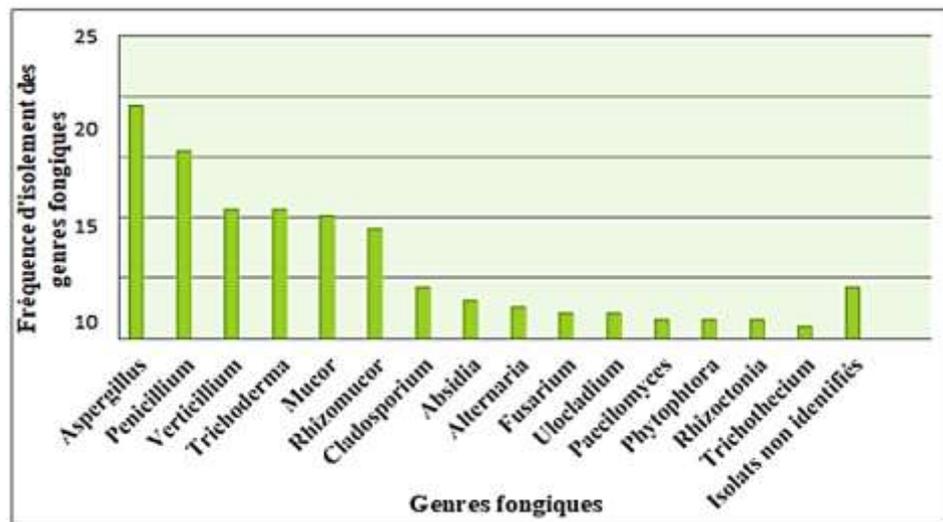
### 2.3. Distribution et abondance relative d'autres champignons telluriques

Les résultats obtenus montrent qu'au total, 187 isolats fongiques provenant des différentes régions oléicoles prospectées ont été identifiés (Tableau 2). L'identification macro et microscopique réalisés nous a permis d'attribuer ces isolats fongiques aux genres suivants: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Absidia*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium* et *Trichothecium roseum*.

**Tableau 2.** Isolats fongiques phytopathogènes isolés de la rhizosphère de l'olivier (Photos originales).

Agents phytopathogènes	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Verticillium sp,</i>		
<i>Cladosporium sp,</i>		
<i>Alternaria sp,</i>		
<i>Trichothecium sp,</i>		
<i>Fusarium sp,</i>		

Le genre *Aspergillus* suivi par le genre *Penicillium* représentent les deux genres dominant dans tous les sites avec une fréquence de 19.25% et 15.50% respectivement, Par contre, le genre *Verticillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Absidia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, *Phytophthora* et *Rhizoctonia* représentent une fréquence de 10.69%, 10.69%, 10.16%, 9.09%, 4.28%, 3.20%, 2.67%, 2.14%, 2.14%, 1.6%, 1.6%, 1.6% respectivement, alors que le genre *Trichothecium* est le moins isolés avec 1,06%. Cependant, 4.33% isolats ne présentent aucune sporulation, ils se caractérisent seulement par la présence d'une structure mycélienne plus ou moins ramifiés, par conséquent, ils n'ont pas été identifiés (Figure 25). La comparaison des résultats entre les quatre régions de prélèvement (Boumerdes, Bouira, Tipaza et Bedjaia), révèle la présence de 5 genres en commun, à savoir: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*.



**Figure 25.** Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des régions oléicoles

Aussi les résultats obtenus montrent que les genres identifiés appartiennent aux embranchements de *Deutéromycètes* (24%), *Ascomycètes* (49%) et *Zygomycètes* (23%). Cependant les autres genres identifiés semblent être moins abondants, ils font partie de l'embranchement de *Basidiomycètes* et d'*Oomycètes*, ils sont de l'ordre (2%) pour chaque embranchement.

## 2.4. Isolement, identification et caractérisation des isolats de *V. dahliae*

### 2.4.1. Isolement de *V. dahliae*

Une collection de 20 isolats fongiques a été isolée et mise en culture sur milieu PDA à partir des branches et rameaux de l'olivier présentant des symptômes caractéristiques de la verticilliose. Le nombre le plus élevé des isolats de *Verticillium* sp. a été isolé à partir de la région de Bouira avec un taux de (60%) M'chedallah (5 isolats), Bechloul (3 isolats), AL-Assnam (2 isolats), Lakhdaria (2 isolats), suivie par la Wilaya de Boumerdes avec un taux d'isolement de (40%) (Keddara, 3 isolats), (Beni Amrane, 1 isolat), (Cap Djenat, 4 isolats), alors que, aucune souche de *V.dahliae* n'a été isolée dans la Wilaya de Tipaza et Béjaia. Les caractéristiques culturales des oliveraies prospectées sont présentées dans l'annexe 1.

### 2.4.2. Purification par la culture monosporique

La collection des isolats fongiques a été purifiée par la technique de culture monosporique réalisée sur milieu minimum Triton X. Des isolats purs issues de la même spore ont été obtenues (Figure 26).



**Figure 26.** Résultats des cultures pures de *Verticillium* sp. obtenus à partir des cultures monosporiques sur le milieu PDA (Photos originales).

### 2.4.3. Identification morphologique des isolats de *Verticillium* sp.

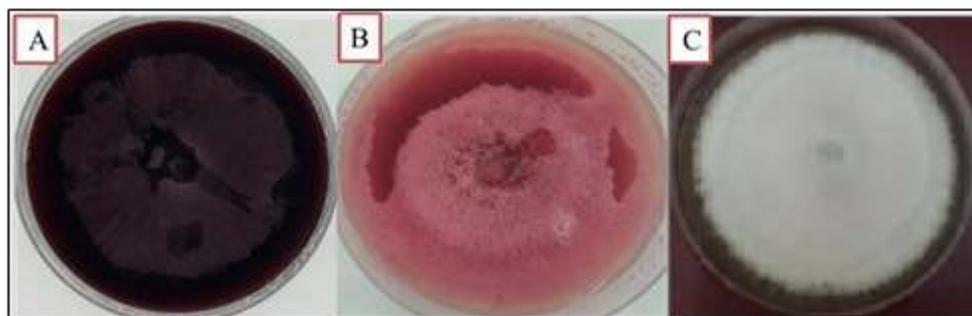
#### 2.4.3.1. Etude macroscopique

Les colonies fongiques mises en culture sur milieu PDA apparaissent blanchâtres avec un mycélium dense plus ou moins cotonneux, après 10 jours d'incubation certains isolats commencent à noircir en raison de production de microsclérotés. Les isolats purifiés ont montré une diversité morphologique sur milieu PDA (Figure 27).

-**Morphotype sauvage:** caractérisé par une production abondante de microsclérotés.

-**Morphotype intermédiaire:** caractérisé par une production moyenne de microsclérotés.

-**Morphotype hyalin:** caractérisé par une perte de production de la mélanine responsable de la pigmentation noire des microsclérotés.

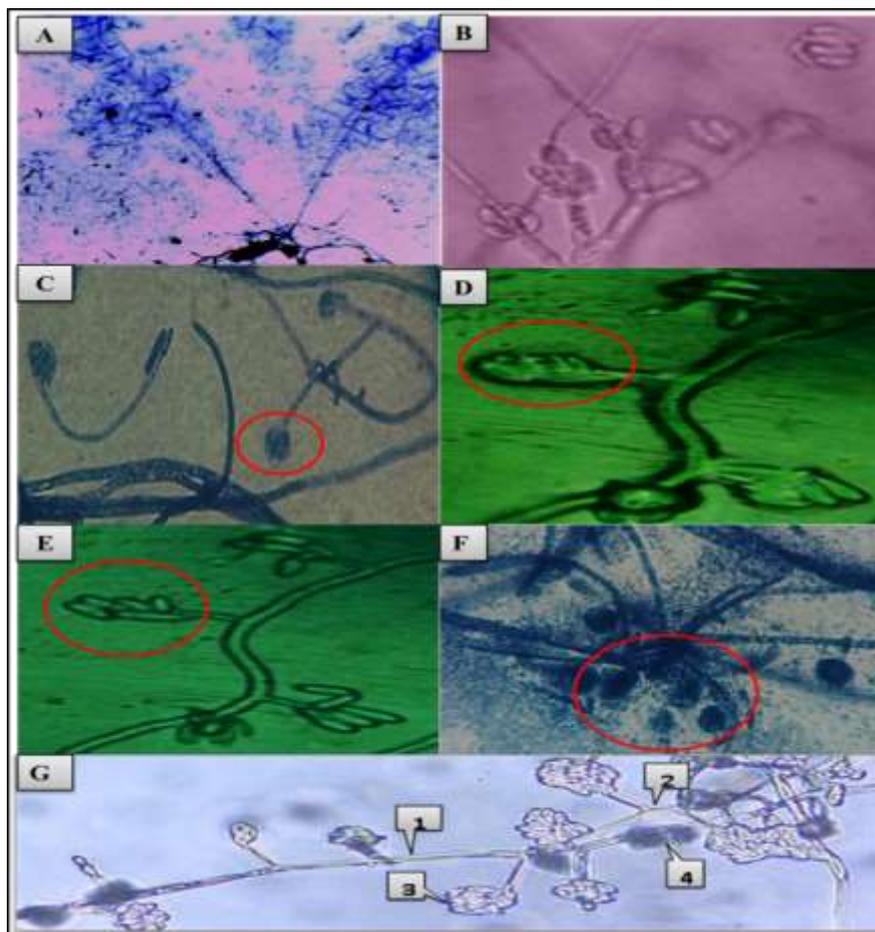


**Figure 27.** Morphotypes de *Verticillium* sp. (Photos originales) (A): Morphotype sauvage, (B): Morphotype intermédiaire, (C): Morphotype hyalin

#### 2.4.3.2. Etude microscopique

Les observations microscopiques ont montré la présence d'hyphes mycéliens ramifiés, des conidiophores portant des phialides verticillées par groupe de trois en forme de V, avec amas de conidies (mucilage) plus ou moins arrondies à leur extrémité. Les conidies sont individualisées ou en amas présentant une forme plus au moins allongée. Nous avons remarqué également la présence des gonflements donnant l'aspect d'un amas de cellule transparent puis brune. Après dix à 15 jours d'incubation, il devient noir, ce qui traduit la

formation des microsclérotos (Figure 28). Cette dernière commence par l'élargissement et le cloisonnement des articles mycéliens aboutissant à une chaîne de cellules rectangulaires dont les parois s'épaississent et s'imprègnent de pigments noirs, c'est dû à une mélanisation. Les cellules se différencient par bourgeonnement de nouvelles cellules d'abord hyalines puis se pigmentent. L'ensemble se transforme progressivement en microsclérotos (Benchaabane *et al.*, 2010). Les mêmes observations ont été rapportées par plusieurs auteurs (Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2010; Loula *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012). Les critères macroscopique et microscopique observés permettent de confirmer que nos souches appartiennent au genre *Verticillium*.

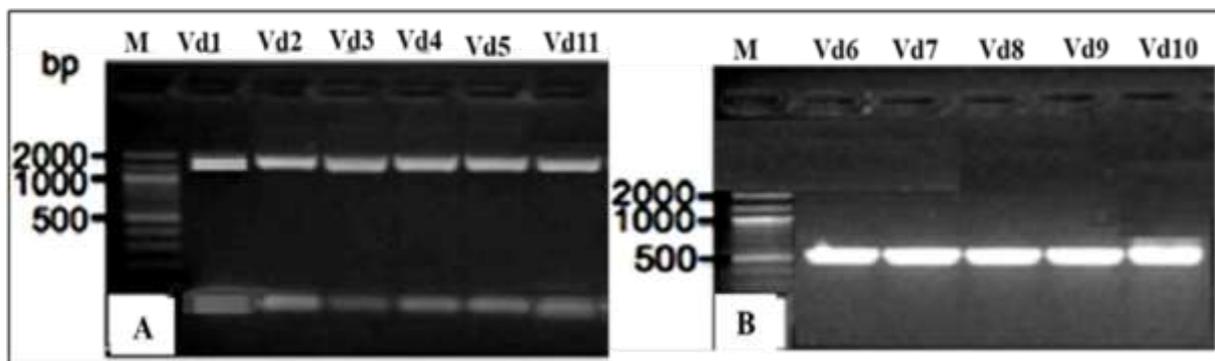


**Figure 28.** Aspect microscopique de *Verticillium* sp. observé sous microscope optique après coloration au bleu de méthylène (Photos originales); (A) des conidiospores portent des phialides verticillées par groupe de trois en forme de V (GX40), (B) phialides verticillés observés au grossissement (GX100), (C et D) phialides portent des masses mucilagineuses à leurs extrémités (GX100), (E) conidies en amas (GX100), (F) formation des microsclérotos et libération de la substance mucilagineuse (GX100), (G) (GX100): 1, conidiophore, 2, phialides verticillés. 3, amas de conidies. 4, microsclérotos.

#### 2.4.4. Identification moléculaire de *Verticillium* spp.

L'identification moléculaire des 11 isolats de *Verticillium* isolées à partir des branches malades de l'olivier présentant des symptômes caractéristiques de dépérissement a confirmé que les 11 isolats appartiennent à l'espèce de *Verticillium dahliae*.

L'identification moléculaire des souches de *Verticillium* spp. nous a permis de les classer en deux grands groupes selon leurs affinités aux amorces d'ADN spécifiques de chaque pathotype testé (Figure 29). L'analyse moléculaire de l'ensemble des souches fongiques isolées confirme leurs appartenances à l'espèce *V. dahliae* puisque elles ont la particularité de se recombiner et de s'amplifier avec les primers spécifiques de cette dernière.



**Figure 29.** Gel d'agarose des amplicons PCR générés avec 2 paires d'amorces spécifiques de *Verticillium dahliae* défoliant et non défoliant (Photos originales). **A:** amplicons générés avec les amorces spécifiques de pathotype non défoliant NDF et NDR. **B:** amplicons générés avec les amorces spécifiques défoliatrices df et dr. **M,** échelle d'ADN 2000 pb utilisé comme marqueur de taille. Les Vd1, Vd2, Vd3, Vd4, Vd5 et Vd11 sont des souches isolées à partir de l'olivier présentant les symptômes du non défoliations. Les souches Vd6, Vd7, Vd8, Vd9 et Vd10 sont isolées à partir de l'olivier présentant les symptômes de la défoliation.

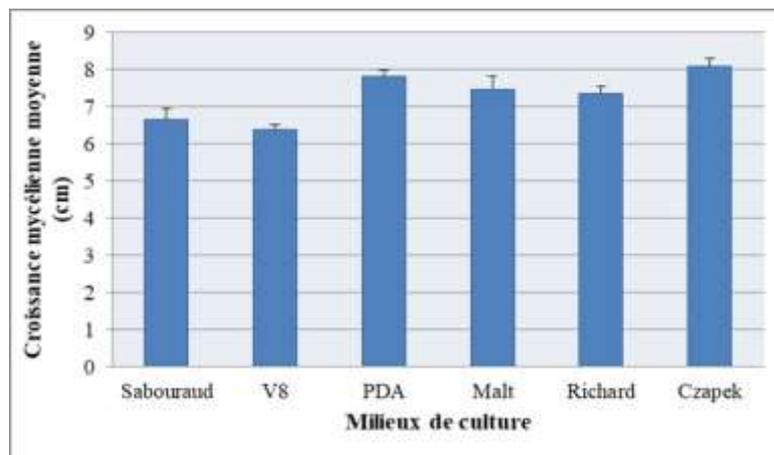
#### 2.5. Influence de quelques facteurs physiologiques sur la croissance mycélienne de *V. dahliae*

Le choix des milieux de culture ainsi que les valeurs de différents paramètres physiologiques testés s'est basé sur l'étude de Boutkhil, (2017) qui a montré que les souches de *V. dahliae* se développent mieux sur les gammes des paramètres physiologiques testés dans notre étude.

##### 2.5.1 Influence du milieu de culture

Les résultats présentés au niveau du tableau 3 (Annexe 3) et de la figure 30 montrent que la croissance des isolats de *V. dahliae* testées diffère d'un milieu à un autre. Le milieu PDA et Malt semblent être les deux milieux organiques les plus favorables à la croissance de la majorité des isolats de *V. dahliae* dont la croissance radiale moyenne est de 7.82cm et 7.48cm respectivement après 7 jours d'incubation. Cependant, la croissance des isolats de *V. dahliae* sur milieu Sabouraud est relativement lente dont le diamètre de la croissance radiale moyenne est de 6.66 cm.

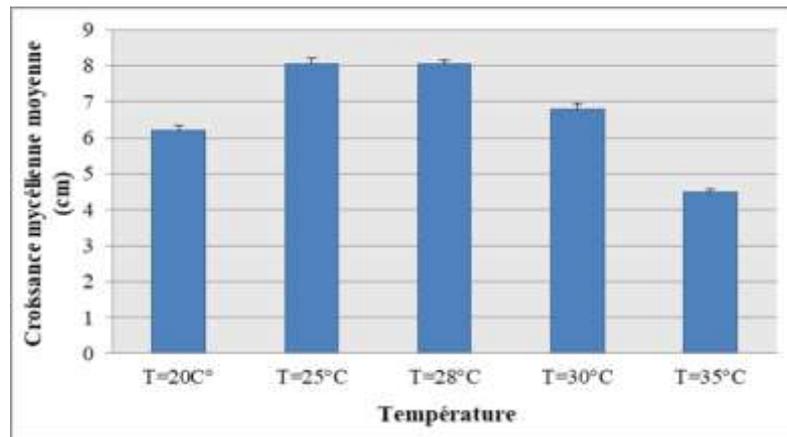
Cependant, les isolats de *V. dahliae* se développent mieux sur le milieu minéral Czapek comparativement au milieu minéral Richard. En comparant la croissance aérienne et radiale sur les milieux organiques et minéraux, on constate que les deux milieux PDA et Malt sont plus favorable à la croissance des isolats de *V. dahliae* par rapport aux autres milieux testés. Le test Fisher montre que la croissance radiale des isolats de *V. dahliae* diffère significativement entre les milieux de culture testés ( $p < 0,05$ ).



**Figure 30.** Influence des milieux de culture sur la croissance mycélienne moyenne des souches de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation.

### 2.5.2. Influence de la température

Les valeurs des mensurations des diamètres des colonies de *V. dahliae* en fonction des températures d'incubations sont présentées dans le tableau 4 (Annexe 3) et figure 31. L'optimum de croissance mycélienne est situé à 25°C, à cette température, la croissance mycélienne moyenne est de 8.06 cm après 7 jours d'incubation. Au-delà de 30°C, nous avons observé un ralentissement de la croissance mycélienne où la croissance radiale moyenne ne dépasse pas 6.8 cm pour l'ensemble des isolats de *V. dahliae* testés. Cependant, les isolats se développent bien sur le milieu de culture et une croissance radiale moyenne de 8.06 et 8.04 cm a été obtenue à 25°C et 28°C respectivement. Suite à ce test, on constate que la température de 25°C est la température optimale pour l'ensemble des isolats de *V. dahliae*. L'analyse de variance montre une différence significatives entre la croissance mycélienne des isolats testés ( $p < 0,05$ ).

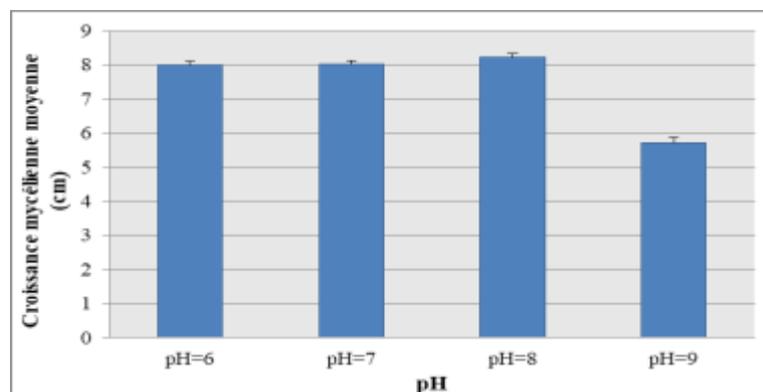


**Figure 31.** Influence de la température sur la croissance mycélienne moyenne des souches de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation.

### 2.5.3. Influence du pH

Le tableau 5 (Annexe3) et la figure 32, indiquent les valeurs des mensurations des diamètres des colonies de *V. dahliae* en fonction des pH de milieu. Les résultats obtenus montrent que les isolats de *V. dahliae* ne tolèrent pas un pH fortement acide ou basique. Elles se développent bien sur un milieu légèrement basique (pH égal 8), avec une croissance mycélienne moyenne de 8,24.

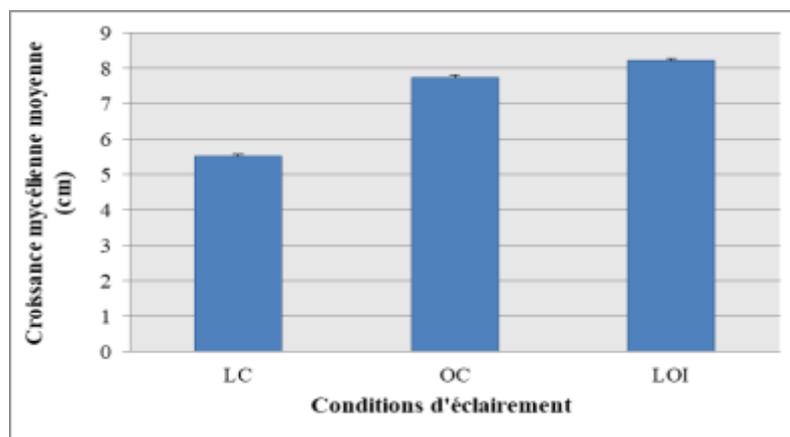
Par ailleurs, le diamètre de la croissance tend à diminuer à un pH neutre ou légèrement acide, la croissance radiale moyenne à un pH 6 et 7 est de 8cm et 8.02cm respectivement. Ces résultats nous laissent supposer que la croissance optimale des isolats de *V. dahliae* est meilleure à un pH neutre à alcalin. L'analyse de la variance par le test Fisher montre une différence significative entre les croissances radiales de l'ensemble des souches étudiées pour les différents pH testés ( $p < 0,05$ ). La présence d'une interaction significative montre que la croissance mycélienne des champignons est affectée par le pH.



**Figure 32.** Influence du pH sur la croissance mycélienne moyenne des souches de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation.

#### 2.5.4. Influence de la lumière

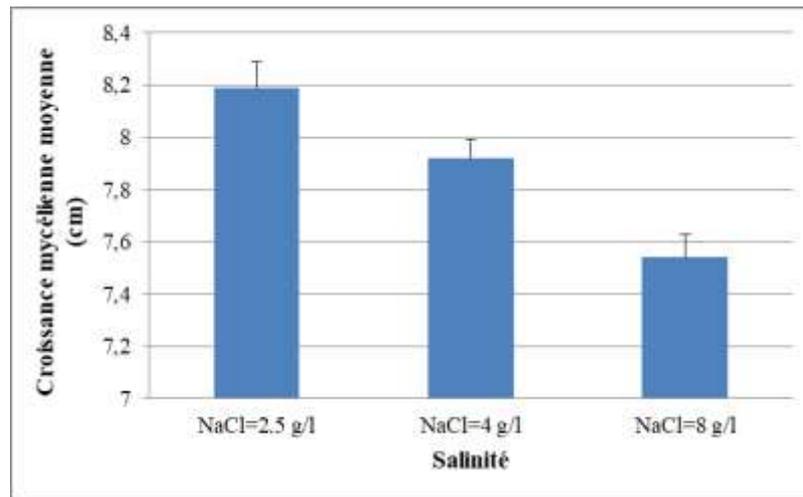
Les résultats présentés dans le tableau 6 (Annexe 3) et la figure 33 montrent que la lumière influence la croissance des souches de *V. dahliae*. La croissance mycélienne est largement importante quand les isolats de *V.dahliae* sont soumise à un cycle alternatif de lumière et d'obscurité (12h de lumière /12h d'obscurité). Une croissance radiale moyenne de 8,23cm est enregistrée dans un cycle alternatif de lumière et d'obscurité après 7 jours d'incubation. Alors qu'en obscurité et en lumière continue, la croissance radiale moyenne ne dépasse pas 7.75cm, Les résultats obtenus montrent que l'alternance de la lumière-obscurité favorise mieux la croissance mycélienne et la sporulation des isolats testés (Figure 33),



**Figure 33.** Influence des conditions d'éclairage sur la croissance mycélienne moyenne des souches de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation.

#### 2.5.5. Influence de la salinité

L'influence de la salinité sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* est clairement élucidée dans cette étude (Tableau7 en Annexe 3) et la figure 34. Les résultats obtenus montrent que la concentration 2,5 g/l en NaCl apparait la concentration optimale de la croissance mycélienne pour la majorité des isolats testés. A cette concentration, 9 isolats ont atteint un diamètre de croissance radial supérieur à 8cm après le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation. Cependant, les isolats testés à la concentration 4 et 8 g/l de NaCl présentent une diminution relative de la vitesse de croissance par rapport à la concentration 2,5 g/l. L'analyse de variance par le test Fisher ne révèle aucune différence significative entre les croissances radiales de l'ensemble des souches étudiées pour les trois valeurs de salinité testées ( $p > 0,05$ ).



**Figure 34.** Influence de la salinité sur la croissance mycélienne moyenne des souches de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation.

## 2.6. Caractérisation et identification des isolats de *Trichoderma* spp.

### 2.6.1. Caractérisation culturelle des isolats de *Trichoderma* spp.

Dans l'ensemble des essais réalisés, la vitesse de croissance et la croissance aérienne des isolats de *Trichoderma* spp. sont plus ou moins différents, trois groupes sont distingués; le premier groupe se caractérise par une croissance importante et rapide, c'est le cas des isolats T1, T2, T3 et T9. Le deuxième groupe se caractérise par une croissance moyenne avec un rythme de croissance relativement moyen, il s'agit de T4, T5, T6, T7, T8, T10, T11, T12, T13 et T14. Alors que la plus faible croissance est notée par le troisième groupe représenté par l'isolat T15.

L'observation des caractères morphologiques des isolats a révélé une hétérogénéité au sein de ce genre, trois morphotypes sont distingués; colonie verte avec mycélium aérien blanc et une croissance mycélienne relativement dense, colonies de couleur vertes observé après sporulation (forte pigmentation), colonies de couleur vertes à jaunes après sporulation. Les colonies sont floconneuses, en touffes ou cotonneuses. La couleur des colonies varie du vert foncé à jaunâtre. Sept isolats de *Trichoderma* spp, se développent de façon cyclique sous forme de cercles concentriques réguliers sur le milieu PDA, c'est le cas des isolats T4, T6, T9, T10, T12, T14 et T15.

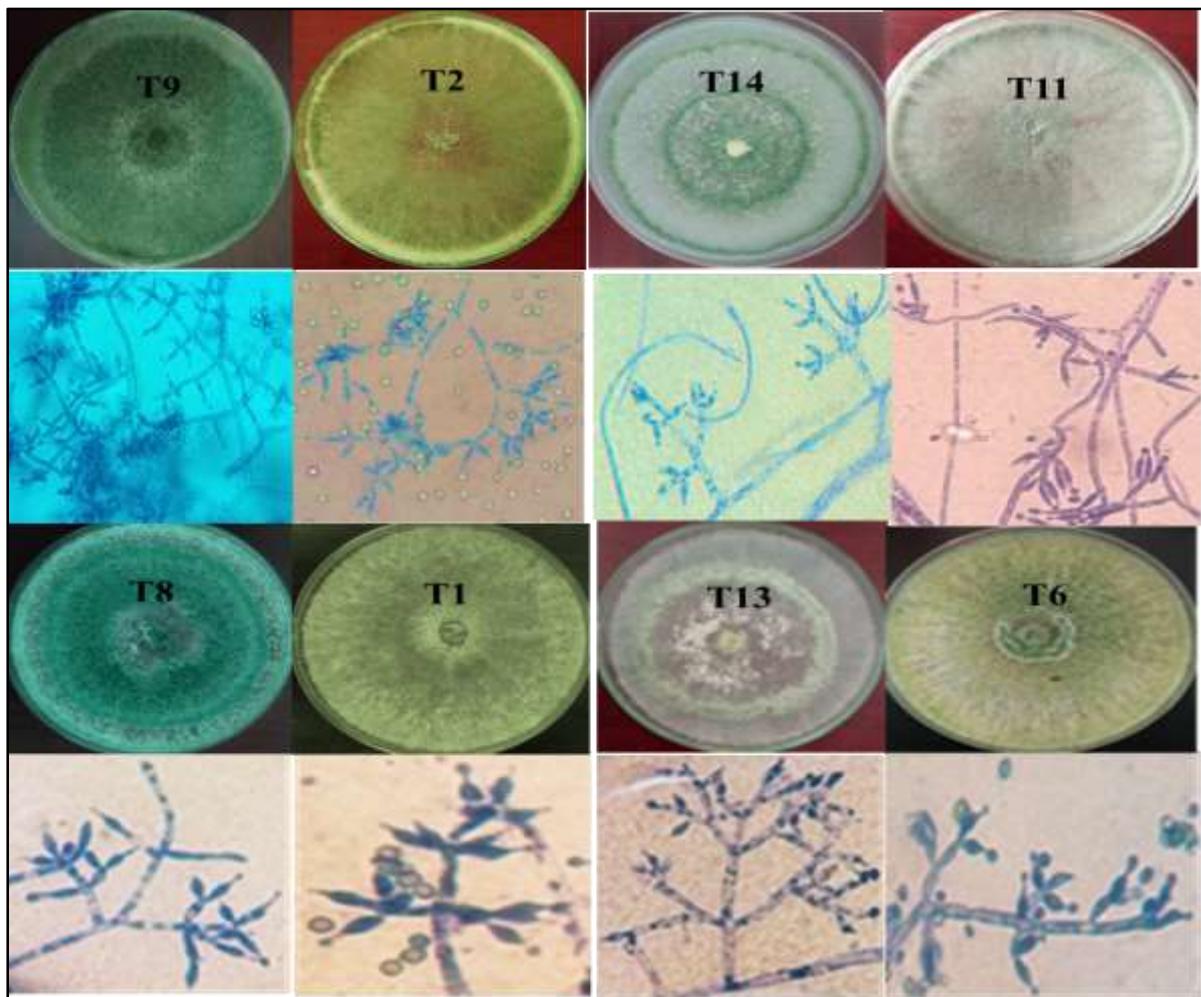
### 2.6.2. Caractérisations microscopique et biométrique des isolats de *Trichoderma* spp.

La caractérisation biométrique par la mesure des dimensions de différentes structures des espèces de *Trichoderma* spp. montre que les valeurs varient d'une souche à une autre. Le tableau 3 présente les dimensions des phialides et des conidies de chaque espèce de *Trichoderma* spp. L'appartenance des isolats au genre *Trichoderma* spp. a été confirmé par des critères microscopiques. Nous avons observé un mycélium constitué d'hyphes ramifiés à parois lisses et hyalines, portant des conidiophores de forme conique ou pyramidale ainsi que des phialides en forme de quilles ou de flasques, spécifique du genre *Trichoderma* spp. Les phialides portent à leur extrémité des phialospores de forme ovoïde ou ellipsoïdale. Cependant des différences morphologiques macroscopiques et microscopiques permis d'affilier les isolats de *Trichoderma* spp. vers leurs espèces.

Les isolats identifiés comme étant des espèces de *T. harzianum* présentent des touffes de couleur vert foncé, mais aucun anneau concentrique n'a été observé. Leur production conidienne est limitée au centre des colonies, diffusées, et semblaient être de couleur vert jaunâtre. Les conidiophores se caractérisent par une ramification et une verticilliation fréquentes. Les phialides sont ampulliformes et convergents.

Les conidies sont de forme subglobale à obovoïde. La formation de chlamydospore est en position terminale et intercalaire. D'autres isolats ont été identifiés comme étant des *T. aureoviride* sur la base des caractères suivants: la colonie présente des touffes ou pustules vert terne, les conidiophores sont ramifiés fréquemment et ils ont une structure pyramidale, les phialides sont lageniforme et divergente, la forme des conidies est obovide. Les chlamydospores sont fréquentes et se forment en position terminale et intercalaire. Cependant, les espèces de *T. koningii* présentent une colonie vert terne à vert bleuté, des conidiophores larges ou étroits, une ramification verticillée fréquente, les phialides sont lageniformes ou ampulliformes et sont plus allongées à l'extrémité. Les conidies sont subcylindrique à ellipsoïde étroite, des chlamydospores fréquentes produite en position intercalaire et terminale. De plus, d'autres isolats sont identifiés comme étant des espèces de *T. longibrachiatum*, ces espèces ont révélé la présence de colonies présentant une croissance rapide, des chlamydospores ont été observées, les conidiophores sont peu ramifiés, les branches primaires sont longues et les branches secondaires sont généralement courtes et rarement rebranchées, les phialides sont principalement solitaires, ampulliformes à lageniformes ou cylindriques et les conidies sont unicellulaires, vertes et ellipsoïdes à obovoïdes.

L'identification microscopique a permis de subdiviser les isolats de *Trichoderma* spp. en quatre espèces, à savoir *T. harzianum* (T4, T5, T7, T8, T9, T10 et T12), *T. aureoviride* (T1, T2 et T3), *T. koninji* (T13, T14 et T15) et *T. longibrachiatum* (T6 et T11) (Figure 35). L'abondance et la région d'isolement des espèces de *Trichoderma* spp. sont comme suit : *T. harzianum* représente l'espèce la plus prédominante avec sept isolats isolées dans la région de Boumerdes (Beni Amrane et Corso); Tipaza (Gouraya) et Bejaia (Sidi Aich). Cependant, *T. aureoviride* est représenté par trois isolats isolés à Bouira (Lakhdaraia) et à Boumerdes (Corso). *T. koninji* est représenté par trois isolats collectés à Boumerdes (Keddara), tandis que l'espèce *T. longibrachiatum* n'est représentée que par deux isolats collectés à Boumerdes (Beni Amrane et Ben merzouga). Le tableau 3 résume les différents caractères des espèces de *Trichoderma* spp. isolées.



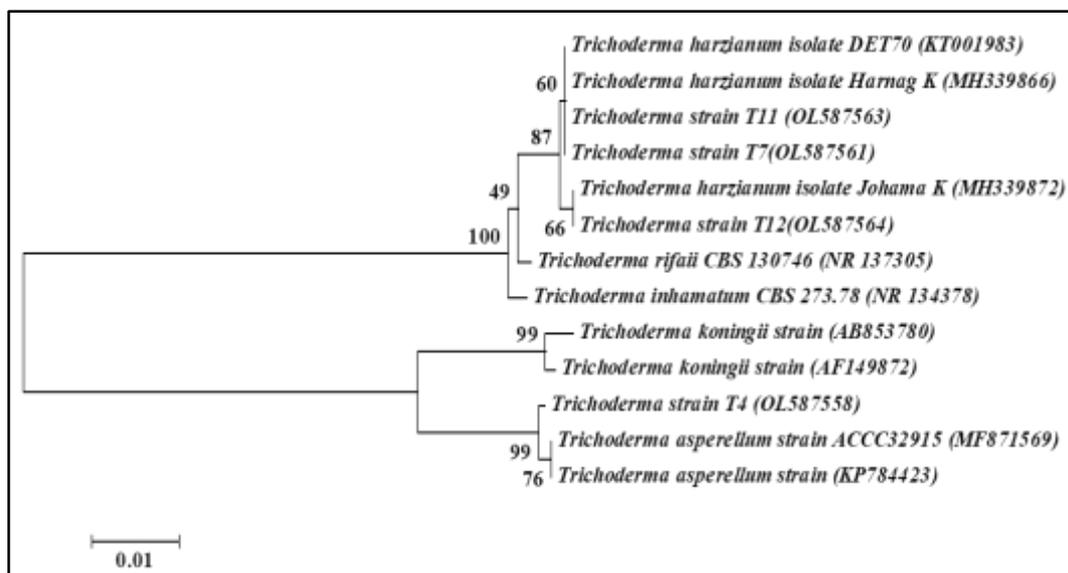
**Figure 35.** Aspects macroscopique et microscopique de quelques souches de *Trichoderma* spp. (Photos originales) (GX100): *T. harzianum* : T8 et T9. *T. aureoviride*: T1 et T2. *T. koninji* : T13 et T14. *T. longibrachiatum*: T6 et T11.

Tableau 3. Caractérisation morphologique et microscopique des isolats de *Trichoderma* spp.

Isolat (T)	Morphologie et couleur des colonies	Forme des phialides	Phialides ( $\mu\text{m}$ ) (Longueur et largeur)	Rayon et périmètre des conidies	Forme des conidies	Formation des chlamydozoospores	Identificatif probable
T1	-Couleur vert terne - Rugueux, spongieux et en relief	Lageniforme	82.43 $\pm$ 6.40 $\mu\text{m}$ 32.96 $\pm$ 1.77 $\mu\text{m}$	18 $\pm$ 0,0 $\mu\text{m}$ 113.1 $\pm$ 0 $\mu\text{m}$	Globose	Terminal et intercalaire	<i>T. aureoviride</i>
T2	- Couleur vert terne - Rugueux, spongieux et en relief	Ampulliforme	260.8 $\pm$ 61,05 $\mu\text{m}$ 27.96 $\pm$ 3,44 $\mu\text{m}$	20 $\pm$ 1,73 $\mu\text{m}$ 125.66 $\pm$ 10,85 $\mu\text{m}$	Globose	Terminal et intercalaire	<i>T. aureoviride</i>
T3	-Couleur vert olive -Lisse et plat - Aspect poudreux	Lageniforme	427.46 $\pm$ 89,86 $\mu\text{m}$ 37.06 $\pm$ 9,11 $\mu\text{m}$	19.66 $\pm$ 2,51 $\mu\text{m}$ 123.56 $\pm$ 15,8 $\mu\text{m}$	Globose à ellipsoïdal	Terminal et intercalaire	<i>T. aureoviride</i>
T4	-Vert à vert foncé - spongieux et surélevé -Aspect granuleux	Lageniforme	138.33 $\pm$ 20,14 $\mu\text{m}$ 45.7 $\pm$ 4,97 $\mu\text{m}$	21.66 $\pm$ 3,21 $\mu\text{m}$ 136.13 $\pm$ 20,19 $\mu\text{m}$	Subglobose à ellipsoïdal	Terminal	<i>T. harzianum</i>
T5	-Vert à vert foncé - Aspect granuleux, plus ou moins spongieux	Ampulliforme	198,6 $\pm$ 10,56 $\mu\text{m}$ 40,53 $\pm$ 1,62 $\mu\text{m}$	22,33 $\pm$ 1,52 $\mu\text{m}$ 140,25 $\pm$ 9,59 $\mu\text{m}$	Obovoïde	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T6	-Vert à vert foncé Aspect granuleux. - spongieux avec mycélium aérien blanc.	Ampulliforme	135.53 $\pm$ 25,18 $\mu\text{m}$ 33.06 $\pm$ 0,80 $\mu\text{m}$	22 $\pm$ 2,0 $\mu\text{m}$ 138.23 $\pm$ 12.55 $\mu\text{m}$	Subglobose à ellipsoïdal	Terminal et intercalaire	<i>T. longibrachiatum</i>
T7	-couleur jaune à verte - Lisse et plat	Lageniforme	123.93 $\pm$ 14,16 $\mu\text{m}$ 32.6 $\pm$ 1,90 $\mu\text{m}$	18.66 $\pm$ 1,15 $\mu\text{m}$ 117.3 $\pm$ 7,27 $\mu\text{m}$	Subglobose	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T8	-Vert à vert foncé -Spongieux avec un aspect granuleux	Lageniforme	229,06 $\pm$ 64,67 $\mu\text{m}$ 31.6 $\pm$ 2,55 $\mu\text{m}$	22.33 $\pm$ 1,1 $\mu\text{m}$ 140.3 $\pm$ 7,27 $\mu\text{m}$	Subglobose	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T9	- Vert à vert foncé - Aspect granuleux plus ou moins spongieux	Lageniforme	164.2 $\pm$ 6,71 $\mu\text{m}$ 32.96 $\pm$ 3,76 $\mu\text{m}$	19.33 $\pm$ 4,16 $\mu\text{m}$ 122.96 $\pm$ 24,44 $\mu\text{m}$	Subglobose	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T10	-Vert à vert foncé - Rugueux, spongieux et en relief	Lageniforme	113.63 $\pm$ 6,36 $\mu\text{m}$ 36 $\pm$ 1,40 $\mu\text{m}$	18+21+24=21 $\pm$ 3 $\mu\text{m}$ 131.93 $\pm$ 18,85 $\mu\text{m}$	Sub cylindrique	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T11	-Couleur verte terne - Lisse et plat	Lageniforme	104.66 $\pm$ 5,03 $\mu\text{m}$ 29.13 $\pm$ 6,65 $\mu\text{m}$	12.66 $\pm$ 1,15 $\mu\text{m}$ 79.6 $\pm$ 7,27 $\mu\text{m}$	Sub cylindrique à ellipsoïdal étroit	Terminal et intercalaire	<i>T. longibrachiatum</i>
T12	-Couleur verte à vert foncé -Aspect granuleux. - Mycélium aérien blanc	Ampulliforme	88.4 $\pm$ 19,97 $\mu\text{m}$ 51.33 $\pm$ 1,82 $\mu\text{m}$	23 $\pm$ 2 $\mu\text{m}$ 144.5 $\pm$ 12,6 $\mu\text{m}$	Sub globose à obovoïde	Terminal et intercalaire	<i>T. harzianum</i>
T13	-Couleur verte terne. -Aspect granuleux.	Ampulliforme	108.4 $\pm$ 26,22 $\mu\text{m}$ 33.8 $\pm$ 1,77 $\mu\text{m}$	15.33 $\pm$ 2,08 $\mu\text{m}$ 96.33 $\pm$ 13,05 $\mu\text{m}$	Obovoïde	Terminal et intercalaire	<i>T. koninji</i>
T14	-Couleur jaune à vert olive -Aspect granuleux et plat.	Ampulliforme	126.46 $\pm$ 29,27 $\mu\text{m}$ 34.9 $\pm$ 4,03 $\mu\text{m}$	17.33 $\pm$ 1,15 $\mu\text{m}$ 111 $\pm$ 9,62 $\mu\text{m}$	Sub globose	Terminal et intercalaire	<i>T. koninji</i>
T15	-Couleur verte terne. -Aspect granuleux. - Colonie avec une zone mycélienne blanche entourée d'un anneau concentrique granuleux.	Lageniforme	157.16 $\pm$ 13,77 $\mu\text{m}$ 34.33 $\pm$ 2,71 $\mu\text{m}$	18 $\pm$ 0,0 $\mu\text{m}$ 113.1 $\pm$ 0 $\mu\text{m}$	Globose	Terminal et intercalaire	<i>T. koninji</i>

### 2.6.3. Caractérisation moléculaire des souches de *Trichoderma* spp. les plus performantes *in vitro*

Les trois souches T7, T12 et T14 qui ont donnée une meilleure réduction de la croissance mycélienne *in vitro* par les trois modes d'action testés ont fait l'objet d'une identification moléculaire. Les regroupements des séquences produites avec celles des espèces connues ont permis l'identification de 4 souches de *Trichoderma* spp. Leur séquençage a permis la construction d'un dendrogramme basé sur la méthode de neighbour-joining. Sur les quinze souches isolées et identifiées selon leurs caractères phénotypiques, quatre souches de *Trichoderma* spp. ont fait l'objet de cette étude à savoir la T4, T7, T11 et T12. L'amplification de la région ITS a donné une bande unique d'environ 600 paires de bases (pb) pour les trois isolats de *Trichoderma* spp. Le séquençage de la région ITS de l'isolat T4 a montré une grande similarité (99%) avec les séquences de références de *Trichoderma asperellum* (Figure 36). Les isolats T7, T11 et T12 ont présenté des séquences ITS avec des pourcentages de similarité respectifs de 60%, 60% et 66 % respectivement avec les séquences de référence de *T. harzianum* (Figure 36). En se basant sur l'ensemble des caractères de similarité des séquences ITS par rapport aux isolats de références, nous pouvons constater que les isolats T7, T11 et T12 appartenait au complexe d'espèce de *T. harzianum*. Cependant, l'isolat T14 a été attribué à l'espèce *T. asperellum*.



**Figure 36.** Arbre phylogénétique basé sur une comparaison de la séquence de l'ADNr de la souche T4 (OL587558), T7 (OL587561), T11(OL587563) et T12 (OL587564) avec certaines souches phylogénétiquement proches (souches validement publiées). Les nombres sur l'arbre indiquent les pourcentages des dérivés de réplifications.

### 2.6.4. Caractérisation physiologique

Le choix des milieux de culture ainsi que les valeurs de différents paramètres physiologiques testés s'est basé sur l'étude de Dendouga *et al.* (2017) qui ont montré que les souches de *Trichoderma* spp. se développent mieux sur les gammes des paramètres physiologiques testés dans notre étude.

#### 2.6.4.1. Influence des milieux de culture

Les résultats de l'effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne sont présentés dans le tableau 4. Ils ont révélés une différence de la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp. sur les milieux testés. En effet, la croissance mycélienne et la sporulation des *Trichoderma* spp. se sont avérées beaucoup plus importante sur les milieux organiques. La meilleure croissance mycélienne est obtenue sur les deux milieux de culture organiques PDA et OGA dont le diamètre des colonies est de 85mm après 3 jours d'incubation à 28°C. De plus, une croissance aérienne et une sporulation abondante sont observées sur ces deux milieux, cependant, un aspect duveteux des colonies et une croissance radiale relativement faible sont observés sur le milieu minéral Czapeck, en plus d'une faible sporulation qui n'apparaît qu'après 5 jours d'incubation. La croissance mycélienne sur ce milieu est lâche et comprise entre 50mm et 69mm après 3 jours d'incubation. L'analyse de variance par le test Fisher montre que la croissance radiale des isolats de *Trichoderma* spp. diffère significativement entre les milieux de culture testés ( $p < 0,05$ ).

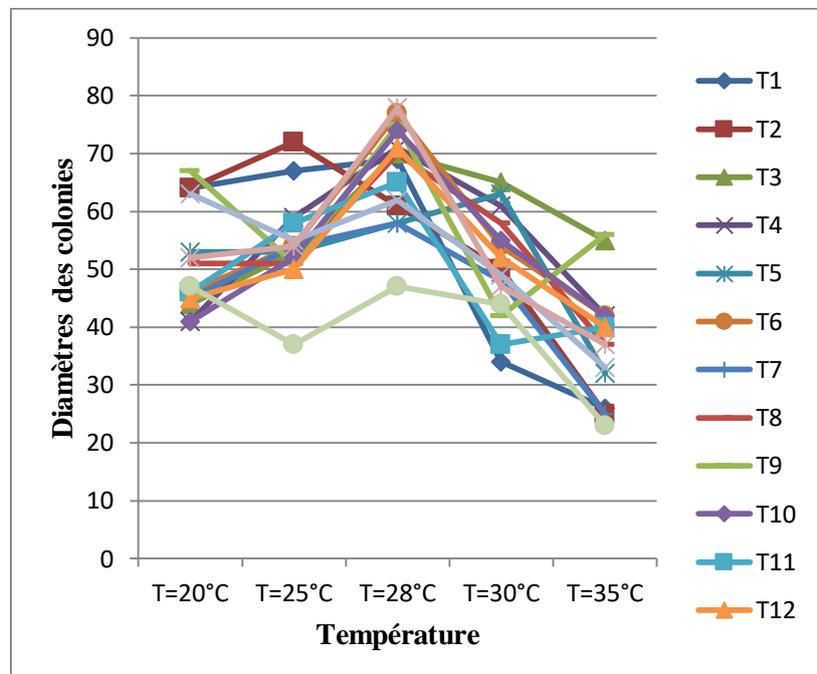
**Tableau 4:** Effet de milieu de culture sur la croissance mycélienne (mm) des souches de *Trichoderma* spp. après deux jours d'incubation

Souches	PDA	Sabouraud	OGA	Waksman	Czapek
T1	61,66±1.52	35,33±1.52	36,33±1,52	35,66±2,51	43,33±3,51
T2	61,33±3.51	40,33±2.51	50,66±3,05	59,66±1,52	42,66±1,52
T3	51,33±1.52	55,33±2.51	47,33±2,51	59,66±2,51	33±2
T4	53,66±3.05	71±2	58,33±2,51	49,33±0,57	32,33±2,51
T5	55,33±1.52	65±3	55,33±2,51	46,66±2,51	28,33±2,51
T6	56±1.73	70,66±1,52	61,66±2,08	50,33±1,52	36,33±4,04
T7	57,33±2.51	53,66±1,15	58,66±1,15	47,66±2,51	36,33±4,04
T8	57,66±2.51	69,33±3,05	52±2	51,66±0,57	33,66±1,52
T9	71±3	55,33±4,5	66,33±1,52	67±2	32,66±2,51
T10	51,33±1.15	71,33±1,52	57,66±2,08	53,66±2,08	34,66±1,52
T11	47,66±2.08	74,33±3,05	61,33±1,52	55,66±2,08	37±2,64
T12	58,66±2.51	58,66±1,15	53±2	57,33±3,05	30±2,64
T13	47,33±2.51	81,33±1,52	30,66±1,15	68±1	35,66±1,15
T14	61,66±2.08	81,33±2,30	61±3	53,33±2,51	29,33±1,15
T15	36±1	52,33±1,52	51,66±2,08	32,33±1,52	33,33±1,52

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm ±les écarts-types.

### 2.6.4.2. Influence de la température

Les résultats de l'effet de la température révèlent que la température affecte la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp. testés qui se développent bien à une gamme de températures allant de 25 à 30°C (Figure 37). Selon ce test de température, tous les isolats de *Trichoderma* spp. sont mésophiles avec une croissance optimale à 28°C. Au-delà de 30°C, la croissance mycélienne ralentit de plus en plus. A 35°C, une croissance limitée a été enregistrée pour tous les isolats de *Trichoderma* spp. à l'exception de l'isolat T3 et T9 qui ont enregistré une croissance mycélienne moyenne de 74.33mm et 85mm respectivement après 3 jours d'incubation. A cette température, les colonies apparaissent plus compactes, plates (absence de mycélium aérien) et moins cotonneuses. L'analyse de la variance montre une différence significative entre la croissance mycélienne des isolats testés ( $p < 0,05$ ).



**Figure 37.** Effet de la température sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de *Trichoderma* après deux jours d'incubation

### 2.6.4.3. Influence du pH

La croissance mycélienne a été évaluée sur milieu PDA ajustés à des valeurs de pH variable. Les résultats obtenus montrent que le pH a un effet sur la croissance des isolats de *Trichoderma* spp. Les isolats testés ont une sporulation et une croissance optimale à des valeurs de pH compris entre 4 et 6. Tous les isolats ont une tendance à bien pousser au pH acide (4 et 5). Cependant, les isolats de *Trichoderma* spp. testés se développent mieux à un pH=5 où la sporulation et la croissance aérienne sont importantes.

Alors que ces dernières diminuent relativement à un pH=4. Par ailleurs, la croissance mycélienne a été réduite considérablement à un pH neutre ou légèrement alcalin (pH 7 et 8). À un pH=7, seulement huit isolats de *Trichoderma* (T1, T2, T4, T7, T10, T12, T14 et T15) parmi les 15 testés atteignent un diamètre de 85mm après 6 jours d'incubation. L'analyse de la variance par le test de Fisher montre une différence significative entre les croissances radiales de l'ensemble de souches testées ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 5.** Effet du pH sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de *Trichoderma* spp. après deux jours d'incubation.

Souches	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
T1	74,33±3,05	40.33±4.16	21,66±2,08	39±4	20,66±1,15
T2	70±5	54.66±7.09	31±1,73	23±2	21,66±0,57
T3	48,33±2,88	61±2	26,66±3,51	21,66±2,51	23,66±2,51
T4	63,66±6,35	64.66±2.08	48,66±1,52	31,33±2,08	15,66±1,52
T5	57,66±2,51	48±2	32,33±2,08	13±1	13,33±1,52
T6	69,33±3,78	59.33±1.52	50,66±2,51	21,33±1,52	16,66±0,57
T7	69±6	58.66±1.52	29±1	26±1,73	12±1
T8	66±3	53.66±3.51	46±3,6	13±1	18,33±1,15
T9	46±4	41.33±4.04	23,33±1,52	11,66±0,57	20,33±0,57
T10	66,33±7,76	57±6.24	49±2	26,33±3,05	17±2
T11	58,66±3,21	46±5.56	23,66±4,04	14,33±2,08	17,33±1,15
T12	49,33±1,15	54.66±9.86	53,66±2,51	33,33±2,08	18±1,73
T13	64±8,71	45.66±3.51	14,33±1,52	42,33±1,15	18,33±0,57
T14	65±6,24	35.33±4.04	22,33±5,03	25,66±1,15	20±1
T15	68±2	53.33±1.52	18,33±2,51	32,66±2,51	15,33±1,52

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm ± les écarts-types

#### 2.6.4.4. Influence de la salinité

La croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp. est affectée aussi par les concentrations du chlorure de sodium ajouté au milieu PDA. Les isolats testés montrent une bonne croissance en absence du sel, leur développement semble affecté par l'augmentation des concentrations en NaCl. À la concentration 0.5M en NaCl, la croissance radiale ralentit et la majorité des isolats de *Trichoderma* spp. semble être moins tolérants à cette concentration.

A une concentration égale ou supérieure à 0.85M en NaCl, on a observé l'absence de germination des spores chez la majorité des isolats de *Trichoderma* spp. Une croissance faible à nulle est obtenue à la concentration 1M de NaCl dont le diamètre de la croissance radiale ne dépasse pas 20mm après 3 jrs d'incubation. L'analyse de variance par le test de Fisher a révélé une différence significative entre les croissances radiales de l'ensemble des souches étudiées pour les trois valeurs de salinité testées ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 6.** Effet de la salinité sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de *Trichoderma* spp. après deux jours d'incubation.

Souches	NaCl=0.125M	NaCl=0.5M	NaCl=0.85M	NaCl=1M
T1	60.66±9.29	23±1	21±2	6±0
T2	68.33±7.23	28,33±2,08	25±2	6±0
T3	47.66±2.51	27±1	21±1,73	6±0
T4	59.66±1.52	34±1	29,66±3,51	6±0
T5	51.33±8.14	14,33±1,52	10,66±0,57	7,66±0,57
T6	62.33±2.51	36,66±1,52	32±2	6±0
T7	52.33±2.51	18,66±3,21	16,33±3,05	10,66±1,52
T8	60.33±2.08	34±1,73	32±3	8,66±0,57
T9	59.33±5.13	19±4,35	17±2	6±0
T10	57.66±2.51	38,33±3,51	31±1	6±0
T11	66.33±7.57	19,33±0,57	15,66±1,52	6±0
T12	63.66±1.52	33,33±1,52	30,33±1,52	6±0
T13	60.33±2.51	23±1,73	15,66±1,52	9±1
T14	66.66±6.50	11,33±1,15	9,33±0,57	8 ±0
T15	37±7.54	23,33±0,57	16,33±1,52	6±0

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm ± les écarts-types.

**2.7. Activité antifongique *in vitro* de *Trichoderma* spp.**

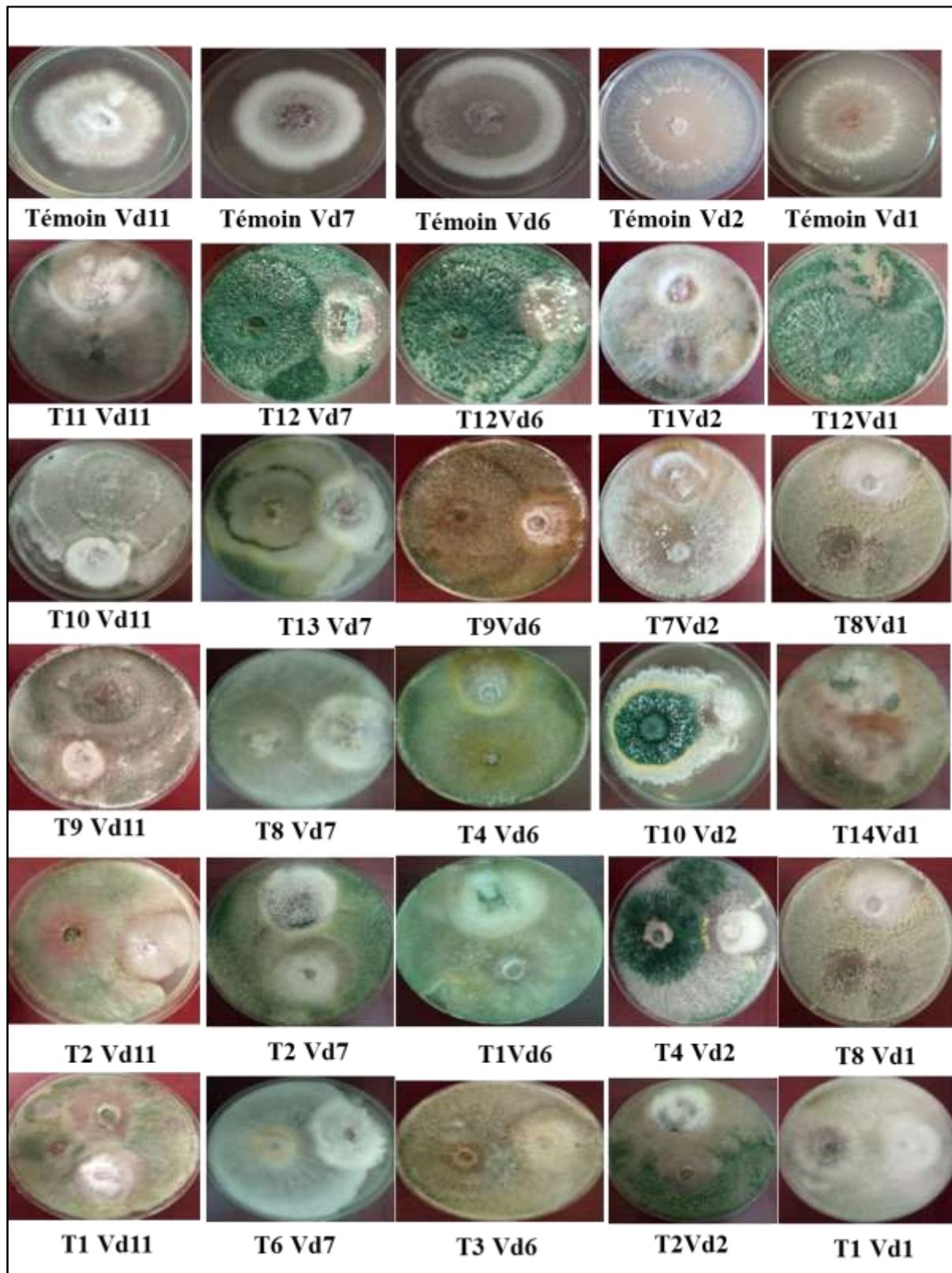
L'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des onze isolats de *Verticillium dahliae* a montré qu'un très grand nombre d'isolats de *Trichoderma* spp. avaient un effet inhibiteur significatif sur la croissance de cet agent phytopathogène avec une variation de taux d'inhibition obtenu par la confrontation directe et/ou indirecte.

**2.7.1. Confrontation directe**

Les résultats obtenus (Tableau 7) révèlent le pouvoir antifongique des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des isolats de *V. dahliae*. Comparativement au témoin, un faible taux de croissance est enregistré chez les différentes souches de *V. dahliae* confrontés aux isolats de *Trichoderma* spp. (Figure 38). Le test LSD a montré une différence significative dans l'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat T12 par rapport aux autres isolats testés de *Trichoderma* spp. Le plus haut pourcentage d'inhibition moyen enregistré était de 100%, marqué par l'isolat T12 (*T. harzianum*) contre les trois isolats de *V. dahliae* (Vd1, Vd2 et Vd5), suivi de T1 à un taux d'inhibition 85% obtenu contre Vd2 après 7 jours d'incubation à 28°C. Cependant, le taux d'inhibition moyen le plus faible (31,81) a été induit par l'isolat T11 contre l'isolat Vd6 (Tableau 7).

**Tableau 7.** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe des isolats de *Trichoderma* spp. contre *V. dahliae*

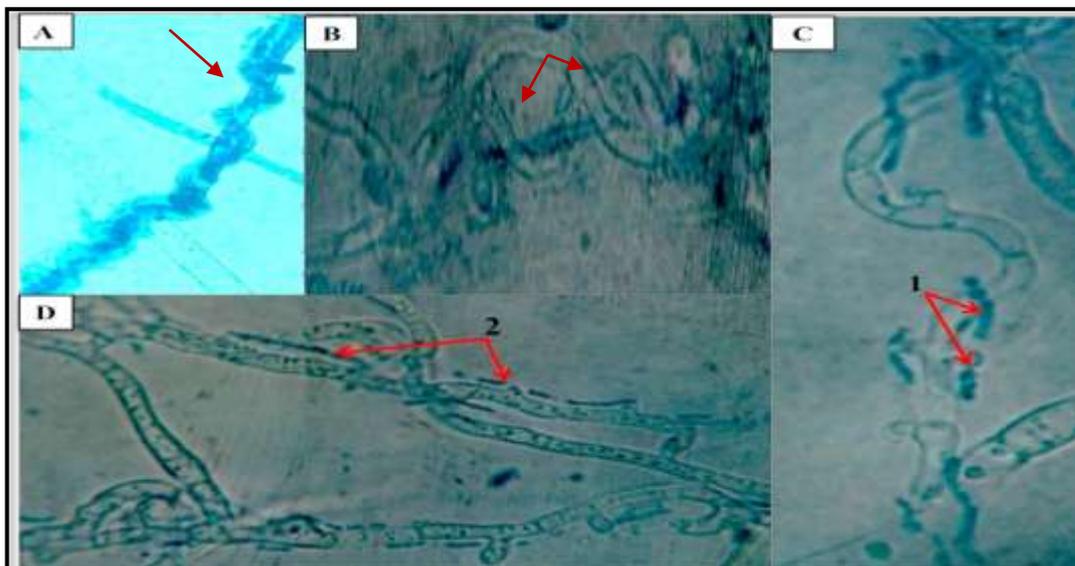
Pourcentage d'inhibition par confrontation directe												
Vd		Vd1	Vd2	Vd3	Vd4	Vd5	Vd6	Vd7	Vd8	Vd9	Vd10	Vd11
T												
<b>T1</b>	M±Et	64.7± 2.08	85±2.5	46.96 ±2.62	63.85 ±3.18	54.11 ±2.03	42.42 ±4	45.83 ±2.40	49.23 ±4.61	40±2. 30	38.46 ±2.66	52.38 ±4.20
<b>T2</b>	M±Et	64.70 ±1.18	82.5±1. 25	54.54 ±4	57.83 ±2.41	55.29 ±1.18	46.96 ±2.62	51.38 ±2.40	46.15 ±0	48±3. 53	49.23 ±4.06	44.44 ±5.5
<b>T3</b>	M±Et	64.7± 1.18	57.5±3. 30	51.51 ±4.01	63.85 ±4.34	52.94 ±3.11	69.69 ±4.01	54.16 ±2.40	61.53 ±0	53.33 ±3.52	32.30 ±1.54	52.38 ±2.74
<b>T4</b>	M±Et	61.17 ±2.03	62.5±2. 16	46.96 ±1.51	55.42 ±4.17	55.29 ±2.03	51.51 ±1.51	55.55 ±3.67	53.84 ±4.07	50.66 ±3.52	46.15 ±4.06	44.44 ±2.75
<b>T5</b>	M±Et	64.70 ±3.11	66.25±3 .30	50.00 ±4.01	57.83 ±2.09	52.94 ±2.03	42.42 ±2.62	65.27 ±1.39	50.76 ±5.32	50.66 ±2.66	46.15 ±0	49.2± 3.17
<b>T6</b>	M±Et	58±2. 03	55±1.25	54.5± 5.45	57.83 ±4.34	54.11 ±1.17	54.54 ±2.62	51.38 ±3.67	61.53 ±4.06	53.33 ±3.52	43.07 ±0	63.49 ±2.74
<b>T7</b>	M±Et	64.7± 4.07	60±1.25	46.96 ±2.62	57.83 ±3.18	47.05 ±1.17	50±4. 01	51.38 ±1.38	53.84 ±0	53.33 ±4.80	49.23 ±4.06	44.44 ±1.83
<b>T8</b>	M±Et	64.7± 2.03	55±2.5	54.54 ±3.03	55.42 ±4.17	47.05 ±3.11	39.39 ±2.62	51.38 ±0	46.15 ±2.66	46.66 ±1.33	44.61 ±1.54	58.73 ±0
<b>T9</b>	M±Et	64.7± 2.35	62.5±0	69.7± 4	61.44 ±1.20	56.47 ±2.03	62.12 ±0	58.3± 10.42	53.84 ±4.07	53.33 ±2.30	43.07 ±1.29	65.07 ±2.74
<b>T10</b>	M±Et	64.70 ±3.11	68.75±0	54.54 ±4	57.83 ±1.20	52.94 ±2.03	46.96 ±4.01	48.61 ±3.67	46.15 ±0	49.33 ±1.33	46.15 ±4.61	68.25 ±2.74
<b>T11</b>	M±Et	55.29 ±1.18	55±2.16	54.54 ±4.01	51.8± 3.19	52.94 ±1.17	31.81 ±1.51	51.38 ±3.66	49.23 ±0	53.33 ±2.67	46.15 ±0	60.31 ±4.19
<b>T12</b>	M±Et	100±0	100±0	54.54 ±2.62	63.85 ±4.17	100±0	54.54 ±4.01	72.22 ±0	53.84 ±1.54	60±3. 52	46.15 ±4.06	52.38 ±1.58
<b>T13</b>	M±Et	61.17 ±1.17	62.50±0	54.54 ±4	63.85 ±4.17	80±2. 03	54.54 ±1.51	65.27 ±0	58.92 ±4.12	57.33 ±2.30	38.46 ±0	52.38 ±4.20
<b>T14</b>	M±Et	61.17 ±1.17	65.00±2 .50	46.96 ±0	63.85 ±3.18	64.70 ±0	43.93 ±4	37.50 ±1.38	56.76 ±1.54	33.33 ±2.67	56.92 ±6.21	44.44 ±0
<b>T15</b>	M±Et	64.70 ±3.11	63.75±3 .30	51.51 ±0	60.24 ±2.09	64.70 ±1.18	54.54 ±4.01	65.27 ±1.39	58.92 ±4.12	53.33 ±0	50.76 ±1.53	49.20 ±1.59



**Figure 38.** Activité antifongique de quelques espèces de *Trichoderma* spp. en confrontation directe à l'égard des isolats de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation sur milieu PDA à 28°C (Photos originales).

Lors de ces tests réalisés *in vitro*, certains isolats ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement mycélien sans contact direct avec l'agent pathogène et une zone d'inhibition localisée entre les isolats de *Trichoderma* spp. et l'agent pathogène est visualisé. Ces observations suggèrent la production des substances antifongiques hydrophiles en particulier des antibiotiques, par les champignons qui sont diffusibles dans le milieu gélosé.

En outre, les tests de confrontation directe ont montré la capacité des isolats T2, T9 et l'isolat T12 à envahir et sporuler au-dessus de quelques isolats de *V. dahliae* après 7 jours d'incubation. Les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les différents isolats de *Trichoderma* spp. en confrontation directe avec l'agent pathogène *V. dahliae* nous ont permis de mettre en évidence le phénomène du mycoparasitisme exercé par les isolats de *Trichoderma* spp. qui se traduit par la formation des cordons et l'enroulement autour des hyphes du pathogène, leur segmentation et à la fin une lyse totale et une dissolution du cytoplasme (libération du contenu cellulaire), ce qui illustre le pouvoir hautement myco-parasitaire de ces isolats (Figure 39).



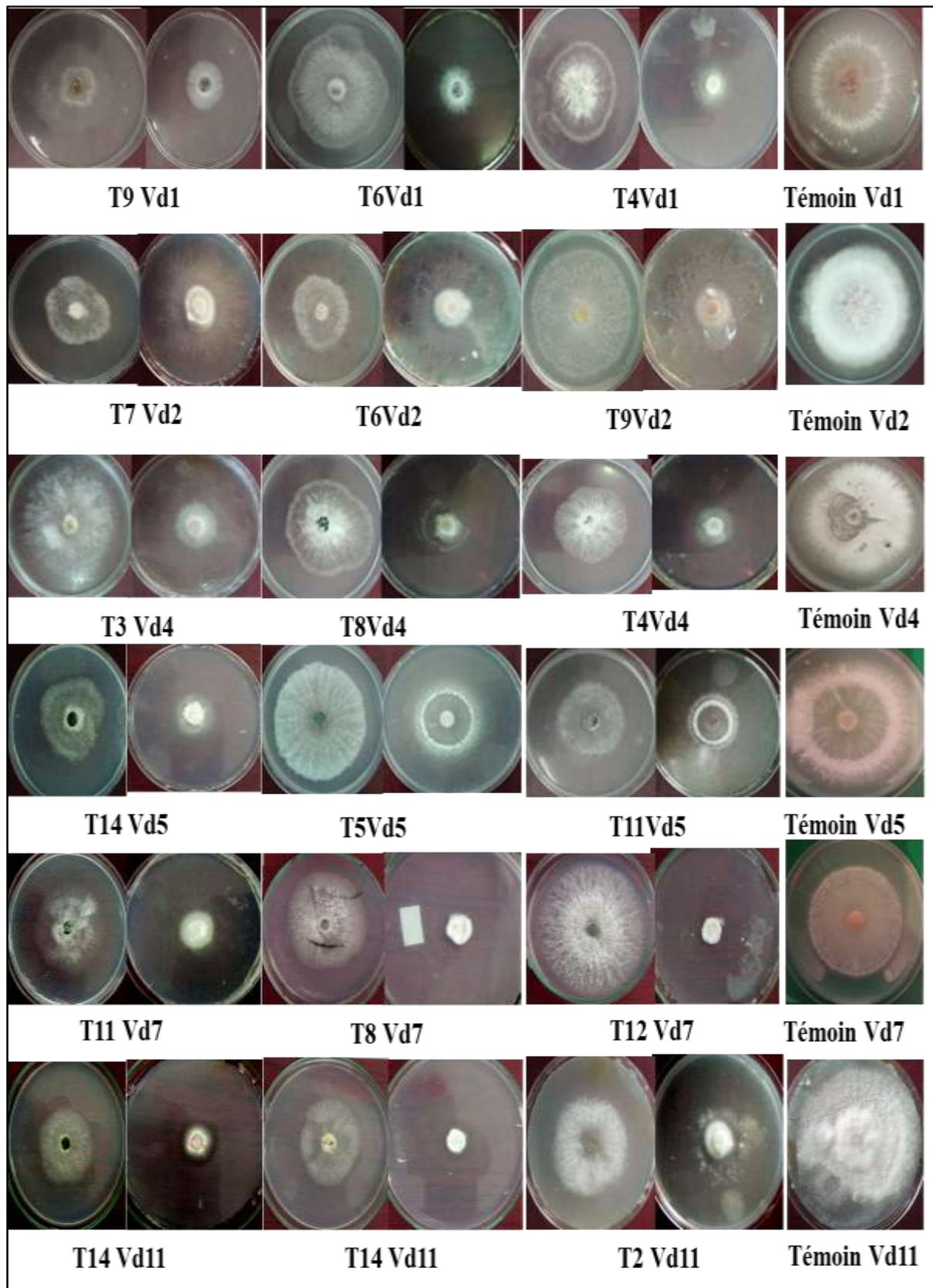
**Figure 39.** Modification morphologique affectant le mycélium du *V. dahliae* (après 7 jours) en confrontation directe (Photos originales), (A+B): les flèches indiquent les endroits de l'enroulement des hyphes de *Trichoderma* spp. sur *V. dahliae* (GX100), (C+D): dégradation et libération du contenu mycélien du *V. dahliae* (GX100).

**2.7.2. Confrontation indirecte**

Les résultats obtenus lors de la confrontation indirecte (à distance) sur le milieu PDA, durant 6 jours d'incubation des quinze isolats de *Trichoderma* spp. avec les onze isolats phytopathogènes de *V. dahliae* ont montré que les espèces de *Trichoderma* spp. étaient capables d'inhiber la croissance mycélienne grâce aux substances volatils qu'elles sécrètent. Ainsi, une réduction significative des diamètres des isolats de *V. dahliae* a été enregistrée. Cette inhibition se traduit par des taux de croissance considérablement inférieurs à ceux des témoins non confrontés. Le taux d'inhibition moyen est compris entre 55,26 % et 65,93 %, les isolats T8, T10, T13 et T14 se sont montrés les plus efficaces à l'égard des isolats de *V. dahliae* testés. Le plus haut pourcentage d'inhibition moyen enregistré a été de 65,93% conféré par l'isolat T14. Le pourcentage d'inhibition moyen s'évalue à 63,12%, 62,34% et 62,25 pour les trois isolats T8, T10 et T13 respectivement. Parmi les 15 souches testées, la souche T14 était la plus inhibitrice contre la majorité des souches de *V. dahliae* testés montrant un pourcentage de réduction de la croissance compris entre 54,54% et 76,47% et un taux d'inhibition moyen 65,93% après 6 jours d'incubation. Alors que, l'isolat T15 s'est montré le moins antagoniste avec un taux d'inhibition moyen 55,26% après 6 jours d'incubation. Pour les autres isolats de *Trichoderma* spp. le pourcentage d'inhibition de *V. dahliae* est moyen et s'étend entre 55,61% et 63,12%. Les observations microscopiques des trois isolats T2, T9 et T14 en confrontation avec les isolats de *V. dahliae* ont montré une modification morphologique affectant le mycélium du *V. dahliae* (fragilisation et rétrécissement du diamètre mycélien). La figure 40 et le tableau 8 illustrent les effets des composés volatils produits par ces souches antagonistes sur la croissance.

**Tableau 8.** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation indirecte des isolats de *Trichoderma* spp. contre *V. dahliae*.

Pourcentage d'inhibition par confrontation indirecte												
Vd		Vd1	Vd2	Vd3	Vd4	Vd5	Vd6	Vd7	Vd8	Vd9	Vd10	Vd11
T	M±Et											
<b>T1</b>	M±Et	58.82 ±2.94	61.66±3 .33	54.54 ±3.15	64.00 ±3.53	72.60 ±3.62	45.00 ±5	50.79± 5.72	65.27 ±4.16	46.15 ±2.66	48.52 ±4.41	44.44 ±2.75
<b>T2</b>	M±Et	66.17 ±2.94	66.66±3 .33	52.72 ±3.63	46.66 ±4.81	50.68 ±2.74	55±4. 40	60.31± 4.19	58.33 ±1.39	50.76 ±4.06	60.29 ±2.94	66.66 ±1.59
<b>T3</b>	M±Et	58.82 ±3.88	53.33±2 .88	54.54 ±1.82	60.00 ±4	56.16 ±2.90	73.33 ±4.40	68.25± 1.59	51.38 ±2.40	64.61 ±3.08	45.58 ±2.54	66.66 ±2.74
<b>T4</b>	M±Et	61.76 ±0	73.33±4 .40	56.36 ±3.64	66.66 ±3.53	64.38 ±2.37	73.33 ±1.67	36.50± 11.25	61.11 ±3.67	38.46 ±3.07	77.94 ±2.54	68.25 ±4.20
<b>T5</b>	M±Et	63.23 ±1.47	58.33±5 .77	58.18 ±3.14	73.33 ±2.67	38.35 ±1.37	58.33 ±4.40	68.25± 4.20	55.55 ±0	35.38 ±1.54	76.47 ±2.54	68.25 ±4.20
<b>T6</b>	M±Et	64.70 ±2.54	63.33±1 .67	50.90 ±6.29	64.00 ±1.33	57.53 ±0	50±4. 41	69.84± 2.74	55.55 ±2.78	30.76 ±4.06	77.94 ±2.58	57.14 ±1.59
<b>T7</b>	M±Et	58.82 ±2.94	63.33±0	56.36 ±4.69	77.33 ±1.33	54.79 ±1.37	48.33 ±5.77	68.25± 5.73	53.84 ±2.78	60.00 ±2.66	72.05 ±2.55	28.57 ±2.74
<b>T8</b>	M±Et	63.23 ±2.94	71.66±0	45.45 ±4.80	65.33 ±2.67	58.90 ±2.62	51.66 ±2.88	68.25± 6.41	52.77 ±5	69.23 ±2.47	83.82 ±1.47	68.25 ±2.75
<b>T9</b>	M±Et	55.88 ±3.88	61.66±2 .88	54.54 ±1.82	69.33 ±2.67	58.90 ±2.37	46.66 ±0	74.60± 4.19	50.00 ±4.24	53.84 ±2.66	77.94 ±3.88	71.42 ±1.58
<b>T10</b>	M±Et	60.29 ±1.47	63.33±2 .88	52.72 ±2.81	64±0	54.79 ±5.97	73.33 ±2.88	74.60± 2.74	30.55 ±3.67	69.23 ±5.32	77.94 ±0	65.07 ±1.58
<b>T11</b>	M±Et	63.23 ±2.94	65.00±1 .66	54.54 ±1.82	60.00 ±3.52	57.53 ±2.37	53.33 ±1.67	60.31± 4.19	44.44 ±3.67	58.46 ±3.07	64.70 ±2.54	52.38 ±4.20
<b>T12</b>	M±Et	61.76 ±3.88	60.00±2 .88	52.72 ±4.80	77.33 ±1.33	56.16 ±0	61.66 ±1.66	52.38± 4.20	52.77 ±1.39	64.61 ±5.32	55.88 ±1.47	63.49 ±1.58
<b>T13</b>	M±Et	63.23 ±1.47	58.33±4 .4	54.54 ±6.29	73.33 ±2.30	58.90 ±4	58.33 ±2.88	63.49± 0	44.44 ±3.67	66.15 ±2.40	70.58 ±3.89	73.01 ±1.59
<b>T14</b>	M±Et	55.88 ±2.94	66.66±2 .88	54.54 ±3.64	73.33 ±2.30	58.90 ±3.25	58.33 ±3.33	73.01± 4.19	65.27 ±1.39	67.69 ±2.66	76.47 ±3.89	76.19 ±2.74
<b>T15</b>	M±Et	63.23 ±2.54	58.33±1 .67	45.45 ±4.80	73.33 ±2.30	54.79 ±1.63	50±3. 33	36.50± 1.58	54.16 ±3.67	38.46 ±1.54	63.23 ±0	68.25 ±4.2



**Figure 40.** Confrontation indirecte entre les isolats antagonistes de *Trichoderma* spp. et les isolats phytopathogènes de *V. dahliae* (Photos originales).

### 2.7.3. Effet des filtrats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae*

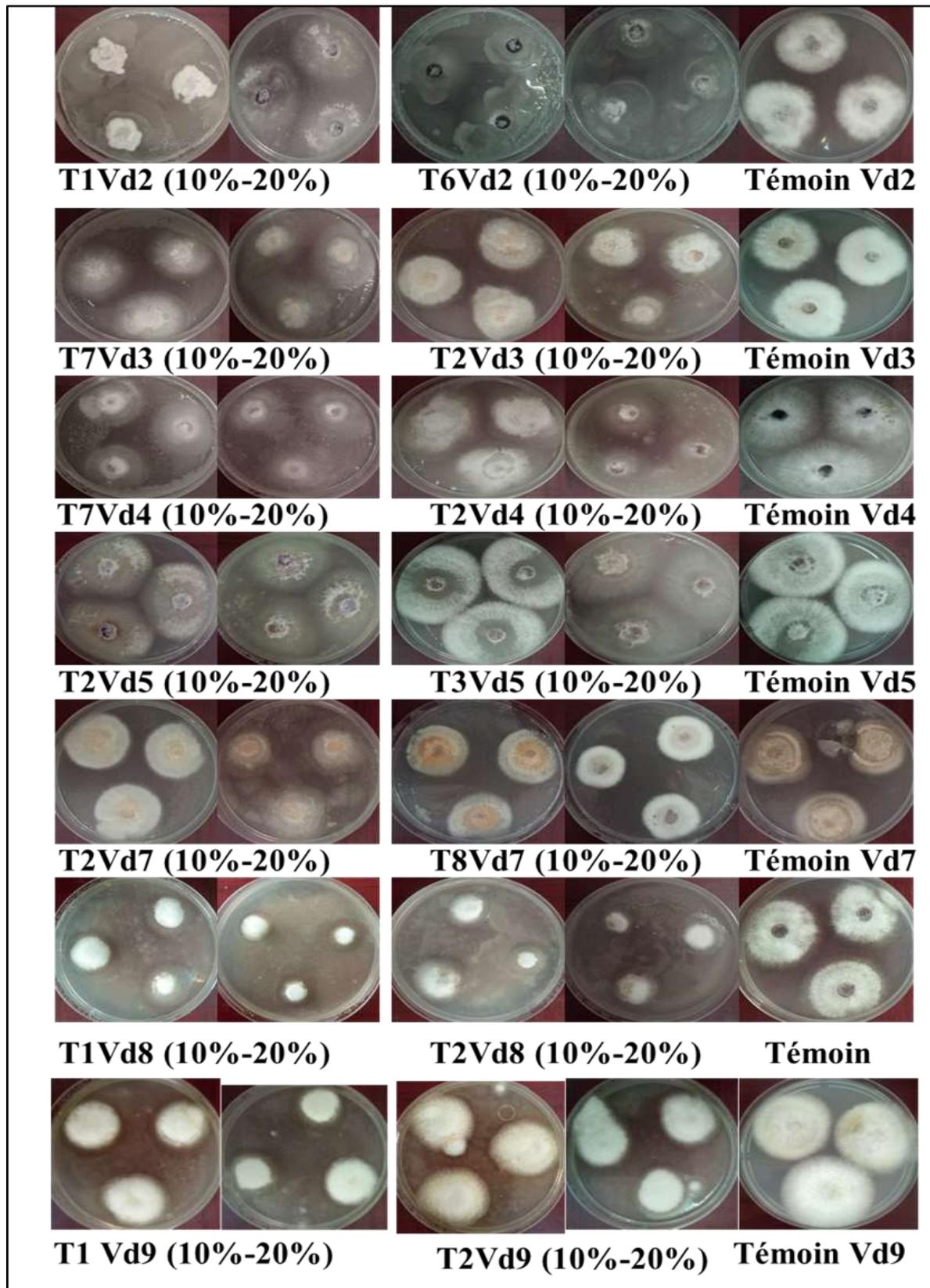
Les résultats de l'effet antifongique des filtrats testés sur milieu solide vis-à-vis des isolats de *V. dahliae* montrent que l'ensemble des filtrats testés ont une action inhibitrice sur la croissance mycélienne du pathogène par rapport aux témoins non confrontés. En effet, la croissance mycélienne du pathogène varie en fonction de la dose du filtrat utilisé, cette croissance se trouve fortement réduite quand le pathogène est traité par une dose élevée (20%). De même des modifications morphologiques sont observées, telles que les changements de couleur des colonies et la diminution de la croissance aérienne. Par contre du point de vue microscopique, les filtrats de *Trichoderma* spp. ont provoqué des altérations morphologiques, les plus importantes ont été observées au niveau des hyphes des pathogènes. Les résultats obtenus ont montré la sensibilité des isolats de *V. dahliae* à des degrés variables à l'égard des 15 filtrats testés (Tableau 9 et 10). Le filtrat de culture T7 a eu un effet assez fort contre la croissance des isolats de *V. dahliae* avec des réductions de croissance allant de 7,5 à 62.5% et de 26.82 à 75% selon la dose de la concentration appliquée 10% et 20% respectivement. Les filtrats des isolats T2 et T7 ont montré un effet d'inhibition remarquable contre *V. dahliae* avec des taux de réduction moyen de 40,42% et 54,69% respectivement à la dose 20%. Les deux filtrats de culture issus des isolats de *Trichoderma* T13 et T14 affectent moins la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* avec un taux d'inhibition moyen de 15,25% et 16,06% respectivement à la dose 20%. Cependant, les filtrats des cultures T4, T6, T9, T10, T11 et T15 ont présenté un effet assez faible sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* (taux d'inhibition moyen à la dose 20% inférieur à 30%). L'isolat Vd2 a montré une sensibilité importante à l'effet antifongique des filtrats testés, par ailleurs parmi les 15 filtrats testés, 5 filtrats ont exhibé un taux d'inhibition égale ou supérieur à 60% sur cet isolat à la dose 20%. En effet, L'utilisation des filtrats de *Trichoderma* spp. a provoqué une inhibition importante de la croissance radiale de *V. dahliae*, cela prouve que les isolats antagonistes testés peuvent agir par la sécrétion de biomolécules capables de ralentir le développement de l'agent pathogène ainsi que sa sporulation.

**Tableau 9.** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *V. dahliae* par les filtrats de *Trichoderma* spp. testés à la concentration 10% sur milieu solide.

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>V. dahliae</i> par l'action des filtrats																
Vd	T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
		10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Vd1	M±Et	11.62 ±2.30	53.48 ±2.32	18.60 ±4.05	11.62 ±0	9.3±4. 02	9.3±2.3 2	41.86±4. 02	23.25 ±4.02	2.32±4 .02	6.9±0	6.97± 0	0±0	6.97± 4.02	9.30± 0	16.27±0
Vd2	M±Et	22.4± 4.33	62.5± 2.50	25±0	47.5± 0	37.5± 0	25±0	62.50±0	57.5± 0	45±4.3 3	7.5±0	0±0	45±0	0±0	10±4. 33	2.5±4.3 3
Vd3	M±Et	12,5± 0	12.5± 4.33	12.5± 4.33	30±6. 61	5±0	7.5±0	37.5±2.5	17.5± 4.33	25±0	25±4. 33	17.5± 4.33	15±0	0±0	0±0	2.5±4.3 3
Vd4	M±Et	4.76± 0	16.66 ±4.12	19.04 ±0	14.28 ±0	4.76± 0	7.14±4. 12	28.57±0	23.80 ±4.12	16.66± 4.12	16.66 ±2.38	11.90 ±4.12	21.42 ±4.12	2.38± 0	4.76± 4,12	4.76±0
Vd5	M±Et	4.76± 0	16.66 ±0	4.76± 0	4.76± 4.12	4.76± 0	0±0	21.42±0	4.76± 0	4.76±6 .29	4.7±0	19.04 ±4.12	4.76± 0	0±0	0±0	0±0
Vd6	M±Et	0±0	28.57 ±0	8.57± 2.85	8.57± 5.71	2.85± 2.85	8.57±0	34.28±0	14.28 ±4.94	14.28± 4.97	0±0	5.71± 4.94	25.71 ±4.94	0±0	0±0	0±0
Vd7	M±Et	11.42 ±2.85	0±0	0±0	8.57± 0	8.57± 4.94	0±0	14.28±2. 86	11.24 ±0	5.71±0	0±0	14.28 ±0	0±0	0±0	42.85 ±0	37.14±0
Vd8	M±Et	36.58 ±0	51.21 ±2.43	56.09 ±4.88	7.31± 4.22	2.43± 0	26.83± 0.05	9.75±4.2 2	24.39 ±0	46.34± 0	39.02 ±4.22	29.26 ±0	0±0	0±0	7.31± 0	2.43±0
Vd9	M±Et	12,5± 0	37,5± 4.33	20±0	10±2. 5	22,5± 0	37,5±0	37,5±6.6 1	22,5± 0	20±2.5	2,5±2. 5	17,5± 0	0±0	37,5± 4.33	5±2.5	12,5±4. 33
Vd10	M±Et	12,5± 4.33	45±2. 5	25±2. 5	12,5± 0	30±4. 33	0±0	7,5±4.33	0±0	32,5±2 .5	20±2. 5	25±4. 33	32,5± 0	12,5± 0	17,5± 0	25±0
Vd11	M±Et	57,14 ±0	14,28 ±0	54,28 ±0	14,28 ±0	60±2. 85	40±0	54,28±0	57,14 ±0	0±0	37,14 ±0	57,14 ±2.95	42,85 ±3.67	0±0	8,57± 0	0±0

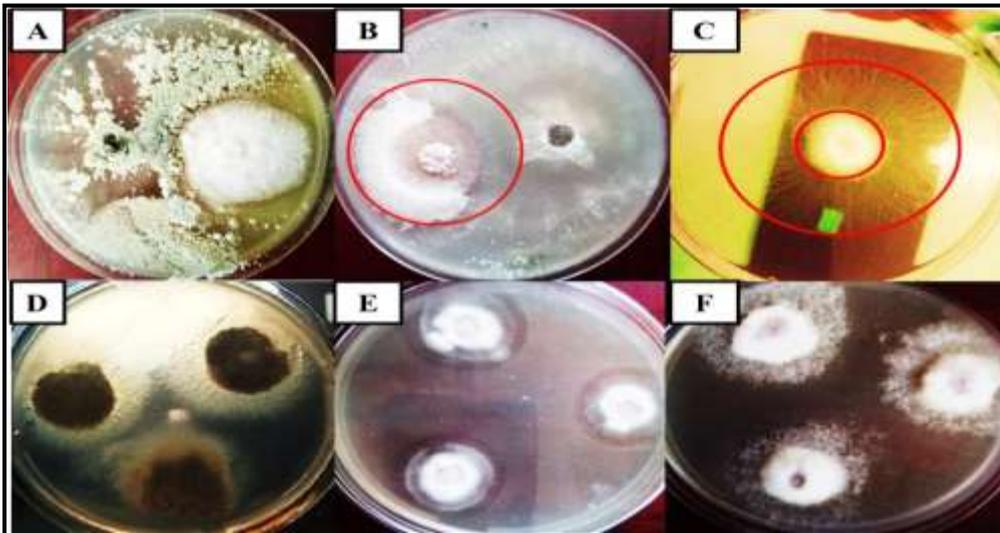
**Tableau 10.** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *V. dahliae* par les filtrats de *Trichoderma* spp. testés à la concentration 20% sur milieu solide.

		Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>V. dahliae</i> par l'action des filtrats														
Vd	T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
		20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
Vd1	M±Et	18.60±0	53.48±0	41.86±0	41.86±0	18.6±0	9.3±0	53.48±4.02	25.58±0	18.60±0	13.95±0	6.97±4.02	18.60±0	6.97±0	11.62±2.32	41.86±2.32
Vd2	M±Et	57.5±0	67.5±0	37.5±4.33	60±2.5	50±0	45±4.33	75±0	75±0	60±0	50±4.33	7.5±4.33	47.5±0	7.5±0	12.5±0	5±4.33
Vd3	M±Et	20±4.33	25±0	20±0	50±0	10±4.33	7.5±0	50±0	17.5±4.33	27.5±4.33	25±0	17.5±0	25±0	2.5±0	12.5±0	15±4.33
Vd4	M±Et	23.80±4.12	28.57±0	19.04±8.25	16.66±4.12	11.90±0	9.52±0	40.47±0	28.57±0	28.57±0	16.66±0	16.66±0	52.38±0	4.76±0	11.9±0	28.57±0
Vd5	M±Et	16.66±2.38	16.66±4.12	16.66±2.38	9.52±0	4.76±4.12	0±0	45.23±4.12	28.57±0	4.76±0	52.38±0	19.04±0	28.57±4.12	4.76±2.38	4.76±0	16.66±0
Vd6	M±Et	2.85±2.85	42.85±0	11.42±0	14.28±0	22.85±0	20±0	42.85±0	14.28±0	14.28±0	8.57±0	11.42±0	42.85±0	5.71±2.86	2.85±0	0±0
Vd7	M±Et	20±0	14.28±2.86	5.71±5.71	14.28±0	40±2.85	11.42±0	51.42±0	25.71±4.94	11.42±0	0±0	25.71±0	45.71±2.86	37.14±4.94	20±2.85	42.85±0
Vd8	M±Et	51.21±0	58.53±0	60.97±4.22	14.63±2.44	9.75±4.88	58.53±2.44	26.82±0	63.41±2.44	70.73±0	51.21±0	31.7±2.44	26.83±0	2.43±0	46.34±4.22	14.63±0
Vd9	M±Et	52,5±5	65±2.5	57,5±4.33	35±4.33	65±4.33	37,5±4.33	75±2.5	50±4.33	32,5±0	5±3.75	42,5±0	40±0	50±0	0±0	55±0
Vd10	M±Et	25±0	50±0	32,5±0	42,5±5	32,5±2.5	32,5±0	70±0	45±4.33	37,5±0	25±0	12,4±0	12,5±4.33	37,5±0	40±4.33	50±0
Vd11	M±Et	68,57±2.85	22,85±2.85	65,71±0	14,28±2.86	65,71±0	45,71±2.94	71,42±0	65,71±2.94	2,85±0	42,85±0	57,14±0	54,28±0	8,57±2.85	14,28±0	8,57±0



**Figure 41.** Effet des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* (Photos originales).

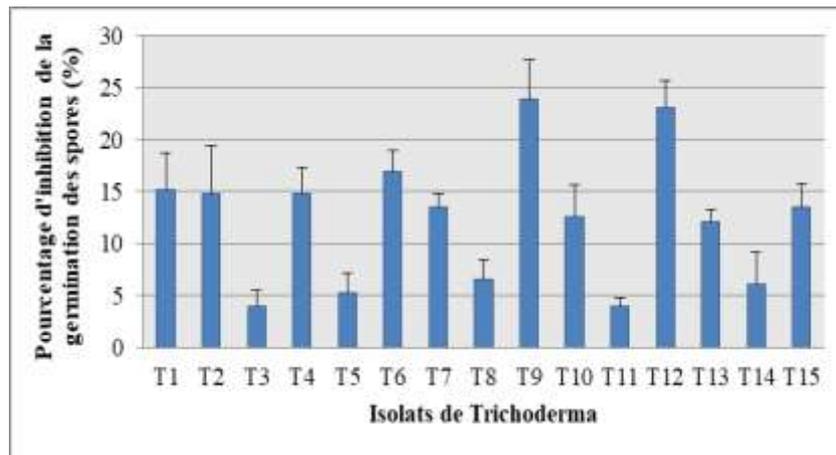
Les isolats de *Trichoderma* spp. testés via les trois mécanismes d'actions ont révélé des altérations morphologiques de l'agent pathogène *V. dahliae* et une inhibition de la croissance mycélienne, la figure 42 illustre l'effet des métabolites antifongiques qui ont affecté la croissance mycélienne du *V. dahliae*.



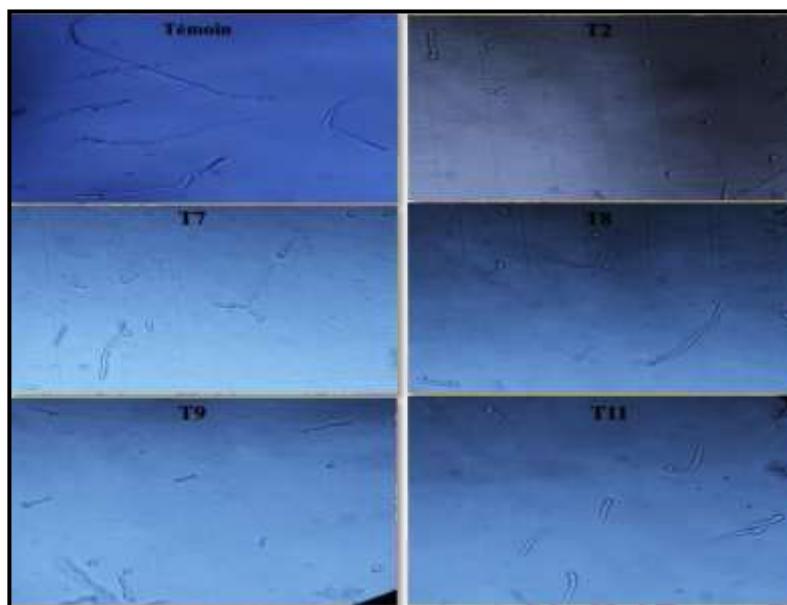
**Figure 42.** Inhibition de la croissance mycélienne par la production des métabolites secondaires (Photos originales) (A) Production d'un pigment de couleur jaune contenant des métabolites antifongiques par l'isolat T10 de *Trichoderma* spp. dans la zone de confrontation avec le pathogène, (B) inhibition de la croissance mycélienne par la production de métabolites antifongiques diffusibles par l'isolat T7 de *Trichoderma* spp., (C) inhibition de la sporulation et la croissance mycélienne par la production des métabolites volatiles, (D+E+F) La lyse mycélienne autour des disques du *V. dahliae* inoculés et inhibition de la croissance mycélienne par l'action des filtrats.

### 2.8. Effet des filtrats de *Trichoderma* sur la germination des conidies de l'isolat Vd4

Les résultats obtenus ont montré une sensibilité des conidies de l'isolat Vd4 vis-à-vis des 15 filtrats de culture de *Trichoderma* spp. testés à des degrés variables (Annexe 4). Après 24 h d'incubation, le pourcentage moyen d'inhibition varie de 3.91 % (T11) à 23.91% (T9) (Figure 43 et 44). Les filtrats de cultures des 15 isolats de *Trichoderma* spp. ont présenté un faible effet sur la germination des spores de l'isolat Vd4 (< 30% d'inhibition).



**Figure 43.** Pourcentage d'inhibition de la germination des spores de l'isolat Vd4



**Figure 44.** Action des filtrats de culture de *Trichoderma* spp. sur la germination des conidies de l'isolat Vd4 en comparaison avec le témoin après 24h d'incubation (GX40) (Photos originales).

### 2.9. Identification des composés volatils produits par *Trichoderma* spp.

Le criblage des souches antagonistes par confrontation indirecte a révélé que les isolats T2, T9, T12 et T14 de *Trichoderma* spp. limitent et réduisent significativement la croissance mycélienne de *V.dahliae*. L'analyse des composés volatils extraits de ces isolats a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS). Pour les deux isolats T14 et T12 de *Trichoderma* spp, des extractions à l'acétate d'éthyle ont été effectuées. Cependant, pour les isolats T2 et T9, les extractions ont été réalisées à l'aide de deux solvants à savoir le méthanol (solvant polaire) et l'hexane (solvant apolaire).

## 2.9.1. Isolat T14

L'analyse chromatographique (GC/MS) de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat T14 a permis d'identifier 26 composés volatils (Tableau 11 et Annexe 9) appartenant à plusieurs groupes de métabolites (les alcools, les acides gras, des composés aromatiques, des amides et des dérivés benzéniques).

L'examen des résultats a révélé la production des acides gras tels que, l'acide octadecanoïque (acide stéarique), l'acide tétradecanoïque, l'acide n-hexadecanoïque, et deux acides dicarboxylique (acide succinique et acide benzoïque). Aussi, la GC-MS a pu détecter des alcools tels que le phényléthyl alcool, des amides tels que le 13-Docosamide, (Z)- et ainsi que des dérivés benzéniques tels que l'acide 1,2-Benzenedicarboxylique.

**Tableau 11.** Identification des composés volatiles de l'isolat T14 par GC-MS

N°	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Q
1	Acide Propanoïque, propyl ester	3.844	1.66	9
2	1,3-Butadiène, 2-fluoro-	4.701	1.81	37
3	Ethanamine, N-méthyl-N-nitroso-	5.176	2.39	37
4	1,3-Dioxolane, 2-méthoxyméthyl-2,4,5-triméthyl-	6.004	8.36	9
5	Benzène, 1,4-dichloro-	6.656	0.65	97
6	Acide Hexadecanoïque, éthyl ester	7.593	3.51	12
7	Phényléthyl Alcool	8.022	2.57	87
8	2-(Aminométhylène)aminoacrylonitril	8.153	1.89	22
9	Acide Benzoïque	9.085	1.14	81
10	Silane, méthylènebis[diméthyl-	10.925	4.83	17
11	Acide Butanedioïque	11.297	3.05	72
12	Acide Propanedioïque acid, méthyl-, diéthyl ester	11.468	2.05	47
13	9H-Carbazole-9-méthanol	13.012	2.22	38
14	Acide Butanoïque, 4-(3,5-diméthylphényl)-4-oxo-	13.577	0.38	20
15	Acide Dodecanoïque	14.075	11.46	99
16	Acide Tétradecanoïque	16.229	7.26	99
17	Acide n-Hexadecanoïque	18.253	6.73	91
18	Acide 9-Octadecanoïque (acide oléique)	19.933	3.13	90
19	Acide Octadecanoïque (acide stéarique)	20.116	2.12	90
20	Acide Hexanedioïque, dioctyl ester	21.991	10.15	96
21	1,2-Benzenedicarboxylique acid, diisooctyl ester	23.191	1.45	80
22	Carbamic acid, N-(3-chloro-4-méthoxyphényl)-, glycidyl ester	24.928	2.88	74
23	13-Docosamide, (Z)-	25.145	10.11	99
24	Phénylserine, 2-fluoro-4,5-diméthoxy-.beta.,.beta.-dihydro-, méthyl ester	28.506	1.65	38
25	Acétamide, N-[2-[[2-(2-nitrophényl)éthényl]phényl]azo]phényl]	30.507	1.34	25
26	Naphthalène, 2-(4-cyanophényl)-6-nonyl-	34.222	1.49	38

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

### 2.9.2. Isolats T2 et T9

Les résultats de l'identification des COV par CG/SM des isolats T2 et T9 de *Trichoderma* spp. sont représentés dans les tableaux 12, 13, 14 et 15 ainsi qu'en annexe 9. Les quatre chromatogrammes (deux chromatogrammes pour chaque souche issus des extraits hexaniques et méthanoliques) ont montré la richesse en nombre de pics détectés (88) chez les deux isolats. Par ailleurs et de point de vue nombre, l'isolat T2, compte plus de pics (55) que l'isolat T9 (33). Nous observons aussi des profils très différents entre les extraits analysés, ce qui indique la production des composés diversifiés. Les métabolites identifiés appartiennent aux groupes chimiques suivants; les alcools, les cétones, les alcènes, les alcanes, les amides, les esters, les composés aromatiques (dérivés phénoliques et benzoïques) et les acides gras.

Certains métabolites sortent dans le volume mort (non retenus par la colonne), avant les 2 min de l'analyse. Cela nous laisse présumer de la présence de nombreux métabolites polaires tels que les acides organiques.

La séparation des pics est assez bonne, nous observons dans les deux chromatogrammes de l'extrait méthanolique de l'isolat T2 et l'extrait hexanique de l'isolat T9 des pics bien distincts et bien séparés, alors que pour les extraits hexaniques de l'isolat T2 et l'extrait méthanolique de l'isolat T9, les pics sont plus ou moins écartés durant les premières 20 minutes et ils apparaissent trop proches et parfois chevauchés au bout d'un temps de rétention ( $R_t > 20$ min). Durant cette deuxième phase et après 20 min de l'élution, plusieurs composés apparaissent dans les chromatogrammes de l'extrait hexanique de l'isolat T2 et l'extrait méthanolique de l'isolat T9 tels que le 9-Octadécénamide, (Z).

Nous avons observé une ressemblance entre les deux profils chromatographiques de l'extrait méthanolique de l'isolat T2 et de l'extrait hexanique de l'isolat T9, En effet, nous retrouvons trois zones chromatographiques: la première, au début de chromatogramme qui nous renseigne sur la présence de métabolites très polaires. Au milieu du chromatogramme (15-26min) nous retrouvons des pics intenses correspondant à des molécules moyennement polaires ou la majorité des métabolites sont détectés dans cette gamme. A la droite du chromatogramme se trouvent les molécules apolaires qui sont éluées à la fin de l'analyse.

La majorité des composés polaires sont retenus et extraits par le méthanol qui est un solvant polaire (acides gras et alcanes) alors que les composés apolaires sont captés davantage par l'hexane. Selon les chromatogrammes de l'extrait hexanique de l'isolat T2 (Annexe 9), les pics majoritaires font référence à des amides et des alcanes, par contre les

principaux pics de l'extrait hexanique de l'isolat T9 représentent des alcanes. Certains COVs sont détectés et caractérisés dans l'extrait hexanique des deux isolats tel que 13-Docosamide, (Z)-, ce qui indique que les deux isolats produisent des composés communs, il s'agit des esters, des alcanes et des amides. Le chromatogramme de l'extrait hexanique de l'isolat T2 illustre la présence de plusieurs pics dont les plus intenses sont les alcanes (Undecane, Octadecane, Eicosane, Z-14- Nonacosane, Tetratriacontane, 1-Bromo-11-iodoundecane) et les amides (tel que: 13- Docosamide, (Z), Hexadecanamide, 9-Octadecanamide, (Z)).

Quant à l'extrait méthanolique, il est constitué principalement des cétones (Cyclopentanone, 2-methyl, des esters : Acide tétradécanoïque, propyl ester et l'acide 9-Octadécanoïque (Z)-, methyl ester), des acides gras (l'acide tétradécanoïque, acide oléique, acide n-Hexadécanoïque, acide palmitique), on note aussi la présence des amides comme le 9-Octadécanamide, (Z), cis-11- Eicosamide et le 13-Docosamide, (Z).

Moins de molécules volatiles sont détectées dans l'extrait hexanique et méthanolique de l'isolat T9. Les résultats de l'extrait hexanique ont mis en évidence des dérivés phénoliques et d'autres benzoïque (Phenol,2,4-bis ;1,1-diméthylethyl ; Benzene ; 1,1'-1,2-cyclobutanediyl bis-, et le cis-Benzonitrile, m-phenethyl), des alcanes ( Tetratriacontane et Octadecane, des esters de l'acide Heptadécanoïque ; l'acide Heptadécanoïque, 16-methyl-, methyl ester et l'acide Hexanedioïque, et bis (2-ethylhexyl) ester).

De même, le chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat T9 comporte divers composés chimiques dont les plus majoritaires sont les alcanes tel que Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tétradécaméthyl et le octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadécaméthyl. Des composés indoliques ont également été détectés comme l'indole-2-one, 2,3-dihydro-N-hydroxy-4-méthoxy-3,3-diméthyl. D'autre part, le premier composé révélé dans l'extrait méthanolique est un dérivé alcoolique trop polaire le Phénylethyl alcool.

**Tableau 12.** Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait hexanique de l'isolat T2

N°	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Q
1	D-Limonene	5.342	0.09	95
2	Undecane	6.331	0.21	95
3	Undecane, 2-methyl-	7.251	0.66	83
4	Cycloheptasiloxane, tetradecamethy 1-	11.732	0.32	87
5	3-(4-N,N-Dimethylaminophenyl)propenoic acid, 2-(diethoxyphosphinyl) , ethyl ester	13.732	0.10	49
6	2(1H)-Quinolinone, 3-hydroxy-4-(3-hydroxyphenyl)-	15.041	0.42	23
7	4H-1-Benzopyran-4-one (koningine)	16.098	0.16	14
8	Tetracosane	16.447	0.11	68
9	Tetratriacontane	16.858	0.09	64
10	2-Pentadecanol	17.098	0.11	64
11	Octadecane, 2-methyl-	18.464	0.10	86
12	Hexadecanamide	18.842	0.25	60
13	9-Octadecenamide, (Z)-	20.413	1.45	98
14	Acide Nonahexacontanoïque	20.653	0.26	74
15	Tetrapentacontane, 1,54-dibromo-	23.248	7.01	49
16	13-Docosenamamide, (Z)-	23.614	8.39	97
17	1-Bromo-11-iodoundecane	23.951	4.62	86
18	Nonacosane	24.609	11.00	92
19	Eicosane	25.272	15.32	92
20	1-Bromo-11-iodoundecane	25.609	11.84	80
21	Hentriacontane	25.986	15.51	86
22	Z-14-Nonacosane	26.826	8.34	81
23	Dibromopentacosane	27.398	4.71	49
24	Triacotane, 1-bromo-	27.781	5.56	90
25	Octadecane	28.907	0.72	53
26	Methylenebis (2,4,6 triisopropylphenylphosphine)	29.118	2.65	45

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

**Tableau 13.** Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait méthanoïque de l'isolat T2

N°	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Q
1	Cyclopentanone, 2-methyl-	4.406	2.65	10
2	Phospholane	5.206	0.88	27
3	Acide Tetradecanoïque, propyl ester	5.966	1.78	47
4	1,2,3,4-Butanetetrol	6.555	1.08	40
5	1,3-Hexanediol, 2-ethyl-	7.189	0.56	22
6	Thiophene, 2,5-dihydro-	8.007	3.93	58
7	Acide Propanedioïque, phenyl-	8.578	2.75	25
8	Toluene	10.653	2.21	11
9	Benzene ethanol, 4-hydroxy-	11.002	1.46	55
10	Benzenamine, 2,5-dimethyl-	11.493	0.41	27
11	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)	11.933	0.54	86
12	Eicosane, 7-hexyl-	14.208	2.67	38
13	Acide Tetradecanoïque	14.722	1.31	96
14	3,6-Di(N-pyrrolidinyl)-1,2,4,5-tetrazine	16.208	0.21	35
15	Acide n-Hexadecanoïque	16.814	7.63	94
16	Ethyl cyclohexanepropionate	17.117	0.46	50
17	Acide 9-Octadecenoïque (Z)-, methyl ester	18.117	0.82	99
18	Acide oleïque	18.483	8.75	96
19	Acide Hexadecanoïque, 10-hydroxy-, methyl ester	20.084	0.14	50
20	Acide 9-octadecenamido, (Z)-	20.432	10.24	98
21	Acide Hexadecanoïque, 2-hydroxy-1-(hydroxyméthyl) ethyl ester	21.581	1.99	91
22	Cis-11-Eicosenamido	22.061	0.68	78
23	Acide Octadecanoïque, 2-hydroxy-1-(hydroxyméthyl) ethyl ester	23.147	4.82	86
24	13-Docosenamido, (Z)-	23.621	21.62	99
25	Cyclopentane, 1,1'-[3-(2-cyclopentylethyl)-1,5-pentanediy]bis-	24.593	2.66	30
26	Tetracosane, 1-bromo-	25.027	8.41	53
27	1,3-Dioxolane, 4-ethyl-5-octyl-2,2 -bis(trifluorométhyl)-, trans-	25.959	1.50	25
28	Octadecane, 1,1'-[1,3-propanediy bis (oxy)]bis-	26.216	6.81	35
29	Méthylènebis (2,4,6-triisopropylphénylphosphine)	29.091	1.03	37

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

**Tableau 14.** Métabolites identifiées par GC/MS dans l'extrait hexanique de l'isolat T9

N°	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Q
1	Phenol, 2,4-bis(1,1-diméthylethyl)	11.935	1.73	96
2	Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl) bis-, cis-	14.187	0.40	72
3	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-	14.770	2.45	80
4	Acide Pentadecanoïque, 14-méthyl-, méthyl ester	16.439	0.30	94
5	Acide Heptadecanoïque, 16-méthyl-, méthyl ester	18.348	0.29	98
6	Acide Hexanedioïque bis (2-éthylhexyl) ester	20.685	0.85	74
7	Benzonitrile, m-phenethyl-	21.205	3.71	35
8	Tétratriacontane	21.468	0.46	87
9	(2,3-Diphénylcyclopropyl)méthyl phényl sulfoxyde, trans- (stilbenes)	22.085	20.90	78
10	13-Docosamide, (Z)-	23.600	13.67	97
11	Octadecane	25.046	29.60	90
12	Ethyl 2-(2-chloroacétamido)-3,3,3- trifluoro-2-(3-fluoroanilino) propionate	25.972	22.48	38
13	Acide silicique, diéthyl bis (triméthylsilyl) ester	28.538	1.89	35
14	Disilane, (diphénylméthyl) pentaphényl	29.093	1.26	9

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

**Tableau 15.** Métabolites volatiles identifiées par GC/MS dans l'extrait méthanoïque de l'isolat T9.

N°	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Q
1	Phenylethyl Alcohol	6.680	1.50	50
2	Acide Benzoïque, 4-méthyl-, méthyl ester	7.904	0.32	72
3	Phenol, p-tert-butyl-	9.109	0.42	91
4	Cyclohexasiloxane, dodécaméthyl-	9.464	0.55	64
5	Phenol, 2,4-bis(1,1-diméthylethyl)	11.927	5.62	96
6	9-Octadécénamide, (Z)-	20.413	1.15	93
7	Cyclohexane, (1-hexyltétradécyl)-	20.689	0.17	12
8	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadécaméthyl-	25.879	23.52	87
9	Indole-2-one, 2,3-dihydro-N-hydroxy-4-méthoxy-3,3-diméthyl-	26.490	12.60	25
10	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tétradécaméthyl-	26.987	20.62	52
11	2-Ethylacridine	28.348	8.79	30
12	Silane, 1,4-phénylènebis(triméthyl)	29.074	2.31	38
13	Indole-2-one, 2,3-dihydro-N-hydroxy-4-méthoxy-3,3-diméthyl-	29.354	2.00	35
14	1-Benzazirène-1-carboxylique acid, 2,2,5a-triméthyl-1a-[3-oxo-1-butenyl] perhydro-, méthyl ester	29.594	2.26	35
15	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tétradécaméthyl-	30.057	3.96	62
16	2-Ethylacridine	31.280	4.87	18
17	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadécaméthyl-	32.223	3.48	72
18	Acide Silicique, diéthyl bis (triméthylsilyl) ester	33.955	3.77	38
19	1,3-Bis(triméthylsilyl)benzène	34.178	2.09	83

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

## 2.9.3. Isolat T12

L'analyse par GC-MS des substances volatiles de la souche T12 a révélé la présence de 59 composés organiques volatils (VOCs) appartenant à différentes classes chimiques telles que les alcools, les acides organiques, les cétones, les alcènes, les alcanes, les dérivés benzéniques, les esters, les monoterpènes et les alcaloïdes (Tableau 16).

De surcroît, l'analyse a dévoilé, une nouvelle molécule produite chez ce genre fongique, il s'agit en l'occurrence de la molécule 7-epi-Nemorosone qui est un alcaloïde produit chez certaines espèces de plantes. Cette analyse a montré également la présence de quelques composés dont l'activité biologique est inconnue tels que : l'anti-2-Acetoxyacetaldoxime.

**Tableau 16.** Identification des composés volatiles de l'isolat T12 par GC-MS

N <sup>o</sup>	Composés chimiques détectés	Temps de rétention (min)	Abondance (%)
1	anti-2-Acetoxyacetaldoxime	5.62	0.0946
2	Ethanol, 2-methoxy-	5.86	3.456
3	Acide Propanoïque, 2-hydroxy-, ethyl ester	6.107	1.7862
4	Isobutyl acetate	6.303	0.717
5	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	6.707	0.4964
6	Acide Butanoïque, 4-hydroxy-	7.713	4.4502
7	1-Propanol, 3-(methylthio)-	9.167	3.6132
8	3-Heptanone, 6-methyl-	9.277	1.2142
9	(SS)- or (RR)-2,3-hexanediol	9.34	1.4045
10	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	9.477	0.4051
11	3-Octanol	9.55	0.5713
12	Decane, 2,5,9-trimethyl-	9.707	1.0929
13	1-Pentene, 4,4-dimethyl-	10.007	1.1669
14	4,5-Octanediol, 2,7-dimethyl-	10.153	0.3249
15	Decane, 4-methyl-	10.507	0.1071
16	2-Ethyl-6-phenyl-1,3,4-thiadiazolo(3,2-a)(1,3,5)-triazine-5,7-dione	10.687	0.0885
17	Phenylethyl Alcohol	11.027	14.5381
18	Acide Oxalique, allyl hexyl ester	11.97	0.0439
19	Undecane	12.093	6.1215
20	Heptane, 2-(hexyloxy)-	12.393	0.0795
21	Vinyl butyrate	12.747	0.2099
22	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl hexyl ester	12.943	0.3548
23	2-Tridecanol, TMS derivative	12.993	0.1256
24	Hexadecane	13.087	1.5414
25	Acide -3-hydroxybutyrique, acetate	13.18	0.0776
26	Octane, 2,3,3-trimethyl-	13.263	0.1282
27	Undecane, 2,8-dimethyl-	13.37	0.3204
28	5-Cyclohexylpentan-2-one	13.48	0.9602
29	Decane, 3,3,6-trimethyl-	13.64	0.1537
30	Butane, 2,2-dimethyl-	13.75	0.2735
31	Tetradecane	14.013	4.7848
32	Acide Sulfurous, 2-ethylhexyl isohexyl ester	14.123	0.7406
33	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	14.263	0.5949
34	Benzeneethanol, 4-hydroxy-	14.48	5.2119
35	1-Dodecanol	14.597	3.3853

36	1,3-Cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-	14.827	1.3699
37	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-	15.077	0.8172
38	3-Ethyl-3-methylheptane	15.257	0.7447
39	Acide Oxalique, allyl dodecyl ester	15.603	0.4699
40	Hexadecane	15.68	2.0358
41	7-epi-Nemorosone	15.803	0.3448
42	Benzene, (1-butylheptyl)-	15.92	1.8139
43	Benzene, (1-ethylnonyl)-	16.173	0.47
44	Citral	16.353	0.2488
45	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	16.52	0.7311
46	Sesquicineole	16.773	4.7302
47	Acide Tridecanoïque, 2-ethyl-2-methyl-, ethyl ester	16.91	3.2014
48	Benzene, (1-pentyl-octyl)-	17.34	0.5621
49	Acide Phthalique, isobutyl octyl ester	17.477	1.24
50	Tridecane, 1-iodo-	17.87	1.1268
51	Decane, 1-bromo-2-methyl-	18.123	4.9626
52	Acide Sulfureux, octadecyl 2-propyl ester	18.303	0.2212
53	Eicosane, 1-iodo-	18.39	1.6005
54	Heptacosane	19.163	0.5588
55	Hexadecane, 1-iodo-	19.497	1.3292
56	Heptacosane	20.353	0.5735
57	Dotriacontane, 1-iodo-	20.743	0.5551
58	Acide Hexanedioïque, bis(2-ethylhexyl) ester	20.84	6.2396
59	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	21.573	2.0058

Tr: temps de rétention; Abondance ou le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (%); Nom de composé proposé par la banque des données NIST02.L ; Q : taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres.

### 3. Discussion

Les tests d'identification moléculaire ont confirmé la diversité génétique des souches de *V. dahlia* isolées à partir des oliveraies prospectées par la présence des deux pathotypes défoliant (D) et non défoliant (ND) caractéristiques des isolats de *V. dahlia* à travers le monde. Les études réalisées en Algérie par Benzina *et al.* (2016) qui ont porté sur l'identification moléculaire de 15 isolats de *V. dahlia* isolées à partir des branches malades de l'olivier confirment que ces souches appartiennent au pathotype défoliant et non défoliant. L'identification de nouvelles souches défoliantes plus agressives sur olivier que les souches non défoliantes a été signalé pour la première fois en Espagne par Mercado-Blanco *et al.* (2002), au Maroc par Lachqer et Sedra (2002), en Palestine par Korolev *et al.* (2008), et en Turquie par Dervis *et al.* (2009).

Le pathotype défoliant est très virulent et les symptômes observés sur oliviers sont très sévères allant de flétrissement, des chloroses, de défoliation jusqu'à une diminution très prononcée de poids et de la hauteur des arbres, voir même dans certaines conditions la plante meurt (Blanco-Lopez *et al.*, 1984; Rodriguez-Jurado *et al.*, 1993; Birem *et al.*, 2009).

Les attaques sur oliviers sont plus graves en présence des deux pathotypes (D) et (ND), provoquant ainsi dans plusieurs cas le dépérissement généralisé des plantes infectées (Lopez-Escudero et Blanco-Lopez, 2007). Pour le reste des isolats (9 isolats) présentant les caractéristiques phénotypique du genre *Verticillium*, d'autres primers spécifiques doivent être utilisé pour confirmer leurs identités en espèces.

L'étude morphologique des isolats de *Trichoderma* spp. a porté sur la mensuration des conidies, phialides et la présence ou absence de chlamydo-spores ainsi que l'aspect cultural de la croissance des colonies (couleur, texture). Nous avons pu relever des différences entre les souches de *Trichoderma* spp., en revanche, la couleur des colonies semble virer de vert - olive à vert foncé et parfois jaune clair. Cela indique une variabilité d'espèces isolées de la rhizosphère de l'olivier.

Les résultats de l'analyse phylogénétique ont montré que les souches de *Trichoderma* spp. utilisées dans cette étude forment un arbre portant des groupes d'espèces reliés entre eux. L'analyse phylogénétique a généré un arbre formé de 6 groupes correspondant aux espèces: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. rifaii*, *T. Koningii*, *T. inhamatum* et *T. asperellum*.

L'analyse des séquences ITS de T7 et T12 a révélé leur appartenance à l'espèce *T. harzianum*, cette analyse a été confirmée par les critères phénotypiques conformés aux tests moléculaires. L'identification moléculaire de T4 a permis d'affilier cette souche à l'espèce *T. asperellum*. Néanmoins, sur la base des caractères phénotypiques, cette souche est plus proche à l'espèce *T. harzianum*. L'identification précise, des espèces de *Trichoderma* spp. basées sur la morphologie est difficile en raison de la similitude des caractères morphologiques (Druzhinina et Kubicek, 2005). Par conséquent, avec l'approche des méthodes moléculaires et les outils d'identification basés sur l'analyse des séquences des gènes, il est possible d'identifier les espèces de *Trichoderma* spp. (Samuels *et al.*, 2006; Kubicek *et al.*, 2008).

L'alignement et l'analyse phylogénétique des trois souches T7, T11 et T12 ont montré une similarité des séquences ITS de 60%, 60% et 66% % avec les séquences de référence de *T. harzianum* (KT001983, MH339866, MH339872). Les trois souches T7, T11 et T12 appartiennent à deux groupes d'espèces différents, le premier groupe comprend la souche T7 et T11 porté par le même clad et montre un pourcentage de similarité de 60% avec les deux séquences de référence (KT001983) et (MH339866), le deuxième groupe est représenté par la souche T12 avec un pourcentage de similarité de 63% avec la séquence de référence (MH339872).

Les deux groupes forment un groupe soutenu par une valeur bootstrap de 87 %. L'appartenance des deux souches T7 et T12 au même clad est due probablement à la conservation du patrimoine génétique des souches de *Trichoderma* spp. provenant de la même région d'isolement (T7 et T11 sont issues des oliveraies de la région de Boumerdes). Alors que l'hétérogénéité observée dans la section de *T. harzianum* qui sépare les deux clads de (T7, T11) et T12 peut être liée à une évolution génétique récente des espèces de *T. harzianum* ou à la variabilité génétique présente chez cette espèce. (Druzhinina *et al.* 2010) rapporte que *T. harzianum* est l'une des espèces qui présente la plus grande variabilité et considérée comme un complexe d'espèces. De plus, les résultats de l'analyse phylogénétiques ont révélé la prédominance de *T. harzianum* dans la niche écologique de l'olivier, cela est due à la capacité de cet espèce à coloniser de nombreux substrats et niches écologiques (Chaverri Kubicek *et al.* 2008).

L'analyse de la séquence ITS de la souche T4 a montré que cette souche a présenté des séquences identiques (99% de similarité) avec les séquences de *Trichoderma asperellum*, cette espèce est représentée par une branche à part qui se distingue des autres groupes. Cette analyse des séquences partielle de la région ITS nous a permis d'affilier les 4 souches à des espèces de *T. harzianum* et *T. asperellum*. Néanmoins, une amplification complète du génome ou de multiples gènes est requise pour une identification plus précise des espèces de *Trichoderma* spp.

L'étude de l'influence des facteurs abiotiques (milieux de culture, température, pH, condition d'éclairage, salinité) sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* a permis de déterminer la valeur optimale de chaque paramètre. En effet, les résultats de l'influence des milieux de culture ont révélé que les isolats testés présentent un optimum de croissance sur milieu PDA, des résultats similaires sont obtenus par Attrassi *et al.* (2005), Benzina *et al.* (2016) qui ont montré que le milieu PDA et Malt étaient les plus favorables à la croissance de *V. dahliae*. car ce sont des milieux nutritifs de base pour la culture des champignons (Ramualde, 1992; Csöndes *et al.*, 2012). Cette différence est due probablement à leur capital enzymatique qui code pour la synthèse des enzymes métabolisant préférentiellement certains substrats d'origines naturelles (Tlemsani, 2010).

Les résultats obtenus montrent également que la température optimale de croissance des isolats de *V. dahliae* testés est de 25°C. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mercado-Blanco *et al.* (2001) et Nigro *et al.* (2005), qui ont signalé que la température optimale de la croissance mycélienne de *V. dahliae* est comprise entre 21 et 28°C.

D'autres auteurs suggèrent que ces températures jouent un rôle déterminant dans l'expression des symptômes des maladies cryptogamiques *in vivo*. Békési (2007) et Ramualde (1992) ont montré la relation entre le facteur thermique et la pathologie de *V. dahliae*. Ils ont classé les deux pathotypes de *V. dahliae* en fonction de leurs optima thermiques: le pathotype non défoliant dont la croissance mycélienne maximale est comprise entre 21 et 24°C et le pathotype défoliant dont la croissance est comprise entre 24 et 28°C.

Le pH est un autre facteur abiotique qui affecte la croissance mycélienne de *V. dahliae*. Plusieurs travaux ont déduit que le pH optimal de la croissance des isolats de *V. dahliae* est légèrement basique. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Laouane et Lazrek, (2002) qui ont observé que les souches de *V. dahliae* se développent mieux à un pH légèrement basique. En effet, plusieurs travaux rapportent que le métabolisme des champignons est affecté par le pH du milieu. D'après Notteghem *et al.* (1980), à pH acide, la membrane mycélienne est saturée en ions hydrogène, réduisant ainsi le passage des cations, alors qu'à pH basique, les ions hydroxyle se trouvent en excès dans la membrane mycélienne, qui limite le passage des anions vers le compartiment intracellulaire (Notteghem *et al.*, 1980). Par conséquent, le champignon pourrait moduler le pH du compartiment intracellulaire, ce qui confère la neutralité interne nécessaire au fonctionnement des enzymes intracellulaires (Doneche et Pucheu-Plante, 1986; Ravolanirina, 1986). Chez certains champignons phytopathogènes, le pH est considéré l'un des paramètres principaux qui détermine l'agressivité des maladies vasculaires (Lemanceau *et al.*, 1989).

Notre étude a montré que les conditions d'éclairement influencent la croissance mycélienne où le cycle alternatif de lumière et d'obscurité favorise mieux la croissance des isolats testés de *V. dahliae*, cela s'explique par le fait que certaines espèces fongiques sont exigeantes en lumière pour leur sporulation. Une bonne sporulation des champignons nécessite deux phases; une phase de formation des conidiophores favorisée par la lumière, suivie d'une phase de conidiogénèse favorisée par l'obscurité (Douglas, 1972; Boutkhil, 2017). L'analyse de la variance par le test Fisher a montré que les régimes de lumière appliqués influence significativement la croissance mycélienne de *V. dahliae* ( $p < 0,05$ ). Cela explique l'importance et l'effet de la lumière sur la croissance mycélienne de *V. dahliae*.

Quant au test de salinité, les isolats de *V. dahliae* se développent mieux à faible concentration en NaCl, les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de Besri (1980) qui a montré la capacité des isolats de *V. dahliae* à se développer sous des potentiels osmotiques bas, avec une stimulation de la croissance à des concentrations salines faible, qui rappellent celles de nos résultats.

Besri (1980) rapporte qu'une salinité variante entre 0.3 et 3g/l de NaCl favorise la croissance mycélienne de *V. dahliae* et entraînent une multiplication plus intense de ce champignon à l'intérieur des tissus vasculaires de la plante ainsi qu'une manifestation plus grave de la maladie.

D'autre part, l'étude de l'influence des différents facteurs physiologiques sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp. a permis de déterminer les valeurs optimales de chaque paramètre. Les résultats obtenus montrent que le milieu PDA est le milieu le plus adéquat et le plus approprié à la croissance et à la sporulation des isolats de *Trichoderma* spp. testés. De ce fait, il a été retenu pour l'ensemble de nos expérimentations. D'autant plus que ce résultat a été déjà démontré par Robert et Davidson (1986), Samuels *et al.* (2002), Chaverri et Samuels (2003), Freeman *et al.* (2004), Watanabe *et al.* (2005), Park *et al.* (2006), Kumar et Sharma (2011), Samuels *et al.* (2011).

Les tests de température ont montré que la température optimale est 28°C pour l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. testés, ces résultats sont en accord avec ceux de Samuels *et al.* (2002) qui rapportent que la majorité des espèces de *Trichoderma* spp. ont un optimum de croissance compris entre 25°C à 30°C.

De plus, l'effet du pH sur la croissance des isolats de *Trichoderma* spp. est clairement élucidé ou le pH optimale de croissance est de 5, les résultats trouvés sont en corrélation avec ceux de Bastos (2001), Kredics *et al.* (2003), Zaim (2007), Hajieghrari *et al.* (2008) qui ont montré que l'optimum de pH des espèces *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. virens* se situe entre pH 4 et 8. D'autre part, Jackson *et al.* (1991) ont signalé que le pH optimal des espèces *T. harzianum*, *T. koningi*, *T. polysporum* et *T. viridese* situe entre pH 2 et 5. Des études effectuées par Kredics *et al.* (2003) ont montré que des espèces de *Trichoderma* spp. étaient capables de se développer dans une large gamme de pH (2 à 6) avec un optimum de 4.

Par ailleurs, Tous les isolats de *Trichoderma* spp. testés sont qualifiés comme halotolérants, car ils ont pu pousser dans les milieux contenant plus de 0.2 M (Cantrell *et al.* 2006; Gal-Hemed *et al.*, 2011).

Les isolats de *Trichoderma* spp. testés pour leur pouvoir antagoniste par confrontation directe et indirecte ont révélé une réduction significative de la croissance de *V. dahliae* par rapport aux témoins, une différence significative du pourcentage d'inhibition a été enregistrée également entre quelques isolats de *Trichoderma* spp. Cette variation d'inhibition de la croissance du pathogène *V. dahliae* est probablement dû à la différence de vitesse de croissance entre les isolats de *Trichoderma* et à leur haut potentiel de compétition pour les nutriments et l'espace.

La compétition des isolats de *Trichoderma* spp. est étroitement liée à la capacité de dégradation et de production d'antibiotiques et d'enzymes (Chet *et al.*, 1998; Kubicek et Harman, 1998). En outre, lors de la confrontation directe, les isolats T2 et T12 ont montré un pouvoir hautement mycoparasitaire à l'égard de *V. dahliae*, cela est dû à leur aptitude à envahir les colonies du *V. dahliae* et à sporuler au-dessus. D'une autre part, l'étude microscopique de la zone de contact entre les isolats de *Trichoderma* spp. et de *V. dahliae* a révélé la présence d'altération mycélienne de l'agent pathogène, cet altération commence par la formation des cordons mycéliens de *Trichoderma* spp. et son enroulement autour de mycélium du phytopathogène, suivie par une dégradation et libération de son contenu cellulaire. Des observations similaires sont rapportées par Moraga-Suazo *et al.* (2011), Amira *et al.* (2017). En outre, Debbi *et al.* (2018) ont signalé que quatre isolats de *Trichoderma* spp. collectés dans l'Ouest de l'Algérie présentent une activité antagoniste par confrontation directe contre deux isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL) et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL) avec un pourcentage d'inhibition compris entre 62,8 et 70,6 %. De même la confrontation indirecte révèle une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *V. dahliae*. Ceci s'explique par le pouvoir des isolats de *Trichoderma* spp. à produire des substances volatiles qui ont un effet antifongique sur le développement de l'agent pathogène. Aneja *et al.* (2005), Siddiquee *et al.* (2012) rapportent que les espèces de *Trichoderma* spp. sont connues par leur potentiel de production d'une large gamme d'antibiotique. Plusieurs travaux ont montré le pouvoir d'inhibition des substances volatiles des souches de *Trichoderma* spp. à l'égard des souches fongiques phytopathogènes, parmi ces travaux, ceux obtenue par Camporota (1985) qui a trouvé un effet d'inhibition important de *T. viride* par rapport à *T. harzianum* à l'égard de *R. solani* suite à la production des métabolites volatiles. De même, Nos résultats sont en accord avec les études précédentes menées par Carrero-Carrón *et al.* (2016) sur le biocontrôle du flétrissement verticillien chez l'olivier qui ont démontré que trois isolats de *Trichoderma asperellum* ont réduit de manière variable la croissance mycélienne de cinq isolats de *V. dahliae* avec un pourcentage d'inhibition compris entre 21% et 95% après dix jours d'incubation. D'autre part, Ruangwong *et al.* (2021) ont également signalé que les composés volatils (COV) de *T. asperelloides* TSU1 inhibaient la croissance mycélienne de *Corynespora cassicola*, *Fusarium incarnatum*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *N. cubana* et *Sclerotium rolfsii*, avec un pourcentage d'inhibition compris entre 38,88 et 68,33 %. Certains travaux ont signalé que l'atténuation ou la répression de sporulation des pathogènes sont corrélés à l'action de 6-PAP (Pezet *et al.* 1999) produit par les espèces de la section *Trichoderma* spp. (Dodd *et al.*, 2003).

Aneja *et al.* (2005) rapporte que le potentiel d'inhibition de la germination et la croissance mycélienne de *Crinipellis pernicioso* et *Moniliophthora roreri* exercé par *T. harzianum* est dû à la sécrétion d'acide nonanoïque plutôt qu'à la présence de 6- pentyl- $\alpha$ -pyrone (6-PAP), sachant que les deux composés sont connus comme des antibiotiques volatiles. Siddiquee *et al.*, (2012) rapporte également que certains acides gras insaturés volatils produits par des *Trichoderma* spp. sont considéré comme des inhibiteurs de la croissance mycélienne des champignons.

La production de molécules bioactives à effet antifongique a été clairement élucidée par les tests des filtrats des isolats de *Trichoderma* spp. La majorité des filtrats testés à différentes concentrations ont réduit significativement le développement mycélien de *V. dahliae* par rapport au témoin non traité. L'effet inhibiteur du filtrat a évolué en fonction de l'augmentation de la dose utilisée. L'augmentation de l'effet des filtrats de *Trichoderma* spp. en fonction des doses utilisées a été signalée par Tapwal *et al.* (2011) qui ont évoqué également l'effet des différentes concentrations (5%, 10%, 15%, 20%) du filtrat de culture de *T. harzianum* sur la croissance mycélienne d'*A. solani* où la dernière dose (20%) a induit le taux de réduction le plus important (41,70%). De même, Nos résultats sont soutenus par les travaux de Marques Eder *et al.* (2017) qui ont démontré l'effet antifongique des filtrats de *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum*. La plus importante inhibition du pathogène *V. dahliae* est de 36%, a été obtenue avec les filtrats de *Trichoderma brevicompactum* (CEN1245). Jamdar *et al.* (2013) et Isaias *et al.* (2014) ont également observé un taux d'inhibition remarquable à l'égard de *V. dahliae*, en utilisant les filtrats de *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. koningiopsis*.

Dans le même sens, les travaux de Thrane *et al.* (2000) ont démontré que deux souches de *T. harzianum* se sont révélés efficaces dans la réduction de la croissance mycélienne du *V. dahliae*, ils ont signalé que ce pouvoir inhibiteur est dû à la sécrétion des enzymes lytique dans le milieu liquide. L'application des filtrats de culture des isolats testés a révélé l'implication des métabolites secondaires inhibiteurs qui ont un effet toxique et fongistatique sur le développement du *V. dahliae*. Il est donc d'intérêt essentiel d'analyser la composition chimique de ces extraits, ce qui permettrait d'identifier les molécules bioactives d'intérêt de lutte contre ce pathogène et ainsi la valorisation de ces antagonistes comme agents de lutte biologique contre la verticilliose de l'olivier.

Ces résultats indiquent aussi que les isolats *Trichoderma* spp. testés peuvent agir par plusieurs modes d'action en produisant des substances volatiles et d'autre diffusibles, suivie par le phénomène du mycoparasitisme.

La sécrétion des substances diffusibles se manifeste souvent par l'apparition d'une pigmentation jaune caractéristique de l'espèce, cette pigmentation est soupçonnée être des antibiotiques (Kubicek et Harman, 1998).

L'analyse GC-MS des extraits organiques des isolats de *Trichoderma* spp. testés a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs substances volatils de nature diverse tels que ; les alcools, les alcanes, les cétones, les alcènes, les amides, les esters, les composés aromatiques (dérivés phénoliques et benzoïques) et les acides gras. Selon la littérature, certaines molécules identifiées sont dotés de propriétés antifongique, antibactérien et d'autres interviennent dans la promotion de la croissance végétale et l'induction de la résistance.

Certains composés majoritaires détectés correspondent à des composés dotés d'activité antifongique tels que l'acide oléique (acides gras), l'eicosane (alcane) et le 13-Docosenamidoïde, (Z) (amide). L'abondance de ces composés dans les extraits analysés explique le taux d'inhibition élevés de la croissance mycélienne de ces isolats.

Plusieurs travaux menés *in vitro* ont montré l'effet antifongique des acides gras et des acides organiques identifiés. Les acides gras tels que l'acide palmitique et l'acide octadécanoïque (acide stéarique) détectés sont connus pour leur activité antibactérienne et antifongique (Pohl *et al.*, 2011). L'activité antifongique et antibactérienne de l'acide pentadécanoïque (Agoramoorthy *et al.*, 2007), l'acide butanedioïque (Liu *et al.*, 2008 ; Sharma *et al.*, 2016), l'acide dodécanoïque (Altieri *et al.* 2007), l'acide heptadécanoïque (Avis *et al.* 2000), l'acide hexadécanoïque et l'acide octadécanoïque (Banaras *et al.* 2017) ont été rapportées contre divers pathogènes fongiques et bactériens. De même Pohl *et al.* (2011) rapportent que les acides gras (l'acide Palmitique, l'acide octadécanoïque) ont une activité antibactérienne et antifongique. D'autre part, Strobel *et al.* (2011) ont rapporté que deux espèces de *Trichoderma* spp; *T. harzianum* et *T. viride* produisent plusieurs substances volatiles comme l'acide butanoïque, l'acide propanoïque et l'acide hexadécanoïque qui réduisent fortement le développement de certains agents phytopathogènes tel que *Cercospora beticola*, agent responsable de la cercosporiose de la betterave (*Beta vulgaris*), *Sclerotinia sclerotiorum*, agent de la pourriture blanche de la carotte (*Daucus carota*), et *Colletotrichum lagenarium*, agent de l'antracnose du melon (*Cucumis melo*), et du concombre (*Cucumis sativus*). L'acide hexanedioïque, ester dioctyle et l'acide methoxyacétique ont été également identifié, ces deux composés ont une activité antimicrobienne (Rodríguez-Meizoso *et al.*, 2010; Sohrabi *et al.* 2014).

D'autre part, les résultats obtenus montre la capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à produire plusieurs alcanes dotés d'activité antifongique tels que: Hexadecane, Tétradecane, Butane, 2,2-diméthyl, Undecane, 2,8-diméthyl-, Undecane, Heptacosane, Dotriacontane, 1-iodo-, Eicosane, 1-iodo. Les Eicosanes sont connue comme des composés antifongiques (Karanja *et al.* 2012; Nandhini, 2015), l'undecane est connu pour ses propriétés antimicrobiennes (Gibka *et al.*, 2009). L'heptacosane présente également une activité antibactérienne (Marrufo *et al.*, 2013 ; Yogeswari *et al.*, 2012 ; Mihailovi *et al.*, 2011). Tandis que, l'hexadecane est considéré parmi les métabolites volatils qui peuvent stimuler la croissance des plantes, lutter contre les agents pathogènes des plantes, et induire une résistance systémique aux maladies (Ryu *et al.*, 2003; Audrain *et al.*, 2015; Fincheira *et al.*, 2017).

Par ailleurs, des composés alcooliques sont également caractérisés tel que le Phényléthyl alcool qui possède des propriétés antimicrobiennes (Zhao *et al.*, 2011; Fraud *et al.*, 2003; Mo et Sung, 2007; Zhang *et al.*, 2013). Une étude *in vitro* a révélé que le Phényléthyl alcool inhibe la croissance fongique et la synthèse de l'ARN, l'ADN et les protéines de *Neurospora crassa* (Lester, 1965). Le Phényléthyl alcool a été signalée comme une molécule qui présente une forte activité antifongique contre *Ganoderma boninense* (Angel *et al.*, 2016). Cette molécule réduit significativement la croissance fongique et contrôle la pourriture bleue causée par *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* dans les agrumes. (Liu *et al.*, 2014). Des études précédentes ont montré également la capacité des espèces *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. spirale*, et *T. virens* à produire ce composé volatil, les espèces qui libèrent le phényléthyl alcool ont montré une capacité antifongique contre plusieurs agents pathogènes des plantes (Zhu *et al.*, 2011; Stoppacher *et al.*, 2010 ; Siddiquee *et al.*, 2012; Angel *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2014). D'autre alcools sont également détectés tels que le 2-tridécanol qui possède des propriétés antimicrobiennes (Raza *et al.*, 2015). Raman *et al.* (2012) rapportent que les alcools ont des propriétés antifongiques et antibactériennes.

Les dérivés du benzène sont également caractérisés. D'après Burke et Nair (1989) les dérivés du benzène ainsi que les composés oléfiniques substitués (allyl) du benzène sont dotés d'une activité antimicrobienne importante (antifongique et antibactérienne). Shen *et al.* (1996) à son tour révèle la capacité des métabolites du benzène à générer des ROS qui peuvent entraîner une peroxydation des lipides et une cytotoxicité subséquent. Raza *et al.* (2015) rapporte aussi que la majorité des benzènes et les phénols ont une activité antifongique.

Une étude menée par Jeong *et al.* (2017) a montré que l'acide benzoïque possède une activité antifongique contre *Rhizoctonia solani* et *Cladosporium gloeosporoides* avec une concentration minimale inhibitrice de 128µg/ml contre la croissance mycélienne. L'observation microscopique faite par Jeong *et al.* (2017) a révélé que l'acide benzoïque (50µg/mL et 100 µg/mL) provoque des variations morphologiques chez les conidies de *C. gloeosporioides* et inhibe la germination des conidies. De plus, l'acide benzoïque (100µg/mL et 200µg/mL) provoque la lyse des mycéliums de *R. solani*. Il a été constaté que certains hyphes de *R. solani* incubées avec 100 µg/ml d'acide benzoïque présentent des anomalies mycéliennes telles que la dégradation, la déformation et la lyse. La plupart des hyphes de *R. solani* ont été dégradés par une incubation avec 200µg/mL d'acide benzoïque. Un autre dérivé benzenique, l'acide - 1,2-Benzenedicarboxylique a été identifié, ce composé est doté d'activité antifongique (Zhang *et al.*, 2018). Kavitha *et al.*, (2010) rapporte que l'acide 1,2-benzenedicarboxylique a une activité antimicrobienne.

L'undecène qui fait partie des alcènes a été également détecté, il possède des propriétés antibactériennes et antifongiques (Dandurishvili *et al.*, 2011; Hunziker *et al.*, 2015). Le 3-Heptanone, 6-méthyl- qui est un cétone a été également produite par l'isolat T12, cette molécule est dotée d'une activité antifongique (Gershon *et al.*, 1971).

Le limonène qui est un monoterpène a été également détecté, cette molécule est considérée comme un médiateur de la croissance végétale conduit à un changement de la concentration de chlorophylle et la taille des plantes (Ryu *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2015).

L'isolat T2 s'est montré capable de produire des koningines, dans une étude similaire menée par Vinale *et al.* (2014) ont démontré que Pyrones, koninginins (complex pyrans), les composés azoté hétérocyclique, ainsi que les butenolides, hydroxy-lactones, diketopiperazines, peptaibols ont été caractérisés et signalés comme étant des métabolites à un effet antifongique produits par le genre *Trichoderma*.

Une autre molécule antifongique appartenant à la famille des stilbènes a été également détecté dans l'extrait hexanique de l'isolat T9, il s'agit de 2,3-diphénylcyclopropyl) méthyl phenyl sulfoxide. Cette molécule a été caractérisé pour la première fois comme étant un métabolite fongique, Les stilbènes sont fréquemment produite par les plantes et font partie des phytoalexines. Les stilbènes présentent des activités antifongiques, jouent un rôle important dans les mécanismes de défense contre les pathogènes des plantes (Lambert, 2011). Ils sont aussi capables d'inhiber la germination des spores et la croissance de champignons pathogènes (Pezet et Pont, 1988).

D'autres molécules volatiles antifongiques sont décelés tel que le citral qui est un monoterpène. Cette molécule rompt la paroi cellulaire, elle pénètre à travers la membrane cellulaire et interagit avec les organites cellulaires. Arlorio *et al.* (1992) ont observé la rupture des parois cellulaires des champignons lors de l'exposition au citral. Li *et al.* (2014) rapporte que le citral inhibe significativement la croissance mycélienne, la formation et la germination des conidies, ainsi que la formation d'appressoriums de *M. grisea*. Le citral est capable de causer des dommages importants aux parois cellulaires des hyphes de *M. grisea* et provoque la lyse cellulaire.

La molécule 7-epi-Nemorosone découverte pour la première fois chez isolat T12 de notre collection des espèces de *Trichoderma* spp, qui est un alcaloïde. Cette molécule a été découverte chez certaines espèces de plantes médicinales et elle est doté d'activité antitumorale et antioxydante (Cuesta Rubio *et al.*, 2002) et antibactérienne (Rojas *et al.*, 2001). Donc un sérieux travail de recherche pourra être développé sur cette souche sur un autre axe de recherche.

## Chapitre II. Screening qualitatif de l'activité enzymatique des isolats de *Trichoderma* spp.

### 1. Matériel et méthodes

Les isolats de *Trichoderma* spp. sont testés pour leur potentiel de production d'enzymes d'intérêt dans la lutte contre les phytopathogènes comme les chitinases, les protéases et les glucanases et d'autres enzymes d'intérêt industriel tels que les cellulases, les amylases, les pectinases et les lipases. La production de chaque enzyme a été mise en évidence sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme source de carbone.

Pour chaque test enzymatique, un disque gélosée de 6 mm de diamètre provenant de cultures âgées de 7 jours de *Trichoderma* spp. est inoculé au centre de la boîte de Pétri.

L'évaluation de l'activité enzymatique a été effectuée en mesurant le halo d'hydrolyse autour des colonies ou la zone de variation et l'intensité de couleur de l'indicateur de pH (Cherukupally *et al.*, 2017). Cette activité est estimée selon l'échelle suivante:

- aucune activité enzymatique n'a été montrée par Les isolats de *Trichoderma* spp;
- + une activité enzymatique très faible
- ++ une activité enzymatique faible
- +++ une activité enzymatique importante
- ++++ une activité enzymatique très importante

#### 1.1. Production d'enzymes lytiques et métabolites d'intérêt (CWDE)

##### 1.1.1. Production des chitinases

###### 1.1.1.1. Préparation de la chitine colloïdale

La chitine est un polysaccharide insoluble dans l'eau et les solvants organiques, pour assurer une répartition homogène en suspension ou sur milieu gélosé, elle doit être reconstituée en chitine colloïdale. Un protocole modifié de Murthy et Bleakley (2012) a été adopté pour la préparation de la chitine colloïdale.

La chitine se dissout dans l'acide chlorhydrique concentré, la technique consiste à ajouter 300ml d'HCl concentré ~ 12M à vingt grammes de poudre de chitine sous agitation continue pendant 10 heures, l'ajout de l'HCl se fait lentement dans un bécher en verre de 1L, sous une hotte chimique à température ambiante (25°C). La suspension obtenue a été traitée avec 2 litres d'eau distillée refroidie, puis incubée pendant une nuit à 4°C pour précipiter la chitine colloïdale. Après précipitation, la suspension est passée à travers deux couches de papier filtre, logés dans un entonnoir.

Le filtrat retenu dans le papier filtre est suffisamment lavé avec de l'eau distillée jusqu'à neutralisation du pH et la chitine colloïdale obtenue a été pressée entre deux papiers filtres (pour éliminer l'humidité supplémentaire), stérilisée, puis conservée à 4°C (Murthy and Bleakley, 2012).

La production des chitinases par les isolats de *Trichoderma* spp. a été étudiée selon la méthode préconisée dans plusieurs travaux (Agrawal et Kotasthane 2012, Cherukupally *et al.* 2017 et Bedine Boat *et al.* 2020). Cette activité a été évaluée sur un milieu contenant la chitine colloïdale comme une seule source de carbone additionnée du pourpre de bromocrésol. Le pH du milieu est ajusté à 4,7. Les disques de *Trichoderma* spp. sont inoculés au centre de la boîte de Pétri. Après une période d'incubation de 2-3 jours à 28 °C, le changement de couleur du jaune au violet pourpre indique l'utilisation de la chitine autour des colonies de *Trichoderma* spp. suite à l'augmentation du pH. L'intensité de la couleur et le diamètre de la zone de couleur pourpre sont prisent comme des critères pour déterminer la production des chitinases.

### **1.1.2. Production des protéases**

La production des protéases par les isolats de *Trichoderma* spp. a été mise en évidence sur un milieu solide contenant du lait écrémé considéré comme source de protéine (Annexe 2). Après incubation à 28°C pendant 3 à 4 jours, l'apparition d'un halo clair autour les isolats de *Trichoderma* indique l'hydrolyse du lait écrémé, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (Berg *et al.*, 2002; López *et al.*, 2019).

### **1.1.3. Production de la $\beta$ -1,3-glucanase**

Pour la production des glucanases par les 15 isolats de *Trichoderma* spp. un milieu synthétique minéral a été utilisé (MSM ; annexe 2) additionné de la farine d'orge comme source de carbone (Teather et Wood, 1982). Après inoculation des disques des isolats de *Trichoderma* spp. au centre de la boîte de Pétri et une incubation à 28°C pendant 3 jours, la révélation l'enzyme a été réalisée par l'ajout de 5 ml d'une solution iodée (1% KI; 0,5% I<sub>2</sub> (v/v)). L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la production des glucanases.

### **1.1.4. Production des cellulases**

La production des cellulases est mise en évidence sur un milieu contenant la cellulose microcristalline (CMC) (Kausar *et al.*, 2010; Kamala et Indira Devi, 2011; Cherukupally *et al.*, 2017).

Un disque de 6 mm de chaque isolat de *Trichoderma* spp. est ensemencé au centre de la boîte de Pétri. Après 3 jours à 28°C. Les cultures sont traitées avec 5 ml d'une solution de rouge Congo pendant 15 min, puis inondées par une solution de NaCl (1M) pendant 1 min. La dégradation de la cellulose a été visualisée sous forme d'une zone jaune claire autour de la colonie fongique. Les diamètres des zones d'hydrolyse sont mesurés pour sélectionner les meilleures souches cellulolytiques.

#### **1.1.5. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

La production de l'acide cyanhydrique est étudiée selon la méthode de Bakker et Schipper (1987). Le milieu TSA additionné de la glycine (4,4g/l) (Annexe 2) a été ensemencé en stries serrées par les cultures des différents isolats de *Trichoderma* spp. Un disque de papier Whatman (N°42 et 9 cm de diamètre) est imbibé et imprégné par une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) et déposé à l'intérieur du couvercle de la boîte. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 96 h. La variation de la couleur du papier Whatman du jaune à brun rougeâtre indique la production de l'HCN. Cette production a été évaluée selon la classification de Ghodsavali et al., (2013):

Jaune : Pas de production (0) ;

Crème : Production faible (1) ;

Marron clair : moyenne (2) ;

Marron foncé : haute capacité (3) ;

Brun rougeâtre : production très élevée d' HCN (4).

### **1.2. Etude de l'endophytisme**

#### **1.2.1. Production des pectinases**

La production des pectinases a été évaluée selon la méthode de Hankin et Anagnostakis, (1975) sur milieu solide (pH 5,5) (Annexe 2). Après trois jours d'incubation, les cultures ont été inondées avec une solution iodée (5g de KI ; 1g de I<sub>2</sub> pour 330ml d'eau distillée). L'apparition d'une zone jaunâtre claire autour de la colonie indique la production des pectinases.

#### **1.2.2. Production des amylases**

La capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à produire des amylases a été déterminée sur milieu gélosé à base d'amidon (Abe et al., 2015) (Annexe 2). Après 3 jours d'inoculation des disques de *Trichoderma* spp. et la mise en incubation à 28°C pendant 3 jours, les boîtes sont traitées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0,5% I<sub>2</sub> (v/v)) pendant 15 minutes.

La production des amylases se traduit par la formation d'un halo jaune clair autour de la colonie pour chaque isolat.

### **1.2.3. Production des lipases**

La production qualitative des lipases a été mise en évidence sur un milieu de culture contenant du Tween 20 (polyoxy-éthylène-sorbitan-monolaurate) comme un substrat lipidique (Annexe 2) (Abe *et al.*, 2015). Après 2 à 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes ont été placées à 4°C pendant 12 heures, avant la lecture des résultats (Hankin et Anagnostakis, 1975). La production des lipases se traduit par l'apparition des précipités de laurâte de calcium ou d'un halo blanc opaque autour des colonies.

## **1.3. Dosage des activités enzymatiques**

L'objectif de cette partie est de mesurer l'activité chitinolytique, protéolytique et cellulotique sur milieu liquide chez quelques isolats de *Trichoderma* spp.

### **1.3.1. Activité protéolytique**

L'activité protéolytique a été mesurée sur un milieu contenant la caséine comme substrat inducteur des protéases. La culture a été réalisée dans des erlens de 250ml, contenant 50 ml de milieu de culture, ces derniers ont été inoculés par la suspension sporale des isolats testés ( $10^7$  spores/ml) et mise sous agitation à 150rpm pendant 5 jours à 28°C. Les filtrats obtenus ont été centrifugés à 9500 rpm pendant 15 min, 500 µl de chaque surnageant des filtrats centrifugés est ajouté à 1.25 ml de la caséine à 1% dissoute dans un tampon phosphate (pH 10). Le mélange est incubé à 40°C pendant 30 min. ensuite, la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 3ml d'une solution d'acide Trichloroacétique (0.19M), le mélange réactionnel est incubé une autre fois à 40°C pendant 15 min, puis centrifugé de nouveau à 9500 rpm pendant 10min, après centrifugation, 500 µl de chaque surnageant est ajouté à 2.5 ml de NaCO<sub>3</sub> (0.4M) et 250 µl du réactif Folin Ciocalteu's. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable de libérer 1 µg de tyrosine par ml en 60 min. Les concentrations sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage par la mesure de la densité optique à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### **1.3.2. Activité Endoglucanase**

Cette activité a été mesurée dans un volume de 1 ml contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique et 0,5ml d'une solution tampon citrate (0.1M) ajusté à un pH de 4.8, un volume de 0.5ml d'une solution de CMC (carboxyméthyl-cellulose) à 1% (W/V) a été ajouté. Ce mélange réactionnel a été incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérée de l'hydrolyse du carboxyméthyl-cellulose a été mesurée (Miller, 1959) par colorimétrie (DNS) (Annexe 5). L'absorbance a été déterminée à 540nm, La concentration en sucres réducteurs correspondants a été évaluée à partir d'une courbe d'étalon de glucose dont les concentrations varient de 0 -0.027M. Une unité de l'activité enzymatique (UI/ml) est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par ml d'enzyme.

### **1.3.3. Dosage de l'activité chitinolytique**

Les isolats de *Trichoderma* spp. qui ont montré une zone d'hydrolyse importante de la chitine sur milieu solide ont été choisis pour évaluer leur activité chitinasique. La méthode utilisée est celle de Miller (1959), elle consiste à mesurer la quantité de N-acétylglucosamine libérée (GlcNAc) à partir du substrat colloïdal (El-Sobky *et al.*, 2019). Des cultures liquides ont été préparées, trois disques de 6 mm de diamètre ont été prélevés dans des conditions aseptiques et mis en culture dans des Erlenmeyers contenant 50 ml du milieu de culture synthétique (Annexe 2). La multiplication de l'inoculum se fait sous agitation continue à raison de 150 tours/min à la température 28°C pendant 5 jours. Le mélange réactionnel est composé de 1 ml d'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 1 ml de chitine dans un tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 5,0) (Annexe 5). Le mélange est incubé dans un Bain Marie agitateur pendant 1 heure à 37°C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, 1 ml du surnageant a été prélevé et rajouté à 3 ml du réactif DNS. Le tout est porté au Bain Marie à 100°C pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 585 nm. La quantité de sucres réducteurs libérés est calculée à partir du courbe étalon du N- Acétyle- Glucosamine (GlcNAc) (Toharisman *et al.*, 2005). Une unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de 1  $\mu$ mol de N- acétylglucosamine par ml en 1 min, dans ces conditions.

## **1.4. Purification partielle des chitinases**

### **1.4.1. Production des chitinases sur milieu liquide**

La production des chitinases par l'isolat T2 a été réalisée sur milieu liquide contenant la chitine colloïdale (Annexe 2). Une suspension sporale (0,5ml) concentrée à  $10^7$  spore/ml de cryptogame est inoculée dans le milieu retenu.

La préparation ainsi formée est maintenue sous agitation continue (140 tours/min) durant 5 jours à 28°C. L'inoculum obtenu est centrifugé à 9500 rpm pendant 15 min puis filtré en utilisant un filtre seringue dont le diamètre des pores est de 0,45 $\mu$ m (Issa, 2016).

Le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut. La purification partielle de l'enzyme passe par deux étapes: une précipitation fractionnée des enzymes par le sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) et une dialyse à membrane semi perméable.

#### **1.4.2. La mise en évidence de l'activité antifongique des chitinases**

L'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae* a été déterminée après 4 jours d'incubation à 28°C d'une culture de phytopathogène aditionnée d'une solution enzymatique de chitinase titrée à 0,077U/ml et à 0,155U/ml de l'isolat T2 partiellement purifié (Saito *et al.* 2011). Dans les mêmes conditions, une culture témoin de *V.dahliae* est conduite parallèlement avec une solution tampon stérile au lieu de l'extrait enzymatique. Le test est réalisé en triplicata et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est obtenu par la formule suivante:

$$\%I = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

**I** (%) représente l'inhibition moyenne de la croissance mycélienne,

**R1** est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de l'extrait enzymatique.

**R2** est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de l'extrait enzymatique

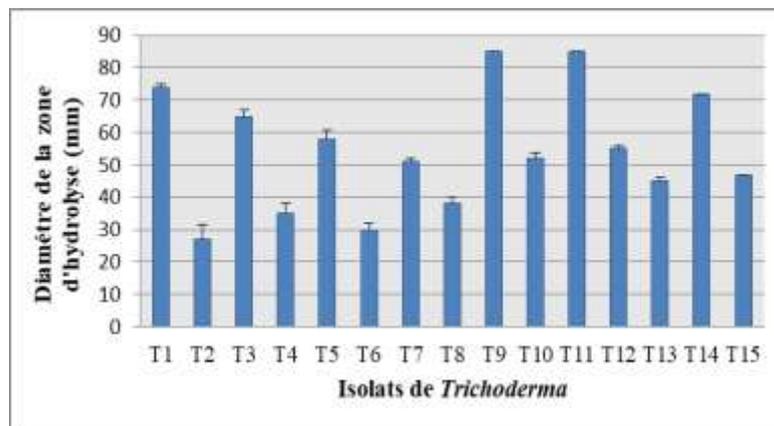
## 2. Résultats

La production d'enzymes extracellulaires à partir des souches fongiques par la méthode de diffusion radiale en milieu solide a été évaluée par des tests qualitatifs. Ces tests ont permis de tester le potentiel de production enzymatique par les isolats de *Trichoderma* spp.

### 2.1. Enzymes et métabolites d'intérêt dans la lutte biologique

#### 2.1.1. Production des protéases

Les résultats des mensurations des zones d'hydrolyse de la caséine par les onze isolats de *Trichoderma* spp. sont consignés sur la figure 45.

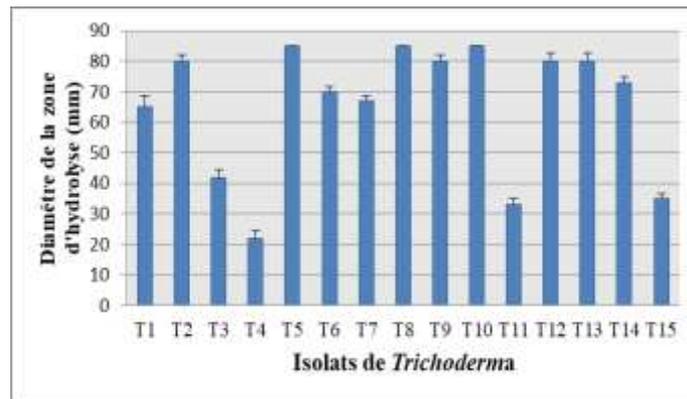


**Figure 45.** Les diamètres des zones d'hydrolyses de la caséine du lait observés chez les isolats de *Trichoderma* spp. après 3 jours d'incubation à 28°C.

Les résultats obtenus (Figure 45) révèlent la capacité de tous les isolats de *Trichoderma* spp. testés à produire des protéases. En effet, après 3 jours d'incubation à 28°C, des diamètres des zones d'hydrolyses mesurés varient entre 27mm et 85mm. Les isolats T1, T3, T5, T7, T9, T10, T11, T12, T13, T14 et T15 ont montré des diamètres d'inhibition supérieurs à 44 mm. Les isolats restants ont montré de faibles diamètres de zones d'hydrolyse ( $\leq 38$ mm). La production des protéases extracellulaires par nos souches est un point à exploiter dans la production et la caractérisation de ces espèces fongiques.

#### 2.1.2. Production des chitinases

Les résultats des mensurations des zones d'hydrolyse de la chitine par les onze isolats de *Trichoderma* spp. testés sont portés sur le graphique de la figure 46.

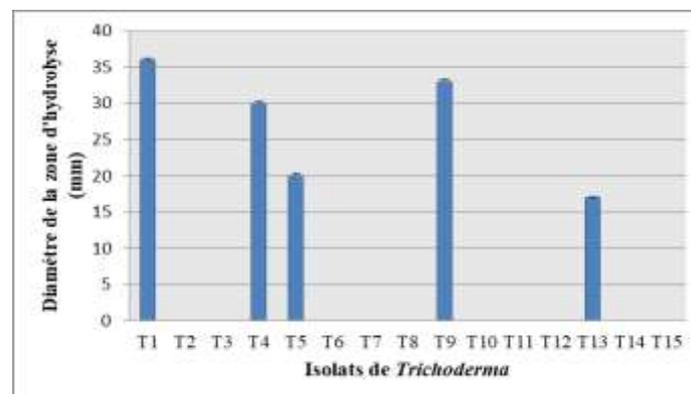


**Figure 46.** Production des chitinases par les isolats de *Trichoderma* spp. (en mm) sur milieu à base de la chitine colloïdale après 3 jours d'incubation à 28°C.

Les résultats mentionnés dans la figure 49 indiquent une production de chitinases chez toutes les souches testées. Néanmoins, la meilleure hydrolyse est observée pour les isolats T2, T5, T6, T8, T9, T10, T12, T13 et T14 avec des diamètres de zones d'inhibition s'étendant entre 70 mm et 85 mm. Le reste des isolats hydrolysent modérément la chitine, en montrant des diamètres d'inhibition variant de 22 mm à 67 mm (Figure 49).

### 2.1.3. Production des glucanases

Les résultats relatifs à la production des glucanases par les isolats retenus sont enregistrés sur le graphique de la figure en ci-dessous

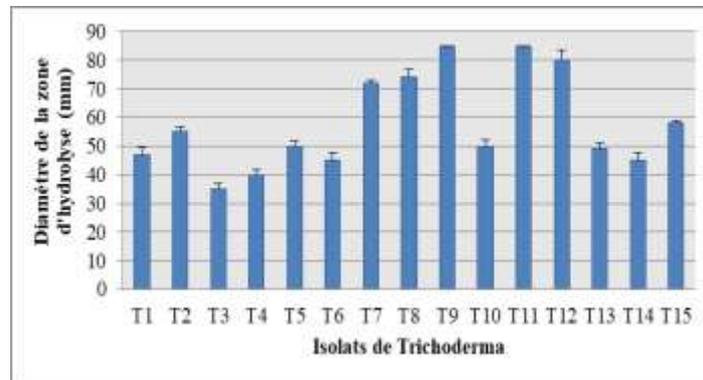


**Figure 47.** Production des glucanases par les isolats de *Trichoderma* spp. (en mm) sur milieu à base de la farine d'orge après 3 jours d'incubation à 28°C.

Sur l'ensemble des isolats testés, seuls T1, T4, T5, T9 et T13 ont présenté une activité glucannasique avec des diamètres d'inhibition oscillant entre 17 mm et 36 mm (Figure 49). La plus forte inhibition est observée pour l'isolat T1 et la plus faible est enregistrée pour l'isolat T13.

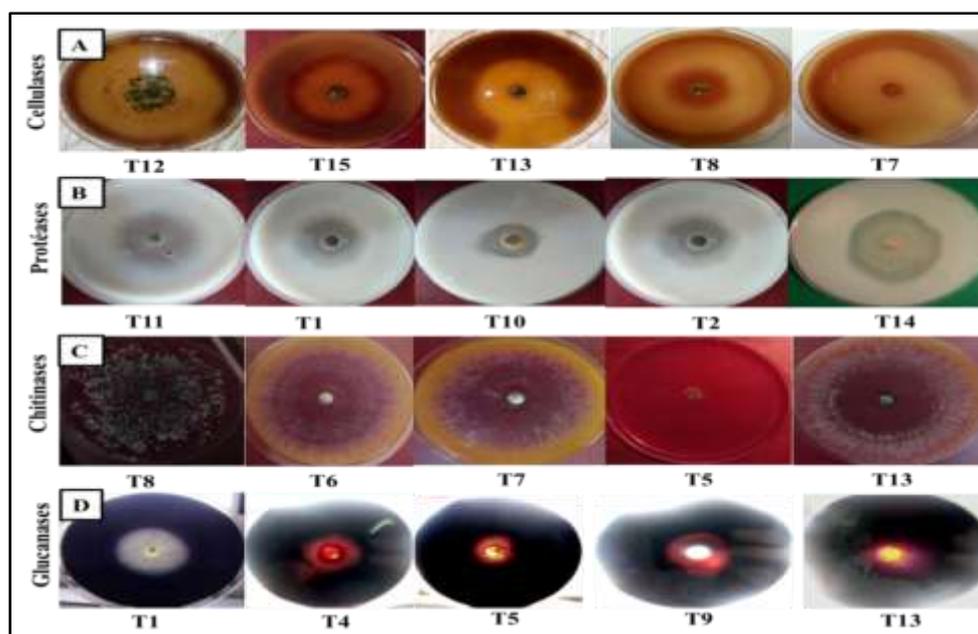
### 2.1.4. Production des cellulases

Les résultats de la dégradation de la cellulose par les isolats de *Trichoderma* spp. sont illustrés sur le graphique de la figure 48.



**Figure 48.** Production des cellulases par les isolats de *Trichoderma* spp. (en mm) sur milieu à base de cellulose après 3 jours d'incubation.

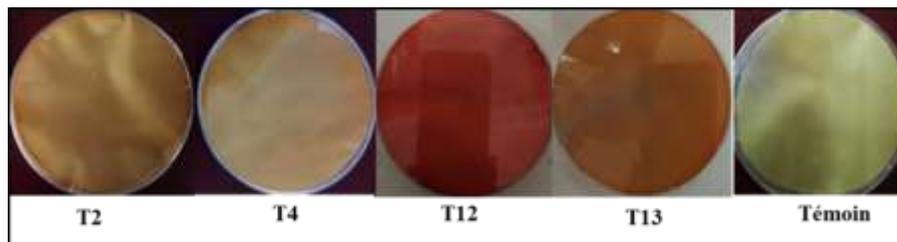
Tous les isolats de *Trichoderma* spp. testés ont montré leur capacité de production des cellulases, cette production se traduit par la présence d'une zone jaune claire autour des colonies dont les diamètres ont été différents d'un isolat à un autre (Figure 49). Les 5 isolats de *Trichoderma* spp. T7, T8, T9, T11 et T12 se sont montrés les plus producteurs avec des diamètres de 72mm, 74mm, 85mm, 85mm et 80mm respectivement. Par contre, l'isolat T3 possède une activité cellulolytique faible avec un diamètre qui ne dépasse pas 35mm.



**Figure 49.** Photos originales qui montrent les différentes zones d'hydrolyse observées après production des cellulases (A), protéases (B), chitinases (C) et glucanases (D) par les isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu solide.

### 2.1.5. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

Le criblage qualitatif de la production de l'HCN a révélé que les isolats de *Trichoderma* spp. étaient capables de produire le HCN, la quantité produite diffère d'un isolat à un autre car il y avait un changement de couleur du papier wattman du jaune à brun rougeâtre. L'isolat T12 produisait plus de HCN que les autres isolats vu la couleur rouge foncé qui a été observé sur le papier Wattman après 7 jours d'incubation (Figure 50). Cependant, une production moyenne de HCN a été notée pour les isolats T2, T4 et T13 avec un virage de la couleur du papier Wattman du jaune claire au crème.

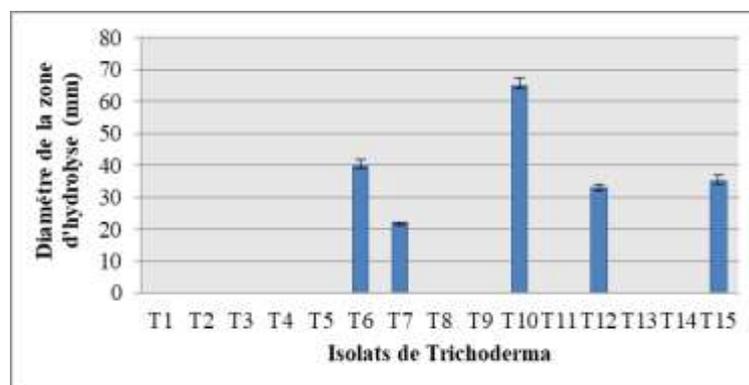


**Figure 50.** Production d'HCN par les isolats de *Trichoderma* spp., évaluée selon la couleur du papier Wattman observée par rapport au témoin (Photos originales).

## 2.2. Enzymes liées à l'endophytisme

### 2.2.1. Production des amylases

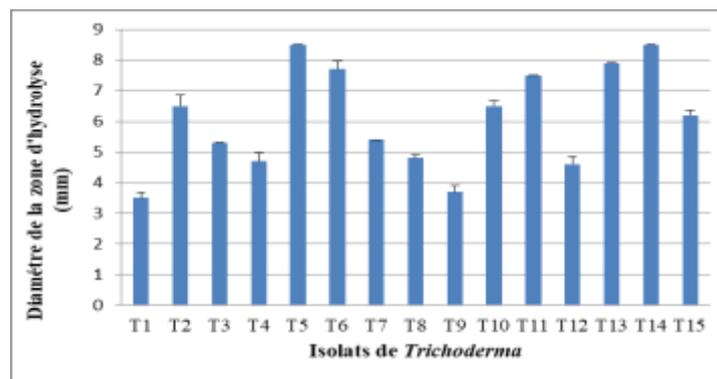
La production des amylases a été révélée par la présence d'un halo jaune clair autour des disques inoculés au centre de boîtes de Pétri. Les résultats obtenus ont montré que, sur les 15 souches de *Trichoderma* testées, 5 isolats sont dotées d'une activité amylolytique. Les deux isolats T6 et T10 possède une bonne aptitude à dégrader l'amidon présent dans le milieu en développant des zones de dégradation de diamètre 40mm et 65mm respectivement. Les zones d'hydrolyse de l'amidon montré pour les isolats T12 et T15 sont moyenne, elles sont estimées à 33mm et 35mm respectivement. Par contre, la plus faible activité amyolasique a été observée chez l'isolat T7 avec un diamètre d'hydrolyse de 22mm (Figure 51).



**Figure 51.** Production des amylases par les isolats de *Trichoderma* (en mm) sur milieu à base d'amidon après 3 jours incubation.

### 2.2.2. Production des pectinases

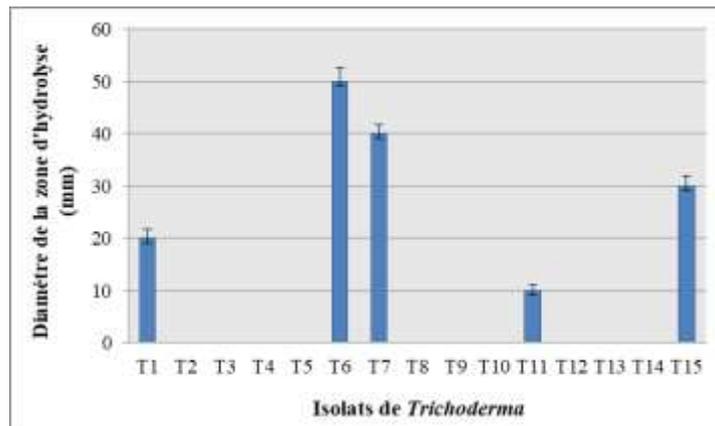
Les résultats obtenus ont montré que la production des pectinases a été positive pour l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. avec des diamètres des zones de lyse variables d'un isolat à un autre. Ces variations s'étendent de 35 mm à 85 mm, l'isolat T5 et T14 ont montré une activité pectinase très importante avec un diamètre d'hydrolyse de 85mm. Les deux isolats T2 et T10 ont révélés une zone d'hydrolyse jaune claire de 65 mm sur le milieu solide. Alors que, l'isolat T1 a une capacité de dégradation moins importante dont le diamètre d'hydrolyse est de 35mm (Figure 52).



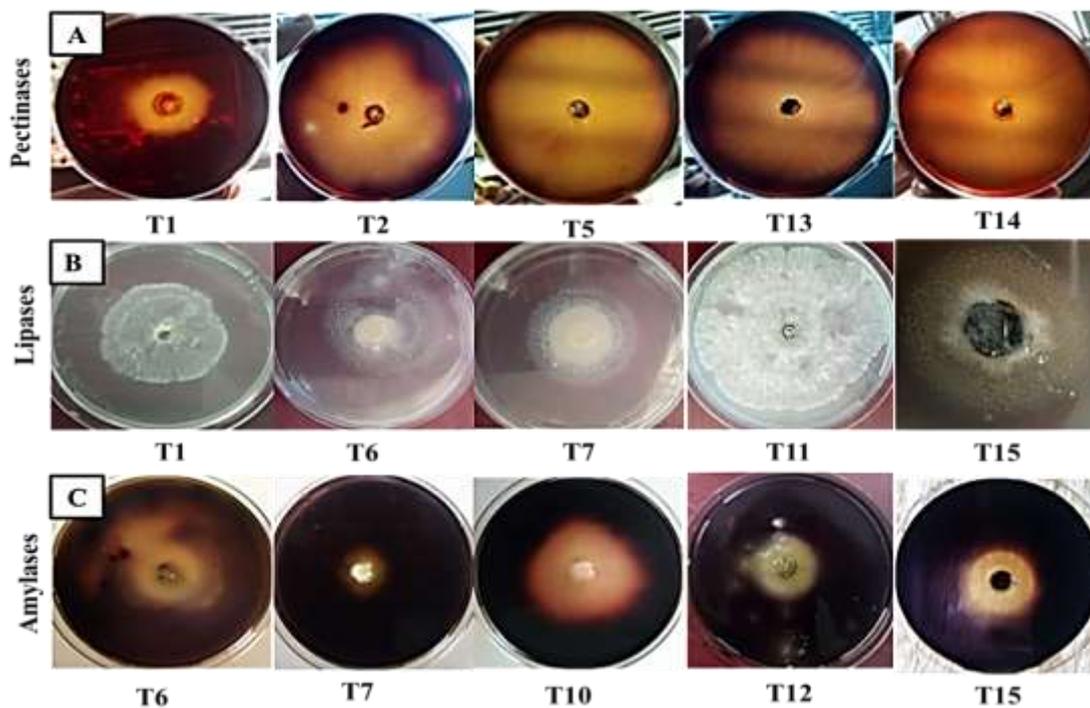
**Figure 52.** Production des pectinases par les isolats de *Trichoderma* spp. (en mm) sur milieu à base de pectine après 3 jours incubation à 28°C.

### 2.2.3. Production des lipases

Les résultats obtenus ont montré que sur l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. cinq isolats seulement ont présenté une activité lipolytique traduite par la production de précipités de lauréate de calcium provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'ester et de l'acide laurique autour des colonies sur le milieu de culture contenant du Tween 20 comme un substrat lipidique (Figure 53). L'activité estérasique a été plus importante chez les isolats T6, T7 et T15 dont le diamètre des précipités est de 50mm, 40mm et 30 mm respectivement. Pour les deux isolats T1 et T11, cette activité est moins importante avec formation des précipités de 20mm et 10 mm respectivement, les autres isolats sont jugés non producteur des lipases.



**Figure 53.** Formation des précipités de lauréate de Calcium autour des colonies de *Trichoderma* après 3 jours d'incubation.



**Figure 54:** Production des pectinases (A), lipases (B) et amylases (C) enregistrée chez quelques isolats de *Trichoderma* spp. après 3 jours d'incubation à 28 °C (Photos originales). Un tableau récapitulatif qui résume les différentes activités enzymatiques testées sur les 15 isolats de *Trichoderma* spp. a été établie (voir tableau 17).

**Tableau 17.** Tableau récapitulatif des résultats des différents tests enzymatiques qualitatifs évalués sur milieu solide chez les isolats de *Trichoderma* spp. testées capables de produire des enzymes extracellulaires

Isolats de <i>Trichoderma</i>	Activité enzymatique						
	Chitinase (3 jours)	Protease (3 jours)	Glucanase (3 jours)	Lipase (3jour)	Amylase (3 jours)	Cellulase (3jours)	Pectinase (3jours)
<b>T1</b>	+++	++++	++	++	-	+++	++
<b>T2</b>	++++	++	-	-	-	+++	+++
<b>T3</b>	+++	+++	-	-	-	++	+++
<b>T4</b>	++	++	++	-	-	+++	+++
<b>T5</b>	++++	+++	++	-	-	+++	++++
<b>T6</b>	++++	++	-	+++	+++	+++	++++
<b>T7</b>	+++	+++	-	+++	++	++++	+++
<b>T8</b>	++++	++	-	-	-	++++	+++
<b>T9</b>	++++	++++	++	-	-	++++	++
<b>T10</b>	++++	+++	-	-	+++	+++	+++
<b>T11</b>	++	++++	-	+	-	++++	++++
<b>T12</b>	++++	+++	-	-	++	++++	+++
<b>T13</b>	++++	+++	++	-	-	+++	++++
<b>T14</b>	++++	++++	-	-	-	+++	++++
<b>T15</b>	++	+++	-	+++	++	+++	+++

A la vue des résultats affichés sur le tableau 17, il ressort clairement que l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. testés ont montré leurs pouvoir de production des enzymes hydrolytiques d'intérêt dans la lutte biologique tels que les chitinases, les protéases, les cellulases et les pectinases avec des intensités de production variables d'un isolat à un autre. Concernant les lipases et les amylases, enzymes impliqués dans les mécanismes d'endophytisme n'ont été produites que par 5 isolats. L'utilisation des différents substrats par la plus part des souches de *Trichoderma* spp. Ceci pourrait suggérer la présence de nombreux enzymes chez une même souche, dont l'induction de la synthèse est influencée en grande partie par la composition de milieu de culture utilisé.

### 2.3. Relations entre les différentes activités enzymatiques étudiées liées au mode d'action de *Trichoderma* spp.

Les associations entre la production des enzymes d'intérêt de lutte (CWDE) (chitinases, protéases et glucanases) testées sur milieu solide sont étudiées. Les valeurs des coefficients de corrélations calculées ont montré une corrélation significative entre la production des chitinases et les glucanases ( $r=0,864$ ), une corrélation positives a été également notée entre la production des chitinases et les protéases ( $r= 0,731$ ). Cependant, L'analyse des résultats de la production des protéases et des glucanases montre une corrélation faible ( $r= 0,313$ ). Le tableau 18 représente la matrice de corrélation entre les différentes enzymes.

**Tableau 18.** Matrice de corrélation calculée sur le paramètre de la production des trois activités enzymatique.

Variables	Chitinases	Protéases	Glucanases
<b>Chitinases</b>	1		
<b>Protéases</b>	<b>0,731</b>	1	
<b>Glucanase</b>	<b>0,864</b>	0,313	1

La corrélation positive observé entre les chitinases et les autres enzymes de dégradation peut nous renseigner sur les mécanismes d'action, donc l'enzyme qui interviennent en premier lieu est la chitinase afin de dégrader la première barrière des champignons phytopathogènes (parois de nature chitineuse, très rigide et complexe) puis viennent en deuxième position les autres enzymes (glucanases et les protéases) qui vont intervenir dans la dégradation des autres composés plus simple; les glucanes et les protéine de la paroi cellulaire.

#### 2.4. Détermination des activités enzymatiques des isolats de *Trichoderma* spp.

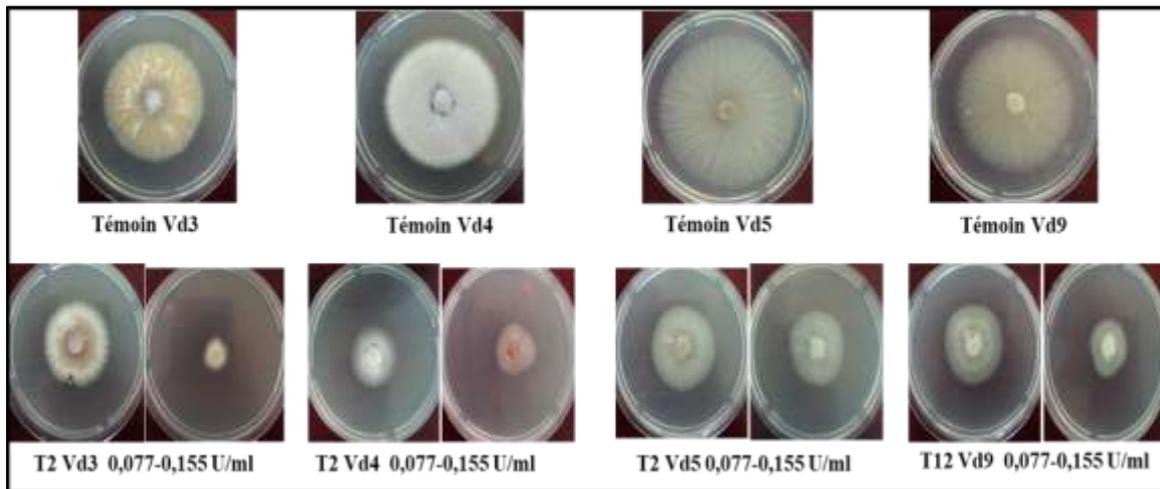
Les résultats de la production des enzymes hydrolytiques (chitinases, cellulases et protéases) par les isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu liquide additionné de la source de carbone appropriée de l'enzyme à produire sont représentés dans le tableau 19. Les isolats de *Trichoderma* ont montré des activités chitinolytiques et protéolytiques plus au moins différentes, les valeurs les plus élevées en protéase et chitinase sont enregistrées par les deux isolats T6 et T2 avec une production estimée à 0,019 U/ml et 0,043 U/ml respectivement. Les isolats T4 et T10 présentent une activité protéolytique moyenne de 0,016U/ml et 0,017U/ml respectivement. En outre, Les activités chitinolytiques obtenues par T10 et T7 sont de l'ordre de 0,034 et 0,017 U/ml respectivement. Alors que, les isolats T9 et T12 ont montré une activité chitinolytique faible estimée à 0,01U/ml et 0,005U/ml respectivement. Cependant, l'activité cellulolique la plus importante a été enregistrée par l'isolat T4 (1.53U/ml) suivie par les deux isolats T10 et T11 qui ont montré une activité estimée à 0.54 U/ml et 0.55U/ml respectivement.

Tableau 19: Dosage des activités enzymatiques

Activité Isolats	Activité chitinase ( $\mu\text{mol/ml/min}$ )	Activité proteolytique ( $\mu\text{mol/ml/min}$ )	Activité cellulosique ( $\mu\text{mol/ml/min}$ )
T1	-	0.015	0.23
T2	0,043	0.015	0.30
T3	-	0.015	0.17
T4	-	0,016	1.53
T5	-	0.015	0.47
T6	-	0,019	0.53
T7	0,017	0.015	0.31
T8	-	0.015	0.25
T9	0,01	0.015	0.29
T10	0,034	0,017	0.54
T11	-	0.015	0.55
T12	0,005	0,015	0.41
T13	-	0.015	0.16
T14	-	0.014	0.20
T15	-	0.014	0.4

### 2.5. Activité antifongique des chitinases *in vitro*

Les résultats de l'activité antifongique des chitinases purifiés partiellement à partir du filtrat de l'isolat T2 de *Trichoderma* spp. (offre le meilleur taux de production : 0.043U/ml) ont montré que la solution enzymatique a fortement inhibé et réduit la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae*. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne varie en fonction des concentrations enzymatiques testées. Cependant, le traitement qui a été effectué avec une concentration enzymatique de 0,077U/ml a donné une réduction de la croissance mycélienne de 25.49%. 43.63%. 51.42% et 41.93% contre les isolats de *V. dahliae* Vd3, Vd4, Vd5 et Vd9 respectivement. Cependant, le traitement avec une solution de concentration plus élevée 0,155U/ml a révélé une inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae* comprise entre 38.57 et 68.62% (Figure 55). Cette concentration a donnée des différences significatives entre les lots traités et le témoin. La figure ci-dessous illustre l'effet de la chitinase à 0,077U/ml et 0,155 U/ml sur la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae* testés.



**Figure 55.** Effet des chitinases purifiées partiellement sur la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae* (Vd3, Vd4, Vd5, Vd9) (Photos originales).

### 3. Discussion

L'étude des activités enzymatiques *in vitro* a montré la capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à produire des chitinases, des protéases, des cellulases et des glucanases. Les isolats de *Trichoderma* ont un potentiel de mycoparasitisme à l'égard des agents pathogène grâce à la production de certaines enzymes hydrolytiques impliqués dans la destruction de l'intégrité de la paroi fongique (CWDE). Des résultats similaires sont observés par Bekkar *et al.* (2016) qui ont mis en évidence le potentiel des espèces du *Trichoderma* spp. à produire des chitinases, cellulases, protéases, amylases et lipases. Plusieurs auteurs évoquent l'intérêt de biocontrôle de ces enzymes entre autre Elad et Kapat (1999) qui rapportent que la production de cellulase, lipase et pectinase par *Trichoderma* spp. est associée au biocontrôle des agents phytopathogènes. En outre, selon Howell (2003) et Harman *et al.* (2004) les protéases, les chitinases et/ou des enzymes glucanases détruisent les polysaccharides de la paroi fongique; la chitine, et les  $\beta$ - glucanes qui assurent la rigidité et l'intégrité des parois des cellules fongiques (Kim et Chung, 2004). De même, les protéases et les cellulases jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, la minéralisation des éléments nutritifs et la promotion de la croissance des plantes (Lima *et al.* 1998).

De plus, Howell (2003) rapporte que les protéases de *Trichoderma* spp. n'intervient pas seulement dans la destruction des protéines membranaires de champignons phytopathogènes mais aussi dans l'inactivation de leurs enzymes hydrolytiques. L'analyse des résultats du dosage des activités protéolytiques et chitinolytiques testées *in vitro* révèle des activités plus ou moins variable des isolats de *Trichoderma* spp.

L'utilisation de la chitine et la caséine comme seules sources de carbone et agents inducteurs s'est référé aux travaux de Shakeri et Foster (2007), qui ont rapporté que la caséine est la meilleure source pour l'induction de la production des protéases chez les souches de *T. harzianum* comparé à la paroi cellulaire de *B. cinerea*. D'une autre part, De la Cruz et al. (1993) ont prouvé que la chitine s'est montrée le substrat le plus inducteur de la production de chitinase par *T. harzianum* par rapport à la paroi purifiée de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Botrytis cinerea* qui sont considérés également comme des inducteurs de la production de glucanases. D'après les résultats obtenus dans notre étude, l'isolat T2 et T6 testés ont révélé des activités chitinolytique et protéolytique maximales estimées à 0,043 U/ml et 0,019 U/ml respectivement.

Il est important de noter que les isolats T9 et T12 de *Trichoderma* spp. ont occasionné une réduction importante de la croissance mycélienne de phytopathogène par confrontation directe et indirecte malgré la faible activité chitinolytique enregistrée. Cela peut être expliqué par le phénomène de synergie, où l'effet est meilleur quand plusieurs métabolites secondaires sont associés, par conséquent, on suggère que les souches de *Trichoderma* spp. peuvent être des agents potentiels efficace en lutte biologique grâce à cette synergie.

En effet, plusieurs études ont signalé que le fonctionnement des enzymes lytiques en synergie avec d'autres métabolites secondaires ayant une activité antibiotique augmente l'effet de ces enzymes (Burmeister, 2008; Vinale *et al.*, 2008). Selon (Schirmböck *et al.*, 1994) l'induction des métabolites volatiles au sécrétion des hydrolases extracellulaires a été également montrée chez des isolats de *T. harzianum* en contrôle biologique.

De plus, certains isolats de *Trichoderma* spp. testés ont montrés une production importante de l'HCN, Ce composé volatil peut inhiber la croissance des champignons phytopathogènes par une action directe sur les cellules en bloquant le cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire. Il intervient dans l'induction de la résistance végétale et contribue à la capture de certains ions métalliques en formant des complexes avec eux (Blumer et Haas, 2000 et Kumar *et al.*, 2012). La production de HCN est un critère important observé chez divers micro-organismes du sol car il favorise indirectement la croissance des plantes en contrôlant certains maladies transmises par le sol (kremer et souissi, 2001; siddiqui *et al.*, 2006). Cela est principalement dû à la production des cyanures, qui peuvent agir comme inhibiteurs métaboliques généraux pour éviter la prédation ou la compétition sans nuire aux plantes hôtes (Noori et Saud, 2012). Nos résultats sont également soutenus par les travaux d'Aarti et Meenu (2015), Ng *et al.* (2015) et Mohiddin *et al.* (2017), Lalngaihawmi et Ashok (2019) qui ont signalé la production de HCN par les espèces de *Trichoderma* spp.

L'effet de la solution enzymatique des chitinases de l'isolat T2 a révélé une réduction de la croissance mycélienne des isolats de *V.dahliae*. Lima *et al.* (1998) ont montré que l'endochitinase (CHIT46) de *Trichoderma* spp. affecte radicalement les parois cellulaires de *S. rolfsii* et *Rhizoctonia solani*. D'après El-Katatny *et al.* (2000), la chitinase de *T. harzianum* a considérablement inhibé la croissance de *S. rolfsii* (jusqu'à 61.8%). Kumar *et al.* (2012) ont également décelé l'activité antagoniste des chitinases de *Trichoderma* spp. contre la pourriture des racines et les pathogènes foliaires. Les chitinases sont partiellement purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium ce qui nous laisse suggérer que l'effet de l'inhibition de la croissance mycélienne pourrait être un effet synergique due à la présence des chitinases et la trichodermine. Cette dernière est un antibiotique à activité antifongique produit au cours de la fermentation par certaines espèces de *Trichoderma* spp. tels que: *T. brevicompactum* (Shentu *et al.*, 2014), *T. koningiopsis* (Leylaie et Zafari, 2018).

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode pratique, non dénaturante pour la séparation et la concentration des protéines (Rosenberg, 2005). Elle est traditionnellement utilisée dans la précipitation des chitinases (Wahyuni *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016b). Selon Gomes *et al.* (2000), une saturation en sulfate d'ammonium entre 50-80% est l'intervalle le plus favorable pour la précipitation des chitinases à partir d'un extrait enzymatique brut (Gomes *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous avons utilisé une saturation de 80%. Ce pourcentage de saturation a également été utilisé par Gomes *et al.* (2000), afin de purifier les chitinases. Le culot formé durant la précipitation est soumis à une dialyse, afin de prévenir l'inhibition de l'enzyme par les sels d'ammonium. La dialyse est généralement utilisée pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel et concentrer la protéine (Liu, 2016).

## Chapitre III. Mise en évidence des traits PGPF (Plant Growth Promoting Fungi)

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Solubilisation des phosphates

Le milieu Pikovskaya solide (PVK) (Annexe 2) a été utilisé pour l'évaluation de la capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à solubiliser le phosphate, ce milieu contient 0,5% de phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) comme seule source de phosphate insoluble. Un disque de 6 mm issu d'une préculture de *Trichoderma* spp. a été ensemencé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PVK solide additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948). Après 5 jours d'incubation à 28°C, l'apparition d'un halo autour des colonies indique la solubilisation de P (Noori et Saud, 2012). Les diamètres des colonies et du halo qui les entourent ont été mesurés. L'indice de solubilisation est ensuite calculé par le rapport du diamètre total (halo+colonie) et le diamètre de la colonie (Edi-Premono *et al.*, 1996).

#### 1.2. La fixation d'azote

L'évaluation de la capacité de fixation de l'azote par les isolats de *Trichoderma* spp. a été déterminé sur un milieu dépourvue d'azote (Annexe 2). Ce dernier a été inoculé par des disques fongiques prélevés à partir des cultures jeunes de 7 jours. Les isolats qui sont fixateurs d'azote montrent une croissance ordinaire autour des disques inoculés après 5 jours d'incubation à 28°C (Zhang *et al.*, 2017).

#### 1.3. Production d'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)

La production de l'ammoniaque a été mise en évidence selon la méthode de Bakker et Schipper, (1987). Le principe de la méthode consiste à ajouter 100µl de chaque suspension fongique à 10ml d'eau peptonée. Après incubation à 25°C durant 96 h, 1 ml du réactif de Nessler est ajouté dans chaque tube à essai. Le changement de couleur du jaune à l'orange indique la production de NH<sub>3</sub>.

#### 1.4. Production et quantification des sidérophores

La capacité de production des sidérophores par les isolats de *Trichoderma* spp. a été évaluée selon la méthode de Hoyos-Carvajal *et al.* (2009). Le milieu extrait de malt additionné de 8-hydroxyquinoline (50 mg l<sup>-1</sup>) comme chélateur des oligoéléments a été utilisé pour révéler la production des sidérophores qui se traduit par une croissance fongique sur le milieu de culture après 5 jours d'incubation à 28°C.

La quantification des sidérophores a concernée les isolats producteurs. Pour ce faire des disques mycéliens de 6 mm de diamètre de chaque isolat ont été inoculés sur le milieu liquide MEB (2 % d'extrait de malt, pH 5,6), puis incubés à une température de 28°C sous agitation (120rpm), pendant 9 jours. Après centrifugation, les surnageants des cultures sont récupérés et les sidérophores sont quantifiés par spectrophotométrie (Ghosh *et al.*, 2015).

#### **1.4.1. Détection des catécholates**

Le test d'Arnou a été utilisé pour la détection des catécholates, En effet, 1ml de chaque surnageant ont été additionnés à 1 ml de HCl 0,5 N, 1 ml de réactif de nitrite au molybdate et 1ml de NaOH (1N). La formation d'une coloration rouge indique la présence des catécholates (Baakza *et al.*, 2004).

#### **1.4.2. Détection des hydroxamates**

Les hydroxamates ont été détectés par spectrophotométrie. Pour cela, à 3 ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> (2%) est ajouté à 1 ml de surnageant, la formation d'un complexe ferrique de couleur orange à vineux présentant un pic entre 420 et 450 nm indique la présence des hydroxamates (Dave *et al.*, 2006).

#### **1.4.3. Détection des carboxylates**

Les carboxylates ont été détectés à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour 1 ml de chaque surnageant ont été ajoutés 1 ml de CuSO<sub>4</sub> (250µM) et 2 ml de tampon acétate (pH=4). Le complexe cuivreux formé présente un maximum d'absorption entre 190-280nm (Dave *et al.*, 2006).

### **1.5. Production des phytohormones**

#### **1.5.1. L'acide indole acétique (AIA)**

La capacité des isolats de *Trichoderma* spp. à produire l'acide indole acétique (AIA) a été évaluée sur milieu liquide PDB (Annexe 2) auquel est ajouté le L-tryptophane (1,02g /l) (Bric *et al.*, 1991). Le milieu estensemencé par 100µl des cultures *Trichoderma* spp. incubé à 25°C pendant 96 h. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de Loper et Scroth (1986). Au préalable, les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/20min, ensuite, 1ml de chaque surnageant a été additionné à 2 ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl<sub>3</sub> à 0.5M). La densité optique est mesurée à 535nm après 20 mn d'incubation à l'obscurité. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle 0 à 10<sup>-3</sup> M d'AIA.

**1.5.1.1. Extraction et révélation de l'AIA par CCM**

Les deux isolats de *Trichoderma* spp. qui ont donné une production importante d'AIA dans le test précédent ont été choisis pour le test d'extraction liquide- liquide et pour la détection de l'AIA par CCM. La fermentation est réalisée dans le milieu liquide PD additionné de 1,02g/l de L-tryptophane. Après trois jours de fermentation à 28°C, une extraction selon la méthode de Bric *et al.* (1991) a été réalisée.

La révélation de la production de l'AIA a été effectuée sur des plaques (CCM) en gel de silice (GF254, épaisseur 0,25 mm). Le système de migration utilisé est formé d'un mélange de Propanol/Eau (8:2) (Kuang-Ren *et al.*, 2003). Le mélange des solvants est versé dans la cuve de chromatographie avec une hauteur de 0,5 cm environ. Sur la même plaque, le témoin contenant l'AIA authentique a été déposé à l'aide d'une pipette Pasteur en laissant un espace de 3 cm entre les deux spots.

**1.5.1.2. Révélation de l'AIA par CCM et lecture**

Après migration et séchage des plaques, la révélation est réalisée par une méthode chimique qui correspond à la pulvérisation de la plaque par le réactif de Salkowski. L'apparition de taches colorées en rose indique un résultat positif.

**1.5.1.3 Détection de l'IAA par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

Les extraits fongiques des deux isolats de *Trichoderma* spp. ont été analysés par HPLC pour obtenir des informations relatives à la production de l'AIA. Cette analyse a été réalisée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques (C.R.A.P.C). Les extraits d'acétate d'éthyle des deux isolats sont analysés par HPLC (Agilent-1260) équipée d'un détecteur UV-visible dans une colonne (C18)150mm/4.6mm /5µm sous des conditions isocratique de 40% de méthanol et 1% d'acide acétique. Une injection d'un volume de 20µl a été réalisée à un flux de 1 ml/min. Les composés ont été détectés par UV-VIS à une longueur d'onde de 254nm-280 nm. L'AIA a été quantifié en utilisant une courbe d'étalonnage créée par l'analyse de standards d'AIA de concentrations connues., A partir d'une solution mère d'acétate d'éthyle, une série de concentrations d'AIA a été préparée 0,25, 0,5, 1 et 2mg/l. Les solutions étalon sont analysées séquentiellement dans les mêmes conditions décrites ci-dessus, l'équation de régression linéaire a été calculée pour les concentrations testées. Les aires de pic de différentes concentrations sont obtenues et leurs temps de rétention ont été également enregistrés.

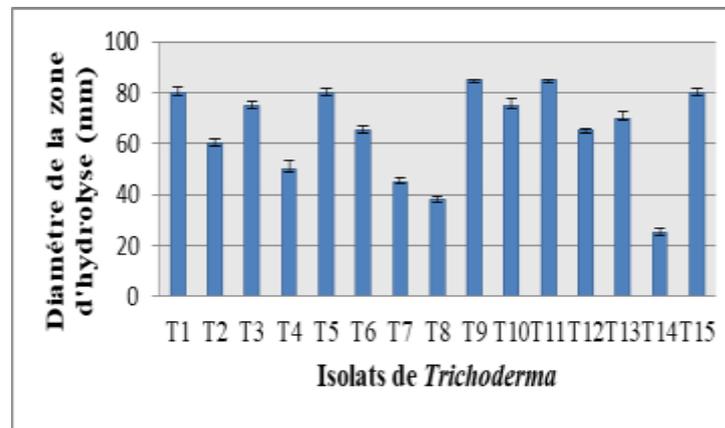
### **1.5.2. Dosage de l'acide gibbérellique**

Les isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés pour la production d'acide gibbérellique sur un milieu spécifique à pH 6.4 selon la méthode décrite par Uthandi *et al.*, (2010). Chaque isolat a été cultivé sur ce milieu pendant 5 jours à 28°C. Les milieux fermentés ont été centrifugés et le surnageant a été utilisé. L'acide gibbérellique a été estimé selon une méthode colorimétrique standard préconisée par Holbrook *et al.*, (1961) et Sharma *et al.*, (2018). L'absorbance a été mesurée à 254 nm et la concentration de gibbérellines a été calculée en préparant une courbe standard en utilisant l'acide gibbérellique comme standard.

## 2. Résultats

### 2.1. Solubilisation des phosphates

Les résultats de solubilisation du phosphate tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sur le milieu solide Pikovaskey (PVK) sont portés sur le graphique de la figure 56.



**Figure 56.** Production des phosphatases par les isolats de *Trichoderma* spp. (en mm) sur milieu Pikovaskey (PVK) additionné de bleu de bromophémol après 3 jours d'incubation à 28°C.

L'analyse de la figure en ci-dessous indique que tous les isolats testés produisent des phosphatases dont la présence, se traduit par la formation d'un halo rouge clair au tour des disques inoculés au centre de la boîte de Pétri (Figure 57C).

Le diamètre de l'halo de solubilisation diffère d'un isolat à un autre (Figure 56). La meilleure solubilisation est enregistrée pour les souches T4, T6 et T10, offrant des IS qui s'évaluent de 1,85, 1,85 et 3 respectivement. En deuxième position viennent les isolats T7, T12, et T13 avec des IS compris entre 1.55 et 1.77. Les isolats restants manifestent la plus faible solubilisation avec un  $\text{IS} \leq 1.41$ .

### 2.2. Production de l'ammoniaque par les isolats de *Trichoderma* spp.

Sur les 15 isolats de *Trichoderma* spp. testés, seules les souches T2, T4, T6, T11 et T12 qui ont exprimé une forte production d'ammoniaque. L'excrétion de ce métabolite se révèle par la formation d'une couleur orange après addition du réactif de Nessler. Une couleur jaune clair du milieu eau peptonée indique une faible production de  $\text{NH}_3$  pour les isolats restants (Figure 57D).

### 2.3. Fixation d'azote par les isolats de *Trichoderma* spp.

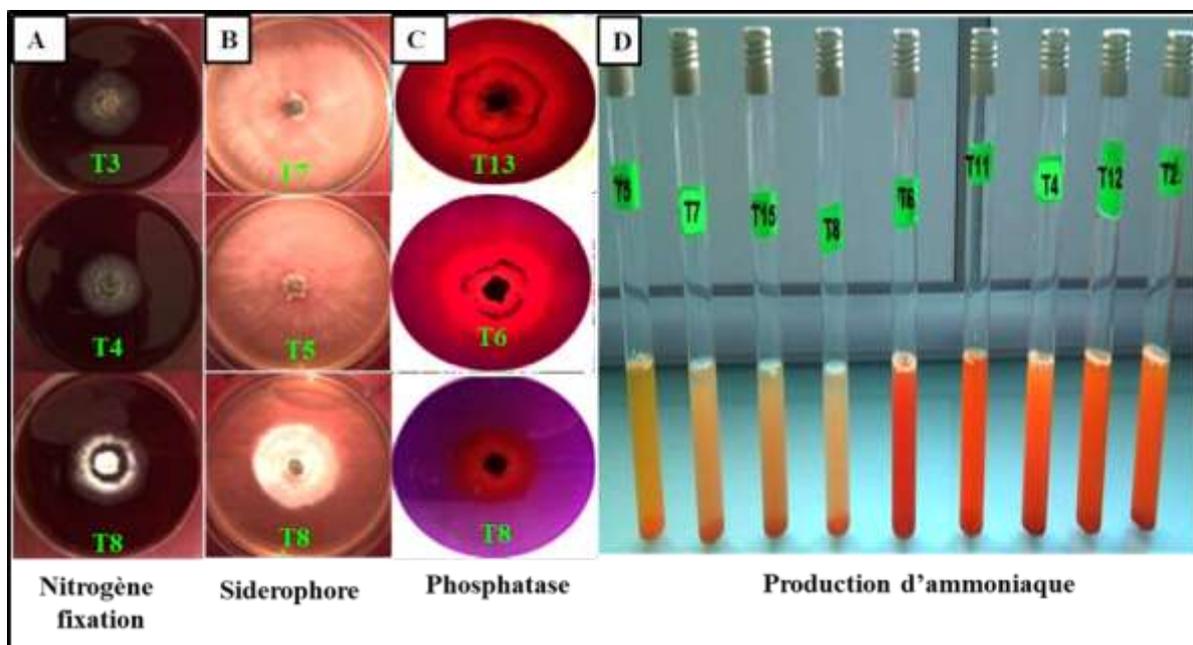
Les isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés pour leur capacité de fixer de l'azote atmosphérique, après 5 jours d'incubation à 28°C, tous les isolats ont présentés une

croissance mycélienne plus ou moins important.

Cependant, l'isolat T8 a montré une forte croissance aérienne et radiale comparativement aux autres isolats, suivis par les isolats T3, T4, et T6 dont les diamètres de la croissance radiale s'évaluaient de 35mm, 31mm et 35 mm respectivement (Figure 57 A).

#### 2.4. Mise en évidence de la production des sidérophores

Les résultats obtenus montrent que parmi les 15 isolats de *Trichoderma* spp. testés, 5 ont montré leurs pouvoir de production des sidérophores. Ce dernier, se traduit par une croissance aérienne et radiale plus ou moins importante selon les isolats testés (Figure 57B). Les isolats T5, T7, T8, T12 et T14 enregistrent une sporulation abondante après 11 jours d'incubation.



**Figure 57.** Production de métabolites et d'enzyme qui stimule la croissance végétale (Photos originales) (A): fixation de l'azote, (B): production des sidérophores, (C): la solubilisation du phosphate (D): production d'ammoniaque.

#### 2.5. Détection de la nature chimique des sidérophores

Les résultats de quantification des sidérophores ont montré que la nature des sidérophores produits par les isolats de *Trichoderma* spp. diffère d'une souche à une autre. Les différents tests réalisés ( $\text{FeCl}_3$  (2%) ; Tetrazolium et Arnow) ont bien indiqué la production des hydroxamates et des catécholates par les isolats T5 et T8. Alors qu'aucun sidérophore de type carboxylates n'est produit par les 5 isolats testés. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

**Tableau 20.** Les différents types de sédirophores produits par les isolats de *Trichoderma* spp.

Isolats de <i>Trichoderma</i>	Hydroxamates			Catécholates		Carboxylates
	Test de FeCl <sub>3</sub> (2%)		Test de Tetrazolium	Test d'Arnow		Test de shenker
	Couleur	Pic à 420-450nm	Pic à 450nm	Couleur	Pic à 515nm	Pic à 190-280nm
<b>T5</b>	Orange à vineux	0.143	0.193	Couleur rouge	0.038	1.422
<b>T7</b>	-	0.006	0.012	-	Nd	0.383
<b>T8</b>	Orange à vineux	0.049	0.282	Couleur rouge	0.018	0.690
<b>T12</b>	-	0.025	0.117	-	Nd	0.113
<b>T14</b>	-	0.009	0.072	-	0.010	0.511

420, 450, 515 et 280 nm : longueurs d'ondes à laquelle les densités optique sont déterminer, Nd : non détectable, - : absence de coloration,

## 2.6. Production des phytohormones

### 2.6.1. Production d'acide gibbérellique

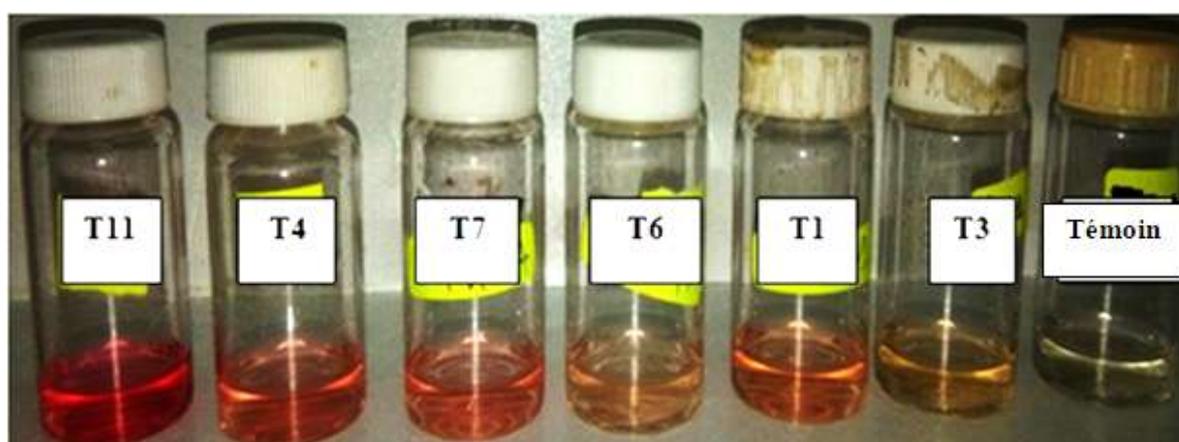
Tous les isolats de *Trichoderma* spp. testés sont capables de produire l'acide gibbérellique, cette production est comprise entre 0.53µg/ml et 7.87µg/ml. Néanmoins, la plus grande quantité d'acide gibbérellique a été produite par T11 (7,87 µg/ml) suivie par T3 (4,64 µg/ml). Les résultats de cette étude indiquent que les isolats de *Trichoderma* spp. testés sont des candidats prometteurs pour la production de l'acide gibbérellique.

### 2.6.2. Production d'acide indoleacétique (A.I.A)

Les résultats obtenus pour ce test, ont montré que tous les isolats de *Trichoderma* spp. se sont avérés producteur d'AIA avec une variabilité quantitative oscillant entre 1,30µg/ml et 21,15µg/ml (Tableau 21, figure 58). L'isolat T11 était plus producteur de l'AIA avec une concentration de 21.15µg/ml. Une production moyenne est notée pour les isolats T2, T4, T7 et T8 avec des concentrations respectives de 7,71 µg/ml, 6,85µg/ml 6,03µg/ml et 7,87µg/ml (Tableau 21). Une faible production d'AIA est signalée pour les isolats restants.

**Tableau 21.** Production d'AIA et d'acide gibbérellique par les différents isolats de *Trichoderma* spp.

Isolats	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	AG ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
T1	5,13	3,98
T2	7,71	3,93
T3	2,44	4,64
T4	6,85	0,67
T5	1,30	3,91
T6	3,06	1,12
T7	6,03	0,67
T8	7,87	3,97
T9	2,59	1,08
T10	6,77	3,11
T11	21,15	7,87
T12	7,16	1,92
T13	4,66	4,51
T14	5,48	0,53
T15	2,91	4,2



**Figure 58.** Production d'AIA par les isolats de *Trichoderma* spp. sur milieu liquide additionné de tryptophane (Photo originale).

#### 2.6.2.1. Détection de la production de l'AIA par chromatographie sur couche mince

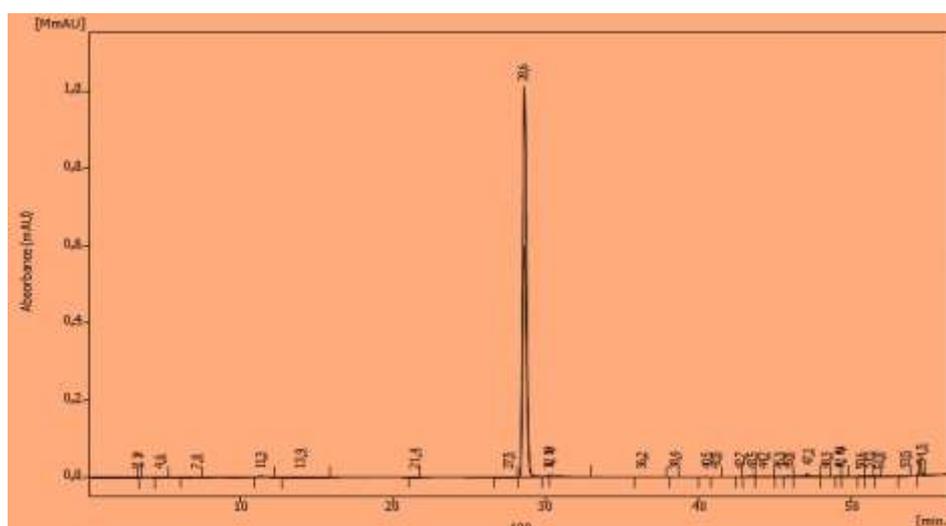
L'analyse qualitative de l'AIA produite par l'isolat T11 et T12 a été réalisée par chromatographie sur couche mince. La révélation chimique par le réactif de Salkowski fait apparaître une tâche de couleur violette attestant la présence de l'AIA (Figure 59) avec un rapport frontal (Rf) identique à celui de témoin de 0.84. Toutefois, une meilleure appréciation aussi bien qualitative que quantitative nécessiterait le recours à des analyses plus approfondies telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).



**Figure 59.** La révélation chimique de l'AIA par le réactif de Salkowski sur plaque de gel de Silice (Photo originale).

### 2.6.2.2. Détection de l'AIA par HPLC

Les résultats de l'analyse des deux extraits fongiques par HPLC révèlent leur capacité à produire de l'AIA mais à des concentrations différentes. La comparaison des temps de rétention, des aires de pic avec l'AIA standard et les spectres d'absorbances montrent des similitudes des profils d'absorbance. Les deux chromatogrammes ont montré un pic compatible et identique à celui de la solution d'AIA de référence (Figure 60). Les pics caractéristiques de cette molécule ont montré un temps de rétention de 28,6 min. La concentration d'AIA des deux extraits analysés est de 17,71 mg/l et 71,19 mg/l pour les deux isolats T12 et T11 respectivement. Ces résultats confirment la capacité des deux isolats analysés à synthétiser de l'AIA.



**Figure 60.** Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de référence

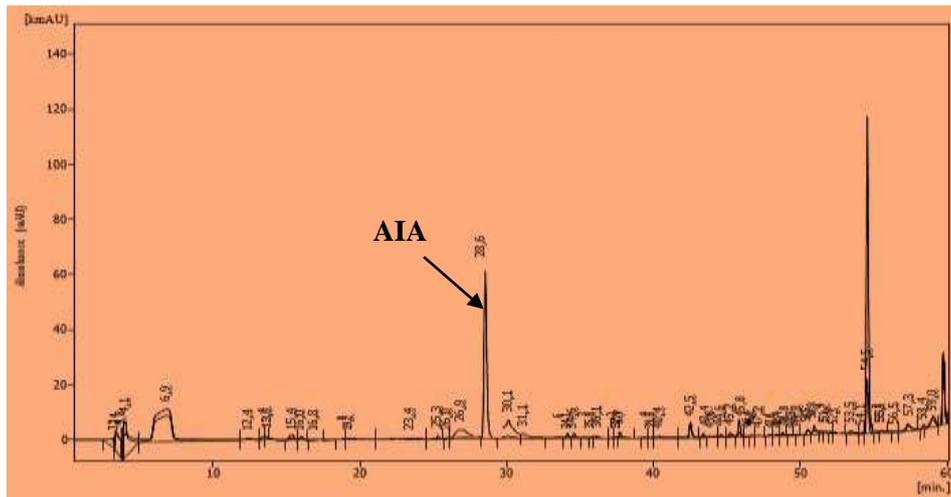


Figure 61. Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de la souche T11

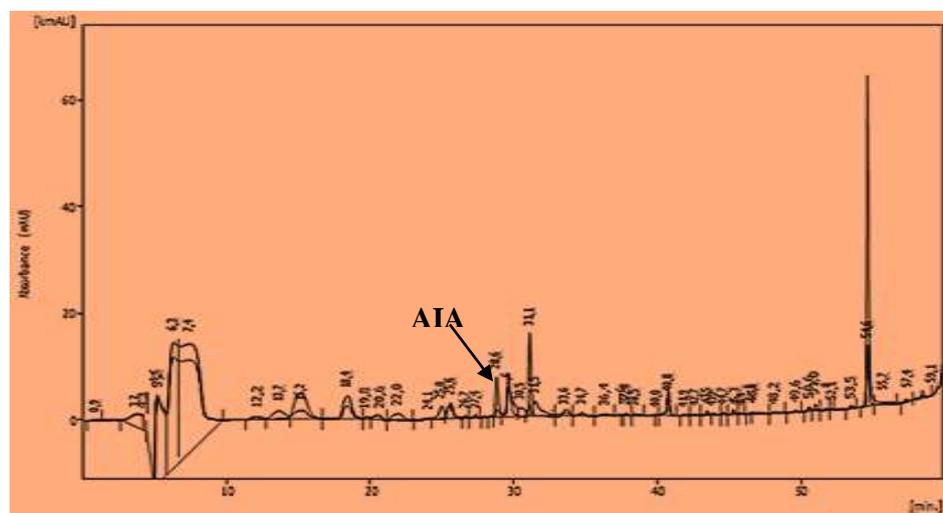


Figure 62. Chromatogramme d'HPLC de l'extrait d'AIA de la souche T12

## 2. Discussion

La capacité de solubilisation du phosphate tricalcique par les isolats de *Trichoderma* spp. a été mise en évidence *in vitro*. Tous les isolats de *Trichoderma* spp. se sont montrés producteurs de phosphatases et ou des phytases indispensable à la solubilisation de phosphate. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Kapri et Tewari, (2010), qui ont montré la capacité de 14 souches de *Trichoderma* spp. isolées de la partie rhizosphérique de différentes espèces végétales à solubiliser le phosphate. Aussi, les travaux d'El-Katatny (2004), qui rapportent que les isolats de *Trichoderma* solubilisent efficacement le phosphate insoluble, cette capacité de solubilisation est considérée comme l'un des mécanismes de la promotion de la croissance des plantes et dépend essentiellement de la source du phosphate et de l'espèce de *Trichoderma* spp. (Kapri et Tewari, 2010; Promwee, 2011).

En effet, la plupart des plantes sont associés avec des champignons du sol, cette association symbiotique confère aux plantes, une meilleure croissance grâce à l'amélioration de la nutrition minérale, en particulier la nutrition phosphatée et par conséquent un meilleur rendement (Egli et Brunner, 2002). Environ 95 à 99% de la teneur totale en phosphate se présente sous une forme insoluble dans les sols agricoles (Vassileva *et al.*, 1998) et donc non assimilable par les plantes, de ce fait, plusieurs recherches sont menées pour développer des biofertilisants alternatives à l'utilisation des fertilisants chimiques par la recherche des microorganismes du sol ayant une capacité à solubiliser le phosphate (Cattelan *et al.*, 1999; Yasser *et al.*, 2014). Selon Tarafdar *et al.* (2003), les isolats de *Trichoderma* sp. sont plus efficaces à solubiliser le phosphore par rapport à d'autres champignons.

L'indice de solubilisation (IS) obtenue varie entre 1 et 3, par conséquent les isolats de notre collection ont été plus solubilisatrice de phosphate par rapport aux isolats de *Trichoderma* spp. testés par d'autres chercheurs, Bekkar *et al.* (2016) ont enregistré pour leurs souches des IS compris entre 1,87 à 2,34. Das *et al.* (2013) ont évalué le pouvoir de solubilisation de phosphate de quelques espèces de *Trichoderma* spp. Ils ont montré pour leurs souches des IS oscillant entre 1,62 à 1,79.

En effet, quelques isolats de *Trichoderma* spp. se sont montrés également producteur de sédirophores sur milieu contenant le 8-hydroxyquinoline comme chélateur des oligoéléments. Les résultats obtenus, sont en accord avec ceux de Ghosh *et al.* (2017) et Vinale *et al.* (2013) qui ont montré que les espèces de *Trichoderma* spp. nommé *T. viride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* et *T. asperellum* sont fortement productrice des sidérophores. D'autre part, une étude récente menée par López *et al.* (2019) ont démontré la capacité de la souche *T. stilbohypoxyli* LBM 120 à produire des sidérophores, par contre, la souche *Trichoderma atroviride* LBM 112 a montré un résultat négatif de production testé sur le même milieu de culture. La production des sidérophores microbiens jouent un rôle important car ils peuvent stimuler soit directement la croissance des plantes en augmentant la disponibilité du fer dans le sol, soit indirectement par inhibition compétitive de la croissance des pathogènes des plantes en piégeant le fer et le rendant moins disponible pour les agents pathogènes (Fgaier et Eberl, 2011).

Les isolats de *Trichoderma* spp. se sont avérés également capables à synthétiser l'AIA (Acide indole acétique) en utilisant le L-tryptophane comme précurseur de biosynthèse. L'AIA est un régulateur de croissance important chez les plantes, la production de ce régulateur de croissance est souvent associée à la stimulation de la croissance par les microorganismes bénéfiques (Patten et Glick, 1996; 2002; Vassilev *et al.*, 2006, Graval *et al.*, 2007).

Le tryptophane est considéré comme le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la biosynthèse de cette phytohormone (Ali *et al.*, 2009). Cependant, les exsudats racinaires sont la source principale naturelle de L-tryptophane pour la microflore rhizosphérique (Spaenpen *et al.*, 2007; Dastager *et al.*, 2010). Les résultats obtenus pour ce test, indiquent que la production est variable d'un isolat à un autre allant de 1,30µg/ml à 21,15µg/ml en présence du L-tryptophane. Lalngaihawmi et Ashok (2019) rapportent que trois espèces appartenant au genre *Trichoderma* spp. ont synthétisé une quantité d'AIA comprise entre 6.32 µg ml<sup>-1</sup> et 13.38 µg ml<sup>-1</sup>. De plus, quatre espèces de *Trichoderma* spp. testés par Mohiddin *et al.* (2017) révèlent une capacité de production d'AIA variable entre 1.538 µg ml<sup>-1</sup> et 6.605 µg ml<sup>-1</sup>. D'après les résultats obtenus, on constate que la production de nos isolats en AIA est beaucoup plus supérieure à celle de Mohiddin *et al.* (2017) dont les valeurs de production sont estimée entre et 1.538 µg ml<sup>-1</sup> et 6.605 µg ml<sup>-1</sup>. Notre étude est soutenue aussi par les travaux de Graval *et al.* (2007) portés sur la production de l'AIA par *Trichoderma atroviride* et *Pseudomonas putida* qui ont révélé que ces deux souches sont capables de synthétiser l'AIA à une quantité 6,2µg/ml et 3,3µg/ml respectivement en présence du tryptophane. D'autre part, les isolats testés ont montré la capacité de production de l'acide gibbérellique, une production maximale de 7.87 µg/ml a été enregistrée par l'isolat T11. Les résultats obtenus sont appuyés par l'étude de Sreenayana *et al.* (2022) qui a révélé la capacité de quatre souches de *Trichoderma* spp. à produire l'acide gibbérellique à des quantités variant entre 9.1 µg/ml et 10.4 µg/ml. L'acide gibbérellique joue un rôle important dans la promotion de la croissance végétale, notamment la germination des graines, l'allongement des tiges, le développement des fleurs et l'induction de la production d'enzymes hydrolytiques dans les grains en germination (Tsavkelova *et al.*, 2006 ; Pallardy 2008 ; Hamayun *et al.*, 2010 ; Jaroszuk *et al.*, 2014).

Les résultats de la présente enquête sont promoteur et reflètent les performances de nos isolats en termes de production des phytohormones. Ces constatations nous laissent supposer que nos isolats fongiques pourraient constituer un biofertilisant efficace pour la promotion de la croissance des plantes.

## Chapitre IV. Essai de protection (*in planta*) des plants de l'olivier à l'égard de la verticilliose vasculaire

### 1. Matériel et méthodes

Deux isolats de *V. dahliae* à savoir le Vd4 et le Vd5 et trois isolats de *Trichoderma* spp. (T2, T9 et T12) ont été testés. Les isolats ont été choisis selon leurs réponses aux différents tests effectués *in vitro* (confrontation directes, confrontation indirectes, l'effet des filtrats de culture...ect)

#### 1.1. Préparation des plants de l'olivier

Des jeunes plants d'oliviers de la variété Chemlal âgés de 8 mois sont utilisés pour effectuer ce test. Le substrat utilisé pour la culture de l'olivier est un mélange constitué de tourbe, de sol, et de sable (V/V/V), préalablement stérilisé par trois autoclavages à raison de 20 minutes à 120°C en laissant un intervalle de 24 heures entre deux stérilisations successives. Ce dernier a été placé dans des pots préalablement lavés avec de l'eau distillée puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium (Boutkhil, 2017).

#### 1.2. Préparation de l'inoculum fongique

Les isolats utilisés (*Trichoderma* spp. et *V. dahliae*) ont été purifiés par une culture monosporique, chaque clone des isolats a été ensemencé sur un milieu PDA et incubé à 28°C pendant 7 jours. Le contenu d'une boîte a été tout gratté, dans 50 ml d'eau distillée stérile puis agité à l'aide d'un agitateur pendant quelques minutes, ensuite, la suspension fongique est filtrée à travers un filtre seringue afin d'éliminer les mycéliums (Rapilly, 1968). La concentration de la suspension sporale a été ajustée par dilution avec de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de  $10^7$  conidies/ml, concentration suffisante pour provoquer la manifestation des symptômes (Rodriguez *et al.*, 1993).

#### 1.3. Méthodes d'inoculation

Les jeunes plants d'oliviers âgés de 8 mois ont été extraits des pots, ensuite, les racines ont été rincées pour une première fois sous un courant d'eau de robinet pour éliminer le sol adhérent aux racines. Un deuxième rinçage avec de l'eau distillée stérile a été effectué. Ensuite, la partie racinaire de chaque plant d'olivier a été trempée pendant 30 minutes dans une suspension sporale de *V. dahliae* à raison de  $10^7$  conidies /ml préalablement préparée, pour le lot témoin non inoculé, les racines ont été trempées dans de l'eau distillée stérile (Rodriguez *et al.*, 1993). Après inoculation, les jeunes oliviers ont été transplantés dans les pots préparés préalablement et périodiquement arrosés avec de l'eau de robinet.

Les pots inoculés par le pathogène et le lot témoin sont placés à la température ambiante, l'expérimentation est répétée trois fois pour chaque clone de *V. dahliae* (ces lots constitués des témoins positifs et négatifs respectivement et peuvent nous renseigner sur le pouvoir pathogène des isolats de *V. dahliae* testés). Un troisième lot est inoculé par une suspension sporale du *V. dahliae* ( $10^7$  conidies/ml) et une suspension sporale des isolats de *Trichoderma* spp. ( $10^7$  conidies/ml) pour mettre en évidence l'effet protecteur de ces isolats sur l'incidence de la verticilliose vasculaire sur olivier (confrontation). Alors qu'un quatrième lot a été inoculé uniquement par les isolats de *Trichoderma* spp. pour tester leur pouvoir de stimulation de la croissance des plantules de l'olivier.

#### **1.4. Estimation des symptômes**

Le pouvoir pathogène des isolats de *V. dahliae* a été estimé par l'observation des symptômes externes (rabougrissement et symptômes foliaires) ainsi que des symptômes internes (brunissement vasculaire) (Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2005; Regragui, 2005; Harir, 2010). Les symptômes ont été enregistrés à intervalles de 10 jours pendant une année après l'inoculation. La sévérité de la maladie a été évaluée en utilisant l'échelle 0-5 (Regragui, 2005):

0. plantes saines
1. <25% des plantes flétries avec un brunissement rare
2. 25% des plantes flétries et a montré un léger brunissement,
3. 50% des plantes fanées et montraient un brunissement progressif
4.  $\geq 75\%$  des plantes fanées et montraient un brunissement complet
5. plantes mortes

##### **1.4.1. Indice de rabougrissement**

Cet indice (I.R) a été déterminé par la mesure de la différence entre l'allongement des plants inoculés et celui des plants témoins. L'indice de rabougrissement (IR) correspond à la réduction de la taille de l'épicotyle chez les plants inoculés par rapport aux plants témoins, Il a été calculé après 48 semaines d'inoculation des plants selon la formule rapporté par Boukenadel (2001):

$$I.R = (T - X) / T \times 100$$

I.R : indice de rabougrissement d'un plant inoculé ;

T : taille moyenne des plants témoins

X : taille moyenne des plants inoculés

L'agent pathogène a été réisolé sur le milieu PDA à partir des jeunes oliviers inoculés préalablement. Les cultures obtenues sur PDA sont comparées à leur culture mère du point de vue macroscopique et microscopique pour s'assurer de l'implication de ces isolats dans l'infection.

#### **1.4.2. Indice d'altération foliaire**

Cet indice a été utilisé pour exprimer l'intensité des dégâts foliés provoqués par le champignon (Beye et Lafay, 1985). Les symptômes ont été progressifs, ils commencent par le jaunissement des feuilles puis leur flétrissement qui peut aboutir à la nécrose et à la chute des feuilles.

Le suivi de la symptomatologie est effectué pendant 48 semaines après l'inoculation. Les symptômes observés ont été répartis en 6 classes selon l'échelle de notation décrite par Regragui (2005). Une note a été attribuée pour chaque plante:

Notes (N)	Symptômes
0	Feuilles d'apparence saines
1	Feuilles cotylédonaire: flétrissement ou jaunissement
2	Feuilles cotylédonaire: chute
3	Feuilles vraies: flétrissement ou jaunissement
4	Feuilles vraies: nécrose
5	Feuilles vraies: chute

L'indice d'altération foliaire de chaque plant est calculé selon la formule suivante (Ramualde, 1992) ;

$$I.A.F = \frac{\sum N}{(4+5n)}$$

IAF: Indice d'altération foliaire ;

$\sum N$ : somme des notes de toutes les feuilles de la plante ;

4: la valeur maximale attribuée aux feuilles cotylédonaire ;

5: la note maximale pour une feuille vraie

n: le nombre de feuilles vraies.

La somme des notes rapportée au nombre de feuilles constitue l'indice d'altération foliaire.

Un indice moyen est ensuite calculé pour chaque lot de plants.

L'indice I.A.F varie de 0 à 100, plus il est élevé, plus la maladie est sévère.

La note 0 correspond à une plante saine.

La note 100 est donnée pour une plante totalement flétrie ou morte.

**1.5. Traitements statistiques**

L'analyse de la variance des résultats du pouvoir pathogène des isolats est réalisée par les Logiciels SPSS 25. Les résultats obtenus sont traités statistiquement par une analyse de la variance (ANOVA), les différences entre les moyennes sont considérés significatives au seuil de  $p < 0.05$ .

## 2. Résultats

### 2.1. La mise en évidence du pouvoir pathogène des isolats de *V. dahliae* in planta

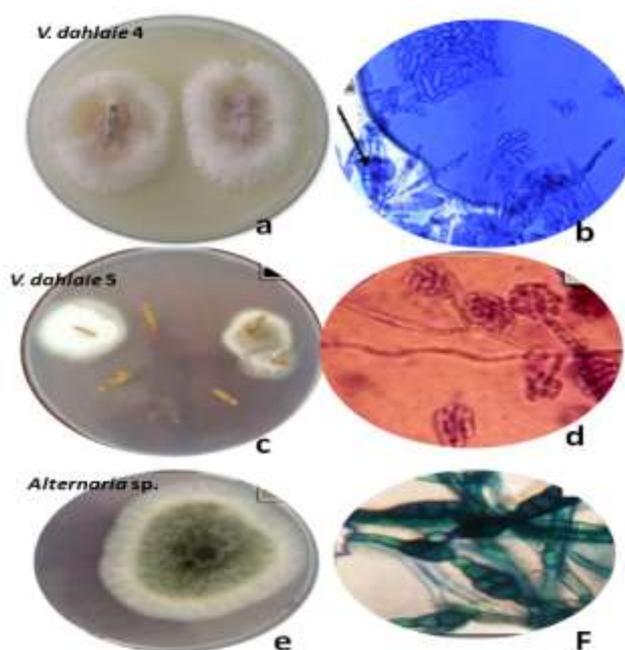
Les essais du pouvoir pathogène des isolats de *V. dahliae* ont été étudiés sur une période de 12 mois. Après 48 semaines d'inoculation, les deux isolats de *Verticillium dahliae* testés (Vd4 et Vd5) se sont montrés capables de coloniser les différents organes des plantules d'olivier (branches, pétioles et les feuilles) et des symptômes typiques de la verticilliose vasculaire à savoir les chloroses, les nécroses, le flétrissement, le dessèchement, l'enroulement en forme de gouttière ainsi que le rabougrissement des plants ont été observés (Figures 63, 65), alors que les plants témoins (non inoculés) n'ont montré aucun symptôme de la verticilliose.



**Figure 63.** Symptômes de flétrissement et de jaunissement des feuilles du lot des plantules d'oliviers inoculés par l'isolat Vd4 et Vd5 après 12 mois d'inoculation (Photos originales).

Le réisolement sur milieu PDA à partir des plants inoculés par les deux isolats de *Verticillium dahliae* (Vd4 et Vd5) a révélé la présence du pathogène dans les sections (branches, pétioles et les feuilles). Par contre, le *V. dahliae* était absent dans les plantules de lot témoin (plantules trempés dans de l'eau distillé stérile). Les cultures obtenues sur milieu PDA sont comparées du point de vue macroscopique et microscopique avec les deux isolats de *Verticillium dahliae* précédemment inoculés (Vd4 et Vd5).

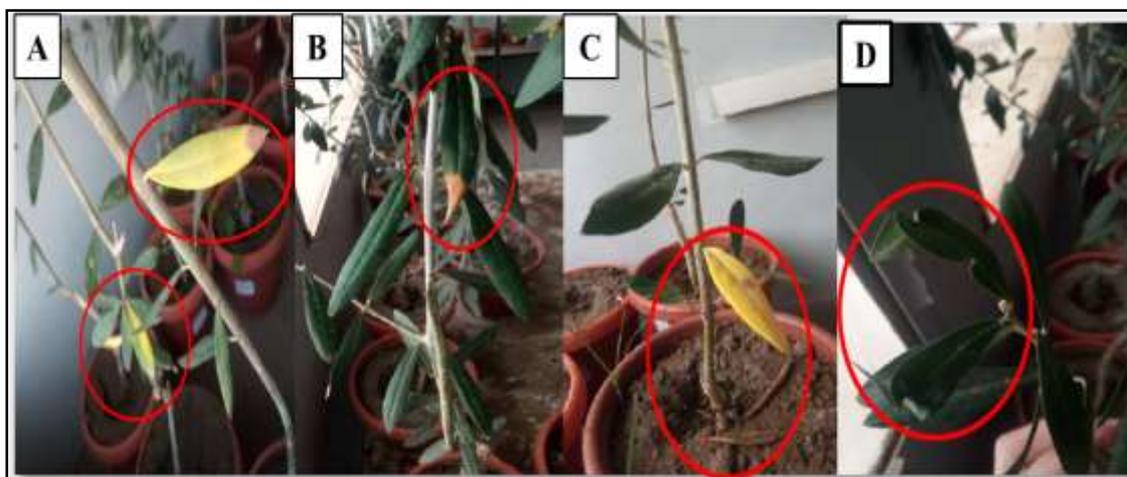
Les colonies obtenues ont montré des caractéristiques culturelles similaires à ceux qui ont servi comme source d'inoculum. Ces résultats confirment que ces isolats sont incriminés dans le mécanisme de l'infection et de l'apparition des symptômes typiques de la verticilliose. Un autre isolat appartenant au genre *Alternaria* sp. qui présente des caractères macromorphologiques spécifiques, colonies fongiques verdâtres (vert olive) entourées du mycélium blanchâtres et des macroconidies de couleur vertes en forme de bouteille avec des cloisons longitudinales et transversales caractéristique ont été observés (voir figure ci-dessous).



**Figure 64.** Aspects macroscopique et microscopique des isolats réisolés à partir des branches des plantules d'olivier inoculés par *V.dahliae* (Photos originales). Les photos **a**, **b**, **c** et **d** montrent l'aspect macroscopique et microscopique des isolats Vd4, Vd5 réisolés à partir des branches des plantules d'olivier pré-inoculés par ces mêmes isolats, la flèche montre les phialides verticillés spécifiques du genre *Verticillium*. Les figures **e** et **f** montrent l'aspect macroscopique et microscopique d'un isolat appartenant au genre *Alternaria* sp. isolé à partir des mêmes branches. Les observations microscopiques sont effectuées au grossissement (x100).

Les résultats obtenus sur les plants de l'olivier inoculés montrent que les deux isolats de *V. dahliae* testés (Vd4 et Vd5) sont capables d'induire des lésions foliaires chez les plantules d'olivier. Ces lésions foliaires se développent avec le temps et entraînent le dessèchement total des feuilles.

Ces dernières résultent d'une perturbation de développement du système racinaire qui se trouve affecté par le pathogène, en effet, de fortes attaques provoquent des flétrissements suivies par des dessèchements unilatéraux sur les plantules d'oliviers. De même, le lot traité par les isolats de *Verticillium dahliae* (Vd4 et Vd5) se manifeste par l'apparition de chlorose et une décoloration plus ou moins prononcée des feuilles (Figure 65). De plus, l'apparition des nécroses foliaires qui commencent soit à partir de l'extrémité (nécroses apicales), soit à partir des bordures (nécroses marginales) puis se propagent progressivement sur toute la surface du limbe foliaire qui apparait à la fin toute brune. Ces symptômes sont absents chez les plantules d'olivier du lot témoin non traité par les souches pathogènes de *V. dahliae*, ce qui indique la pathogénicité de ces souches vis-à-vis l'olivier



**Figure 65.** Symptômes observés après inoculation des plantules d'olivier avec les isolats Vd4 et Vd5 (Photos originales). (A+B) l'apparition de chlorose et une décoloration plus ou moins prononcée des feuilles (C) nécroses, dessèchement et chute des feuilles (D) enroulement en forme de gouttière.

### 2.1.1. Résultats de l'indice de rabougrissement

Les résultats montrent que l'inoculation des plantules de l'olivier par les deux isolats de *V. dahliae* (Vd4 et Vd5) induit des symptômes de rabougrissement par rapport au témoin, Après 48 semaines d'inoculation, les valeurs des I.R. varient selon la souche fongique, l'indice de rabougrissement (IR) le plus élevé a été obtenu chez les plants inoculés par l'isolat Vd4 (30,82%), alors qu'un indice de 8,84% a été enregistré chez les plants traités par la suspension sporale de l'isolat Vd5. Donc, le pouvoir rabougrissant des souches a été plus prononcé chez l'isolat Vd4 comparativement à l'isolat Vd5.

Une analyse de la variance (ANOVA) des résultats a révélé une différence significative entre les I.R obtenus chez les deux souches de *V. dahliae* comparativement au témoin ( $p < 0,05$ ) (voir annexe 10, Figure 66).



**Figure 66.** Rabougrissement des plantules d'olivier, après 30 semaines d'inoculation par les deux isolats Vd4 et Vd5 (Photo originale).

### 2.1.2. Résultats de l'indice d'altération foliaire

L'indice d'altération foliaire permet de quantifier l'agressivité des deux isolats de *V. dahliae* (Vd4 et Vd5) sur les plants d'olivier traités. Dans nos conditions expérimentales, l'inoculation des plantules d'olivier par les deux isolats Vd4 et Vd5 a révélé des symptômes typiques de verticilliose après 12 mois d'inoculation. A la base de la partie aérienne, on observe un jaunissement progressif des feuilles les plus âgées suivi de leur dessèchement et de leur chute.

L'estimation des I.A.F moyens montrent que l'olivier est sensible aux isolats (Vd4 et Vd5) inoculés. L'I.A.F, le plus élevé est obtenu avec la souche Vd4 (19.46%). Cependant, l'I.A.F provoqué par la souche Vd5 est de (7.10%). L'apparition des symptômes chez les plantes inoculées par *V. dahliae* est une réaction de la plante à l'infection qui s'explique par la présence de certains métabolites toxiques libérés par le champignon dans les tissus de l'hôte telle que des toxines phénoliques, des toxines de structure protéique ou oligosaccharide.

Les résultats de l'indice de rabougrissement et de l'indice d'altération foliaire, montrent clairement que l'isolat Vd4 de *V.dahliae* était plus virulent que l'isolat Vd5, raison pour

laquelle il a été choisi pour le test de confrontation *in planta* avec les isolats de *Trichoderma* spp.

## 2.2. Pouvoir de protection des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *V. dahliae* *in planta*

Pour évaluer l'efficacité des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard de *V. dahliae*, l'agent responsable de la verticilliose vasculaire de l'olivier, un suivi a été effectué chaque 10 jours jusqu'au 48<sup>ème</sup> semaines après plantation. La comparaison de la croissance axiale entre le lot traité uniquement par les isolats de *Trichoderma* spp. (T2, T9 et T12) et le lot traité par les isolats de *Trichoderma* spp. et *V. dahliae* (Vd4) indique une différence dans la croissance des plants de l'olivier en faveur du lot traité uniquement par les isolats de *Trichoderma* spp. Cela s'explique par le fait que l'isolat Vd4 de *V. dahliae* affecte la croissance des plantules d'olivier en réduisant leur activité métabolique et physiologique (voir figure 67).



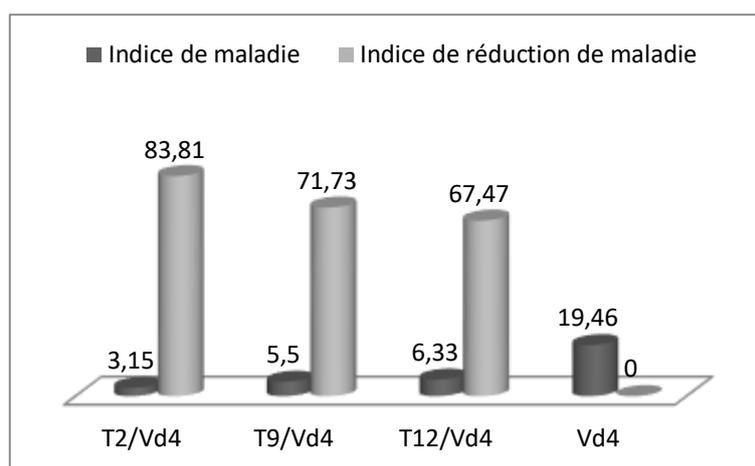
**Figure 67.** Comparaison de la croissance axiale entre les lots traités uniquement par les isolats de *Trichoderma* spp. (T2, T9 et T12) et les lots traités par les différents isolats de *Trichoderma* spp. en confrontation avec l'isolat Vd4 de *V. dahliae* après 48 semaines d'inoculation (Photo originale).

L'analyse de la variance a révélé une différence non significative ( $p > 0.05$ ) entre la croissance axiale des plants traités avec les isolats de *Trichoderma* spp. et une différence significative ( $p < 0.05$ ) (voir annexe 10) a été marqué entre les lots traités uniquement avec les

isolats de *Trichoderma* spp et les lots traités avec *Trichoderma* spp en confrontation avec l'isolat Vd4 de *V.dahlaie*. Cette réduction du pouvoir pathogène est due probablement à l'induction de la résistance systémique chez les lots traités par *Trichoderma* spp. et la production de plusieurs métabolites qui stimulent la croissance végétale tels que l'AIA, les gibbérellines, les phosphatases, fixation d'azote, la production des sédirophores et de l'ammoniaque.

Le traitement préventif par la suspension sporale des trois isolats de *Trichoderma* spp. (T2, T9 et T12) des plants de l'olivier contre le *V. dahlaie* (Vd4) a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de ces isolats et leur aptitude de lutte contre la verticilliose également.

Les essais effectués sur des plantules d'olivier âgées de 8 mois de la variété Chemlal ont montré une réduction de la sévérité de la maladie sur les lots traités préventivement par les spores des souches de *Trichoderma* spp. et de *V. dahliae* comparativement au témoin malade. L'inoculation des racines par les souches de *Trichoderma* spp. a atténué les symptômes de la maladie ce qui nous laisse suggérer que les souches appliquées peuvent contrôler et réduire la croissance du pathogène *V. dahliae* à un seuil acceptable. Le mécanisme déployé dans ce cas se base soit sur la protection des plantes contre les phytopathogènes par la production d'antibiotiques et/ou d'enzymes lytiques ou par induction de la résistance systémique après colonisation des tissus internes des plantes. D'autre part, nous avons observé que les oliviers inoculés par les isolats de *V. dahliae* et les souches de *Trichoderma* spp. perdent moins de feuilles par rapport au lot traité uniquement par les souches phytopathogènes de *V. dahliae*. Les souches de *Trichoderma* spp. ont réduit la gravité de la maladie, ce qui suggère une amélioration de la résistance des oliviers vis à vis de pathogène *V. dahliae*. De faibles indices de maladie ont été enregistrés, variant de 3,15 et 6,33 et de même, des pourcentages de réduction de l'indice de maladies très élevés ont été enregistrés, allant de 67,47 à 83,81. L'indice de la maladie le plus élevé (19,46) a été enregistré chez le témoin positif inoculé par le Vd4. Le traitement des plantules d'olivier par *Trichoderma aureoviridae* (T2) a confirmé l'indice de la maladie le plus faible (3,15) et a permis d'enregistrer le pourcentage de réduction de l'indice de maladie le plus élevé (83,81%). *Trichoderma harzianum* (T9) a induit un indice de maladie de 5,5 et une réduction de 71,73%. L'isolat de *T. harzianum* (T12) a donné un indice de maladie de 6,33 et 67,47% de réduction (Figure 68).



**Figure 68.** Effet de trois isolats *T. aureoviridiae* (T2), *T. harzianum* (T9) et *T. harzianum* (T12) sur l'indice de la verticilliose vasculaire de l'olivier.

### 3. Discussion

Sur la base des résultats de l'IR obtenus, il apparaît clairement que l'isolat Vd4 de *V. dahliae* (30,82%) été le plus virulent sur les plants de l'olivier de la variété Chemlal testés par rapport à l'isolat Vd5 avec IR qui ne dépasse pas 8,84%. Des I.R. relativement similaires (entre 10 et 60%) ont été rapportés par Boukenadel (2001); Bellahcene *et al.* (2005); Castroverde *et al.* (2010) et Reguragui (2005). Le rabougrissement ou le déficit de croissance causé par *V. dahliae* a été signalé chez l'olivier et d'autres espèces végétales comme le coton, la pomme de terre, le poivron, l'aubergine, le fraisier, et une plante ornementale (*Lagunarai patersonii*A.) (Ramualde, 1992; Pennisi *et al.*, 1993; Ferrandino, 1995; Polizzi, 1996; Cherrab *et al.*, 2002; Pegg et Brady, 2002; Tohidfar *et al.*, 2012) Il est à noter que la virulence de la souche Vd4, isolée à partir des plants de l'olivier à partir de la région Al-assnam (Bouira) est due probablement au phénomène de spécificité racinaire signalée par plusieurs auteurs (Lemanceau *et al.*, 1998; Mercado-blanco *et al.*, 2004). Cet I.R. qui est élevé peut être expliqué par la virulence de la souche elle-même, qui appartient au pathotype non défoliant de *V. dahliae*. Les travaux de Hu *et al.* (2015) ont montré la relation entre les pathotypes D et ND de la même espèce isolés à partir des arbres d'olivier. Ces mêmes auteurs ont signalé que les isolats de *V. dahliae* appartenant au pathotype non défoliant présentent des IR supérieur au IR des souches appartenant au pathotype défoliant.

Le suivi de l'effet de la lutte biologique contre *V. dahliae* (Vd4) a été étudié sur une période d'environ 12 mois. Les essais effectués sur des jeunes oliviers âgés de 8 mois de la variété Chemlal, ont montré une réduction 83,81% de la maladie sur le lot traité préventivement par l'isolat T2 de *Trichoderma aureoviridae* et ce comparativement au témoin

malade. En effet, des fortes attaques de flétrissement suivies par des dessèchements souvent unilatéraux sont observées sur les jeunes oliviers inoculés par l'isolat phytopathogène (Vd4) où l'indice de la maladie est aux alentours de 19. Les autres isolats de *Trichoderma* spp. T9 et T12 ont donné également des indices de réduction de la maladie très importants (71,73% et 67,47% respectivement).

Les champignons du genre *Trichoderma* spp sont connus pour leur rôle dans l'acquisition des nutriments et la défense des plantes contre les maladies (Chandanie *et al.*, 2006 ; Wehner *et al.*, 2010). Ils peuvent contrôler chez les cultures de plein champ, un grand nombre de champignons foliaires et terrestres (*Botrytis* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Rizoctonia solani*, *Pythium* sp., etc.) (Carrero-Carron *et al.*, 2016 ; Benzina *et al.*, 2020 et Chihat *et al.*, 2021). Cependant, l'ampleur de l'utilisation agricole de ces organismes symbiotiques reste limitée, à cause de la spécificité vis à vis de la plante hôte, ainsi que les interactions entre ces espèces et d'autres microorganismes, entre autres *Trichoderma* spp. qui ne sont pas encore clairement compris. Cette étude rapporte l'effet des isolats autochtones de *Trichoderma* spp. afin d'améliorer la croissance, par conséquent la résistance à la verticilliose de l'olivier.

Besnard et Davet (1993) et Hibar *et al.* (2005) ont comparé l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. sur les plants de tomate infectés par des pathogènes et qui ont présenté un développement végétatif et racinaire plus important que les plants témoins. Cette stimulation de croissance est due à l'augmentation du transfert des nutriments à partir du sol jusqu'aux racines (Kleifeled et Chet, 1992; Ousley *et al.*, 1994).

Des isolats autochtones de *Trichoderma* testé par Benzina *et al.* (2020), a pu produire de l'AIA en utilisant le L-tryptophane comme précurseur de synthèse. La production d'AIA par *T. harzianum* favorise la croissance des tiges et des coléoptiles. Cette même souche aussi présente un potentiel de solubilisation des phosphates, ce qui améliore la nutrition des plants de tomate. En outre, l'activité de biocontrôle contre *V. dahliae* chez les tomates a été détectée dès le début, les pourcentages les plus élevés de la diminution de l'incidence de la maladie ont été enregistrés pour l'isolat de *Trichoderma* spp. qui était respectivement de 60.7 et 52%, contre deux isolats de *V. dahliae* (Vd6 et Vd2).

Ce désavantage peut être dû à la durée de temps nécessaire à *Trichoderma* pour occuper prioritairement la niche écologique, en l'occurrence les racines et la rhizosphère et met à profit des plants, l'un de ses modes d'interaction, dont la compétition. Selon Caron *et al.* (2002), *T. harzianum* a un effet stimulateur de croissance si l'agent de lutte biologique est introduit au moins deux semaines avant l'arrivée de l'agent pathogène. Effectivement, les

souches de *Trichoderma* spp. ont une action préventive et efficace lorsqu'ils s'installent et colonisent les racines des plantes avant l'arrivée des champignons pathogènes à l'intérieur des racines.

En effet, Benítez *et al.* (2004) ont prouvé que les souches de *Trichoderma* spp. exercent une lutte biologique contre les agents phytopathogènes fongiques, soit indirectement, en se disputant les nutriments et l'espace, en modifiant les conditions environnementales ou en favorisant la croissance et les mécanismes de défense et d'antibiose des plantes, ou directement par des mécanismes tels que le mycoparasitisme.

Des résultats analogues à ceux que nous avons observés ont été rapportés par plusieurs auteurs, chez plusieurs plantes. A titre d'exemple, chez le modèle olivier–*V. dahliae* en présence de *T. harzianum* (Carrero-Carron *et al.*, 2018). Dans le domaine de bio contrôle, le genre *Trichoderma* sp. reste l'élément de choix dans l'élaboration des programmes de lutte biologique, car il possède un pouvoir antagoniste à large spectre d'action. Ce champignon agit directement sur la population pathogène de la rhizosphère, en libérant des métabolites affectant la croissance du pathogène et des enzymes extracellulaires capables de détériorer la paroi du pathogène. Outre ses activités antifongiques, *Trichoderma* spp. est capable de stimuler la résistance et la croissance des plantes face aux bio-agresseurs (Al-Ani, 2019).

---

## **Conclusion et Perspectives**

---

## **Conclusion et perspectives**

L'objectif principal de ce travail était d'identifier et de rechercher parmi le genre *Trichoderma* spp. de souches autochtones isolées du sol Algérien, notamment dans les zones qui n'ont pas été encore inspectées, lesquelles pourraient être efficaces contre le pathogène *Verticillium dahliae*, champignon phytopathogène responsable du flétrissement verticillien de l'olivier.

Dans ce contexte, plusieurs isolements ont été effectués et ont concernés, en premier lieu les souches de *Trichoderma* spp. isolées à partir des sols rhizosphériques des oliveraies dans différentes régions du nord Algérien (Boumerdes, Bouira, Béjaïa et Tipaza). En deuxième lieu, les souches du champignon phytopathogène *V. dahliae* isolées à partir des branches et des rameaux d'arbres d'oliviers présentant les symptômes caractéristiques de la verticilliose. Les souches isolées ont également été identifiées selon des techniques appropriées et référencées.

Au total, 187 isolats fongiques ont été isolés et caractérisés. L'identification macro et microscopique nous a permis d'attribuer ces isolats fongiques aux genres suivants: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Absidia*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium* et *Trichothecium roseum*. Avec une dominance du genre *Aspergillus* suivi par le genre *Penicillium* avec une fréquence de 19.25% et 15.50% respectivement.

Une collection de 20 isolats fongiques a été isolée à partir des branches et rameaux de l'olivier présentant des symptômes caractéristiques de la verticilliose. Le nombre le plus élevé des isolats de *Verticillium* sp. a été à partir de la région de Bouira avec un taux de (60%), suivie par la Wilaya de Boumerdes avec un taux d'isolement de (40%), alors qu'aucune souche n'a été isolé dans les Wilayas de Tipaza et de Béjaïa. L'identification moléculaire a confirmé que sur les 20 isolats testés, 11 isolats appartiennent à l'espèce de *Verticillium dahliae*, puisque elles ont la particularité de se recombiner et de s'amplifier avec les primers spécifiques de cette dernière. Ces résultats confirment la diversité génétique des souches de *V. dahliae* isolées à partir des oliveraies prospectées par la présence des deux pathotypes défoliant (D) (5 isolats) et non défoliant (ND) (6 isolats) caractéristiques des isolats de *V. dahliae* à travers le monde.

20 isolats ont été assignés au genre *Trichoderma* spp. sur la base des caractères morphologiques décrits par Rifai (1969) ; Bissett (1991) ; Gams et Bissett (1998) ; Samuels *et al.* (2002). En raison du degré élevé de similitude entre les espèces, les caractères morphologiques ne permettent pas une identification précise, c'est pourquoi nous avons procédé à l'identification de quelques isolats de *Trichoderma* spp. en séquençant l'ADN des régions d'espaceurs transcriptionnels internes 1 et 4 (ITS1 et ITS4) de l'ADNr. Cela a permis d'identifier 4 souches et de les attribuer à 2 espèces différentes, dont une *Trichoderma asperellum* (T4) et les trois autres appartiennent au groupe de *Trichoderma harzianum* (T7, T9 et T12). Cette étude a permis de déterminer la distribution des différentes espèces identifiées à travers les différentes régions prospectées.

Les résultats de l'étude réalisée sur le taux de croissance des isolats identifiés sur les différents milieux de culture testés, ainsi que la détermination des paramètres physico-chimiques de croissance nécessaire pour l'évaluation du pouvoir pathogène de *V. dahliae* ont montré une croissance optimale de ces souches sur les milieux organiques spécifiquement le milieu PDA, sous une température de 25°C à un pH=8 et à un cycle alternatif lumière et d'obscurité de 12h de lumière/12h d'obscurité.

Les isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une croissance optimale sur le milieu PDA à un pH 5 avec des valeurs de pH situés entre 4 et 6 pour un optimum de sporulation. La majorité des isolats de *Trichoderma* spp. sont considérés comme halotolérants, ils peuvent se développer sur PDA à 0.2M en NaCl avec une bonne croissance en absence du sel et une diminution du taux de croissance avec des concentrations croissantes de chlorure de sodium.

Par ailleurs, dans l'étude visant à sélectionner des isolats efficaces contre l'agent pathogène associé à la culture de l'olivier, un screening *in vitro* de l'activité antagoniste a été effectué afin d'évaluer le comportement des 15 isolats *Trichoderma* spp. à l'égard des 11 isolats de *V. dahliae*. L'évaluation de cette activité *in vitro* a porté sur l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance de *V. dahliae* en confrontation directe et indirecte. Il en ressort que la majorité des isolats de *Trichoderma* spp. ont un effet inhibiteur significatif sur la croissance mycélienne du pathogène via les trois modes d'action à savoir : la confrontation directe, la confrontation indirecte et les tests de l'effet des filtrats avec une variabilité du taux d'inhibition. Certains isolats de *Trichoderma* spp. ont révélé un potentiel mycoparasitaire très important.

Les deux isolats T2 et T12 ont enregistré le plus haut potentiel mycoparasitaire qui se traduit par leur aptitude à envahir et à sporuler au-dessus des colonies de *V.dahliae*. Les observations microscopiques ont révélé également l'effet mycoparasitaire de ces isolats qui se manifestent par un enroulement autour des hyphes du pathogène et une lyse cellulaire. Cependant l'isolat T14 s'est montré le plus efficace par la production des substances volatiles. De plus, les isolats T7, T2 et T8 se sont avérés efficace par la production des métabolites diffusibles à effet antifongique.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité enzymatique des isolats antagonistes sur milieu solide contenant un substrat adéquat, les résultats obtenus via les tests enzymatiques qualitatifs *in vitro* ont démontré que la majorité des isolats de *Trichoderma* spp. sont fortement productrice des enzymes impliqués dans le mycoparasitisme tels que les chitinases, les protéases et les glucanases. D'autres enzymes ont un intérêt dans le phénomène d'endophytisme sont également produites par les isolats de *Trichoderma* spp. comme les amylases, les pectinases, les cellulases et les lipases. Ces enzymes hydrolytiques sont indispensables pour la colonisation du milieu inter et intra cellulaire des plantes et pour renforcer par conséquent quelques propriétés métaboliques telles que l'amélioration de la croissance et le contrôle des agressions biotique et abiotique. Ils sont capables de produire également des enzymes solubilisateurs et fixateurs de molécules d'intérêts tels que le phosphate et l'azote qui favorisent la croissance des plantes et ceux par la production des phosphatases, des sidérophores, d'ammoniaque. Ces souches ont également prouvé leurs pouvoirs de production de certaines phytohormones, l'acide indole acétique (AIA) et des gibbérellines. Ceci nous laisse suggérer que ces isolats en plus de leur intérêt pour la lutte biologique, peuvent être des promoteurs de la croissance des plantes (Plants Growth Promoting Fungi).

Les espèces de *Trichoderma* spp. sont connues pour la production de plusieurs métabolites antifongiques. L'analyse des composés volatils réalisée à l'aide de chromatographies en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS), nous a permis d'approfondir nos connaissances sur leur potentiel en matière d'antibiose par composés volatils. Les espèces *T. aureoviride* (T2), *T. harzianum* (T9), *T. harzianum* (T12) et *T. koninji* (T14) se sont montrés producteurs de plusieurs métabolites appartenant à des classes chimiques différentes et ayant des propriétés antifongiques tels que le Phényléthyl alcool (dérivé alcoolique), des acides gras (e.g. acide palmitique, acide octadecenoïque), des

alcanes (Undecane, Tetratriacontane, Eicosane), des amides comme (9-Octadecenamamide, (Z), cis-11-Eicosenamamide et le 13-Docosenamamide, (Z)).

Les essais réalisés *in planta* sur des plants d'olivier de la variété sensible Chemlal âgées de 8 mois ont permis d'une part ; de reproduire les mêmes symptômes typiques de la verticilliose (chloroses, nécroses, flétrissement, dessèchement, rabougrissement et mort des plantes) observés sur terrain dans nos conditions expérimentales et de confirmer et de s'assurer de la virulence des isolats de *Verticillium dahliae* inoculés et d'autres parts de l'effet protecteur des isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard de ce même pathogène. Nous avons noté que l'isolat Vd4 de *V. dahliae* était plus agressif que Vd5 selon les paramètres mesurés (indice de rabougrissement et indice d'altération des feuilles). Il a ainsi été constaté que les trois isolats antagonistes de *Trichoderma* (T2, T9 et T12) sont capables de réduire significativement l'incidence de la maladie du flétrissement vasculaire chez l'olivier. Cette étude a montré que l'action des souches de *Trichoderma* testées ne se limite pas seulement à la protection de la plante mais aussi à la stimulation de la croissance de l'olivier. De plus, les résultats obtenus dans la caractérisation de ces souches y compris la production des substances favorisant la croissance des plantes (AIA) et la solubilisation de phosphate sont corrélés avec les résultats obtenus *in vivo*, cela nous laisse supposer que ces isolats sont aussi des PGPF présentant des compétences rhizosphériques en stimulant la croissance végétative.

Au terme de cette étude et à la lumière des résultats trouvés, nous pouvons conclure d'une façon concordante que nos objectifs sont atteints et nous préconisons l'utilisation des isolats de *Trichoderma* spp. dans la lutte préventive contre la verticilliose et dans la promotion de la croissance de l'olivier.

**Par ailleurs, nos résultats éclairent de nombreuses perspectives et voies de recherche intéressantes, notamment:**

- Tester les souches de *Trichoderma* spp. à plus grande échelle et en conditions plus proches de la réalité (Serres, champs).
- Mettre en évidence de nouvelles formulations biologiques à base des souches les plus performantes de *Trichoderma* spp. possédant des propriétés antagonistes et de stimulation de la croissance des plantes.
- Etudier la persistance et l'influence des facteurs abiotiques tels que les pH extrêmes et la salinité des sols, la sécheresse, les fluctuations des températures, les stress métalliques afin

d'assurer une bonne croissance et un effet meilleur des souches de *Trichoderma* spp. *in planta*.

- Des travaux d'expérimentation ou de suivis *in planta* seraient nécessaires afin de confirmer l'intérêt de cette étude qui a permis de mettre en avant l'intérêt de l'utilisation d'un agent antagoniste du genre *Trichoderma* sp, En effet, malgré son efficacité, dans des conditions contrôlées *in vitro*, les souches de *Trichoderma* spp. peuvent présenter des difficultés lors de sa mise en œuvre *in planta* (absence d'optimisation des expérimentations et standardisation, contraintes d'élaboration, difficultés de confirmer les résultats des essais *in vitro* dans le champ). Face à ces limites, des tests de nouvelles matières actives pouvant pallier les inconvénients de cette stratégie.

- Elargir l'expérimentation *in planta* des souches de *Trichoderma* spp. les plus performantes contre d'autres souches phytopathogènes de dépérissement de l'olivier.

- L'utilisation des souches de *Trichoderma* spp. dans une approche de lutte intégrée

- Etudier la biosécurité et l'impact du relâchement d'un biopesticide formulé à base de *Trichoderma* spp. sur l'environnement et la santé humaine.

- Purification de la nouvelle molécule (7-epi-Nemorosone) produite par la souche T12 (*Trichoderma harzianum*) et la mise en évidence de ses activités antitumorale, antioxydante et antibactérienne.

- Production des enzymes d'intérêt de lutte à l'échelle industrielle.

- Purification des enzymes produites par ces isolats et la détermination de leurs structures

- Identifier les mécanismes d'interaction et les relations trophiques établies entre les isolats performants et les racines de l'olivier. Pour comprendre les capacités de survie et de maintien des isolats de *Trichoderma* spp. au sein d'une rhizosphère. De telles connaissances nous aident à l'élaboration et/ou l'optimisation d'un produit bioformulé à base de *Trichoderma* spp. utilisé comme agent de biocontrôle au sein d'une rhizosphère donnée.

---

## **Références bibliographiques**

---

## Références bibliographiques

- Aarti, T., Meenu, S. (2015).** Role of volatile metabolites from *Trichoderma citrinoviride* in biocontrol of phytopathogens. *Int J Res Chem Environ* 5: 86–95.
- Abdelguerfi, A. (2003).** Rapport de Synthèse sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie ». MATE-GEF/PNUD: Projet ALG/97/G31.123p.
- Abdel-Sater, M.A. (2001).** Antagonistic interactions between fungal pathogen and leaf surface fungi of onion (*Allium cepa* L.). *Pakistan journal of biological sciences*. 2001; 4: 838-842.
- Abe, C.A.L., Faria, C.B., De Castro, F.F., de Souza, S.R., Santos, F.C., da Silva, C.N., Tessmann, D.J., & Barbosa-Tessmann, I.P. (2015).** Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 15328–15346.
- Abu-Qamar, M., & Al-Raddad, A. (2001).** Integrated control of Verticillium wilt of olive with cryptonol in combination with a solar chamber and fertilizer. *Phytoparasitica*, 29 (3), 223-230.
- Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Hsu, M. (2007).** Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Braz J Microbiol* 38(4):739–742.
- Agrawal, T., Kotasthane, A.S. (2012).** Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus* 1(1):73.
- Ahmad, I., & Baker, R. (1987).** Composition saprophytic ability and Cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*,” *Phytopathology*, vol. 77. P: 358-362.
- Akrami, M., Hadi, G., Ahmadzadeh, M. (2011).** Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling Fusarium rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10 : 2653-2658.
- Al-Ani, L.K.T. (2019).** Bioactive secondary metabolites of *Trichoderma* spp. for efficient management of phytopathogens. In: Singh HB, Keswani C, Reddy MS, Royano ES, García-Estrada C (eds) *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms - discovery and applications*. Springer, Singapore, pp 125–143.
- Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K., & Hasnain, S. (2009).** Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 542–547.
- Altieri, C., Cardillo, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M. (2007).** Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. *J Food Prot* 70(5):1206–1212.
- Amira, M.B., Lopez, D., Mohamed, A.T., Khouaja, A., Chaar, H., Fumanal, B., Gousset-Duponta, A., Bonhomme, L., Labela, P., Goupila, P., et al. (2017).** Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biol Control*. 110:70–78.
- Anaissie, E. J., McGinnis, M.R., & Pfaller, M.A. (2003).** Clinical mycology. *Annals of Internal Medicine*, 138(9), 776.

- Anderson, R.D. (1993).** Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dans : Proceedings of the International Symposium Cellular and Molecular Aspects of Biosynthesis and Action of the Plant Hormone Ethylene. (Agen, France, 31 août – 4 septembre, 1992). Pech J.C., Latché A. & Balagué C. (éds.). New York, Springer, pp 197-204.
- Andrabi, M., Vaid, A., Razdan, V.K. (2011).** Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *J Plant Prot Res* 51: 5–59.
- Anees, M.R., Azim, S., Ur Rehman, M., Jamil, S., El Hendawy, N.A., Al Suhaiban, N.A. (2018).** Antifungal potential of *Trichoderma* strains originated from North Western regions of Pakistan against the plant pathogens. *Pak. J. Bot* 50(5): 2031–2040.
- Aneja, M., Gianfagna, T.J., & Hebbar, P.K. (2005).** *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 304-307.
- Angel, L.P.L., Yusof, M.T., Ismail, I.S., Ping, B.T.Y., Azni, I.N.A.M., Kamarudin, N.H., Sundram, S. (2016).** An *in vitro* study of antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense*. *J. Microbiol.* 54, 732–744.
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E. (2014).** Biological control agents (BCAs) of Verticillium wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathology*, 63: 1062–1069.
- Arias-Calderon, R., Leon, L., Bejarano-Alcazar, J., Belaj, A., de la Rosa, R., Rogriguez-Jurado, D. (2015b).** Resistance to Verticillium wilt in olive progenies from open-pollination. *Sci Hortic* 185:34-42.
- Arias-Calderón, R., Rouiss, H., Rodríguez-Jurado, D., De la Rosa, R., León, L. (2014).** Variability and heritability of fruit characters in olive progenies from open-pollination. *Scientia Horticulturae*, 169: 94–98.
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Bonfante, P. (1992).** Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Protoplasma*, 171, 34–43.
- Attrassi, K., Selmaoui, K., Touhami, A.O., Badoc, A., & Douira, A. (2005).** Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144(1-2), 47-62.
- Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M., & Ghigo, J. M. (2015).** Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233. doi: 10.1093/femsre /fuu013.
- Avis, T., Boulanger, R., Bélanger., R. (2000).** Synthesis and biological characterization of (Z)-9-heptadecenoic and (Z)-6-methyl-9-heptadecenoic acids: fatty acids with antibiotic activity produced by *Pseudozyma focolosa*. *J Chem Ecol* 26(4):987–1000
- Azabou, M.C., Gharbi, Y., Medhioub, I., Ennouri, K., Barham, H., Tounsi, S., & Triki, M.A. (2020).** The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against Verticillium wilt of olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control*, 142, 104168.
- Baakza, A., Dave, B.P., Dube, H.C. (2004).** Chemical nature, ligand denticity and quantification of fungal siderophores. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42, 96-105.

- Bachouche, N., & Kellouche, A. (2012).** Etude de l'entomofaune de l'olivieraie de la region de TiziOuzou. Algérie. 1-6.
- Baídez, A.G., Gómez, P., del Río, J.A., & Ortuño, A. (2007).** Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 55:3373-3377.
- Baker, S.E., Perrone, G., Richardson, N.M., Gallo, A., Kubicek, C.P. (2012).** Phylogenomic analysis of polyketide synthase-encoding genes in *Trichoderma*. *Microbiology (Reading, England)* 158, 147-154.
- Bakker, A.W., & Schippers, B. (1987).** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry.* 19: 451–457.
- Banaras, S., Javaid, A., Shoaib, A., Ahmed, E. (2017).** Antifungal activity of *Cirsium arvense* extracts against phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Planta Daninha* 35:e0171.
- Bastos, C.N. (2001).** Effect of temperature, pH and nutrition on growth and sporulation of *Trichoderma stromaticum* sp. nov., an antagonist of cocoa witches' broom pathogen. *Summa. Phytopathol.*, 27: 73–76.
- Beckman, C.H. (1981).** Modelling the succession of host-parasite interactions in vascular diseases of plants. Pags. 15-35 en: Pathobiology fo *Verticillium* species. Pro. 3rd International Symposium on *Verticillium*, Bari, Italy. *Phytopathol Mediterr* 23: 95-221.
- Bedine Boat, MA., Sameza, M.L., Iacomì, B., Tchameni, S.N., Boyom, F.F. (2020).** Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-of pathogens. *Biocontrol Science and Technology* 30(3):228–242.
- Békési, P. (2007).** Sunflower diseases in 2007. *Agrofórum*, 18:17–19.
- BEKKAR, A. A. (2015).** Pouvoir antagoniste et mode d'action du *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes (Doctoral dissertation, Université Mustapha Stambouli de Mascara, Département de Bi).
- Bekkar, A.A., Belabid, L., & Zaim, S. (2016).** Biocontrol of Phytopathogenic *Fusarium* spp. by Antagonistic *Trichoderma*. *Biopestic. Int.* 12(1): 37-45. <http://0973-483X/12.01/37-45>.
- Belabid L. (2003).** La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le Nord Ouest Algérien: morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f.sp. *lentis* (Vasud. & Srini.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. *Doct. D'Etat. Univ. Oran (Algérie)*, 178p.
- Bellahcene, M. (2004).** La verticilliose de l'olivier : étude épidémiologique et diversité génétique de *Verticillium dahlia* kleb., Agent de la verticilliose. Thèse. *Doct. D'Etat. Univ. Oran (Algerie)*. 144pp.
- Bellahcene, M., Assigbetsé, K., Fortas, Z., Geiger, J.P., Nicole, M., Fernandez, D. (2005).** Genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from olive trees in Algeria. *Phytopathol. Mediterr.*, 44: 266–274.
- Bellahcene, M., Fortas, Z., Geiger, J.P., Matallah, A., Henni, D. (2000).** *Verticillium* wilt in olive in Algeria: geographical distribution and extent of the disease. *Olive*, 82: 41– 43.

- Bellahcene, M., Fortas, Z., Henni, D., Matallah, A., Geiger, J.P., Nicole, M. (1997).** Importance and epidemiology of *Verticillium dahliae* (Kleb.) on olive in Kabylie. In: Proceeding oh 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, june 1-5, Montpellier, France, 661p.
- Bellahcene, M., Fortas, Z., Kaddous, M., Matallah, A., Nicole, M., Geiger, J.P. (1998).** La verticilliose de l'olivier dans les oliveraies de la région ouest d'Algérie : estimation du taux d'infection, caractérisation de l'agent causal et analyse quantitative des microsclerotes dans le sol. XI<sup>ème</sup> Journées Nationales de Microbiologie, S.A.M, 30 Nov – 1 Dec, Oran, Algérie, pp. 36-37.
- Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2004).** Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. International Journal of Food Microbiology. 96, 19-27.
- Benchabane, M. (1990).** Observation des cas de verticilliose de l'olivier à cap Djinet et Sidi-Aïch. Rapport de mission. ITAF, Algérie. p 5.
- Benchabane, M., Alia, A., Fadil, J., Toua1, D. (2010).** Etat de la verticilliose dans quelques oliveraies algériennes. Revue Ezzaitouna, 11(1).
- Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC (2004)** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol 7(4):249-260
- Benouzza, S., Bellahcene, M., & Fortas, Z. (2021).** Biocontrol of *Verticillium dahliae* by native *Trichoderma* strains isolated from Algeria. *MYCOPATH*, 18(2).
- Benouzza, S. (2012).** Inventaire de la mycoflore de la rhizosphère de l'olivier et étude de ses potentialités antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae* Kleb : agent de la verticilliose de l'olivier. *Mycopath*, 18(2), 59-70.
- Benzina-Tihar, F., Reghmit, A. N., Oulebsir-Mohandkaci, H., Sahir-Halouane, F.2020.** Endophytic olive fungi (*Olea europaea* cv. *europaea*) from the north of Algeria and screening of their antagonist activities against *Verticillium dahlia*. IOBC-WPRS Bulletin. P : 7-15.
- Benzina-Tihar, F., Sahir-Halouane, F., & Hameed, K.M. (2016).** Algerian isolates of fluorescent 'Pseudomonas' spp. as potential biological control against wilt pathogen ('*Verticillium dahliae*'). *Plant Omics*, 9(1), 48-60.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., Hallmann, J. (2002).** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 51(2):215–229.
- Berlanger, I., Powelson, M.L. (2005).** Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. American Phytopathological Society, <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/VerticilliumWilt.aspx>. Page Consultée le 9 novembre 2010.
- Besnard, O. & P. Davet. (1993).** Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp. à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes. *Agronomie* 13 : 413-421.
- Besri, M. (1980).** Influence du potentiel osmotique de l'eau sur la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et de *Verticillium dahliae*. *Phytopathologische Zeitschrift* 99, 1-8
- Besri, M., & Diatta, F. (1985).** Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamidés. *Bull. OEPP*, 15(3) : 379-386.

- Beye, I., & Lafay, J.F. (1985).** A study of selection criteria for general resistance to *Verticillium* wilt in tomato [*Verticillium dahliae*; components, notation, growth, flowering, foliar symptoms]. Agronomie (France).
- Binder, E.M. (2007).** Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133: 149–166.
- Birem, F. (2009).** Evaluación de la resistencia de cultivares de olivo al patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* y de las alteraciones fisiológicas en plantas infectadas.
- 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. Intrageneric classification. *Can. J. Bot.* 60:2357-2372.
- Bissett, J. (1991b).** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. *Can. J. Bot.* 69:2373-2417.
- Bissett, J. (1991c).** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. *Can. J. Bot.* 69:2418-2420.
- Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M., & Caballero, J.M. (1984).** Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathol. Mediterr.* 23:1-8.
- Błaszczuk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., Jedryczka, M. (2014).** *Trichoderma* spp. application and prospects for use in organic farming and industry. *J Plant Prot Res*, 54:309–317.
- Blumer, C., & Haas, D. (2000).** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.
- Bortolus, M., de, Z.M., Formaggio, F., Maniero, A.L. (2013).** Alamethicin in bicelles: Orientation, aggregation, and bilayer modification as a function of peptide concentration. *Biochimica et Biophysica Acta.*;1828:2620-2627.
- Botton, B., Bretton, A., Fever, M., Gautier, S., Guy, Ph., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.-J., Vayssier, Y., & Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. Pp., 34- 428.
- Boughalleb-M’Hamdi, N., Salem, I.B., M’Hamdi, M. (2018).** Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28: 25.
- Boukenadel, F. (2001).** Contribution à l’étude de *Verticillium dahliae* Kleb., agent de la verticilliose de l’olivier. Mém. Magister, Univ. Tlemcen (Algérie), 103p.
- Boutkhil, S. (2017).** Isolement, identification et caractérisation physiologique et pathogénique de quelques pathogènes de l’olivier (*Olea europea* L.) (Doctoral dissertation).
- Brewer, D., Mason, F.G., Taylor, A. (1987).** The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. *Can J Microbiol* 33, 619–625.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., & Silverstone, S. (1991).** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Env. Microbiol.* 533- 538.

- Brueckner, H., Graf, H., Bokel, M. (1984).** Paracels in, characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. *Experientia* 40:1189–1197.
- Bubici, G., Cirulli, M. (2012).** Control of Verticillium wilt of olive by resistant rootstock. *Plant Soil*, pp 363–376.
- Budzikiewicz, H. (2004).** Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.). In: Budzikiewicz H, Flessner T, Jautelat R, Scholz U, Winterfeldt E, Herz W, Falk H, Kirby GW, eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna: Springer Vienna, 81–237.
- Burke, B.A., Nair, M.G. (1989).** Antimicrobial/antifungal compositions. United States Utility Patent, US4876277.
- Burmeister, L. (2008).** The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. These de doctorat, université de gottfried wilhelm Leibniz, hanovre, Allemagne, 135p.
- Cabanás, C.G.L., Schilirò, E., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J. (2014).** The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. *Front. Microbiol.*, 5:427.
- Camporota, P. (1985).** Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie*, 5(7), 613-620.
- Cantrell, S.A., Casillas-Martínez, L., Molina, M. (2006).** Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol Res*;110:962–970.
- Caron J., Laverdiere L., Pierre O., Thibodeau G., & Richard R.B. (2002).** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 (2): 73-87.
- Carrero-Carrón, I., Rubio, M.B., Niño-Sánchez, J., Navas-Cortés, J.A., JiménezDíaz, R.M., Monte, E., et al. (2018).** Interactions between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible wild olive clones. *Plant Pathol.* 67, 1758–1767.
- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J.L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., & Jiménez-Díaz, R.M. (2016).** *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of Verticillium wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Prot.* 88, 45–52.
- Castroverde C.D.M., Nazar R.N., Robb J. (2010).** Defense genes in tomato. In E.D. Aubé and F.H. Poole (eds.) *Tomatoes: Agricultural Procedures, Pathogen Interactions and Health Effects*. Hauppauge, New York: Nova Publishers (in press).
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., & Fuhrmann, J.J. (1999).** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bioforma*, Edition Bioforma Paris, 25: 26 - 45.
- Chandanie, W. A., Kubota, M., & Hyakumachi, M. (2006).** Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant and soil*, 286(1), 209-217.

- Chandrakala, A., Chandrashekar, S.C., Jyothi, G., & Ravikumar, B.M. (2012).** Effect of cell-free culture filtrates of bio-control agents on the spore germination and infection by *Phytophthora infestans* causing late blight of potato. *G.J. B.A.H.S*, 1(2): 40-45.
- Chaverri Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS (2008).** Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B*;9:753–63.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., Geiser, D.M. (2003).** Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol*, 27:302–313.
- Chaverri, P., Samuels, G.J. (2004).** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Stud. Mycol*, 48:1-116.
- Cherrab, M., Zaouid, D., Bennani, A., Serrhini, M.N. (2002).** Etude du pouvoir pathogène des isolats de *Verticillium dahliae* Kleb. issus de l'olivier (picholine marocaine) au Maroc, *Actes. Inst. Agron.Vet.*, 22 : (1) 31- 37.
- Cherukupally, R., Amballa, H., Reddy, B.N. (2017).** *In vitro* screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. *Ann Plant Sci* 6:1784–1789.
- Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I. (1997).** Fungal antagonists and mycoparasites,” Wicklow DT, Soderstrom B(eds.). *The mycota IV: Environmental and microbial relationships*, Springer-Verlag Berlin. P: 165-184.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, I. (1998).** Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial Relationships*. Springer-Verlag, Berlin pp 165–184.
- Chihat S, Aleandri M P, Vannini A, Bruni N, Boureghda H (2021).** Identify and biocontrol efficiency of *Trichoderma* spp. Isolated from different soils and ecosystems in Algeria. *Journal of Plant Pathology*.
- Christianson, D.W. (2008).** Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology* 12: 141–150.
- Cirulli, M. (1975).** Il deperimento dell'olivo da *Verticillium dahliae* kleb. *L'Italia Agricola*, 112: 120–4.
- Colella, C., Miacola, C., Amenduni, M., D'Amico, M., Bubici, G., & Cirulli, M. (2008).** Sources of *Verticillium* wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant Pathol.* 57:533-539.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., Jiménez-Díaz, RM. (2006).** Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology*, 96(5), 485-495.
- Collier, L., Balows, A., & Sussman, M. (1998).** *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9, (4). Arnold, London, Sydney, Auckland, New York.
- Collins, D.P., Jacobsen, B.J. (2003).** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 153–161.

- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010).** Plant growth promoting rhizobacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 669-678.
- CsÖndes, I., Cseh, A., Taller, J., Poczai, P. (2012).** Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Mol Biol Rep*, 39: 3259–3269.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B.A., Ramirez-Apan, T., & Cárdenas, J. (2002).** Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Naturforsch C* 57: 372-378.
- Cutler, H.G., Jacyno, J.M. (1991).** Biological activity of (-) harzianopyridone isolated from *Trichoderma harzianum*. *Agric Biol Chem* 55:2629–2631
- Damalas, C.A., Koutroubas, S.D. (2018).** Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* 8: 13.
- Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., Keshelava, R., Tediashvili, M., Vainstein, A., Khmel, I., Szegedi, E., Chernin, L. (2011).** Broadrange antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 110,
- Das, A., Dutta, B.K. & Barooah, A.K. (2013).** *In vitro* Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Fungi Isolated from Tea Agroecosystem Soil of Barak Valley, Southern Assam. *International Journal of Microbiological Research*, 4 (3): 336-341.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K. & Pandey, A. (2010).** Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol*, 27: 259-265.
- Dave, B.P., Anshuman, K., Hajela, P. (2006).** Siderophores of halophilic archaea and their chemical characterization. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 340-3
- De Castro, A.M., Ferreira, M.C., Da Cruz, J.C., Pedro, K.C.N.R., Carvalho, D.F., Leite, S.G.F., Pereira, N. (2010).** High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res*, 1 (1): 1–8.
- De Jonge, R., & Thomma, B.P. (2009).** Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity. *Trends Microbiol* 17: 151-157.
- De Jonge, R., Van Esse, H.P., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Thomma, B.P. (2012).** Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 5110-5115.
- De la Cruz Quiroz, R., Roussos, S., Hernández, D., Rodríguez, R., Castillo, F., Aguilar, C.N. (2015).** Challenges and opportunities of the biopesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. *Critical Reviews in Biotechnology*. 35, 326-333.
- De la Cruz, J., Rey, M., Lora, J.M., Hidalgo-Gallego, A., Dominguez, F., Pintor-Toro, J.A., Liobell, A., Benitez, T. (1993).** Carbone source control on  $\beta$ -glucanase, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol.*, 159: 316-322.

- De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Rodríguez-Herrera, R., Hernandez-Castillo, D., Aguilar, C.N. (2018).** Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science* 4(2):237–243.
- Debbi, A., Bouregghda, H., Monte, E., Hermosa, R. (2018).** Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *front. Microbiol* 9:282.
- Degenklob, T., Berf, A., Gans, W., Schlegel, B., & Grafe, U. (2003).** The occurrence of peptaibols and structurally related peptaiboliques in fungi and their fragment ions. *J. Peptide. Sci.*9:666-678.
- Degenkolb, T., Von Döhren, H., Fog Nielsen, K., Samuels, G.J., Brückner, H. (2008).** Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity* 5: 671–680.
- Deghiche-Diab, N., Deghiche, L., & Belhamra, Y.I. (2021).** New record of *Phloeotribus scarabaeoides* (Bernard, 1788) on introduced olive trees in Biskra region–Algeria. *Munis Entomology & Zoology*, 16(2), 1093-1102.
- Dendouga, W., Bouregghda, H., Belhamra, M. (2016).** Biocontrol of Wheat *Fusarium* Crown and Root Rot by *Trichoderma* spp. and Evaluation of Their Cell Wall Degrading Enzymes Activities. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 51 (1), pp. 1–12.
- Dendouga, W., Bouregghda, H., Belhamra, M. (2017).** Impact des facteurs écologiques sur les moisissures antagonistes et productrices des enzymes hydrolytiques. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 51 (1), pp. 1–12.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971).** Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*; 57: 41-48.
- Deravel, J., Krier, F., & Jacques, P. (2013).** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*.
- Dervis, S., Yetisir, H., Yıldırım, H., Tok, F.M., Kurt, S., & Karaca, F. (2009).** Genetic and pathogenic characterization of *Verticillium dahliae* isolates from eggplant in Turkey. *Phytoparasitica*, 37(5), 467-476.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003).** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol*, 4(5), 315-325.
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., & Samuels, G.J. (2003).** *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.
- Doneche, B., Pucheu-Plante, B. (1986).** Influence de divers effecteurs sur le développement de *Botrytis cinerea* en milieu synthétique: Définition d'un cycle conidien. *Vitis*, 25: 21-30.
- Douglas, D.R. (1972).** The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. *Can. J. Bot.*, 50: 629-634.
- Douzane, M., Daas, M.S., Meribai, A., Guezil, A.H., Abdi, A., & Tamendjari, A. (2021).** Physico-chemical and sensory evaluation of virgin olive oils from several Algerian olive-growing regions. *OCL*, 28, 55.

- Drechsel, H. & Jung, G. (1998).** Peptide Siderophores; *Journal of Peptide Science*; 4; 147-181
- Druzhinina IS, Komoń-Zelazowska M, Atanasova L, Seidl V, Kubicek CP (2010).** Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLoS ONE*;5:9191.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C.P. (2005).** Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B:100-112.
- Druzhinina, I., & Kopchinskiy, A. (2006).** *Hypocrea/Trichoderma* Biodiversity [Online]. Available at: <http://www.isth.info/biodiversity/index.php> [Accessed: 16 March 2013].
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., & Kubicek C. (2006).** The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, Vol.47 No. 2, pp. 55–64, ISSN 1618-2545.
- Druzhinina, I., Kubicek, C. (2005).** Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University Science*.Vol. 6B, No. 2, pp. 100-112, ISSN 1009-3095.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology* 9: 749–759.
- Dubey, S., Tripathi, A., Dureja, P., & Grover, A. (2011).** Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi", *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 81, No. 5.
- Dubos, B. (1986).** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers.ex Fr) Pouzar (Plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. L'emploi d'ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l'INRA, N°34. 10 janvier 1985. Versailles (France), pp 37-49.
- Dunlop, R.W., Simon, A., Sivasithamparam, K. (1989).** An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *J Nat Prod* 52:67–74.
- Easton, G.D., Nagle, M.E, Bailey, D.L. (1969).** A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation water. *Phytopathology*.
- Edi-Premono, M., Moawad, A.M., & Vlek, P.L.G. (1996).** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones. J. Crop Sci*, 11:13-23.
- Egli, S., Brunner, L. (2002).** Les mycorhizes: une fascinante biocénose en forêt. WSL Birmensdorf. 8p.
- Eisendle, R., Oberegger, P., Buttinger., & Illmer Haas, H. (2004).** Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the Pae C-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*," *Eukaryotic cell*.Vol. 3. P: 561-563.
- Elad, Y., & Kapat, A. (1999).** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. (1981).** A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9: 59-67.

- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004).** Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems- an introduction. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen (eds.), *Botrytis, Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 1–8.
- El-Katatny, M.H. & Emam, A.S. (2012).** Control of postharvest tomato rot by spore suspension and antifungal metabolites of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 1: 1505-1528.
- El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S, Gübitz, G.M. (2000).** Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technol Biotechnol*. 38:173–180.
- El-Katatny, M.S. (2004).** Inorganic phosphate solubilisation by free or immobilized *Trichoderma harzianum* cells in comparison with some other soil fungi. *Egyptian J. Biotechnol*. 17: 1338-1353.
- El-Sobky, M.A, Fahmi, A.I, Eissa, R.A, El-Zanaty, A.M. (2019).** Genetic characterization of *Trichoderma* spp. isolated from diferent locations of Menoufa Egypt and assessment of their Antagonistic Ability. *J Microb Biochem Technol*, 11(1).
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., Von Tiedemann, A. (2007).** Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 259–274.
- Eziashi, E.I., Uma, N.U., Adekunle, A.A., Airede, C.E. (2006).** Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *Afr J Biotechnol*, 5:703– 706.
- Fabbri, A., Lambardi, M., Ozden-Tokatli, Y. (2009).** Olive Breeding. *Breeding Plantation Tree Crops*, 12: 423-465.
- FAO Stat. (2017).** <http://faostat.fao.org/>.
- FAOSTAT. (2018).** Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Dataset. Rome, Italy: FAO.
- FAOSTAT. (2020).** Production Statistics. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (accessed on 17 February 2020).
- Ferrandino, F.J. (1995).** How *Verticillium* wilt affect yields of eggplants, tomato and potatoes. *PlantScience*, 32 :2-5.
- Fgaier, H., Eberl, H., (2011).** Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *J Theo Biol*, 273, 103–114.
- Fiddman, P.J., Rossall S. (1993).** The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 119-126.
- Fincheira, P., Parada, M., & Quiroz, A. (2017).** Volatile organic compounds stimulate plant growing and seed germination of *Lactuca sativa*. *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 17, 853–867.
- Fraud, S., Rees, E.L., Mahenthiralingam, E., Russell, A.D., Maillard, J.Y. (2003).** Aromatic alcohols and their effect on gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1435–1436.

- Fravel, D.R., Connick, W.J., Lewis, J.A. (1998).** Formulation of Microorganisms To Control Plant Diseases. In: Burges HD, ed. *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Dordrecht: Springer Netherlands, 187–202.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zreibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S., Elad, Y. (2004).** *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*, and survival in strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110: 361-370.
- Fuchs, Y., Saxena, A., Gamble, H.R., Anderson, J.D. (1989).** Ethylene biosynthesis-inducing protein from Cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol*, 89: 138-143.
- Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U., Ebizuka, Y. (2001).** Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry & Biology* 8: 189–197.
- Fujiwara, A., Okuda, T., Masuda, S. (1982).** Isonitrile antibiotics, a new class of antibiotics with an isonitrile group. I. Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. *Agric BiolChem* 46:1803–1809.
- Gaigole, A.H., Wagh, G.N., Khadse, A.C. (2011).** Antifungal activity of *Trichoderma* species against soil borne pathogen. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 2: 461-465.
- Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G., Müller, R. (2002).** The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 13082–13090.
- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., et al. (2011).** Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol*; 77:5100–5109.
- Gamliel, A., Austerweil, M., & Kritzman, G. (2000).** Non-chemical approach to soil-borne pest management-organic amendments. *Crop Protection*, 19: 847-853.
- Gams, W., & Bissett J. (2002).** Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C. P. and Harman, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd, pp. 3-31.
- Gams, W., Bissett, J. (1998).** Morphology and Identification of *Trichoderma* . In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd. pp. 3–34.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993).** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Garo, E., Starks, C.M., Jensen, P.R. (2003).** Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. *J Nat Prod* 66:423–426.
- Gershon, H., McNeil, M.W, Parmegiani, R., & Godfrey, P.K. (1971).** *Appl. Environ. Microbiol.* 22(3), 438-440.
- Gharbi, Y., Barkallah, M., Bouazizi, E., Cheffi, M., Krid, S., Triki, M.A., Gdoura, R. (2016b).** Development and validation of a new real-time assay for the quantification of *Verticillium dahliae* in the soil: a comparison with conventional soil plating. *Mycol Progress*, 15: 54.

- Gharbi, Y., Bouazizi, E., Triki, M.A., Gdoura, R. (2016).** Phenotypic and Molecular Characterization of *Verticillium dahliae*, the Causal Agent of Verticillium Wilt of Olive in Tunisia. *Journal of Applied Life Sciences International*, 4(3): 1-8.
- Gharbi, Y., Triki, M.A., Trabelsi, R., Fendri, I., Daayf, F., Gdoura, R. (2014).** Genetic structure of *Verticillium dahlia* isolates infecting olive trees in Tunisia using AFLP, pathogenicity and PCR markers. *Plant Pathology*, 64,871–879.
- Ghisalberti, E.L., & Sivasithamparam, K. (1991).** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol Biochem*, 23: 1011–1020.
- Ghodsalavi, B., Ahmadzadeh, M., Soleimani, M., Madloo, P.B., & Taghizad-Farid, R. (2013).** Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *AJCS*. 7, 338-344.
- Ghosh, S.K., Banerjee, S., Sengupta, C. (2017).** Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic fungi. *J Biopest*. 10(2): 105–112.
- Ghosh, S.K., Pal, S., Chakraborty, N. (2015).** The qualitative and quantitative assay of siderophore production by some microorganisms and effect of different media on its production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 153-157.
- Gibka, A.J., Styczynska, K., Glinski, M. (2009).** Antimicrobial activity of undecan-3-one, undecan-3-ol and undec-3-yl acetate. *CentrEur J Immunol*. 2009; 34:154-157.
- Gomes, R.C., Semedo, L.T.A.S., Soares RMA, et al. (2000).** Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 30:146–150.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Legarda, G., Ruano-Rosa, D., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Niqui, J. L., et al. (2018a).** Mercado-Blanco, J. Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the Olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: from the host roots to the bacterial genomes. *Front. Microbiol*. 9:277.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Ruano-Rosa, D., Legarda, G., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Triviño, J.C., et al. (2018b).** Bacillales members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture* 8:90.
- Gravel, V., Antoun, V., & Tweddell R.J. (2007).** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 39: 1968– 1977.
- Gravel, V., Antoun, V., & Tweddell, R.J., (2007).** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 39: 1968– 1977.
- Gullino, M.L., Migheli, Q., Garibaldi, A. (1999).** Biological and integrated control of Fusarium wilt of carnation in Italy. *Acta Horticulturae*, 482, 97–100.
- Guo, C-J., Yeh, H-H., Chiang, Y-M., Sanchez, J.F., Chang, S-L., Bruno, K.S., Wang, C.C.C. (2013).** Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *Journal of the American Chemical Society* 135: 7205–7213.

- Haas, D., Keel, C. (2003).** Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* Spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* 41: 117–153.
- Haddad, B., Gristina, A.S., Mercati, F., Saadi, A.E., Aiter, N., Martorana, A., Carimi, F. (2020).** Molecular Analysis of the Official Algerian Olive Collection Highlighted a Hotspot of Biodiversity in the Central Mediterranean Basin. *Genes*, 11, 303.
- Hajieghrari, B., Giglou, M.T., Mohammadi M.R., Davari M. (2008).** Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7: 967-972.
- Hamayun, M., Sumera, A., Ilyas, I., Bashir, A., In-Jung, L. (2010).** Isolation of a Gibberellin producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(1):202–207.
- Han, P., Yang, C., Liang, X., Li, L. (2016b).** Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from “Baozhu” pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chem* 196:808–814.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S.L. (1975).** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597–607.
- Harir, M. (2010).** Effet antagonistes entre les souches d’Actinomycetes et le *Verticillium dahliae* Kleb., agent de la verticilliose de l’olivier. *Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie)*. 77p.
- Harman, G.E. (2000).** Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. (4), 84, 377-393.
- Harman, G.E. (2006).** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190–194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2:43–56.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012).** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Khiareddine, H., El-Mahjoub, M. (2005).** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 9: 163-171.
- Hiemstra, J.A., Harris, D. (1998).** A compendium of *Verticillium* wilts in tree species. CPRO: Ponsen and Looijen, Wageningen.
- Holbrook, A.A., Edge, W.L.W., Bailey, F. (1961).** Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid in gibberellins. *ACS Washington, D.C*; 159-167.
- Hoppenau, C.E., Tran, V-T., Kusch, H., Abhauer, K.P., Landesfeind, M., Meinicke, P., Popova, B., Braus-Stromeyer, S.A., & Braus, G.H. (2014).** *Verticillium dahliae* VdTHI4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato. *Environ Exp Bot* 108: 14-22.
- Howell, C.R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87: 4–10.

- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J. (2009).** Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol Control*. 51:409–416.
- Hu, X. P., Gurung, S., Short, D. P., Sandoya, G. V., Shang, W. J., Hayes, R. J., & Subbarao, K. V. (2015).** Non defoliating and defoliating strains from cotton correlate with races 1 and 2 of *Verticillium dahliae*. *Plant disease*, 99(12), 1713-1720.
- Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W. (2015).** Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol*;99:3395–405.
- Hunziker, L., Bönisch, D., Groenhagen, U., Bailly, A., Schulz, S., Weisskopf, L. (2015).** *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 821–830
- I.N.P.V. (2010).** **Institut Nationale de Protection des Végétaux.** Rapport national sur l'état de la verticilliose en Algérie. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques.
- I.N.P.V. (2011).** **Institut Nationale de Protection des Végétaux.** Rapport national sur l'état de la verticilliose en Algérie. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques.
- Inbar, L.A. Menendez., & Chet, I. (1996).** Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium sclerotiorum* made its role in biological control,” *Soil BiolBiochem.* Vol. 28. P: 757-763.
- Irina, S., Druzhinina., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Benjamin, A., Horwitz Charles, M., Kenerley, Enrique Monte, Prasun K., Mukherjee, Susanne Zeilinger, Igor V., Grigoriev & Christian, P., Kubicek. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology.* Volume 9.
- Isaias, C.O., Martins, I., Silva, J.B.T., Silva, J.P. & Mello, S.C.M. (2014).** Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfisii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathol.* 40:(1)34-41.
- Islam, M.M., Hossain, D.M., Rahman, M.M.E, Suzuki, K., Narisawa, T., Hossain, I., Harada, N. (2016).** Native *Trichoderma* strains isolated from Bangladesh with broad spectrum antifungal action against fungal phytopathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 49(1–4):75–93
- Issa, Q.M. (2016).** Optimization, Production and Antifungal Activity of Chitinase Produced by *Trichoderma harezianum*. *Journal of Biotechnology Research Center*, 10(1), 16-24.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., El Mahjoub, M. (2005).** Emergence en tunisie de nouveau pathotypes de *Verticillium tricorpus* pouvant attaquer la tomate, l'aubergine et la pomme de terre. *EPPPO/OEPP Bulletin*, vol. 35, Number, 3 (7):497-503.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Father, A., Hibar, K., El Mahjoub, M. (2006).** Pathogenicity of tunisian isolates of three *Verticillium* species on Tomato and Aggplant. *Plan. Pathol. Journal* 5(2): 199-207.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Platt, H. W., Ayed, F., & El Mahjoub, M. (2010).** Variation in aggressiveness of Tunisian *Verticillium dahliae* races 1 and 2 isolates and response of differential tomato cultivars to *Verticillium* wilt. *International Journal of Plant Breeding*, 4(1), 63-70.

- Jackson, A.M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991).** Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 494-501.
- Jamdar, Z., Mohammadi, A.H., & Mohammadi, S. (2013).** Study of antagonistic effects of *Trichoderma* species on growth of *Verticillium dahliae*, the causal agent of Verticillium wilt of pistachio under laboratory condition. *J. Nuts* 4(4):53-56.
- Jeerapong, C., Phupong, W., Bangrak, P., Intana, W., & Tuchinda, P. (2015).** Trichoharzianol, a new antifungal from *Trichoderma harzianum* F031. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3704–3708.
- Jeleń, H., Blaszczyk, L., Chelkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2014).** Formation of 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6-pap) and other volatiles by different trichoderma species", *Mycological Progress*, Vol. 13, No. 3, 589-600.
- Jeleń, H., Blaszczyk, L., Chelkowski, J., Rogowicz, K., Strakowska, J. (2013).** Formation of 6-n-pentyl- 2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Prog.* 13: 589–600.
- Jeong, M.H., Lee, Y.S., Cho, J.Y., Ahn, Y.S., Moon, J.H., Hyun, H.N., & Kim, K.Y. (2017).** Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial pathogenesis*, 110, 645-653.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M.M., Antoniou, P.P., & Tjamos, E.C. (2012).** Verticillium wilt: a major threat to olive production current status and future prospects for its management. *Plant Dis.* 96, 304–329.
- Kamala, T., Indira Devi, S. (2011).** Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3. Biotech*, 1:217–225.
- Kamoun, P. (1977).** Appareil et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion 2ème édition. Paris. P 236.
- Kapri, A., Tewari, L. (2010).** Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(3), 787–795.
- Karanja, E., Boga, H., Muigai, A., Wamunyokoli, F., Kinyua, J., Nonoh, J. (2012).** Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected novel Streptomyces species isolated from selected Kenyan national parks. In: Scientific conference proceeding
- Kausar, H., Sariah, M., Saud, H.M, Alam, M.Z., Ismail, M.R. (2010).**Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw.evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64 (7): 594-600.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Narasimhulu, M., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., Rao, K.V., & al. (2010).** Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL\_113. *Microbiol. Res.* 165, 199–210.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. (2005).** Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews. Microbiology* 3: 937–947.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Kim, Y-H., Kang, S-M., Lee, J-H., Lee, I-J. (2011).** Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochemistry* 46: 440–447.

- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., Hirsch, A.M. (2018).** Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Kim, P.I., Chung, K.C. (2004).** Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett*, 234:177–183.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J., & Kubicek, C.P. (1998).** Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet. Biol*, 24:298-309.
- Kiritsakis, A., & Shahidi, F. (2017).** Olives and Olive Oil as functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing. John Wiley & Sons, United States, 688 p.
- Kleifeled, O. et I. Chet. 1992.** *Trichodema harzianum* - Interaction with plants and effects on growth response. *Plant Soil* 144 (2) : 267-272.
- Klimes, A., & Dobinson, K.F. (2006).** A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 43:283–294.
- Klimes, A., Amyotte, S.G., Grant, S., Kang, S., & Dobinson, K.F. (2008).** Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene VDH1. *Fungal Genetics and Biology*, 45:1525–1532
- Klosterman, S.J., Atallah, Z., Vallad, G.E., Subbarao, K.V. (2009).** Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 39–62.
- Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, B.P., Chen, Z., Henrissat, B., Lee, Y.H., Park, J., & Col. (2011).** Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLOS Pathog* 7: e1002137.
- Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2005).** Tricho BLAST: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tools. *Mycol Res*, 109(6):658–660.
- Korolev, N., Katan, T. (1997).** Improved Medium for Selecting Nitrate-Nonutilizing (nit) Mutants of *Verticillium dahlia*. *Phytopathol.*, 87: 1067-1070.
- Korolev, N., Rav David, D., & Elad, Y. (2008).** The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl*, 53(4), 667-683.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. (2003).** Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.*, 41: 37-42.
- Kremer, R.J., & Souissi, T. (2001).** Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *C Microbiol* :43 182–186.
- Kuang-Ren, C., Turksen, S., Umran, E., Timmer, L.W., Peter, P.U. (2003).** Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters*. 226, 23-30.
- Kubicek, C.P., & Harman, G.E. (1998).** *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd.

- Kubicek, C.P., Bissett, J., Kullnig-Gradinger, C.M., Druzhinina, I.S., Szakacs, G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol*,38(3):310–317.
- Kubicek, C.P., Komon-zelazowska, M., Druzhinina, I.S. (2008).** Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science B* 9(10), 753, 2008.
- Kucuk., & Kivanc. (2004).** vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma hazrianum*.*Turk. J. Biol.* Vol 28. P: 11-128.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T., & Kubicek, C.P. (1996).** Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*,93:7755–7760.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Meyer, W., Kubicek, C.P., & Borner, T. (1997).** Revision of *Trichoderma* section Longibrachiatum including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences.*Mycologia*, 89: 442–460.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., & Kubicek, C.P. (2002).** Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. *Mycol. Res*, 106:757-767.
- Kumar, A.A., Kumar, S., Devi, S., Patil, C., & Negi, S. (2012).** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. *Recent Res. Sci. Technol.*, 4: 01-05.
- Kumar, M.A., Sharma, P. (2011).** Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology*, 10 : 4532-4543.
- Kumar, R., Tapwal, A., Kumar Borah, R. (2012).** Verticillium Wilt infecting *Parkia roxburghi* seedling in manipur india. *Academic Journal Inc.*, 1-6.
- Lachqer, K., Sedra, M.H., & Tantaoui, A. (2002).** Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from olive (*Olea europea*) in Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 41(1), 19-27.
- Lalngaihawmi & Bhattacharyya, A. (2019).** Study on the Different Modes of Action of Potential *Trichoderma* spp. from Banana Rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 8(01): 1028–1040.
- Lambert, C. (2011).** Etude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Thèse de Doctorat d'Université, Bordeaux, France.
- Langcake, P., & Pryce, R., (1976).** The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1): 77-86.
- Laouane, H., Lazrek, H.B., Sedra, M.H. (2011).** Synthesis and toxicity evaluation of cinnamyl acetate:a new phytotoxin produced by a strain of *Verticillium dahlia* 252 pathogenic on olive tree. *Intl. J. Agr. Biol.*, 13:444-446.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R. (2002).** Effects of Varying Environmental Conditions on Biological Control of *Fusarium* Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 92: 1160–1166.

- Leclerc, G., Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B. (1998).** Directed Biosynthesis of Peptaibol Antibiotics in Two *Trichoderma* Strains. *The Journal of Antibiotics* 51: 170–177.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W. (2016).** Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology* 3:7.
- Lee, S.B., and Taylor. J.W. (1990).** Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287 in M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Lemanceau, P. (1989).** Role of competition for carbon and iron in mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts. In *Vascular wilt diseases of plants* (pp. 385-396). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., Zhao, M. (2011).** Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 10: 19864–19873.
- Lepengue, N.A., Mouaragadja, I., M'Batchi, B. & Ake, S. (2009).** Etude de quelques caractéristiques physico chimiques du filtrat toxique de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle. *Sciences et Nature*; 6: 95-105.
- Lester, G. (1965).** Inhibition of growth, synthesis, and permeability in *Neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *J Bacteriol*, 90, 29–37.
- Leuchtman, A., Samuels G.J., & Petrini, O. (1996).** Isoenzyme subgroups in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88: 384–394.
- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrur Lahkim, L. (2003).** Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathol.*, 52, 212– 218.
- Leylaie, S., Zafari, D. (2018).** Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from Vinca plants. *Front Microbiol.* 9:1484.
- Li, R.Y., Wu, X.M., Yin, X.H., Liang, J.N., & Li, M. (2014).** The natural product citral can cause significant damage to the hyphal cell walls of *Magnaporthe grisea*. *Molecules*, 19(7), 10279-10290.
- Li, Z., Wang, T., Luo, X., Li, X., Xia, C., Zhao, Y., Cui, Z. (2018).** Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum*. *Biological Control*, 126, 36-44.
- Lieckfeldt, E., et al., (1999).** A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2418-2428.
- Lima, G., De-Curtis, F., Castoria, R., De-Cicco, V. (1998).** Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 257-267.
- Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C., Deng, X. (2014).** Mechanisms of action for 2-phenylethyl ethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiol*, 14, 242.
- Liu, S. (2016).** *Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*, Second edition. Elsevier, Amsterdam Boston Heidelberg

- Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., Wang, J. (2008).** Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166(2):93–102.
- Liu, S.P., Hong, Y.B., Wu, Z., Ma, Y.S., Jue, D.W., Xie, C., Zhu, Y.P., Chen, M., & Yang, Q. (2013b).** Protein extract of tobacco expressing *StoVe1* gene inhibits *Verticillium dahliae* proliferation. *Cze J Genet Plant Breed* 49: 58-64
- Liu, S.Y., Chen, J.Y., Wang, J.L., Li, L., Xiao, H.L., Adam, S.M., & Dai, X.F. (2013a).** Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene* 529: 307-316.
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., Xu, J., Liu, S., Chen, L., Chen Tycol. (2014).** Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat Commun* 5: 4686.
- Loper, J.E., & Scroth, M.N. (1986).** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- López, A.C., Alvarenga, A.E., Zapata, P.D., Luna, M.F, Villalba, L.L. (2019).** *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilexparaguariensis* St. Hil, *Mycology*.
- López-Escudero, F. J., & Mercado-Blanco, J. (2011).** *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344, 1–50.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. (2005).** Effects of drip irrigation on population of *Verticillium dahliae* in olive orchards. *Journal of Phytopathology*, 153: 238- 239
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. (2007).** Response of olive cultivars to stem puncture inoculation with a defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Hort Science*, 42:294–298.
- López-Escudero, F.J., Mercado-Blanco, J. (2010).** *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant. Soil.*, 1 – 50.
- López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., & Trapero, A. (2021).** Plant biostimulants: New insights into the biological control of *Verticillium* wilt of olive. *Frontiers in Plant Science*, 12, 782.
- Lopez-villalta, M.C. (1999).** Contrôle des parasites et des maladies de l'olivier. Ed. Conseil oléicole international, 312 p.
- Lorito, M. (1998).** Chitinolytic enzymes and their genes. in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. G. E. Harman and C. P. Kubicek, eds. Taylor & Francis, London. pp. 73-99.
- Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C.K., Woo, S.L., Harman, G.E. (1993).** Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*. 83, 721-728.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C.P. (1996).** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 178: 6382–6385.
- Loula, J., Mehna, A.M., Abou Chaar, M., Selti, M.N., Adama, F. (2011).** Diversité génétique de *Verticillium dahliae* Kleb ; Agent causal de la verticillioe du coton en syrie. *Arab J. Pl. Prot.* Vol. 29, No. 1.

- Loussert, R., Brousse, G., (1978).** L'olivier Technique agricoles et productions méditerranéennes Eds Maisonneuve et Larousse. Paris. France. 480. 168. 170 pp.
- Luo, X., Xie, C., Dong, J., Yang, X., Sui, A. (2014).** Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6921- 6932.
- M.A.D.R.P: Ministry for Agriculture the Rural Development and Peach. (2018).** Agricultural Statistics Series B.
- Marfori, E.C., Kajiyama, S., Fukusaki, E. (2002).** Trichosetin, anovel tetramic acid antibiotic produced in dual culture of *Trichoderma harzianum* and *Catharanthus roseuscallus*. *Z Naturforsch C J Biosci* 57:465–470.
- Markakis, E.A., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Paplomatas, E.J., & Tjamos, E.C. (2016).** Biological control of Verticillium wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *Biocontrol* 61, 293–303.
- Markakis, E.A., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Roussos, P.A., Paplomatas, E.J., Tjamos, E.C. (2010).** Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *Plant disease*, 94:1156- 1162.
- Marques, E., Martins, I., Mello, S.C.M. (2017).** Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotrop* 18(1):0418.
- Marrufo, T., Nazzaro, F., Mancini, E., Fratianni, F., Coppola, R., De Martino, L., Agostinho, A., De Feo, V. (2013).** Chemical composition and bioactivity of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. *Molecules* 18(9):10989-11000.
- Martin-Lapierre A. (2011).** Application de composts et de fumigants pour lutter contre la verticilliose (*Verticillium dahliae*) du fraisier. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Laval (Canada). 108p.
- Matallah-Boutiba, A., Nicole, M., Fortas, Z., Bellahcène, M., Henni, D., Geiger, J.P. (1997).** Defense responses of inoculated olive tree seedlings to *Verticillium dahliae*. In: 7th International Verticillium Symposium. Athens (GR).
- Mendoza Garcia, R.A., Martijn ten Hoopen, G., Kass, D.C.J., Sánchez Garita, V.A., Krauss, U. (2003).** Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of Rosellinia root rot in cocoa. *Biological Control* 27: 210–227.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervas, A., Jiménez- Díaz, R.M. (2004).** Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated *fluorescent Pseudomonas* spp. *Biol. Control.*, 30: 474–486.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S., Jiménez-Díaz, R.M. (2003).** Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 87(12), 1487-1494.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., & Jiménez-Díaz, R. M. (2002).** Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 108(1), 1-13.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., Jiménez-Díaz, R.M. (2001).** Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *Plant. Pathology.*, 50 : 609–619.

- Merzoug, A., Taleb, M., & Sahla, A. (2018).** Identification des principaux agents fongiques responsables du dépérissement vasculaire et pourriture racinaire des oliviers en pépinières dans le Nord-ouest algérien. *Revue Agrobiologia*, 8(2), 1117-1124.
- M'Henni, Y.B. (2020).** Gestion de la maladie de dépérissement du pommier: criblage *in vitro* et in planta des activités protectrices d'une collection de microorganismes contre les Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7 (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
- Mihailovi, V., Vukori, N., Niforovi, N., Soluji, S., Mladenovi, M., Maskovi, P. (2011).** Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L., *J. Med. Plants Res.* 5(7): 1164-1174.
- Miller, G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mishra, V.K. (2010).** *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology*; 2: 28-35.
- Mo, E.K., Sung, C.K. (2007).** Phenylethyl alcohol (PEA) application slows fungal growth and maintains aroma in strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 234–239.
- Mohiddin, F.A., Bashir, I., Padder, S.A., Hamid, B. (2017).** Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Trichoderma* species. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(6): 563–569
- Mondol, M.A.M., Surovy, M.Z., Islam, M.T., Schüffler, A., Laatsch, H. (2015).** Macrocyclic Trichothecenes from *Myrothecium roridum* Strain M10 with Motility Inhibitory and Zoosporicidal Activities against *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 8777–8786.
- Monte, E., Llobell, A. (2003).** *Trichoderma* in organic agriculture. In: Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). pp 725-733.
- Montesinos, E. (2003).** Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 6: 245–252.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Moselio, S. (2009).** Pesticides, Microbial. In: Moselio S. *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Oxford, UK. 110-120.
- Montes-Osuna, N., and Mercado-Blanco, J. (2020).** Verticillium wilt of olive and its control: what did we learn during the last decade. *Plants* 9:735.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., Sanfuentes, E. (2011).** Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* Seedlings. *Chilean J Agric Res.* 71:412–417.
- Morán-Diez, M.E., Carrero-Carrón, I., Rubio, M.B., Jiménez-Díaz, R.M., Monte, E., & Hermosa, R. (2019).** Transcriptomic analysis of *Trichoderma atroviride* overgrowing plant-wilting *Verticillium dahliae* reveals the role of a new M14 metallo-carboxypeptidase CPA1 in biocontrol. *Frontiers in microbiology*, 1120.
- Moutassem, D., Belabid, L., & Bellik, Y. (2020).** Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. *Journal of Crop Protection*, 9(2), 217-231.

- Mukherjee, P.K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M.E., McCluskey, K., Pouchus, Y.F., Kenerley, C.M. (2011).** Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *The Journal of Biological Chemistry*;286:4544-4554.
- Mulè, R., Fodale, A.S., Tucci, A. (2002).** Control of olive verticillium wilt by trunk injection with different doses of fosetyl-al and benomyl. *ISHS Acta Horticulturae*, 586.
- Murthy, N.K.S., Bleakley, B.H. (2012).** Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms.
- Nagy, E., Has, V., Kadar, R. (2006).** The influence of *Fusarium* ear infection on the maize yield and quality (Transilvania – Romania). *Commun Agric. Appl. Biol. Sci*, 7: 1147-1150.
- Naing, K.W., Anees, M., Kim, S.J., Nam, Y., Kim, Y.C., Kim, K.Y. (2014).** Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology*, 64(1), 55-63.
- Nandhini, S.U. (2015).** Gas chromatography–mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine Streptomyces. *Asi J Pharm Clin Res* 8:244–246
- Narayanasamy, P. (2013).** Mechanisms of Action of Bacterial Biological Control Agents. In: Narayanasamy P, ed. *Progress in Biological Control. Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents*. Dordrecht: Springer Netherlands, 295–429.
- Nasraoui, B. (2006).** Systématique. In : les champignons parasites des plantes cultivées : biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire, 119- 195.
- Navas-Cortés, J.A., Landa, B.B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J.L., RodríguezJurado, D., Jiménez- Díaz, R.M. (2008).** Spatiotemporal analysis of spreads of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in Southern Spain. *Phytopathology*, 98:167–180.
- Neubauer, C., Heitmann, B., Müller, C. (2014).** Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 140: 341–352.
- Neumann, N.K.N., Stoppacher, N., Zeilinger, S., Degenkolb, T., Brückner, H., Schuhmacher, R. (2015).** The Peptaibiotics Database – A Comprehensive Online Resource. *Chemistry & Biodiversity* 12: 743–751.
- Ng, L.C., Ngadin, A., Azhari, M., Zahari, N.A. (2015).** Potential of *Trichoderma* spp. as Biological Control Agents Against Bakanae Pathogen (*Fusarium fujikuroi*) in Rice. *Asian Journal of Plant Pathology* 9: 46–58.
- Nigro, F., Gallone, P., Romanazzi, G., Schena, L., Ippolito, A., Salerno, M.G. (2005).** Incidence of Verticillium wilt on olive in apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. *J Plant. Pathol.*, 87 (1) : 13-23
- Noori, M.S.S., Saud, H.M. (2012).** Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *J. Plant Pathol. Microbiol* 3:120.
- Notteghem, J.L., Nriatempo, G.M., Chatel, M., Dechanet, R. (1980).** Techniques utilisées pour la sélection de variétés de riz possédant la résistance horizontale à la pyriculariose. *Ann. Phytopathol*, 12 : 199-266.

- Okuda, T., Fujiwara, A., & Fujiwara, M. (1982).** Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitril antibiotics. *Agric. Biol. Chem*, 46:1811–1822.
- ONFA: Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires (2016).** Bilan de la campagne oléicole 2015/2016 « Segment huile d'olive ». p13.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008).** Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16(3):115-25.
- Otadoh, J.A., Okoth, S.A., Ochanda, J., Kahindi J.P. (2011).** Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. Phaseoli. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13: 99 - 107.
- Ouazzani Chahdi, A., Chliyeh, M., Mouria, B., Dahmani, J., Ouazzani Touhami, A., Benkirane, R., ... & Douira, A. (2014).** *In vitro* and *in vivo* effect of salinity on the antagonist potential of *Trichoderma harzianum* and sensitivity of tomato to Verticillium wilt. *Int J Recent Sci Res*, 5(4), 780-791.
- Ousley, M.A., J.M. Lynch et J.M. Whipps. 1994.** Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biol. Fertil. Soils* 17 (1) : 85-90.
- Pagnol, J. (1975).** L'olivier. 3eme édition, Avignon (France). Ed. Aubanel, 180p.
- Pallardy, S. (2008).** Plant hormones and other signaling molecules. *Physiology of Woody Plants*. 367–377.
- Pane, C., Celano, G., Zaccardeli, M. (2014).** Metabolic patterns of bacterial communities in aerobic compost teas associated with potential biocontrol of soilborne plant diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 53: 277-286.
- Pankhurst, C.E., Lynch, J.M. (2005).** Biocontrol of soilborne plant diseases. *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, pp. 129-136. *Encyclopedia of Soils in the Environment* 129-136
- Pantou, M.P., & Typas, M. (2005).** Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:213-220
- Papasotiriou, F.G., Varypatakis, K.G., Christofi, N., Tjamos, S.E., Paplomatas, E.J. (2013).** Olive mill wastes: A source of resistance for plants against *Verticillium dahliae* and a reservoir of biocontrol agents. *Biological Control*, 67: 51–60.
- Paplomatas, E.J., Bassett, D.M., Broome, J.C., DeVay, J.E. (1992).** Incidence of Verticillium wilt and yield losses of cotton cultivars based on soil inoculum density of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 82: 1417-1420.
- Park, M.S., Bae, K.S., Yu, S.H. (2006).** Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology*, 34: 11-113.
- Patten, C.L., Click, B.R. (2002).** Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68 : 3795-3801.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (1996).** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.
- Pegg, G.F., Brady, B.L. (2002).** *Verticillium* wilts. (Éditeur : CAB International). CABI Publishing, Wallingford, UK. 552p.

- Pennisi, A.M., Cacciolas, O., Di San Lio, G.M., Perrotta, G. (1993).** Evaluation of the susceptibility of olive cultivars to *Verticillium wilt*. Bulletin OEPP, 23(3): 537-541.
- Pérez-Artés, E., García-Pedrajas, M.D., Bejarano-Alcázar, J., Jiménez-Díaz, R.M. (2000).** Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. European Journal of Plant Pathology, 106(6), 507-517.
- Pezet, R., & Pont, V. (1988).** Identification of pteroslíbene in grape berries of *Vitis vinifera*. Plant Physiology and Biochemistry, 26(5): 603-607.
- Pezet, R., Pont, V., & Tabacchi, R. (1999).** Simple analysis of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. Phytochem. Anal., 10: 285-288.
- Pikovskaya, R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya, 17: 362-370.
- Pochon, J., & Tardieux, P. (1962).** *Techniques d'analyse en microbiologie du sol* (Vol. 11). Editions de la Tourelle.
- Pohl, C.H., Kock, J.L. & Thibane, V.S., (2011).** Antifungal free fatty acids: A review", Science Against Microbial Pathogens: Current Research and Technological Advances, Vol. 1, 61-71.
- Polizzi, G. (1996).** L'avvizzimento della *Lagunaria patersonii* da *Verticillium dahliae*. Informator fitopatologico. 5 : 46-49.
- Powelson, M.L., Rowe, R.C. (1993).** Biology and management of early dying of potatoes. Annual Review of Phytopathology, 31: 111-126.
- Promwee, A. (2011).** Role of *Trichoderma* spp. as phosphate solubilizing microorganism. Thai Journal of Soils and Fertilizers. 33(1): 17-30.
- Rallo, L., Díez, C.M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., Rallo, P. (2018).** Quality of olives: A focus on agricultural proharvest factors. SciHortic 233: 491-509.
- Raman, B.V., La, S., Saradhi, M.P., Rao, B.N., Khrisna, A., Sudhakar, M. & Radhakrishnan, T. (2012).** Antibacterial, antioxidant activity and gc-ms analysis of *eupatorium odoratum*", Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, Vol. 5, No. 2, 99-106.
- Ramualde, N. (1992).** Influence des conditions de culture sur la croissance de *V. dahliae* et diversité du pouvoir pathogène du champignon vis-à-vis du Cotonnier. Maitrise de physiologie végétale appliquée. Univ.Montpellier (France). 34p.
- Rapilly F. (1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties, Institut National de la Recherche Agronomique Paris*, V19 :103. .
- Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M.D., Kang, S., Bhat, R.G., Subbarao, K.V., Grant, S.J & Dobinson K.F. (2005).** Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect Microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. Current Genetics. 48:109-116.
- Ravolanirina, F. (1986).** Etude de l'influence de quelques facteurs sur la croissance mycélienne des terfez *in vitro* et synthèse des mycorhizes. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Clermont-Ferrand (France). 72p.
- Raza, W., Yuan, J., Wu, Y.C., Rajer, F.U., Huang, Q., Shen, Q.R. (2015).** Biocontrol traits of two *Paenibacillus polymyxa* strains SQR-21 and WR-2 In response to fusaric acid, a phytotoxin produced by *Fusarium* species. Plant Pathol. 64, 1041-1052.

- Regragui, A. (2005).** Contribution à l'étude de l'influence de la salinité sur le couple tomate – *Verticillium* : Conséquences physiologiques et impact sur la bioprotection des tomates contre la verticilliose. Doct. D'Etat. Univ. MohammedV-Agdal(Maroc). 257p
- Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G., 2008.** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*, 7:89–123.
- Rhouma, A., Ben Salem, I., M'Hamdi, M., Boughalleb-M'Hamdi, N. (2018).** Antagonistic potential of certain soilborne fungal bioagents against *Monosporascus* root rot and vine decline of watermelon and promotion of its growth. *Novel Research in Microbiology Journal* 2: 85–100.
- Rifai, M. A. (1969).** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.
- Robert, P. (1980).** Dictionnaire alphabétique et analogique de langue française. Ed. Le robert, Paris T. VI, 731 p.
- Roberts, W.T., Davidson P.M. (1986).** Growth Characteristics of Selected Fungi on Polyvinyl Chloride Film. *Appl. Envir. microbiol.*, 51: 673-676.
- Rodríguez Jurado, D. (1993).** Host-parasite interactions in *Verticillium* wilt of olive (*Olea europaea* L.) caused by *Verticillium dahliae* Kleb. Ph.D. thesis. University of Córdoba, Córdoba, Spain. (in Spanish).
- Rodríguez, E., García-Garrido, J.M., García, P.A., Campos, M. (2009).** Large-scale epidemiological study and spatial patterns of *Verticillium* wilt in olive orchards in southern Spain. *Crop Protection*, 28: 46–52
- Rodríguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Godeas, A. (2011).** *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177–1186.
- Rodriguez-Jurado, D., Bejarano-Alcazar, J. (2007).** Dispersal of *Verticillium dahliae* in irrigation water used in olive orchards in Andalusia, southern Spain. *Boletin de Sanidad Vegetal* 547-562.
- Rodriguez-Jurado, D., Blanco-Lopez, M.A., Rapoport, H.F., Jimenez-Diaz, R.M. (1993).** Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalusia (southern of Spain). *EPPO Bull.*, 23: 513-516.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010).** Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 456–463.
- Rojas, N.M., Cuesta, O., Avilés, A., Lugo, D., & Avellaneda, S. (2001).** Actividad antimicrobiana de nemorosona aislada de *Clusia rosea*. *Rev Cub Farm* 35: 197- 200.
- Rosenberg, I.M. (2005).** Protein Analysis and Purification. Birkhäuser Boston, Place of publication not identified
- Roussos, S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Provence, Marseille, France.
- Ruangwong, O.U., Wonglom, P., Suwannarach, N., Kumla, J., Thaochan, N., Chomnunti, P., Sunpapao, A. (2021).** Volatile Organic Compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: Impact on Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, 7(3), 187.

- Ruano-Rosa, D., Prieto, P., Rincón, A.M., Gómez-Rodríguez, M.V., Valderrama, R., Barroso, J. B., et al. (2016).** Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl* 61, 269–282.
- Ruggieri, G. (1946).** A new disease of olive. *L'Italia Agricola*, 83: 369–372.
- Russell, D.W., Sambrook, J. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual (Vol. 1, p. 112). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., et al. (2003).** Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4927–4932.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wie, H.X., Pare, P.W., Kloepper, J.W. (2003).** Bacterial volatiles promote growth of Arabidopsis. *Proc Nat Acad Sci*;100:4927–32.
- Saito, S., Odagiri, M., Furuya, S., Suzuki, S., & Takayanagi, T. (2011).** Inhibitory effect of chitinases isolated from Semillon grapes (*Vitis vinifera*) on growth of grapevine pathogens. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 20(1), 47-54.
- Samson, A.R., Hoekstra, E.S., Van Oorschot, C.A.N. (1981).** Introduction To Food-Borne Fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science. p: 4 - 42.
- Samuels, G. J., Suarez, C., Solis, C., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismail, A. & Evans, H.C. (2006).** *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two newspecies isolated from cacao in South America. *Mycological research* 110: 381-392.
- Samuels, G.J. (1996).** *Trichoderma*: a Review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100 (8): 923-935.
- Samuels, G.J. et al. (2002).** *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. (2004).** *Trichoderma* Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Re-trieved August 31, 2004, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. (2015).** *Trichoderma* Online [Online]. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [consulted le : 05 janvier 2015].
- Samuels, G.J., Dodd S., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O. (2002).** *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.
- Samuels, G.J., Dodd, S., Lu, B.S. Petrini, O., Schroers, H.J. & Druzhinina, I. (2006).** The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56: 67–133.
- Samuels, G.J., Ismaiel, A., De Souza, J., Chaverri, P. (2011).** *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. *Mycol. Progress*, 10: 743-740.
- Samuels, G.J., Petrini, O., & Manguin, S. (1994).** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86:421- 435.
- Sanchez, J.F., Somoza, A.D., Keller, N.P., Wang, C.C.C. (2012).** Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports* 29: 351–371.

- Santhanam, P., & Thomma, B.P. (2013).** *Verticillium dahliae* Sge1 differentially regulates expression of candidate effector genes. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 249-256.
- Saremi, H., Amiri, M.E., Mirabolfathi, M. (2010).** Application of Soil Solarisation for Controlling Soilborne Fungal Pathogens in Newly Established Pistachio and Olive Orchards. *International Journal of Fruit Science*. 143-156.
- Saydam, G., Copcu, M. (1972).** Verticillium wilt of olive in Turkey. *J Turk Phytopathol* 1:45–49
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E & Kubicek, C.P. (1994).** Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4364-4370.
- Schubert, M., Fink, S., Schwarze, F.W.M.R. (2008).** Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control*. 45, 111-123.
- Segarra, G, Casanova, E, Avilés, M., Trillas, I. (2010).** *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls Fusarium Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. *Microbial Ecology* 59: 141–149.
- Shakeri, J. & Foster, H.A. (2007).** Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma* sp. Signpost, Trivandrum, pp: 129-150.
- Sharma, D., Pramanik, A., Agrawal, P.K. (2016).** Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don, 3 *Biotech*. 6-210.
- Sharma, K.K. & Singh, U.S. (2014).** Cultural and morphological characterization of rhizospheric isolates of fungal antagonist *Trichoderma*. *Journal of Applied and Natural Science*, 6 (2): 451- 456.
- Sharma, S., Sharma, A., & Kaur, M. (2018).** Extraction and evaluation of gibberellic acid from *Pseudomonas* sp.: Plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 2790-2795.
- Sharon, E., Chet, I., Spiegel, Y. (2011).** *Trichoderma* as a Biological Control Agent. In: Davies K., Spiegel Y. (eds) *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Building Coherence Between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*. Springer, Berlin, pp. 183-202.
- Shaw, S., Cocq, K.L, Paszkiewicz, K., Moore, K., Winsbury, R., Zabala, M., de, T., Studholme, D.J., Salmon, D., Thornton, C.R., Grant, M.R. (2016).** Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology* 17: 1425–1441.
- Shen, B. (2003).** Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* 7: 285–295.
- Shen, Y., Shen, H.M., Shi, C.Y., Ong, C.N. (1996).** Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells. *Hum Exp Toxicol* 15:422–427.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., Zhang, C. (2014).** Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Braz J Microbiol*. 45:248–254.

- Shishkoff, N., McGrath, M.T. (2002).** AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. *Plant Disease* 86: 915–918.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol* 48, 21–43.
- Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005).** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95: 76–84.
- Short, D.P., Gurung, S., Maruthachalam, K., Atallah, Z., & Subbarao, K. V. (2014).** *Verticillium dahliae* race 2-specific PCR reveals a high frequency of race 2 strains in commercial spinach seed lots and delineates race structure. *Phytopathology* 104:779-785
- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K., Kausar, H. & Hasan, M.M. (2012).** Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science*, 50: 358-367.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Sheikh, I.H., & Khan, A. (2006).** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. *W J Microbiol Biotechnol* 22: 641–650.
- Simon, A., Sivasithamparam, K. (1989).** Pathogen Suppression: A Case Study In Biological Suppression Of *Gaeumannomyces Graminis* Var. *Tritici* In Soil. *Soil Biol Biochem* 21: 331-337.
- Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A., Kumar V. (2014).** Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology and Mycology*, 3(1): 127–134.
- Singh, H.B., Singh, B.N., Singh, S.P. (2013).** Exploring different avenues of *Trichoderma* as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate-an overview. *Rev Plant Pathol* 5: 315–426
- Sohrabi, M., Zhang, L., Zhang, K., Ahmetagic, A., Wei, M.Q. (2014).** Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clin Microbiol: Open Acc.* 3:151.
- Soltani, N., Conn, K.L., Abbasi, P.A., & Lazarovits, G. (2002).** Reduction of potato scab and verticillium wilt with ammonium lignosulphonate soil amendment in four Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 332–339.
- Spaenpen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (4): 425-448.
- Spatafora, J.W., Sung, G.-H., Johnson, D., Hesse, C., O'Rourke, B., Serdani, M., Spotts, R., Lutzoni, F., Hofstetter, V., Miadlikowska, J., Reeb, V., Gueidan, C., Fraker, E., Lumbsch, T., Lucking, R., Schmitt, I., Hosaka, K., Aptroot, A., Roux, C., Miller, A.N., Geiser, D.M., Hafellner, J., Hestmark, G., Arnold, A.E., Budel, B., Rauhut, A., Hewitt, D., Untereiner, W.A., Cole, M.S., Scheidegger, C., Schultz, M., Sipman, H., & Schoch, C.L. (2006).** A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* 98:1018- 1028
- Speckbacher, V., Zeilinger, S. (2018).** Secondary Metabolites of Mycoparasitic Fungi. *Secondary Metabolites - Sources and Applications.*

- Sreenayana, B., Vinodkumar, S., Nakkeeran, S., Muthulakshmi, P., & Poornima, K. (2022).** Multitudinous Potential of Trichoderma Species in Imparting Resistance Against *F. oxysporum* f. sp. cucumerinum and Meloidogyne incognita Disease Complex. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), 1187-1206.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., Schuhmacher, R. (2010).** Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods*, 81, 187–193.
- Strobel, G., Singh, S.K., Riyaz-Ul-Hassan, S., Mitchell, A.M., Geary, B. & Sears, J. (2011).** An endophytic/ pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol. Letters* 320: 87–94.
- Tapwal, A., Singh, U., Teixeira da Silva, J.A., Singh, G., Garg, S. & Kumar, R. (2011).** In vitro antagonism of *Trichoderma viride* against five phytopathogens. *Pest Technology*; 5: 59-61.
- Tarafdar, J.C., Bareja, M., & Panwar J. (2003).** Efficiency of Some Phosphatase Producing Soil-Fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 43, (1):27-32.
- Teather, R.M, Wood, P.J. (1982).** Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 777-780.
- Thanassouloupoulos, C.C. (1993).** Spread of verticillium wilt by nursery plants in olive groves in the Halkidiki area (Greece) 1. *EPPO Bulletin*, 23(3), 517-520.
- Thanassouloupoulos, C.C., Biris, D.A., Tjamos, E.C. (1979).** Survey of Verticillium wilt of olive trees in Greece. *Plant Disease Reports*, 63: 936–940.
- Thrane, C., Jensen, D.F., Tronsmo, A. (2000).** Substrate colonization, strain competition, enzyme production in vitro, and Biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. *European Journal of Plant Pathology* 106: 215–225.
- Tihar-Benzina, F., Sahir-Halouane, F., & Hameed, K.M. (2016).** Algerian isolates of *fluorescent Pseudomonas* spp. as potential biological control against wilt pathogen (*Verticillium dahliae*). *Plant Omics*, 9(1), 48-60.
- Timpner, C., Braus-Stromeyer, S.A., Tran, V.T., & Braus, G.H. (2013).** The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 1312-1324.
- Tjamos, E.C. (1993).** Prospects and strategies in controlling Verticillium wilt of olive. *EPPO Bulletin*, 23:505-512.
- Tjamos, E.C., & Paplomatas, E.J. (1987).** Effect of soil solarization on the survival of fungal antagonists of *Verticillium dahliae* 1. *EPPO Bulletin*, 17(4), 645-653.
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., & Katinakis, P. (2004).** Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J., & Katinakis, P. (2005).** Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 555–561.

- Tlemsani, M. (2010).** Contribution à l'étude de flétrissement vasculaire du pois chiche causé par *Fusarium oxysporum* Schelch. Emend. Synd et hans.f. sp. ciceri (Padwich) : caractérisation, lutte biologique et comportement variétal. Mém. Magis. Univ. Oran (Algérie). 163p.
- Toharisman, A., & Mulyadi, M. (2005).** Peran Silikat Bagi Tanaman Tebu. Gula Indonesia, 29(4), 27-30.
- Tohidfar, M., Robabeh Hossaini, R., Nemat, S.B., Meisam, T. (2012).** Enhanced Resistance to *Verticillium dahlia* in Transgenic Cotton Expressing an Endochitinase Gene from *Phaseolus vulgaris*. Genet. Plant Breed., 48 (1): 33-41.
- Tombesi, A., Tombesi, S., Saavedra, M.S., Fernández-Escobar, R., d'Andria, R., Lavini, A., Jardak, T. (2007).** (Eds). Conseil Oléicole Internationale. Techniques de production en oléiculture. Madrid (Espagne), ISBN. 1ère édition, 348p.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndounbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D., Hebbar, K.P. (2007).** Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control 43: 202-212
- Trabelsi, R., Gdoura, R., Triki, M. (2017).** *Fusarium brachygibbosum* and *Fusarium chlamydosporum* causing wilt and die-back of olive in Tunisia. Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration, pp 581-582.
- Tran, V.T., Braus-Stromeyer, S.A., Kusch, H., Reusche, M., Kaever, A., Kühn, A., Valerius, O., Landesfeind, M., Abhauer, K., Tech, M., & col. (2014).** Verticillium transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plants roots. New Phytologist 202: 565-581.
- Trapero, C., Rallo, L., López-Escudero, F. J., Barranco, B., & Muñoz-Díez, C. (2015).** Variability and selection of verticillium wilt resistant genotypes in cultivated olive and in the Olea genus. Plant Pathol. 64, 890-900.
- Triki, M.A., Hassairi, A., Mahjoub, M. (2006).** First observations of *Verticillium dahliae* on olive trees in Tunisia. EPPO Bulletin, pp 69-71.
- Triki, M.A., Krid Hadj Taieb, S., Hammami Mellouli, I., Rhouma, A., Gdoura, R., Hassairi, A. (2012).** Identification and screening of bacterial isolates from saharan weeds for *Verticillium dahliae* control. Journal of Plant Pathology, 305-311.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. (2006).** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Applied biochemistry and microbiology, 42(2):117-126.
- Tuzun, S., Kloepper, J. (1995).** Practical application and implementation of induced resistance. In: Hammerschmidt R, Kuc J, eds. Induced resistance to disease in plants. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 152-168.
- Ubalua, A.O., Oti, E. (2007).** Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. Afr. J. Biotechnol., 21: 2447-2450
- Uthandi, S., Karthikeyan, S. & Sabarinathan, K.G. (2010).** gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* SG2. J. Scient. Ind. Res., 69: 211-214.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. (2006).** Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Appl. Microbiol. Biot, 71: 137-144.

- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M., Vassilev, N. (1998). Application of encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *J Biotechnol*, 63:67–72
- Vey, A., Hoagland, R.E., & Butt, T.M. (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N. (eds), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI, Wallingford, pp. 311–346.
- Viccini, G., Mannich, M., Fontana-Capalbo, D.M. (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*, 42, 275–8
- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., & Taylor, J.D. (2001). Identification and Origin of Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., and Taylor, J.D. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. *Phytopathology* 91: 492–499.
- Vinale, F. *et al.*, (2007). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, pp. 1-10.
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K. (2009a). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* 72:2032–2035
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K. (2009b). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* 48:705–711
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 705–711.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* 347: 123–129.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., *et al.* (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 347, 123–129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Manganiello, G. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*. 8, 127-139.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens, *The Open Mycology Journal*. 8, 127-139.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., Chet, I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*, 305:42–48.
- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I., Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 8: 737–746.

- Von Döhren, H. (2004).** Biochemistry and General Genetics of Nonribosomal Peptide Synthetases in Fungi. In: Brakhage AA, ed. *Advances in Biochemical Engineering. Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases: -/-*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 217–264.
- Wahyuni, S., Suhartono, M.T., Khaeruni, A., et al. (2016).** Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from *Bacillus* SW41 for Chitin Oligomer Production. *Asian J Chem* 28:2731–2736.
- Walters, D., Newton, A., Lyon, G. (2007).** *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing, Oxford UK, 258 pp.
- Wang, C-J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D-D., Liu, H-X., Wang, Y-P., Guo, J-H. (2012).** Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth Promoting *Rhizobacterium* Strains. *PLoS ONE* 7
- Wardle, D.A., Parkinson, D., Waller, J.E. (1993).** Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* 94: 165-172.
- Watanabe, S., Kumakura, K., Hiroyuki Iyozumi, H.K., Togawa, M., Nagayama, K. (2005).** Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71:351-356.
- Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K. (1988).** Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reesei*. *Plant Soil* 107:81–8.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC. 2010.** Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity. *Pedobiologia*. 53(3):197–201. Wilhelm S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*. 45:180–181.
- Wheeler, D.L., Johnson, D.A. (2016).** *Verticillium dahliae* infects, alters plant biomass, and produces inoculum on rotation crops. *Phytopathology*, 106: 602-613.
- Whipps, J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52, 487-511.
- Whipps, J.M., Lumsden, R.D. (2001).** Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22.
- Whitmore, L., Chugh, j., Snoock, C.F. & Wallace, B.A. (2007).** Peptaibol Database. [www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home/shtml](http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home/shtml)
- Wilhelm, S. (1955).** Longevity of *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45:180-181
- Witter, A.E., Hutchins, D.A., Butler, A., & Luther, G.W. (2000).** Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater; *Marine Chemistry*; 69(1-2); 1-17
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002).** Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current opinion in plant biology*, 5(4), 300-307.
- Xu, H-M., Rong, Y-J., Zhao, M-X., Song, B., Chi, Z-M. (2014).** Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 127–136.\$

- Xu, X., Nicholson, P. (2009).** Community Ecology of Fungal Pathogens Causing Wheat Head Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47:83-103.
- Yadeta, K.A., Thomma, B.P.H.J. (2013).** The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.*, Volume 4 Article 97.
- Yamazaki, H., Takahashi, O., Kirikoshi, R., Yagi, A., Ogasawara, T., Bunya, Y. (2020a).** Epipolythiodiketopiperazine and trichothecene derivatives from the NaI-containing fermentation of marine-derived *Trichoderma cf. brevicompactum*. *J. Antibiot.* 73, 559–567.
- Yasser, M.M., Mousa, A.S.M., Massoud, O.N., Nasr, S.H. (2014).** Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from Egyptian soils. *J Biol Earth Sci*, 4(1): B83-B90.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. (1999).** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65:1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. (2000).** Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem*, 38: 863–873.
- Yogeswari, S., Ramalakshmi, S., Neelavathi, R., Muthumary, J. (2012).** Identification and comparative studies of different volatile fractions of *Monochaetia kanesensis* by GCMS. *Global J. Pharm.* 6(2):65-71
- Zachos, D.G. (1963).** La verticilliose de l'oliver en Grèce. *Annual Institutional Phytopathology Benaki*, 5: 105–107.
- Zachow, C., Berg, C., Müller, H., Monk, J., Berg, G. (2016).** Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *Journal of Biotechnology*. 235, 162-170.
- Zaim, S. (2007).** Contribution de l'étude de *Trichoderma* sp. Agent antagoniste de *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri et *Fusarium oxysporum* f. sp. Lentis, agent du flétrissement vasculaire du pois chiche et de la lentille. *Mém. Mgister, Centre Univ. Mustapha Stambouli, Mascara*, 89p.
- Zare, R., Gams, W., Starink-Willemse, M., & Summerbell, R.C. (2007).** Gibellulopsis, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and Musicillium, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85:463-483.
- Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK. (2016).** Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30: 74–90.
- Zeilinger, S., Garcia-Estrada, C., Martin, J.-F. (2015).** Fungal secondary metabolites in the « OMICS » era. *Springer New York* 2, 1-12.
- Zhang, F., Chen, C., Zhang, F., Gao, L., Liu, J., Chen, L., Chen, C. (2017).** *Trichoderma harzianum* containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and diminished adverse effect caused by *Fusarium oxysporum* in soybean. *Journal of plant physiology*, 210, 84-94.
- Zhang, N., Castlebury, L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S.M., Schoch, C.L., Seifert, K.A., Rossman, A. Y., Rogers, J.D., Kohlmeyer, J., VolkmannKohlmeyer, B., & Sung, G.H. (2006).** An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 98:1076- 1087.

- Zhang, S., Xu, B., Zhang, J., & Gan, Y. (2018).** Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pesticide biochemistry and physiology*, 147, 59-66.
- Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., Ma, P. (2013).** Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9525–9534.
- Zhao, D.L., Zhang, X.F., Huang, R.H., Wang, D., Wang, X.Q., Li, Y.Q., et al. (2020).** Antifungal nafuredin and epithiodiketopiperazine derivatives from the mangrove-derived fungus *Trichoderma harzianum* D13. *Front. Microbiol.* 11:1495.
- Zhao, L.J., Yang, X.N., Li, X.Y., Mu, W., Liu, F. (2011).** Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* StrainBMP-11. *Agric. Sci. China.* 10, 728–736.
- Zhihui, B., Bo1, J., Yuejie, L., et al. (2008).** Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences.* 20, 353–8.
- Zhou, P., Wu, Z., Tan, D., Yang, J., Zhou, Q., Zeng, F., et al. (2017).** Atrichodermones A–C, three new secondary metabolites from the solid culture of an endophytic fungal strain, *Trichoderma atroviride*. *Fitoterapia* 123, 18–22.
- Zhu, Y.J., Zhou, H.T., Hu, Y.H., Tang, J.Y., Su, M.X., Guo, Y.J., Chen, Q.X., Liu, B. (2011).** Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chem*, 124, 298–302.
- Ziegler, J., Facchini, P.J. (2008).** Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59: 735–769.

---

## **Annexes**

---

**Annexe 1: Caractéristiques des vergers d'oliviers prospectés****Tableau 1:** Les valeurs moyennes des paramètres climatiques (température en °C et pluviométrie en mm) mensuels des quatre régions d'étude durant les années de prospection.

Régions paramètres	Boumerdes			Bouira			Bedjaia			Tipaza		
	Alt (m)	T° (°C)	Plu (mm)									
valeurs moyennes	121	18	739	525	17.6	669	660	18.8	800.6	230	17.6	642.4

**Tableau 2:** Caractéristiques culturelles des oliveraies prospectées.

Domination des isolats	Pathotypes	Age des plantations	Sites de prélèvements	Dates des isolements	Variétés d'olivier
Vd1, Vd2, Vd3, Vd4	ND	6 à 8 ans	Cap Djenat	2018	Chemlal
Vd5, Vd6, Vd7	ND	Adulte	keddara	2019	Chemlal
Vd8	ND	Adulte	Beni Amrane	2018	Chemlal
Vd9, Vd10	ND	Adulte	Lakhdaria	2018	Chemlal
Vd11, Vd12, Vd13, Vd14, Vd15	ND	9 ans	M'chedallah	2019	Chemlal
Vd16, Vd17, Vd18	D	7 à 9 ans	Bechloul	2019	Introduite
Vd19, Vd20	D	Adulte	AL-Assnam	2020	Sigoise

**Annexe 2: Composition des différents milieux de cultures utilisés (Composants g/ litre)**

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)		Milieu de Czapek–Dox	
Pomme de terre	200 g	NaNO <sub>3</sub>	2g
Dextrose	20 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
Agar	20 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5g
		KCl	0,5g
		F <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 7HO <sub>2</sub>	0,01g
		Saccharose	30g
		Agar	20g
Milieu Pikovaskey		Milieu des chitinases	
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5g	Glucose	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
KCl	0,2g	NH <sub>4</sub> Cl	1g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1g	NaCl	0,5 g
Glucose	10g	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
FeSO <sub>4</sub>	0,005g	MgSO <sub>4</sub>	0,12g
Bleu bromophénol	0,25g	Chitine colloïdale	1% (p:v)
Agar	20g	Agar	20g

<b>Gélose Tryptone de soja (TSA)</b>		<b>Milieu de Czapek–Dox</b>	
<b>additionné de glycine</b>		NaNO <sub>3</sub>	2g
Trypticase	17g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
Soytone	3g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5g
Chlorure de sodium	5g	KCl	0,5g
Glycine	4,4g	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,01g
Agar	20g	Saccharose	30g
		Agar	20g
<b>Milieu PDB (Potato –Dextrose Broth)</b>		<b>Milieu Richards</b>	
Infusion de pomme de terre	200g	KNO <sub>3</sub>	10g
Dextrose	15g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,5g
Agar	20g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5g
		Saccharose	50g
		Agar	20g
<b>Milieu V-8</b>		<b>Milieu MEA (Malt- Extract- Agar)</b>	
Légumes assortis pour enfant	100g	Extrait de malt	20g
Concentré de Tomate à 25%	70g	Agar	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g		
Agar	20g		
<b>Milieu des glucanase (MSM additionné de la farine d'orge)</b>		<b>Milieu Waksman</b>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5g
KCl	0,2g	Peptone	5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,002g	Glucose	10g
MnSO <sub>4</sub>	0,002g	Agar	20g
ZnSO <sub>4</sub>	0,002g		
NaNO <sub>3</sub>	1g		
Farine d'orge	10g		
Agar	20g		
<b>Milieu des pectinases</b>		<b>Milieu des lipases</b>	
Pectin	10g	Tween 20	10 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.3g	Peptone	10 g
MgSO <sub>4</sub>	0,1g	NaCl	5 g
Agar	20g	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g
		Agar	20 g
<b>Milieu des protéases</b>		<b>Milieu Malt Acide Triton</b>	
Lait allégé (non gras)	300 mL	Acide citrique	250mg
Agar	20 g	Triton	3ml
		Agar	20 g
<b>Milieu des amylases</b>		<b>Milieu de culture OGA</b>	
Extrait de levure	3 g	Extrait de levure	5g
Peptone	5 g	Glucose	20g
Amidon soluble	2 g	Agar	20g
Agar	20 g	Oxytétracycline	0,10g

<b>Milieu des cellulases</b>		<b>Milieu Sabouraud</b>	
<i>-Activité endoglucanase</i>		Peptone	10g
Carboxy-méthyl-cellulose(CMC)	20 g	Glucose	20g
Agar	20g	Agar	20g
<b>Milieu pour le test de fixation d'azote</b>		<b>Milieu liquide des chitinases</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g	chitine colloidal	10g
CaCO <sub>3</sub>	5 g	bactopeptone	1g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.2 g	urée	0,3g
NaCl	0.3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
Mannitol	10 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3g
agar	20 g	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,3g
		Oligoéléments	0.1g
		glucose	0,2g
<b>Milieu liquide des protéases</b>		<b>Milieu pour la production de l'acide gibbéréllique</b>	
Caséine	10g	Extrait de levure	5g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	Saccharose	30g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9g	Nitrate de sodium	30g
KCl	0.2g	Sulfate de magnésium	0,5g
glucose	0.2g	Chlorure de potassium	0,5g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.002g	Sulfate ferreux	0,01g
MnSO <sub>4</sub>	0.002g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
ZnSO <sub>4</sub>	0.002g		
NaNO <sub>3</sub>	1g		

**Annexe 3:** Caractérisation physiologique des souches de *V. dahlia* et de *Trichoderma*

**Tableau 3:** Effet de milieu de culture sur la croissance mycélienne des souches de *V. dahlia*.

Souches	Sabouraud	V8	PDA	Malt	Richard	Czapek
<b>Vd1</b>	5,8 ± 0,1	7,1 ± 0,1	6,8 ± 0,45	7,5 ± 0,2	7,2±0,2	8,4 ± 0,17
<b>Vd2</b>	6,13 ± 0,15	6,2 ± 0,2	7,45 ± 0,25	7,9 ± 0,53	7,6±0,1	7,9 ± 0,15
<b>Vd3</b>	6,8 ± 0,3	6,3 ± 0,1	7,9 ± 0,1	6,8 ± 0,25	8,4±0,05	7,4 ± 0,3
<b>Vd4</b>	7,6 ± 0,45	6,1 ± 0,1	7,9 ± 0,05	8,1 ± 0,1	7,3±0,1	8,4 ± 0,05
<b>Vd5</b>	4,9 ± 0,68	7,4 ± 0,2	8,5 ± 0	8,03 ± 0,4	6,7±0,2	8,4 ± 0,11
<b>Vd6</b>	6,9 ± 0,33	6,2 ± 0,2	8,2 ± 0,2	7,5 ± 0,5	6,7±0,1	8,06 ± 0,25
<b>Vd7</b>	7,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	7,6 ± 0,1	6,49 ± 0,4	6,76±0,04	7,8 ± 0,5
<b>Vd8</b>	6,2 ± 0,45	5,9 ± 0,1	8,3 ± 0,3	7,4 ± 0,45	7,3±0,1	8,4 ± 0,11
<b>Vd9</b>	7,06 ± 0,38	7,4 ± 0,2	8,4 ± 0,25	7,63 ± 0,25	8,43±0,11	8,4 ± 0,05
<b>Vd10</b>	6,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1	8,5 ± 0	8,1 ± 0	7,45±0,2	8,4 ± 0,11
<b>Vd11</b>	8,02 ± 0,2	4,4 ± 0,2	6,5 ± 0,1	6,9 ± 0,78	7,1±0,1	7,6 ± 0,4
<b>CMM</b>	6.66±0.29	6.39±0.14	7.82±0.16	7.48±0.35	7.35±0.19	8.10±0.2

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm ± les écarts-types.

**Tableau 4:** Effet de la température sur la croissance mycélienne (cm) des 15 souches de *V. dahlia* testées.

Souches	T=20°C	T=25°C	T=28°C	T=30°C	T=35°C
Vd1	5.6±0.1	8,46±0,05	8,46±0,05	8±0,1	4,2±0,007
Vd2	7.2±0.26	7,83±0,15	8±0,18	5,5±0,15	4,4±0,09
Vd3	4.1±0.1	8±0,15	7,9±0,1	6,8±0,25	2±0,1
Vd4	7.3±0.20	8±0,02	8,43±0,11	8,4±0,15	2,8±0,08
Vd5	7.5±0.17	8,43±0,11	8,43±0,05	8±0,1	3,8±0,07
Vd6	7,3±0.26	8±0,2	7,97±0,06	6,06±0,25	4,49±0,18
Vd7	6±0.2	7,96±0,35	7,7±0,15	6,2±0,25	4,2±0,09
Vd8	5.2±0.05	8,46±0,05	7,9±0,21	5,5±0,1	7±0,1
Vd9	5.4±0.1	7,5±0,14	8,3±0,1	8,29±0,13	6,69±0,15
Vd10	5.9±0	7,6±0,22	8,4±0,15	5,4±0,18	6,5±0,08
Vd11	6.6±0.1	8,43±0,11	7,03±0,08	6,69±0,12	3,2±0,2
CMM	6.19±0.14	8.06±0.14	8.04±0.11	6.80±0.16	4.48±0.10

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm  $\pm$  les écarts-types

**Tableau 5:** Effet du pH sur la croissance mycélienne (mm) des 15 souches de *V. dahlia* testées.

Souches	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
Vd1	7.9±0.09	8.1± 0.26	8.39±0.07	8±0.1
Vd2	8.02± 0.26	7.69± 0.08	8.46± 0.05	4.3±0.26
Vd3	8.29±0.04	8.4±0.1	8.02±0.08	2.9±0.1
Vd4	8± 0.08	8.39± 0.04	8.43± 0.05	4±0.17
Vd5	8.4± 0.1	7.85± 0.09	8.43± 0.11	8±0.2
Vd6	8.26± 0.1	8.46± 0.05	8.39± 0.04	5.4±0.26
Vd7	8.46± 0.05	8.2±0.1	7.9± 0.26	3±0.26
Vd8	7.9± 0.08	7.5± 0.2	8.1± 0.09	8±0.17
Vd9	8.46± 0.05	8.43±0.11	8.3±0.1	8±0
Vd10	7.14± 0.07	7.4± 0.08	8.46± 0.05	7.3±0
Vd11	7.2± 0.1	7.89± 0.07	7.79 ± 0.08	4±0.17
CMM	8±0.09	8.02±0.10	8.24±0.09	5.71±0.15

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm  $\pm$  les écarts-types

**Tableau 6 :** Effet de la lumière sur la croissance mycélienne (mm) des 11 souches de *V. dahliae* testées.

Souches	LC	OC	LOI
Vd1	6.2±0.05	7.9±0.1	8.46±0.06
Vd2	5.5±0.09	7.8±0.04	8.02±0.05
Vd3	5.8±0.08	7.9±0.09	7.9±0.07
Vd4	5.7±0.03	8.1±0.09	8.4±0.06
Vd5	5.9±0.04	7.6±0.2	8.49±0.01
Vd6	4.9±0.02	7.04±0.05	8.2±0.19
Vd7	6.2±0.1	7.7±0.11	7.5±0.1
Vd8	5.8±0.1	7.6±0.05	8.48±0.02
Vd9	4.9±0.08	8.4±0.05	8.4±0.06
Vd10	5.02±0.04	8.3±0.1	8.48±0.02
Vd11	4.9±0.2	7.01±0.04	8.3±0.05
CMM	5.52±0.07	7.75±0.08	8.23±0.06

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm  $\pm$  les écarts-types

**Tableau 7 :** Effet de la salinité sur la croissance mycélienne (mm) des 11 souches de *V. dahliae* testées.

Souches	NaCl=2.5 g/l	NaCl=4 g/l	NaCl=8 g/l
Vd1	7.9±0.1	8.46±0.05	5.1±0.21
Vd2	8.1±0.16	7.8±0.08	8.2±0.07
Vd3	8.4±0.08	7.5±0.06	8.48±0.03
Vd4	8.1±0.08	8.3±0.1	8.2±0.08
Vd5	8.48±0.01	8.46±0.03	8.1±0.08
Vd6	8.1±0.05	8.1±0.1	8.4±0.1
Vd7	8.03±0.21	7.5±0.08	8.02±0.16
Vd8	8.47±0.04	8.46±0.05	5.10±0.09
Vd9	8.43±0.11	8.44±0.09	8.4±0.06
Vd10	8.2±0.1	8.45±0.01	8.44±0.10
Vd11	7.9±0.21	5.7±0.16	6.5±0.1
CMM	8.19±0.1	7.92±0.07	7.54±0.09

Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne mesurée en mm  $\pm$  les écarts-types.

**Annexe 4:** Pourcentages d'inhibition obtenus par les trois mécanismes d'action (confrontation directe, confrontation indirecte et effet des filtrats) et pourcentages d'inhibition de la germination des spores.

**Tableau 8:** Pourcentages d'inhibition obtenus par confrontation directe

Pourcentage d'inhibition par confrontation directe												
T	Vd	Vd1	Vd2	Vd3	Vd4	Vd5	Vd6	Vd7	Vd8	Vd9	Vd10	Vd11
T1	R1	63,52	82,5	50	67,46	52,94	40,90	43,05	53,84	41,33	35,38	55,55
	R2	63,52	87,5	45,45	62,65	52,94	39,39	47,22	49,23	41,33	40	53,96
	R3	67,05	85	45,45	61,44	56,47	46,96	47,22	44,61	37,33	40	47,61
	M±Et	64.7± 2.08	85±2.5	46.96 ±2.62	63.85 ±3.18	54.11 ±2.03	42.42 ±4	45.83 ±2.40	49.23 ±4.61	40±2. 30	38.46 ±2.66	52.38 ±4.20
T2	R1	63,52	83,75	57,57	57,83	56,47	45,45	54,16	46,15	52	50,76	50,79
	R2	64,7	82,5	56,06	55,42	54,11	45,45	50	46,15	46,66	52,30	41,26
	R3	65,88	81,25	50	60,24	55,29	50	50	46,15	45,33	44,61	41,26
	M±Et	64.70 ±1.18	82.5±1. 25	54.54 ±4	57.83 ±2.41	55.29 ±1.18	46.96 ±2.62	51.38 ±2.40	46.15 ±0	48±3. 53	49.23 ±4.06	44.44 ±5.5
T3	R1	63,52	62,5	48,48	67,46	50,58	68,18	55,55	61,53	52	30,76	53,96
	R2	64,7	56,25	50	65,06	51,76	66,66	55,55	61,53	50,66	32,30	53,96
	R3	65,88	61,25	56,06	59,03	56,47	74,24	51,38	61,53	57,33	33,84	49,20
	M±Et	64.7± 1.18	57.5±3. 30	51.51 ±4.01	63.85 ±4.34	52.94 ±3.11	69.69 ±4.01	54.16 ±2.40	61.53 ±0	53.33 ±3.52	32.30 ±1.54	52.38 ±2.74
T4	R1	60,0	63,75	48,48	60,24	54,11	53,03	52,77	50,76	49,33	44,61	46,03
	R2	60,0	63,75	45,45	53,01	54,11	51,51	54,16	52,3	48	43,07	46,03
	R3	63,52	60	46,96	53,01	57,64	50	59,72	58,46	54,66	50,76	41,26
	M±Et	61.17 ±2.03	62.5±2. 16	46.96 ±1.51	55.42 ±4.17	55.29 ±2.03	51.51 ±1.51	55.55 ±3.67	53.84 ±4.07	50.66 ±3.52	46.15 ±4.06	44.44 ±2.75
T5	R1	68,23	65	46,96	56,62	51,76	40,90	63,88	53,84	50,66	46,15	46,03
	R2	63,52	63,75	48,48	56,62	51,76	40,90	66,66	53,84	48	46,15	52,38
	R3	62,35	70	54,54	60,24	55,29	45,45	65,27	44,61	53,33	46,15	49,2
	M±Et	64.70 ±3.11	66.25±3 .30	50.00 ±4.01	57.83 ±2.09	52.94 ±2.03	42.42 ±2.62	65.27 ±1.39	50.76 ±5.32	50.66 ±2.66	46.15 ±0	49.2± 3.17
T6	R1	60	53,75	50	61,44	54,11	56,06	54,16	64,61	50,66	43,07	61,9
	R2	60	55	53,03	59,03	55,29	56,06	52,77	63,07	52	43,07	61,9
	R3	56,47	56,25	60,60	53,01	52,94	51,51	47,22	56,92	57,33	43,07	66,66
	M±Et	58±2. 03	55±1.25	54.5± 5.45	57.83 ±4.34	54.11 ±1.17	54.54 ±2.62	51.38 ±3.67	61.53 ±4.06	53.33 ±3.52	43.07 ±0	63.49 ±2.74

<b>T7</b>	<b>R1</b>	67,05	60	43,93	56,62	47,05	48,48	50	53,84	49,33	50,76	46,03
	<b>R2</b>	67,05	58,75	48,48	55,42	45,88	46,96	51,38	53,84	52	52,3	46,03
	<b>R3</b>	60	61,25	48,48	61,44	48,23	54,54	52,77	53,84	58,66	44,61	42,85
	<b>M±Et</b>	64.7± 4.07	60±1.25	46.96 ±2.62	57.83 ±3.18	47.05 ±1.17	50±4. 01	51.38 ±1.38	53.84 ±0	53.33 ±4.80	49.23 ±4.06	44.44 ±1.83
<b>T8</b>	<b>R1</b>	63,52	55	51,51	60,24	44,7	39,39	51,38	47,69	48	43,07	58,73
	<b>R2</b>	63,52	52,5	54,54	53,01	45,88	43,93	51,38	47,69	46,66	44,61	58,73
	<b>R3</b>	67,05	57,5	57,57	53,01	50,58	43,93	51,38	43,07	45,33	46,15	58,73
	<b>M±Et</b>	64.7± 2.03	55±2.5	54.54 ±3.03	55.42 ±4.17	47.05 ±3.11	39.39 ±2.62	51.38 ±0	46.15 ±2.66	46.66 ±1.33	44.61 ±1.54	58.73 ±0
<b>T9</b>	<b>R1</b>	64,7	62,5	65,15	61,44	58,82	62,12	73,61	50,76	54,66	43,07	61,9
	<b>R2</b>	62,35	62,5	71,21	60,24	55,29	62,12	73,61	52,3	54,66	44,1	66,66
	<b>R3</b>	67,05	62,5	72,72	62,65	55,29	62,12	55,55	58,46	50,66	41,53	66,66
	<b>M±Et</b>	64.7± 2.35	62.5±0	69.7± 4	61.44 ±1.20	56.47 ±2.03	62.12 ±0	58.3± 10.42	53.84 ±4.07	53.33 ±2.30	43.07 ±1.29	65.07 ±2.74
<b>T10</b>	<b>R1</b>	61,17	68,75	50	57,83	50,58	50	50	46,15	49,33	41,53	66,66
	<b>R2</b>	67,05	68,75	57,57	56,62	54,11	48,48	51,38	46,15	48	50,76	66,66
	<b>R3</b>	65,88	68,75	56,06	59,03	54,11	42,42	44,44	46,15	50,66	46,15	71,42
	<b>M±Et</b>	64.70 ±3.11	68.75±0	54.54 ±4	57.83 ±1.20	52.94 ±2.03	46.96 ±4.01	48.61 ±3.67	46.15 ±0	49.33 ±1.33	46.15 ±4.61	68.25 ±2.74
<b>T11</b>	<b>R1</b>	56,47	52,5	59,09	49,39	52,94	31,81	54,16	47,69	53,33	46,15	57,14
	<b>R2</b>	54,11	56,25	53,03	50,60	51,76	33,33	52,72	47,69	50,66	46,15	58,73
	<b>R3</b>	55,29	56,25	51,51	55,42	54,11	30,30	47,22	47,69	56	46,15	65,07
	<b>M±Et</b>	55.29 ±1.18	55±2.16	54.54 ±4.01	51.8± 3.19	52.94 ±1.17	31.81 ±1.51	51.38 ±3.66	49.23 ±0	53.33 ±2.67	46.15 ±0	60.31 ±4.19
<b>T12</b>	<b>R1</b>	100	100	56,06	59,03	100	51,51	72,22	53,84	61,33	43,07	52,38
	<b>R2</b>	100	100	56,06	66,26	100	53,03	72,22	52,30	62,66	44,61	53,96
	<b>R3</b>	100	100	51,51	66,26	100	59,09	72,22	55,38	56	50,76	50,79
	<b>M±Et</b>	100±0	100±0	54.54 ±2.62	63.85 ±4.17	100±0	54.54 ±4.01	72.22 ±0	53.84 ±1.54	60±3. 52	46.15 ±4.06	52.38 ±1.58
<b>T13</b>	<b>R1</b>	62,35	62,5	57,57	59,03	81,17	54,54	65,27	55,38	58,66	38,46	49,20
	<b>R2</b>	61,17	62,5	56,06	66,26	81,17	53,03	65,27	61,83	58,66	38,46	50,79
	<b>R3</b>	60	62,5	50	66,26	77,64	56,06	65,27	63,07	54,66	38,46	57,14
	<b>M±Et</b>	61.17 ±1.17	62.50±0	54.54 ±4	63.85 ±4.17	80±2. 03	54.54 ±1.51	65.27 ±0	58.92 ±4.12	57.33 ±2.30	38.46 ±0	52.38 ±4.20
<b>T14</b>	<b>R1</b>	61,17	65	46,96	67,46	64,70	46,96	37,5	56,92	33,33	55,38	44,44
	<b>R2</b>	62,35	67,5	46,96	62,65	64,7	45,45	36,11	55,38	30,66	55,38	44,44
	<b>R3</b>	60	62,5	46,96	61,44	64,70	39,39	38,88	58,46	36	44,61	44,44
	<b>M±Et</b>	61.17 ±1.17	65.00±2 .50	46.96 ±0	63.85 ±3.18	64.70 ±0	43.93 ±4	37.50 ±1.38	56.76 ±1.54	33.33 ±2.67	56.92 ±6.21	44.44 ±0

T15	R1	61,17	66,25	51,51	59,03	64,70	51,51	66,66	55,38	53,33	50,76	47,61
	R2	67,05	65	51,51	59,03	63,52	53,03	63,88	63,07	53,33	52,30	50,79
	R3	65,88	60	51,51	62,65	65,88	59,09	65,27	61,83	53,33	49,23	49,20
	M±Et	64.70 ±3.11	63.75±3 .30	51.51 ±0	60.24 ±2.09	64.70 ±1.18	54.54 ±4.01	65.27 ±1.39	58.92 ±4.12	53.33 ±0	50.76 ±1.53	49.20 ±1.59

Tableau 9: Pourcentages d'inhibition obtenus par confrontation indirecte

Pourcentage d'inhibition par confrontation indirecte												
T	Vd	Vd1	Vd2	Vd3	Vd4	Vd5	Vd6	Vd7	Vd8	Vd9	Vd10	Vd11
T1	R1	55,88	58,33	52,72	68	69,86	40	46,03	61,11	47,69	44,11	46,03
	R2	58,82	65	58,18	62,66	71,23	50	49,2	69,44	47,69	48,52	46,03
	R3	61,76	61,66	52,72	61,33	76,71	45	57,14	65,27	43,07	52,94	41,26
	M±Et	58.82± 2.94	61.66±3. 33	54.54± 3.15	64.00± 3.53	72.60± 3.62	45.00± 5	50.79± 5.72	65.27± 4.16	46.15± 2.66	48.52± 4.41	44.44± 2.75
T2	R1	63,23	70	47,27	42,66	50,68	58,33	58,73	56,94	53,84	63,23	66,66
	R2	66,17	63,33	43,63	45,33	47,94	56,66	57,14	58,33	52,3	60,29	68,25
	R3	69,11	66,66	40	52	53,42	50	65,07	59,72	46,15	57,35	65,07
	M±Et	66.17± 2.94	66.66±3. 33	52.72± 3.63	46.66± 4.81	50.68± 2.74	55±4.4 0	60.31± 4.19	58.33± 1.39	50.76± 4.06	60.29± 2.94	66.66± 1.59
T3	R1	60,29	56,66	54,54	64	58,9	78,33	68,25	54,16	61,53	47,05	68,25
	R2	61,76	51,66	56,36	60	57,53	71,66	69,84	50	64,61	47,05	68,25
	R3	54,41	51,66	52,72	56	53,33	70	66,66	50	67,69	42,64	63,49
	M±Et	58.82± 3.88	53.33±2. 88	54.54± 1.82	60.00± 4	56.16± 2.90	73.33± 4.40	68.25± 1.59	51.38± 2.40	64.61± 3.08	45.58± 2.54	66.66± 2.74
T4	R1	61,76	70	56,36	69,33	65,75	71,66	39,68	63,88	41,53	76,47	73,01
	R2	61,76	71,66	52,72	68	65,75	75	53,96	62,5	35,38	76,47	65,07
	R3	61,76	78,33	60	62,66	61,64	73,33	31,74	56,94	38,46	80,88	66,66
	M±Et	61.76± 0	73.33±4. 40	56.36± 3.64	66.66± 3.53	64.38± 2.37	73.33± 1.67	36.50± 11.25	61.11± 3.67	38.46± 3.07	77.94± 2.54	68.25± 4.20
T5	R1	63,23	61,66	56,36	73,33	38,35	60	66,66	55,55	36,92	75	65,07
	R2	61,76	61,66	56,36	76	39,72	61,66	65,07	55,55	35,38	75	66,66
	R3	64,70	51,66	61,81	70,66	36,98	53,33	73,01	55,55	33,84	79,41	73,01
	M±Et	63.23± 1.47	58.33±5. 77	58.18± 3.14	73.33± 2.67	38.35± 1.37	58.33± 4.40	68.25± 4.20	55.55± 0	35.38± 1.54	76.47± 2.54	68.25± 4.20
T6	R1	66,17	61,66	47,27	65,33	57,53	46,66	71,42	55,55	32,3	76,41	58,73
	R2	66,17	63,33	47,27	64	57,53	48,33	71,42	52,77	33,84	76,41	57,14
	R3	61,76	65	58,18	62,66	57,53	55	66,66	58,33	26,15	80,88	55,55
	M±Et	64.70± 2.54	63.33±1. 67	50.90± 6.29	64.00± 1.33	57.53± 0	50±4.4 1	69.84± 2.74	55.55± 2.78	30.76± 4.06	77.94± 2.58	57.14± 1.59
T7	R1	61,76	63,33	61,61	77,33	56,16	41,66	66,66	54,16	61,53	70,58	30,15
	R2	58,82	63,33	54,54	76	53,42	51,66	63,49	56,94	61,53	70,58	30,15
	R3	55,88	63,33	52,72	78,66	54,79	51,66	74,6	51,38	56,92	75	25,39
	M±Et	58.82± 2.94	63.33±0	56.36± 4.69	77.33± 1.33	54.79± 1.37	48.33± 5.77	68.25± 5.73	53.84± 2.78	60.00± 2.66	72.05± 2.55	28.57± 2.74
T8	R1	63,23	71,66	47,27	65,33	63,01	50	55,55	56,94	72,58	82,35	69,84
	R2	60,29	71,66	49,09	68	57,53	50	66,66	54,16	67,69	83,82	69,84
	R3	66,17	71,66	40	62,66	56,16	55	66,66	47,22	70,76	85,29	65,07
	M±Et	63.23± 2.94	71.66±0	45.45± 4.80	65.33± 2.67	58.90± 2.62	51.66± 2.88	68.25± 6.41	52.77± 5	69.23± 2.47	83.82± 1.47	68.25± 2.75
T9	R1	60,29	63,33	56,36	72	57,53	46,66	77,77	54,16	52,3	76,47	71,42
	R2	54,41	63,33	52,72	66,66	57,53	46,66	76,19	51,38	52,3	75	73,01
	R3	52,94	58,33	54,54	69,33	61,64	46,66	69,84	45,83	56,92	82,35	69,84
	M±Et	55.88± 3.88	61.66±2. 88	54.54± 1.82	69.33± 2.67	58.90± 2.37	46.66± 0	74.60± 4.19	50.00± 4.24	53.84± 2.66	77.94± 3.88	71.42± 1.58

<b>T10</b>	<b>R1</b>	60,29	60	58,18	64	58,9	71,66	73,01	26,38	63,07	77,94	65,07
	<b>R2</b>	58,82	65	49,09	64	57,53	71,66	73,01	33,33	72,3	77,94	66,66
	<b>R3</b>	61,76	65	50,90	64	47,94	76,66	77,77	31,94	72,3	77,94	63,49
	<b>M±Et</b>	60.29± 1.47	63.33±2. 88	52.72± 2.81	64±0	54.79± 5.97	73.33± 2.88	74.60± 2.74	30.55± 3.67	69.23± 5.32	77.94± 0	65.07± 1.58
<b>T11</b>	<b>R1</b>	66,17	65	56,36	56	54,79	53,33	65,07	41,66	55,38	66,17	50,79
	<b>R2</b>	63,23	66,66	52,72	61,33	58,9	55	58,73	43,05	58,46	66,17	49,20
	<b>R3</b>	60,29	63,33	54,54	62,66	58,9	51,66	57,14	48,61	61,53	61,76	57,14
	<b>M±Et</b>	63.23± 2.94	65.00±1. 66	54.54± 1.82	60.00± 3.52	57.53± 2.37	53.33± 1.67	60.31± 4.19	44.44± 3.67	58.46± 3.07	64.70± 2.54	52.38± 4.20
<b>T12</b>	<b>R1</b>	58,82	61,66	56,36	77,33	56,16	63,33	47,61	51,38	58,46	54,41	65,07
	<b>R2</b>	60,29	61,66	54,54	78,66	56,16	61,66	53,96	52,77	67,69	55,88	61,9
	<b>R3</b>	66,17	56,66	47,27	76	56,16	60	55,55	54,16	67,69	57,35	63,49
	<b>M±Et</b>	61.76± 3.88	60.00±2. 88	52.72± 4.80	77.33± 1.33	56.16± 0	61.66± 1.66	52.38± 4.20	52.77± 1.39	64.61± 5.32	55.88± 1.47	63.49± 1.58
<b>T13</b>	<b>R1</b>	61,76	63,33	61,81	74,66	56,16	60	63,49	43,05	69,23	69,11	73,01
	<b>R2</b>	64,70	56,66	50,90	74,66	56	60	63,49	41,66	67,69	67,64	71,42
	<b>R3</b>	63,23	55	50,90	70,66	63,01	55	63,49	48,61	64,51	75	74,6
	<b>M±Et</b>	63.23± 1.47	58.33±4. 4	54.54± 6.29	73.33± 2.30	58.90± 4	58.33± 2.88	63.49± 0	44.44± 3.67	66.15± 2.40	70.58± 3.89	73.01± 1.59
<b>T14</b>	<b>R1</b>	55,88	68,33	58,18	72	56	61,66	71,42	65,27	69,23	75	77,77
	<b>R2</b>	52,94	68,33	54,54	72	56	55	69,84	66,66	69,23	73,52	77,77
	<b>R3</b>	58,82	63,33	50,90	76	61,64	58,33	77,77	63,88	64,61	80,88	73,01
	<b>M±Et</b>	55.88± 2.94	66.66±2. 88	54.54± 3.64	73.33± 2.30	58.90± 3.25	58.33± 3.33	73.01± 4.19	65.27± 1.39	67.69± 2.66	76.47± 3.89	76.19± 2.74
<b>T15</b>	<b>R1</b>	64,70	58,33	40	70,66	56	46,66	34,92	55,55	38,46	63,23	73,01
	<b>R2</b>	64,70	56,66	47,27	74,66	56,16	50	36,5	56,94	36,92	63,23	66,66
	<b>R3</b>	60,29	60	49,09	74,66	58,9	53,33	38,09	50	40	63,23	65,07
	<b>M±Et</b>	63.23± 2.54	58.33±1. 67	45.45± 4.80	73.33± 2.30	54.79± 1.63	50±3.3 3	36.50± 1.58	54.16± 3.67	38.46± 1.54	63.23± 0	68.25± 4.2

Tableau 10: Pourcentages d'inhibition obtenus par l'action du filtrat à 10%

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>V. dahliae</i> par l'action des filtrats																
Vd	T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
		10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Vd1	R1	11,62	51,16	20,93	11,62	13,95	11,62	39,53	27,9	6,97	6,97	6,97	0	2,32	9,3	16,27
	R2	9,30	53,48	20,93	11,62	6,97	6,97	39,53	20,93	0	6,97	6,97	0	9,3	9,3	16,27
	R3	13,95	55,81	13,95	11,62	6,97	9,3	46,51	20,93	0	6,97	6,97	0	9,3	9,3	16,27
	M±Et	11.62± 2.30	53.48± 2.32	18.60± 4.05	11.62± 0	9.3±4.0 2	9.3±2.32	41.86±4. 02	23.25± 4.02	2.32±4. 02	6.9±0	6.97±0	0±0	6.97±4. 02	9.30±0	16.27±0
Vd2	R1	20	65	25	47,5	37,5	25	62,5	57,5	47,5	75	0	45	0	15	7,5
	R2	20	60	25	47,5	37,5	25	62,5	57,5	47,5	75	0	45	0	7,5	0
	R3	27,5	62,5	25	47,5	37,5	25	62,5	57,5	40	75	0	45	0	7,5	0
	M±Et	22.4±4. 33	62.5±2. 50	25±0	47.5±0	37.5±0	25±0	62.50±0	57.5±0	45±4.3 3	7.5±0	0±0	45±0	0±0	10±4.3 3	2.5±4.33
Vd3	R1	12,5	7,5	17,5	22,5	5	75	37,5	22,5	25	27,5	22,5	15	0	0	7,5
	R2	12,5	15	10	32,5	5	75	40	15	25	27,5	15	15	0	0	0
	R3	12,5	15	10	35	5	75	35	15	25	20	15	15	0	0	0
	M±Et	12,5±0	12,5±4. 33	12,5±4. 33	30±6.6 1	5±0	7,5±0	37,5±2.5	17,5±4. .33	25±0	25±4.3 3	17,5±4. 33	15±0	0±0	0±0	2,5±4.33
Vd4	R1	4,76	21,42	19,04	14,28	4,76	4,76	28,57	28,57	21,4	19,04	16,66	26,19	2,38	7,14	4,76
	R2	4,76	14,28	19,04	14,28	4,76	11,9	28,57	21,42	14,28	14,28	9,52	19,04	2,38	7,14	4,76
	R3	4,76	14,28	19,04	14,28	4,76	4,76	28,57	21,42	14,28	16,66	9,52	19,04	2,38	0	4,76
	M±Et	4.76±0	16.66± 4.12	19.04± 0	14.28± 0	4.76±0	7.14±4.1 2	28.57±0	23.80± 4.12	16.66± 4.12	16.66± 2.38	11.90± 4.12	21.42± 4.12	2.38±0	4.76±4, 12	4.76±0
Vd5	R1	4,76	16,66	4,76	7,14	4,76	0	21,42	4,76	11,90	4,76	23,8	4,76	0	0	0
	R2	4,76	16,66	4,76	7,14	4,76	0	21,42	4,76		4,76	16,66	4,76	0	0	0
	R3	4,76	16,66	4,76	0	4,76	0	21,42	4,76	2,38	4,76	16,66	4,76	0	0	0
	M±Et	4.76±0	16.66± 0	4.76±0	4.76±4. 12	4.76±0	0±0	21.42±0	4.76±0	4.76±6. 29	4.7±0	19.04± 4.12	4.76±0	0±0	0±0	0±0
Vd6	R1	0	28,57	11,42	14,28	2,85	8,57	34,28	17,14	17,14	0	8,57	31,42	0	0	0
	R2	0	28,57	5,71	8,57	5,71	8,57	34,28	17,14	17,14	0	8,57	22,85	0	0	0
	R3	0	28,57	8,57	2,85	0	8,57	34,28	8,57	8,57	0	0	22,85	0	0	0

	<b>M±Et</b>	0±0	28.57±0	8.57±2.85	8.57±5.71	2.85±2.85	8.57±0	34.28±0	14.28±4.94	14.28±4.97	0±0	5.71±4.94	25.71±4.94	0±0	0±0	0±0
<b>Vd7</b>	<b>R1</b>	11,42	0	0	8,57	11,42	0	17,14	11,42	5,71	0	14,28	0	0	14,28	37,14
	<b>R2</b>	14,28	0	0	8,57	11,42	0	11,42	11,42	5,71	0	14,28	0	0	14,28	37,14
	<b>R3</b>	8,57	0	0	8,57	2,85	0	14,28	11,42	5,71	0	14,28	0	0	14,28	37,14
	<b>M±Et</b>	11.42±2.85	0±0	0±0	8.57±0	8.57±4.94	0±0	14.28±2.86	11.24±0	5.71±0	0±0	14.28±0	0±0	0±0	42.85±0	37.14±0
<b>Vd8</b>	<b>R1</b>	36,58	53,65	60,97	12,19	2,43	26,83	9,75	24,39	46,34	41,46	29,26	0	0	7,31	2,43
	<b>R2</b>	36,58	51,21	51,21	4,87	2,43	26,73	4,87	24,39	46,34	41,46	29,26	0	0	7,31	2,43
	<b>R3</b>	36,58	48,78	56,09	4,87	2,43	26,83	14,63	24,39	46,34	34,14	29,26	0	0	7,31	2,43
	<b>M±Et</b>	36.58±0	51.21±2.43	56.09±4.88	7.31±4.22	2.43±0	26.83±0.05	9.75±4.22	24.39±0	46.34±0	39.02±4.22	29.26±0	0±0	0±0	7.31±0	2.43±0
<b>Vd9</b>	<b>R1</b>	12,5	42,5	20	12,5	22,5	37,5	45	22,5	22,5	2,5	17,5	0	35	5	15
	<b>R2</b>	12,5	35	20	10	22,5	37,5	35	22,5	20	0	17,5	0	35	7,5	15
	<b>R3</b>	12,5	35	20	7,5	22,5	37,5	32,5	22,5	17,5	5	17,5	0	42,5	2,5	7,5
	<b>M±Et</b>	12,5±0	37,5±4.33	20±0	10±2.5	22,5±0	37,5±0	37,5±6.61	22,5±0	20±2.5	2,5±2.5	17,5±0	0±0	37,5±4.33	5±2.5	12,5±4.33
<b>Vd10</b>	<b>R1</b>	15	47,5	27,5	12,5	32,5	0	10	0	35	45	27,5	32,5	12,5	17,5	25
	<b>R2</b>	15	42,5	25	12,5	32,5	0	10	0	32,5	42,5	27,5	32,5	12,5	17,5	25
	<b>R3</b>	7,5	45	22,5	12,5	25	0	2,5	0	30	47,5	20	32,5	12,5	17,5	25
	<b>M±Et</b>	12,5±4.33	45±2.5	25±2.5	12,5±0	30±4.33	0±0	7,5±4.33	0±0	32,5±2.5	20±2.5	25±4.33	32,5±0	12,5±0	17,5±0	25±0
<b>Vd11</b>	<b>R1</b>	57,14	14,28	54,28	14,28	62,85	40	54,28	57,14	0	37,14	51,42	45,71	0	8,57	0
	<b>R2</b>	57,14	14,28	54,28	14,28	57,14	40	54,28	57,14	0	37,14	60	40	0	8,57	0
	<b>R3</b>	57,14	14,28	54,28	14,28	60	40	54,28	57,14	0	37,14	60	46,87	0	8,57	0
	<b>M±Et</b>	57,14±0	14,28±0	54,28±0	14,28±0	60±2.85	40±0	54,28±0	57,14±0	0±0	37,14±0	57,14±2.95	42,85±3.67	0±0	8,57±0	0±0

Tableau 11: Pourcentages d'inhibition obtenus par l'action du filtrat à 20%.

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>V. dahliae</i> par l'action des filtrats																
Vd	T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
		20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
Vd1	R1	18,60	53,48	41,86	41,86	18,60	9,3	58,13	25,58	18,6	13,95	2,32	18,6	6,97	13,95	39,53
	R2	18,60	53,48	41,86	41,86	18,60	9,3	51,16	25,58	18,6	13,95	9,3	18,6	6,97	11,62	44,18
	R3	18,60	53,48	41,86	41,86	18,60	9,3	51,16	25,58	18,6	13,95	9,3	18,6	6,97	9,3	41,86
	M±Et	18.60±0	53.48±0	41.86±0	41.86±0	18.6±0	9.3±0	53.48±4.02	25.58±0	18.60±0	13.95±0	6.97±4.02	18.60±0	6.97±0	11.62±2.32	41.86±2.32
Vd2	R1	57,5	67,5	42,5	57,5	50	42,5	75	75	60	52,5	12,5	47,5	7,5	12,5	0
	R2	57,5	67,5	35	62,5	50	42,5	75	75	60	52,5	5	47,5	7,5	12,5	7,5
	R3	57,5	67,5	35	60	50	50	75	75	60	45	5	47,5	7,5	12,5	7,5
	M±Et	57.5±0	67.5±0	37.5±4.33	60±2.5	50±0	45±4.33	75±0	75±0	60±0	50±4.33	7.5±4.33	47.5±0	7.5±0	12.5±0	5±4.33
Vd3	R1	22,5	25	20	50	7,5	75	50	20	25	25	17,5	25	2,5	12,5	10
	R2	22,5	25	20	50	7,5	75	50	20	25	25	17,5	25	2,5	12,5	17,5
	R3	15	25	20	50	15	75	50	12,5	32,5	25	17,5	25	2,5	12,5	17,5
		20±4.33	25±0	20±0	50±0	10±4.33	7.5±0	50±0	17.5±4.33	27.5±4.33	25±0	17.5±0	25±0	2.5±0	12.5±0	15±4.33
Vd4	R1	28,57	28,57	28,57	21,42	11,9	9,52	40,47	28,57	28,57	16,66	16,66	52,38	4,76	11,9	28,57
	R2	21,42	28,57	14,28	14,28	11,9	9,52	40,47	28,57	28,57	16,66	16,66	52,38	4,76	11,9	28,57
	R3	21,42	28,57	14,28	14,28	11,9	9,52	40,47	28,57	28,57	16,66	16,66	52,38	4,76	11,9	28,57
	M±Et	23.80±4.12	28.57±0	19.04±8.25	16.66±4.12	11.90±0	9.52±0	40.47±0	28.57±0	28.57±0	16.66±0	16.66±0	52.38±0	4.76±0	11.9±0	28.57±0
Vd5	R1	19,04	11,90	19,04	9,52	2,38	0	50	28,57	4,76	52,38	19,04	26,19	2,38	4,76	16,66
	R2	16,66	19,04	14,28	9,52	2,38	0	42,85	28,57	4,76	52,38	19,04	26,19	4,76	4,76	16,66
	R3	14,28	19,04	16,66	9,52	9,52	0	42,85	28,57	4,76	52,38	19,04	33,33	7,14	4,76	16,66
		16.66±2.38	16.66±4.12	16.66±2.38	9.52±0	4.76±4.12	0±0	45.23±4.12	28.57±0	4.76±0	52.38±0	19.04±0	28.57±4.12	4.76±2.38	4.76±0	16.66±0
Vd6	R1	5,71	42,85	11,42	14,28	22,85	20	42,85	14,28	14,28	8,57	11,42	42,85	5,71	2,85	0
	R2	0	42,85	11,42	14,28	22,85	20	42,85	14,28	14,28	8,57	11,42	42,85	2,85	2,85	0
	R3	2,85	42,85	11,42	14,28	22,85	20	42,85	14,28	14,28	8,57	11,42	42,85	8,57	2,85	0

	<b>M±Et</b>	2.85±2.85	42.85±0	11.42±0	14.28±0	22.85±0	20±0	42.85±0	14.28±0	14.28±0	8.57±0	11.42±0	42.85±0	5.71±2.86	2.85±0	0±0
<b>Vd7</b>	<b>R1</b>	20	17,14	11,42	14,28	42,85	11,42	51,42	25,71	11,42	0	25,71	42,85	42,85	22,85	42,85
	<b>R2</b>	20	14,28	5,71	14,28	40	11,42	51,42	25,71	11,42	0	25,71	48,57	34,28	20	42,85
	<b>R3</b>	20	11,42	0	14,28	37,14	11,42	51,42	17,14	11,42	0	25,71	45,71	34,28	17,14	42,85
	<b>M±Et</b>	20±0	14.28±2.86	5.71±5.71	14.28±0	40±2.85	11.42±0	51.42±0	25.71±4.94	11.42±0	0±0	25.71±0	45.71±2.86	37.14±4.94	20±2.85	42.85±0
<b>Vd8</b>	<b>R1</b>	51,21	58,53	60,97	14,63	14,63	58,53	26,82	65,85	70,73	51,21	34,14	26,83	2,43	51,21	14,63
	<b>R2</b>	51,21	58,53	60,97	14,63	7,31	60,97	26,82	60,97	70,73	51,21	29,26	26,83	2,43	43,9	14,63
	<b>R3</b>	51,21	58,53	60,97	14,63	7,31	56,09	26,82	63,41	70,73	51,21	31,7	26,83	2,43	43,9	14,63
	<b>M±Et</b>	51.21±0	58.53±0	60.97±4.22	14.63±2.44	9.75±4.88	58.53±2.44	26.82±0	63.41±2.44	70.73±0	51.21±0	31.7±2.44	26.83±0	2.43±0	46.34±4.22	14.63±0
<b>Vd9</b>	<b>R1</b>	52,5	67,5	52,5	32,5	62,5	35	75	45	32,5	3,8	42,5	40	50	0	55
	<b>R2</b>	57,5	65	60	32,5	62,5	35	72,5	52,5	32,5	0	42,5	40	50	0	55
	<b>R3</b>	47,5	62,5	60	40	70	42,5	77,5	52,5	32,5	7,5	42,5	40	50	0	55
		52,5±5	65±2.5	57,5±4.33	35±4.33	65±4.33	37,5±4.33	75±2.5	50±4.33	32,5±0	5±3.75	42,5±0	40±0	50±0	0±0	55±0
<b>Vd10</b>	<b>R1</b>	25	50	32,5	47,5	30	32,5	70	47,5	37,5	25	12,5	15	37,8	42,5	50
	<b>R2</b>	25	50	32,5	42,5	35	32,5	70	47,5	37,5	25	12,5	15	37,8	42,5	50
	<b>R3</b>	25	50	32,5	37,5	32,5	32,5	70	40	37,5	25	12,5	7,5	37,8	35	50
	<b>M±Et</b>	25±0	50±0	32,5±0	42,5±5	32,5±2.5	32,5±0	70±0	45±4.33	37,5±0	25±0	12,4±0	12,5±4.33	37,5±0	40±4.33	50±0
<b>Vd11</b>	<b>R1</b>	71,42	25,71	65,71	17,14	65,71	48,57	71,42	68,57	2,85	42,85	57,14	54,28	8,57	14,28	8,57
	<b>R2</b>	68,57	22,85	65,71	14,28	65,71	48,57	71,42	68,57	2,85	42,85	57,14	54,28	11,42	14,28	8,57
	<b>R3</b>	65,71	20	65,71	11,42	65,71	40	71,42	60	2,85	42,85	57,14	54,28	5,71	14,28	8,57
	<b>M±Et</b>	68,57±2.85	22,85±2.85	65,71±0	14,28±2.86	65,71±0	45,71±2.94	71,42±0	65,71±2.94	2,85±0	42,85±0	57,14±0	54,28±0	8,57±2.85	14,28±0	8,57±0

**Tableau 12:** Pourcentage d'inhibition de la germination des spores de l'isolat Vd4

<b>Souches</b>	<b>Pourcentage d'inhibition de la germination</b>
<b>T1</b>	15.21±3.45
<b>T2</b>	14.78±4.60
<b>T3</b>	3.90±1.56
<b>T4</b>	14.78±2.30
<b>T5</b>	5.21±1.89
<b>T6</b>	16.95±1.99
<b>T7</b>	13.47±1.30
<b>T8</b>	6.52±1.89
<b>T9</b>	23.91±3.79
<b>T10</b>	12.60±3.04
<b>T11</b>	3.91±0.87
<b>T12</b>	23.03±2.64
<b>T13</b>	12.16±1.15
<b>T14</b>	6.08±3.04
<b>T15</b>	13.47±2.30

**Annexe 5:** Réactifs et solutions tampons utilisés**Réactif de Salkowski**

Acide perchlorique (35%) 50ml

FeCl<sub>3</sub> à (0.5 M). 1ml**Réactif DNS** (Miller et al., 1956)

NaOH 10 g

Potassium Sodium Tartare 182 g

3,5-Dinitrosalicylic Acid 10 g

Phénol 2 g

Sodium sulfite 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

**Solution de picrate de sodium**

Acide picrique 50g

Carbonate de sodium anhydre 20g

Eau distillée 1000 ml

## Préparation des solutions tampons

**Tableau 13:** Préparation des tampons pour le test de la détermination du pH (selon Kamoun, 1977)

pH	Solutions stock		Composition du tampon
	A	B	
4	Acide citrique (0,1M)	Phosphate dissodique (0.2M)	53.7ml de A+(100-53.7) ml de B
5	Acide citrique (0,1M)	Phosphate dissodique (0.2M)	42.4 ml de A+(100-42.4) ml de B
6	Acide citrique (0,1M)	Phosphate dissodique (0.2M)	27.9 ml de A+(100-27.9) ml de B
7	Acide citrique (0,1M)	Phosphate dissodique (0.2M)	6.8 ml de A+(100-6.8) ml de B
8	Tris (0,2 M)	Hcl (0,1M)	25ml de A+13 ml de b et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée stérile

### Tampon acétate de Sodium 50 mM (pH= 5.0)

Acétate de sodium	4,10 g
Acide acétique glacial	2,85 ml
Eau distillée stérile	1000 ml

### Tampon citrate (0.1M)

**Solution A:** Acide citrique monohydrate (0,1M)

**Solution B:** Citrate trisodium dihydrate (0,1M)

Mélanger 40 ml de A et 60 ml de B pour obtenir un pH=4,8

### Tampon phosphate de sodium (50mM) pH =7.0

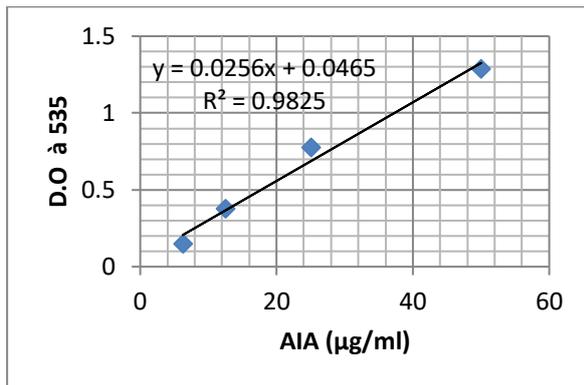
Verser 800 ml d'eau distillée dans un récipient approprié.

Ajoutez 7,744 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 2,913 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  à la solution.

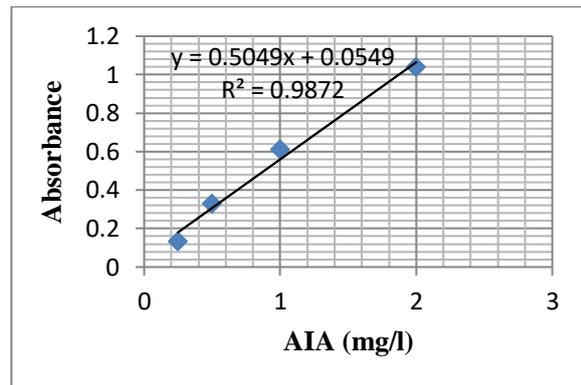
Ajustez la solution au pH final souhaité avec HCl ou NaOH.

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 L.

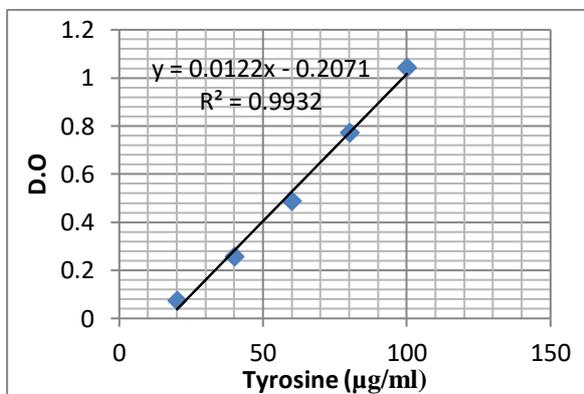
**Annexe 6: Courbes d'étalonnage**



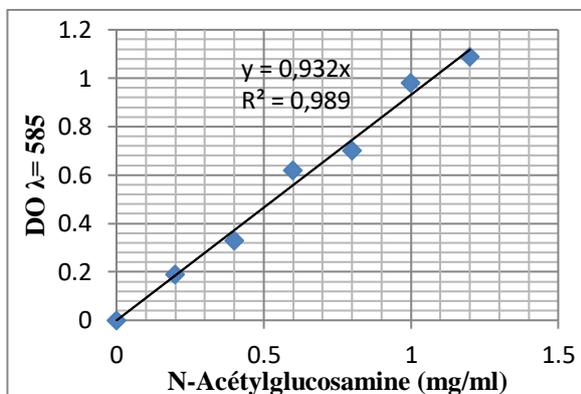
**Courbe d'étalonnage de l'AIA**



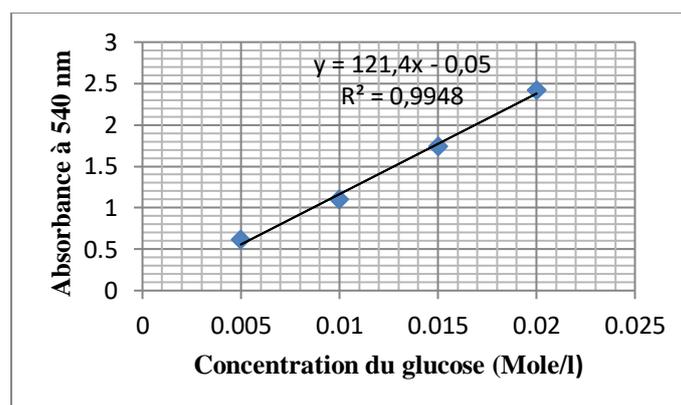
**Courbe d'étalonnage d'AIA obtenue par HPLC**



**Courbe d'étalonnage du Tyrosine**



**Courbe d'étalonnage du N-acétylglucosamine.**



**Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage de l'activité endoglucanase**



**Annexe 08:** Séquence de la région ITS2-ITS4 amplifiée par ITS2 et ITS4***Trichoderma* sp. strain T4 (OL587558)**

GTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGT  
TACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGGAACCGGCGCCCGC  
CGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA  
AATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGA  
TCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGC  
AGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAAC  
ACCAAACCTTTCTGAAATGTTG

***Trichoderma* sp. strain T7 (OL587561)**

CCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGC  
CTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAAC  
CAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAG  
GCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGG  
GGGTGCGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGC  
CGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAA  
ACACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGG

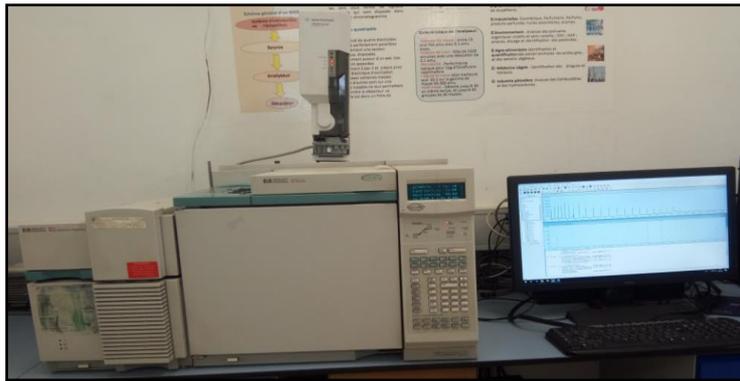
***Trichoderma* sp. strain T11 (OL587563)**

CTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC  
TCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACC  
AAAACCTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTA  
GGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG  
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT  
TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGG  
GGGTGCGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCG  
CCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTA  
AACACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGA

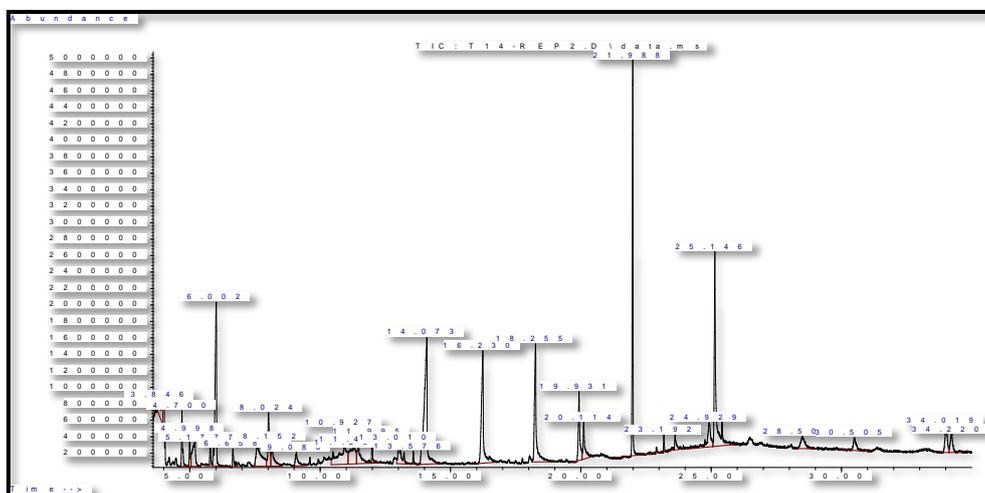
***Trichoderma* sp. strain T12 (OL587564)**

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC  
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGG  
AGGACCAACCAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGG  
CGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG  
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGA  
ACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGT  
GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCC  
ACAGCCGTTAAACACCAACTTCTGAAATGTTGACC

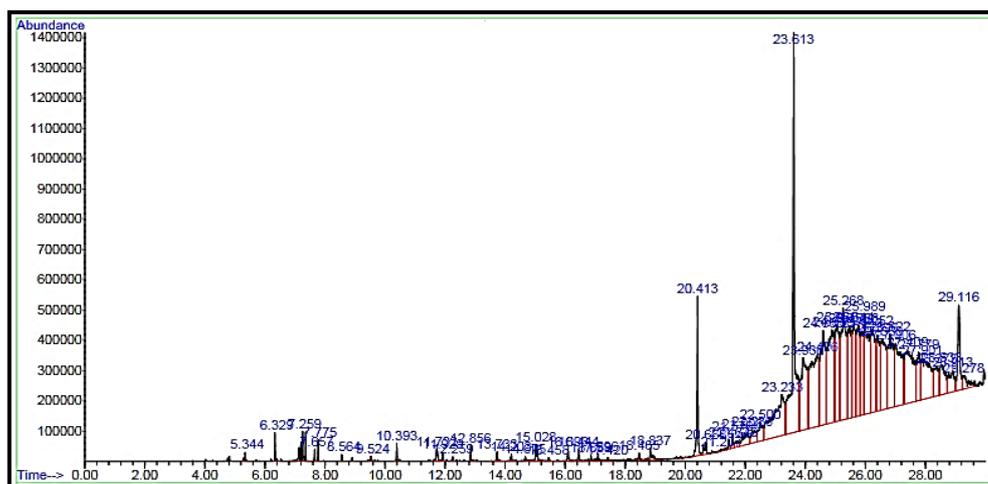
## Annexe 9



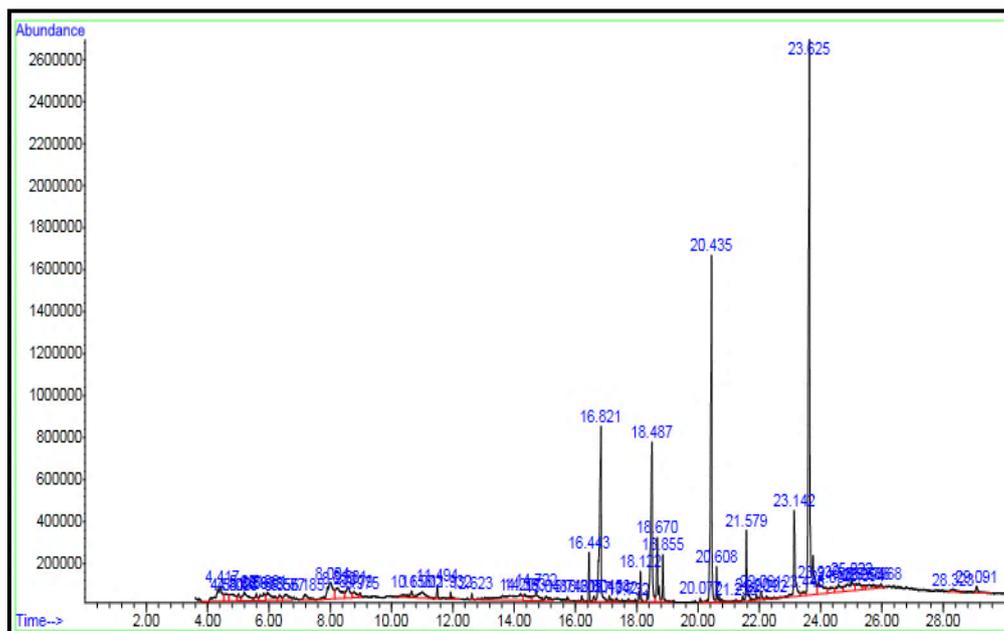
**Figure 4.** Machine de chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.



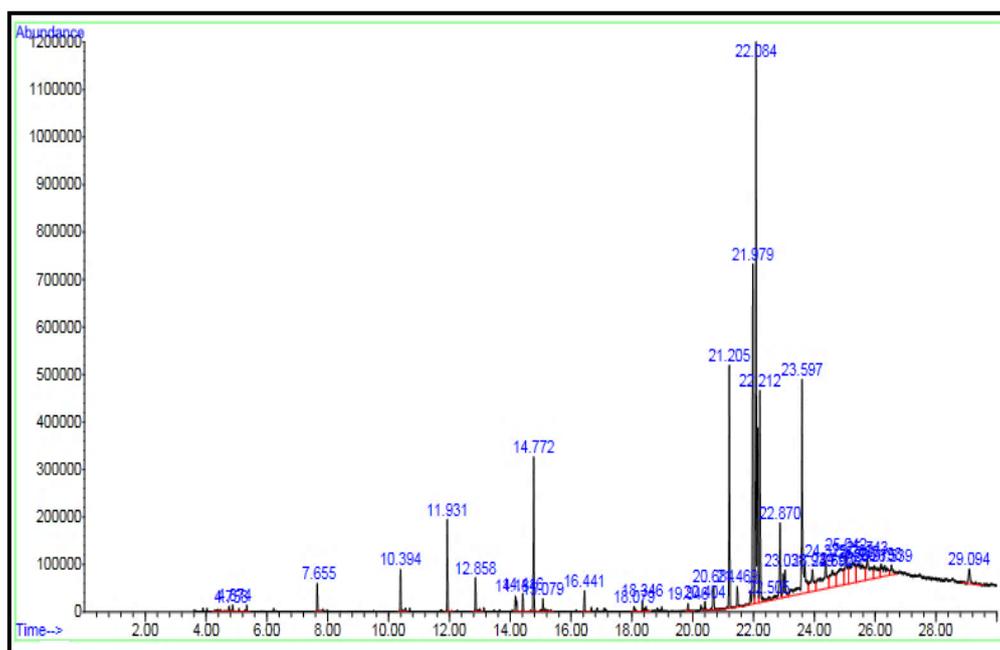
**Figure 5.** Chromatogramme des composés volatiles détectés dans l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat T14 par CG-MS.



**Figure 6.** Chromatogramme des composés volatiles détectés dans l'extrait hexanique de l'isolat T2 par CG-MS



**Figure 7.** Chromatogramme des composés volatiles détectés dans l'extrait méthanolique de l'isolat T2 par CG-MS.



**Figure 8.** Chromatogramme des composés volatiles détectés dans l'extrait hexanique de l'isolat T9 par CG-MS.



## Annexe 10

**Tableau 14:** Les tests de pathogénicité sur les plantules d'olivier, les résultats sont exprimés en centimètre (longueur des plantules d'olivier)

	Témoïn négatif non traité			Lot traité par Vd4			Lot traité par Vd5			Lot traité par T2			Lot traité par T9			Lot traité par T12			Lot traité par T2+ Vd4			Lot traité par T9+ Vd4			Lot traité par T12+ Vd4		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Premier Jour du traitement</b>	95	85	82	75	66	71	91	87	84	91	93	90	85	86	89	83	85	86	92	94	90	84	90	95	85	92	96
<b>Après 2.5 mois du traitement</b>	110	100	100	77	80	76	102	98	98	112	118	110	89	95	105	95	100	112	110	113	107	85	95	100	87	98	107
<b>Après 5 mois du traitement</b>	115	120	103	79	83	81	110	105	110	120	140	114	90	105	107	112	112	122	110	123	109	90	100	105	88	103	114
<b>Après 7.5 mois du traitement</b>	129	122	105	81	84	84	111	107	117	140	155	117	95	109	130	125	125	140	120	130	115	91	105	110	90	108	125
<b>Après 10 mois du traitement</b>	132	127	110	83	86	85	112	108	Mort 117	145	160	120	104	110	133	126	127	142	125	130	117	100	100	128	90	125	128
<b>Après 12 mois du traitement</b>	133	128	112	83	88	87	112	111	Mort 117	153	171	130	119	123	136	129	131	146	125	133	123	103	108	129	94	127	130

**Tableau 15:** Résultats de l'indice d'altération foliaires et l'indice de rabougrissement mesuré chez les plantules d'olivier traités par les différentes souches de *V. dahlia* après 12 mois du traitement.

Souches	Lot témoin non traité	Vd4	Vd5	Vd4+T2	Vd4+T9	Vd4+T12
<b>I.A.F</b>	2,86±0,42	19,46±1,19	7,10±1,03	3,15±0,52	5,5±1,38	6,33±2,76
<b>Taux de protection</b>	-	-	-	83,81	71,73	67,47
<b>I.R</b>	-	30,82±2,12	8,84±2,58	-	-	-

## Etude statistique

## 1. Analyse de la variance des indices de rabougrissement

ANOVA					
	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	2337,556	2	1168,778	25,470	<b>,001</b>
Intragroupes	275,333	6	45,889		
Total	2612,889	8			

## Comparaisons multiples par le test LSD

Lots (I)	lots (J)	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
Vd4	Vd5	-27,333 *	5,531	,003	-40,87	-13,80
	Témoin	-38,333 *	5,531	,000	-51,87	-24,80
Vd5	Vd4	27,333 *	5,531	,003	13,80	40,87
	Témoin	-11,000	5,531	,094	-24,53	2,53
Témoin	Vd4	38,333 *	5,531	,000	24,80	51,87
	Vd5	11,000	5,531	,094	-2,53	24,53

\*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

2. Analyse de la variance entre les lots traités uniquement par Vd4 et les lots traités en combinaison entre Vd4 et les souches de *Trichoderma* T2, T9 et T12

ANOVA					
	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	2767,000	3	922,333	5,909	<b>,020</b>
Intragroupes	1248,667	8	156,083		
Total	4015,667	11			

## Comparaisons multiples par le test LSD

Lots (I)	Lots (J)	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
Vd4	Vd4-T2	-41,000 *	10,201	,004	-64,52	-17,48
	Vd4-T9	-27,333 *	10,201	,028	-50,86	-3,81
	Vd4-T12	-31,000 *	10,201	,016	-54,52	-7,48
Vd4-T2	Vd4	41,000 *	10,201	,004	17,48	64,52
	Vd4-T9	13,667	10,201	,217	-9,86	37,19
	Vd4-T12	10,000	10,201	,356	-13,52	33,52
Vd4-T9	Vd4	27,333 *	10,201	,028	3,81	50,86
	Vd4-T2	-13,667	10,201	,217	-37,19	9,86
	Vd4-T12	-3,667	10,201	,729	-27,19	19,86
Vd4-T12	Vd4	31,000 *	10,201	,016	7,48	54,52
	Vd4-T2	-10,000	10,201	,356	-33,52	13,52
	Vd4-T9	3,667	10,201	,729	-19,86	27,19

\*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

**3. Analyse de la variance entre les lots traités par les souches de *Trichoderma* T2, T9 et T12 et le lot témoin non traité (effet PGPF).**

ANOVA					
	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	1378,250	3	459,417	2,596	<b>,125</b>
Intragroupes	1416,000	8	177,000		
Total	2794,250	11			

**Comparaisons multiples par le test LSD**

Lot (I)	Lot (J)	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
Non traité	T2	-27,000*	10,863	,038	-52,05	-1,95
	T9	-1,667	10,863	,882	-26,72	23,38
	T12	-11,000	10,863	,341	-36,05	14,05
T2	Non traité	27,000*	10,863	,038	1,95	52,05
	T9	25,333*	10,863	,048	,28	50,38
	T12	16,000	10,863	,179	-9,05	41,05
T9	Non traité	1,667	10,863	,882	-23,38	26,72
	T2	-25,333*	10,863	,048	-50,38	-,28
	T12	-9,333	10,863	,415	-34,38	15,72
T12	Non traité	11,000	10,863	,341	-14,05	36,05
	T2	-16,000	10,863	,179	-41,05	9,05
	T9	9,333	10,863	,415	-15,72	34,38

\*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

---

## **Publications**

---



# *Trichoderma* spp. isolates from the rhizosphere of healthy olive trees in northern Algeria and their biocontrol potentials against the olive wilt pathogen, *Verticillium dahliae*

Abdenaceur Reghmit · Farida Benzina-tihar · Francisco Javier López Escudero · Fatma Halouane-Sahir · Zahia Oukali · Souhila Bensmail · Nourelhouda Ghozali

Received: 1 February 2021 / Accepted: 2 October 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

**Abstract** *Trichoderma* species are known for their ability to control many plant diseases. In this study, fifteen (T1–T15) indigenous strains of *Trichoderma* spp. isolated from rhizosphere soils of olive in northern Algeria were investigated for their biocontrol potential against eleven strains of *Verticillium dahliae*, the causal agent of wilting on olive (*Olea europaea* cv. *europaea* L.). Direct and indirect confrontation assays were performed to investigate if isolates of *Trichoderma* affect mycelium growth. In addition, gas chromatography–mass spectroscopy (GC–MS) was applied to identify the volatile organic compounds (VOCS) produced by the T2 isolate. Besides, *Trichoderma* isolates were screened for the production of extracellular enzymes on solid medium including chitinases, proteases and cellulases. Results showed

that *Trichoderma* isolates demonstrated an effective potential in reducing mycelium growth against *V. dahliae* in vitro. T12 was the highest antagonistic of the *Trichoderma* isolates by direct confrontation assay method. This isolate exhibited an average inhibition rate of 68.86% against *V. dahliae* isolates, whereas the evaluation of volatile metabolites effect revealed that inhibition percentage of radial growth varies between 55.26 and 65.93%. Importantly, results showed the presence of 33 compounds detected in the methanolic and hexanic fraction of T2 isolate, including important volatile compounds with antifungal activities such as Undecane, Octadecane, Eicosane, 13-Docosenamide, (Z), Hexadecanamide, 9-Octadecanamide, (Z), Cyclopentanone, 2-methyl, Tetradecanoic acid, propyl ester, Tetradecanoic acid, oleic acid, and n-Hexadecanoic acid. Interestingly, all isolates tested showed chitinolytic, proteolytic and cellulolytic activity. T2 and T12 were the effective *Trichoderma* isolates showing high chitinase production on solid medium. Besides that, isolates T2 and T6 demonstrated the highest chitinolytic and proteolytic activity with values 0.043  $\mu\text{mol/ml/min}$  and 0.019  $\mu\text{mol/ml/min}$ , respectively. Overall, the isolates, T2, T6, and T12 are the most effective agents against olive wilt pathogen *V. dahliae* in vitro. Hence, they could be further investigated for biocontrol of olive wilt *in vivo*.

A. Reghmit (✉) · F. Benzina-tihar · F. Halouane-Sahir · Z. Oukali · N. Ghozali  
Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources, Department of Biology, University of M'hamed Bougara, Boumerdes, Algeria  
e-mail: a.reghmit@univ-boumerdes.dz

F. López Escudero  
Escuela Técnica Superior of Agricultural and Forestry Engineers, Department of Agronomy, University of Córdoba, University Campus of Rabanales, Celestino Mutis Building (C4), 14071 Córdoba, Spain

S. Bensmail  
Department of Biological Sciences, Faculty of Nature, Life and Earth Sciences, Akli Mohand Oulhadj University, 10000 Bouira, Algeria

**Keywords** Olive wilt · *Trichoderma* sp. · *V. dahliae* · Biocontrol · Chitinases

## Introduction

Olive cultivation is affected by a wide range of biotic constraints. Verticillium wilt of olive (VWO) is one among important devastating diseases affecting olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) in the Mediterranean Basin including Algeria; it is caused by the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb (López-Escudero and Mercado-Blanco 2011). Several symptoms of Verticillium wilt appear on plants affected such as wilt, chlorosis, necrosis, vascular discoloration, browning and gutter rolling, stunting, dieback, and premature plant senescence (Fradin and Thomma 2006).

Control of Verticillium wilt in olive is very difficult due to the broad host range of the pathogen and the long-term survival of microsclerotia which can stay for years in the soil (Pegg and Brady 2002; Jiménez-Díaz et al. 2012). Furthermore, using chemical pesticides for soil-borne diseases requires the use of many fungicides and it is not recommended because that leads to environmental pollution, development of chemical resistance, and its low cost-efficiency (Song et al. 2014). These reasons have increased the research of alternative disease control measures. Nowadays, a key practice to deal with plant pathogens in sustainable agriculture is the biological control, which is based on managing natural resources and developing antagonistic activities against harmful microorganisms (Jie et al. 2015) which makes it an effective and eco-friendly approach when it comes to crops protection from various diseases (Huang et al. 2012).

Many microorganisms are known as biocontrol agents against several plant diseases caused by various microorganisms including *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Lysobacter* spp., and *Trichoderma* spp. These microorganisms offer an environment-friendly alternative to get out of these chemical pesticides damages (Naing et al. 2014; Anees et al. 2018; Li et al. 2018a, b). *Trichoderma* spp. are known as promising fungal for the management of plant diseases, especially against soil-borne pathogens (Elad et al. 2004). Therefore, *Trichoderma* spp. are most investigated and employed as biopesticide industries globally (Whipps and Lumsden 2001; Singh et al. 2012; Keswani et al. 2014). A previous preliminary study indicated that some strains of *Trichoderma* spp. show potential for biocontrol of

Verticillium wilt in olive which contributes to the integrated management of the disease, but the mode of actions of those strains was not determined (Díaz et al. 2009). This genus has antagonistic activities and can act by various mechanisms against a wide range of soil-borne phytopathogenic fungi (Tondje et al. 2007). The *Trichoderma* species modes of action are based mainly on the production of antibiotics and/or hydrolytic enzymes, as well as competition for nutrients and the systemic activation of plant defense responses (Harman et al. 2004; Hermosa et al. 2012; Shores et al. 2010). Several *Trichoderma* species produced cell wall degrading enzymes such as proteases, glucanases, and chitinases; these hydrolytic enzymes have significant effects on growth and development of the plant pathogens (Sivan et al. 1984; Coley-Smith et al. 1991; Lunge and Patil 2012). Moreover, *Trichoderma* species are able to produce antibiotics such as peptaibols, mycotoxins, and more than 100 metabolites with antibiotic activities including polyketides, pyrones, terpenes, and metabolites derived from amino acids and polypeptides (Sivasithamparam and Ghisalberti 1998).

The aim of this study was to characterize *Trichoderma* species associated to the ecological niche in some olive-growing regions of Algeria and exploring the different biocontrol processes such as production of hydrolytic enzymes and antifungal metabolites involved in biocontrol against *Verticillium dahliae*. As well as to reveal the potential of these species to be used later as biopesticides for management of phytopathogene *Verticillium dahliae*. Therefore, safe environmental methods are applied to reduce the effects of chemical pesticides.

## Material and methods

### Soil and branches samples collection

This study was carried out in the period extending from March 2018 to November 2019 in olive groves located in northern Algeria: Boumerdes (altitude: 121 m, average temperature: 18 °C, annual precipitation: 739 mm), Bouira (altitude: 525 m, average temperature: 17.6 °C, annual precipitation: 669 mm), Bejaia (altitude: 660 m, average temperature: 18.8 °C, annual precipitation: 800.6 mm), and Tipaza (altitude: 230 m, average temperature: 17.6 °C, annual

precipitation: 642.4 mm) based on Koppen-Geiger Classification.

The olive wilt pathogen, *V. dahliae*, was isolated from soil and branches of olive plants showing characteristic symptoms of Verticillium wilt. Samples were collected in sterile bags and immediately transported to the laboratory for further use. The samples of soil around healthy olive roots and rhizosphere zone taken to a depth of (10–40 cm) were used to search *Trichoderma* species. Soils were air dried (at 27 °C), homogenized, and ground with a mortar and pestle.

### Fungal isolation and identification

#### *Isolation and identification of Trichoderma species*

*Trichoderma* spp. were isolated on potato dextrose agar (PDA) medium by soil dilution plate technique (Johnson and Curl 1972), 10 g of soil was added to 90 ml of distilled water in order to make a suspension, and the mixture should then be vigorously shaken using a vortex. A series of soil dilutions were prepared by transferring 1 ml from each dilution into following dilution going up to  $10^{-7}$ . The plates were incubated at  $26 \pm 2$  °C for 5 days. *Trichoderma* colonies that appeared in the plates were transferred into new PDA medium for purification. Then, second purification of fungal isolates was applied by single spore isolation method. After seven days of incubation on PDA medium, fungal colonies coming from monospore cultures were examined macroscopically and microscopically (Rifai 1969). Macroscopic characterization was performed using the morphological characteristics such as: growth rate, colony colour, texture and formation of concentric rings. Whereas, the microscopic observation of *Trichoderma* isolates was done by examination of phialides and conidia shape, as well as chlamydo-spores position. The fungi were then preserved in the mycological collection of valorization and conservation of biological resources laboratory (UMBB, Boumerdes, Algeria).

#### *V. dahliae* isolation and identification

In order to isolate *Verticillium dahliae*, branches were thoroughly washed by sterile distilled water

to remove all soil particles, then each branch was sectioned into small pieces (0.5 cm) by a sterile scalpel, and pieces were then disinfected in a solution containing 5% sodium hypochlorite for 5 min, rinsed with sterile distilled water. The surface of the tissue was then sterilized using 75% ethanol solution and was dried on a sterile filter paper and plated on PDA. When colonies grow up from infected tissues, mycelial fragments of each isolate were taken and transferred into new PDA medium for purification. Morphological and molecular identification was applied to identify fungal isolates as described by Gharbi et al. (2015). Eleven isolates of *V. dahliae* were isolated and used in this work, named Vd1 to Vd11.

#### *Molecular identification of Verticillium dahliae strains by PCR assay*

DNA of *Verticillium dahliae* strains was extracted from 100 mg of mycelia powder using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was estimated by measuring the absorbance at 260 nm. The final concentration of DNA samples is adjusted to  $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . The DNA samples were stored at  $-20$  °C for further use. For PCR reactions, 1  $\mu\text{l}$  of DNA at the concentration  $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  was used as template (Russell and Sambrook 2001). The primers DF (CATGTTGCTCTGTTGACTGG) and DR (GACACGGTATCTTGTCTGAA) were used to identify defoliating *V. dahliae* strains, whereas primers NDF (CAGGGGATACTGGTACGAGACG) and NDR (ATGAGTATTGCCGATAAGAACA) were used to identify non-defoliating strains of the same species (Pérez-Artés et al. 2000). PCR assays were carried out according to the method described by Mercado-Blanco et al. (2003) and Collado-Romero et al. (2006); specific primers were used for identification of defoliating (D) and non-defoliating (ND) pathotypes. PCRs are performed separately using two primer pairs: DF/DR and NDF/NDR, with a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, MN) (Pérez-Artés et al. 2000; de Jonge et al. 2012). The final volume of each PCR is 25  $\mu\text{l}$  containing the following reagents: 2.5  $\mu\text{l}$  of  $10 \times$  buffer [ $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$  KCl and 10% v/v Triton X-100],  $2.5 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.2 \text{ mmol l}^{-1}$

dNTP (CinnaGen Co., Iran), 100 nmol l<sup>-1</sup> one of each primer (Primer), 1 U of Taq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI), and 1 µl of template DNA. Each reaction is performed according to the following thermal cycling parameters: initial denaturation was done at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C. The hybridization temperature of the defoliation and non-defoliation primers were 61 °C and 58 °C respectively for 1 min, extension was performed at 72 °C for 1 min, and the final cycle was done for 1 min of polymerization and 5 min of extension. Amplified products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel in tris-1×acetate-EDTA (TAE) buffer at 85 V for 60 min, and gels were stained with Ethidium bromide for 15 min and visualized on a UV transilluminator.

#### Antagonistic activity

##### *Dual culture method*

*Trichoderma* spp. isolates were evaluated in vitro for their antagonistic ability against strains of *V. dahliae*. Dual culture technique was adopted in direct confrontation tests. Discs, 6 mm diameter cut from 7 days old cultures of *Trichoderma* and *V. dahliae*, were placed 4 cm apart from each other on 9 cm diameter PDA Petri and incubated at 26 ± 2 °C. All combinations were prepared in three replicate for each treatment. The positive control was done by the inoculation of the pathogen alone in the center of the tested plates (Hajjeharai et al. 2008; De la Cruz-Quiroz et al. 2018; Bedine Boat et al. 2020). The inhibition percentage of growth (%I) was calculated according to Whipps (1997) using the following formula:

$$\%I = [(R1 - R2)/R1] \times 100, \quad (1)$$

where R1 is the diameter of radial growth of pathogen in control and R2 represents the diameter of radial growth of pathogen in *Trichoderma* tests.

##### *Sealed plate method*

Effect of volatile metabolites produced by *Trichoderma* isolates against fungal pathogens was investigated according to the method described by Dennis and Webster (1971) and Ruangwong et al. (2021). Two PDA plates were prepared with 6 mm culture discs cut

from place in the center of the plate. One with disc cut from *Trichoderma* culture and the second one with disc cut from *Verticillium* culture. Those plates were inoculated in sandwich formation where plate containing disc pathogen was placed upside down facing plate containing *Trichoderma* isolate. Each paired plate was sealed tight with adhesive tape to keep the volatile substances confined inside and incubated at 26 ± 2 °C. The control arrangement contained the *Verticillium* culture only. The inhibition percentage of growth (%I) was calculated using same previously mentioned formula (“Dual culture method”).

##### *Culture filtrate*

The method adopted consists in incorporating culture filtrates of antagonistic species (*Trichoderma* spp.) into culture medium inoculated later with disks of phytopathogenic fungus in order to evaluate their effects against *Verticillium dahliae* Kleb (Jamdar et al. 2013; Islam et al. 2016; Marques et al. 2017).

The experiment of antifungal activity of filtrates was carried out with fifteen *Trichoderma* culture filtrates (T1 to T15) against eleven isolates of *V. dahliae* named (Vd1 to Vd11). Three disks taken from the culture of *Trichoderma* were cultured in Erlenmeyer flasks containing 150 ml of PDL (potato dextrose liquid) and remaining in a rotary shaker at 150 rpm with 26 ± 2 °C temperature by 24 h rotation for 7 days. The liquid part was collected by centrifugation at 9500 rpm for 10 min and then filtered through syringe filter (0.45 µm diameter). The obtained filtrates were incorporated into the PDA medium with two different concentrations (10% and 20%) (V/V). Three agar discs (6 mm diameter) were taken from the cultures of *V. dahliae* and were placed at equal distances from each other in the Petri plate. The plates were incubated at 26 ± 2 °C until the control of pathogen colonies overlaps.

Results were expressed as the inhibition percentage of growth of each isolate of *V. dahliae* tested against each *Trichoderma* isolate with respect to the mean colony diameters of each *V. dahliae* grown alone. The inhibition percentage of growth (%I) was calculated using same previously mentioned formula (“Dual culture method”).

Extraction and detection of VOCs by gas chromatography–mass spectrometer (GC–MS)

#### *Cultivation of Trichoderma*

Isolate T2 was cultured on PDA at 28 °C for 7 days; dishes with 6 mm of diameter of *Trichoderma* sp. were inoculated into 1000 ml Erlenmeyer flasks containing 250 ml of sterile potato dextrose broth (PDB). These cultures were incubated on a rotary shaker for 10 days at 120 rpm at  $28 \pm 2$  °C.

#### *Extraction procedure of VOCs*

T2 was subject to extraction of fungal metabolites according to the method described by Siddiquee et al. (2012). Two solvents were used to extract bioactive compounds from *Trichoderma* filtrates: methanol (polar solvent) and n-hexane (nonpolar solvent). The extracted VOCs were then applied to identify by GC–MS. Inoculum cultured in an Erlenmeyer flask was kept immersed in 225 mL of ethyl acetate overnight, and then filtration was used to get out cell debris and kept only secondary metabolites in ethyl acetate phase and medium (water phase). The ethyl acetate phase was separated from the water phase (medium) and it was washed twice with distilled water. The extraction of metabolites from the ethyl acetate phase was performed using 100 mL of methanol and n-hexane. The organic phases were separated using a separation funnel. Then the organic fraction was evaporated at 50 °C by rotary evaporated until 5 mL of solvent was obtained; each extract sample was stored at  $-20$  °C for further GC–MS analysis.

#### Gas chromatography-mass spectrometer analysis

Mass spectrometry (GC–MS) analysis of the hexanic and methanolic extract was carried out through GC–MS (Hewlett Packard Agilent 5973 mass spectrometer). Capillary column was impregnated with stationary phases (5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane),  $30 \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ } \mu\text{m}$  df. provided with Hewlett Packard Agilent 6890 plus detector. Ionization was performed by an electron ionization system with ionizing energy of 70 eV. Helium gas (99.99%) was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1.5 ml/min. The column temperature was maintained initially at 60 °C for 1 min, then increases up to 300 °C at the rate of 10°C/min, ending with a 5 min

hold isothermal at 300 °C, and 1.5  $\mu\text{l}$  of samples was manually injected in the split less mode. Total running time of GC–MS was 35 min. The relative percentage of each extract constituent was expressed as percentage with peak area normalization.

#### Qualitative screening of enzymes

Production of extracellular enzymes was assessed on selective solid medium. Enzymatic activity was evaluated by measuring the halo of hydrolysis zone around the disc inoculated as follows: – (no change): isolates showing no enzyme activity, + (halo zone less than 10 mm): isolates showing very low enzyme activity, ++ (halo zone of 10–30 mm): isolates showing low enzyme activity, +++ (halo zone of 40–60 mm): isolates showing high enzyme activity, ++++ (halo zone of 70 mm and above): isolates showing very high enzyme activity.

#### *Protease assay*

Protease activity was evaluated on solid medium skim milk agar (skim milk 300 ml, agar 20.00 g, and distilled water 1000 ml) (Berg et al. 2002; López et al. 2019). Six millimeters of agar disc cut from 5-day-old *Trichoderma* culture of each isolate was transferred to Petri dishes containing the selective medium. Clear zones appear around the transferred disc indicates a proteolytic activity.

#### *Chitinase activity*

Chitinase activity of the *Trichoderma* isolates was carried out on the Chitinase detection Medium (4.5 g of colloidal chitin, 0.30 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.00 g of  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 2.00 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.00 g of Citric acid monohydrate, 15.00 g of Agar, 0.15 g of Bromocresol purple and 0.20 ml of Tween-80); pH was adjusted to 4.7 (Agrawal and Kotasthane 2012; Cherukupally et al. 2017; Bedine Boat et al. 2020). The medium containing colloidal chitin as unique carbon source supplemented with Bromocresol purple as described by Murthy and Bleakley (2012), the medium was then conserved at 4 °C until further use. Culture plugs of the *Trichoderma* isolates were inoculated into the medium and incubated at  $25 \pm 2$  °C for 2–3 days. Chitinase activity was evaluated by varying color from yellow to purple in the chitin hydrolysis region. Color

intensity and diameter changing color of the Bromocresol purple around the colonies were used as the criteria to reveal the chitinase activity.

### Cellulase assay

The qualitative production of cellulases was screened according to the method described by Hankin and Anagnostakis (1975) and Cherukupally et al. (2017) on the Czapek-Mineral Salt Agar Medium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.00 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50 g, NaNO<sub>3</sub> 2.00 g, KCl 0.50 g, Peptone 2.00 g, Agar 20.00 g, and distilled water 1000 ml) supplemented with carboxy methyl cellulose (CMC) 5.00 g. Culture discs of 6 mm cut from 5-day-old actively growing *Trichoderma* colony culture of each isolate was inoculated in the center of the medium and incubated at 26 ± 2 °C for 3 to 5 days. The plates were flooded with aqueous Congo red (2% w/v) solution for 15 min. Then, the agar surfaces were washed with distilled water, at the end plates were inundated with NaCl (1 M) for 90 s. Formation of yellow-opaque area around the colonies indicates the production of cellulases.

### Determination of protease activity

Proteolytic activity was determined using broth medium containing 1% of casein as substrate, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9 g/l, KCl 0.2 g/l, glucose 0.2 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 g/l, MnSO<sub>4</sub> 0.002 g/l, ZnSO<sub>4</sub> 0.002 g/l, and NaNO<sub>3</sub> 1 g/l for 5 days at 28 °C. After incubation for 5 days at 28 °C, the broth medium was centrifuged in 9500 rpm for 15 min. Five hundred microliters of each supernatant was added to 1.25 ml of 1% casein dissolved in phosphate buffer (pH 10). Then, it was incubated at 40 °C for 30 min. the reaction was stopped by adding 3 ml of 0.19 M Trichloroacetic acid solution to the mixture incubated furthermore at 40 °C for 15 min. The complex was centrifuged again at 9500 rpm for 10 min and 500 µl of each supernatant was added to 2.5 ml of 0.4 M NaCO<sub>3</sub> and 250 µl of Folin and Ciocalteu's reagent. The free amino acids and short peptides were determined colorimetrically at 660 nm by the Folin and Ciocalteu's phenol reagent. One unit of enzyme activity is defined as the amount of 1 mL of enzyme solution required to produce 1 µmol of tyrosine in one min.

### Chitinase hydrolytic activity assay

Isolates of *Trichoderma* showed larger zone of chitin hydrolysis on solid medium were selected to evaluate their Chitinase hydrolytic activity. Method of Miller (1959) was adopted, which consists in measuring the amount of *N*-acetylglucosamine released (GlcNAc) from the substrate colloidal (El-Sobky et al. 2019). Two discs (6 mm diameter) from 5-day-old *Trichoderma* cultures were inoculated into 50 ml of synthetic medium (SM) (0.1% bactopectone; 0.03% urea; 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.14% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.03% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.03% CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 1 ml of 0.01% trace elements solution (Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup>), 0.02% glucose and colloidal chitin 1%). After incubation, broth was centrifuged at 8000 × g for 5 min, and then 1 ml of 1% colloidal chitin dissolved in 0.05 M sodium acetate buffer (50 mM, pH 5,0) was added to 1 ml of supernatant (enzyme solution) and incubated in a water bath with constant agitation at 37 °C for 1 h. After centrifugation at 5000 rpm for 15 min, 1 ml of supernatant was taken and added to 3 ml of reagent DNS, followed by boiling of the mixture for 5 min. The absorbance was measured with spectrophotometer at 585 nm. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 µmol of GlcNAc per min under the conditions of the study.

### Statistical analysis

All data of antagonistic activity assay were subjected to analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test and significant means were segregated by Fisher's protected least significant difference (LSD) using the IBM SPSS Statistics version 25.0. *P*-value of <0.05 was considered to be statistically significant. Moreover, significant differences (*p* ≤ 0.05) between the means of direct and indirect confrontation assay were determined by paired *t* test.

## Results

### Macroscopic and microscopic identification of *Trichoderma* isolates

Results of macroscopic and microscopic examination revealed that the fifteen *Trichoderma* isolates could be subdivided into four phenotypic groups,

namely *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. koninji*, *T. longibrachiatum*. Species were collected from different areas as follows: *T. harzianum* was the predominant species represented by seven isolates obtained from area Boumerdes (Beni Amrane and Corso); Tipaza (Gouraya) and Bejaia (Sidi Aich). However, *T. aureoviride* was represented by three isolates collected from Bouira (Lakhdaraia) and Boumerdes (Corso). *T. koninji* represented by three isolates again collected from Boumerdes (Keddara). Whereas *T. longibrachiatum* species was represented only by two isolates collected from Boumerdes (Beni Amrane and Ben merzouga). Isolates identified as *T. harzianum* colony showed dark green producing tufts, and no concentric rings were observed. Their conidial productions were restricted to the center of the colonies, diffused, and appeared to be yellowish-green color. Conidiophores character frequent branching and verticillate. Phialides were ampulliform and convergent. Conidia subglobose to obovoid shape. Formation of chlamydospore was in terminally and intercalary position. Other isolates were identified as *T. aureoviride* based on the following characters: colony showed compute dull green tufts or pustules. Conidiophores character frequently branching and pyramidal structure, phialides was lageniform shape and divergent, and conidia shape was obovoid. Chlamydospore is frequently produced in terminally and intercalary position. However, isolates identified as *T. koningii* showed dull green to bluish-green colony, conidiophores broad or narrow, verticillate branching frequently, phialides showed lageniform or ampulliform, shape divergent, and terminal phialid more elongated. Conidia shape was subcylindrical to narrow ellipsoid. Chlamydospore is frequently produced in intercalary and terminally position. Moreover, other isolates identified as *T. longibrachiatum* species revealed the presence of colonies exhibiting rapid growth; chlamydospores were observed, conidiophores are sparingly branched, primary branches are long, secondary branches are usually short and rarely rebranched, phialides are mostly solitary ampulliform to lageniform or cylindrical, and conidia are one-celled, green, and ellipsoidal to obovoid. The macroscopic and microscopic appearance of some isolates is illustrated (Fig. 1).

Molecular characterization of *Verticillium dahliae* strains by PCR assay.

Molecular characterization of the 11 strains of *V. dahliae* revealed that these strains could be divided into two main groups: defoliating and non-defoliating pathotype. Result of PCR shows that 6 strains belonged to pathotype D (Vd1, Vd2, Vd3, Vd4, Vd5, and Vd11) and 5 strains belonged to pathotype ND (Vd6 to Vd10) (Fig. 2). The 11 fungal strains were identified as *V. dahliae* species due to their particularity of recombining and amplifying with specific primers characteristic for each pathotype.

Results of antagonistic activity

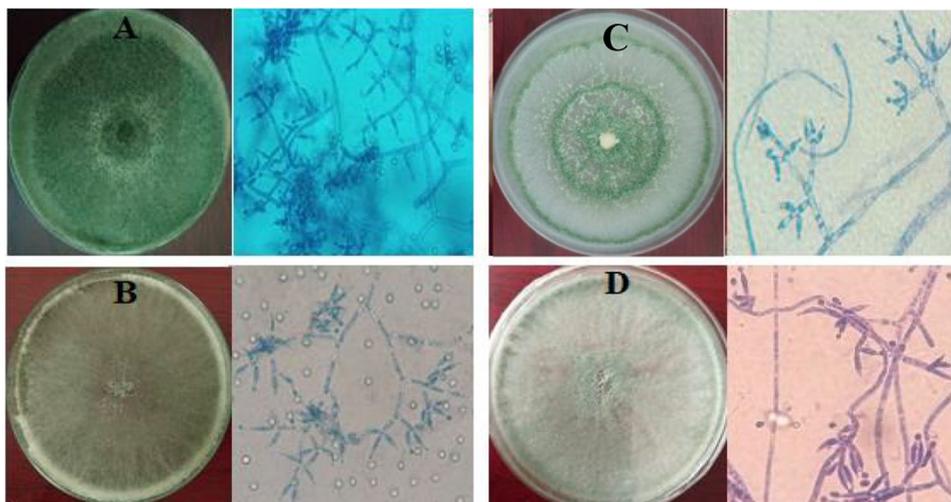
#### *Mycelial growth inhibition by direct confrontation assay*

*Trichoderma* isolates were investigated in vitro by different mechanisms responsible for biocontrol, to select those having promising antagonistic activities against *V. dahliae*. Statistical analysis showed a significant effect of *Trichoderma* isolates on reducing mycelial growth of *V. dahliae* by direct confrontation assay. Average percentage of inhibition varied between 50.93% and 68.86%, after 7 days of incubation. Importantly, T12 was the most effective isolate showing an average percentage of inhibition with 68.86% against *V. dahliae* isolates (Fig. 3A, Table 1). The LSD test showed a significant difference in the inhibition of mycelial growth of T12 isolate compared to other isolates tested.

The destructive effect on pathogen *V. dahliae* was carried out by microscopic observation in the zone of confrontation, hyphae of *Trichoderma* were observed coiled around mycelium of *V. dahliae*, when the pathogens were encircled, and the vacuolization started followed by cell disintegration due to the liberation of multiple lytic enzymes involved in parasitic interaction.

#### *Inhibitory activity of volatile metabolites against V. dahliae*

The results of volatile metabolites activity against *V. dahliae* showed a high inhibitory activity. The inhibition rate ranged from 55.26 to 65.93%. *V. dahliae* growth was significantly limited by the volatile compounds produced by *Trichoderma* spp. when compared to control cultures. Interestingly, an average percentage of inhibition superior than 60% was recorded for six tested isolates, while T14 showed the highest inhibitory efficacy with (65.93%). Moreover,

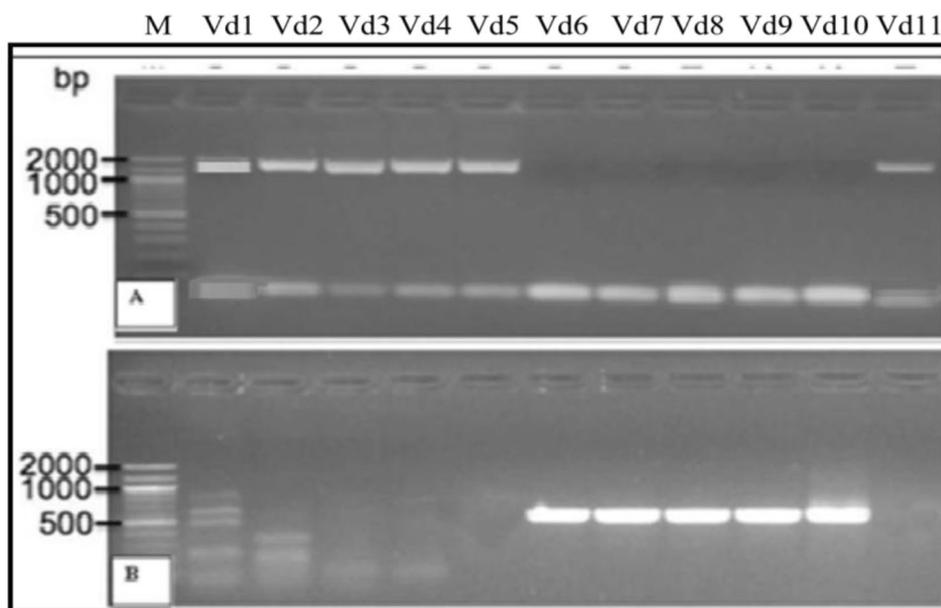


**Fig. 1** Macroscopic and microscopic appearance of colonies representing phenotypic groups of *Trichoderma* after 7 days of incubation **A** *T. harzianum*, **B** *T. aureoviride*, **C** *T. koninji*, **D** *T. longibrachiatum*

isolate T9 was also recorded among isolates exhibiting high average percentage of inhibition with 61.38% (Fig. 3B).

*Effect of Trichoderma spp culture filtrate on mycelial growth of V. dahliae*

*Trichoderma* filtrate tested had a potential to inhibit



**Fig. 2** Agarose gel of PCR amplicons generated with 2 pairs of primers specific for defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae*. **A** Amplicons generated with the non-defoliant pathotype-specific primers NDF and NDR. **B** amplicons generated with the defoliating specific primers df and dr. **M** 2000 bp

DNA used as size marker. Strains Vd1, Vd2, Vd3, Vd4, Vd5, and Vd11 isolated from olive tree showing the symptoms of defoliation. Strains Vd6, Vd7, Vd8, Vd9, and Vd10 isolated from the olive tree presenting the symptoms of non-defoliation

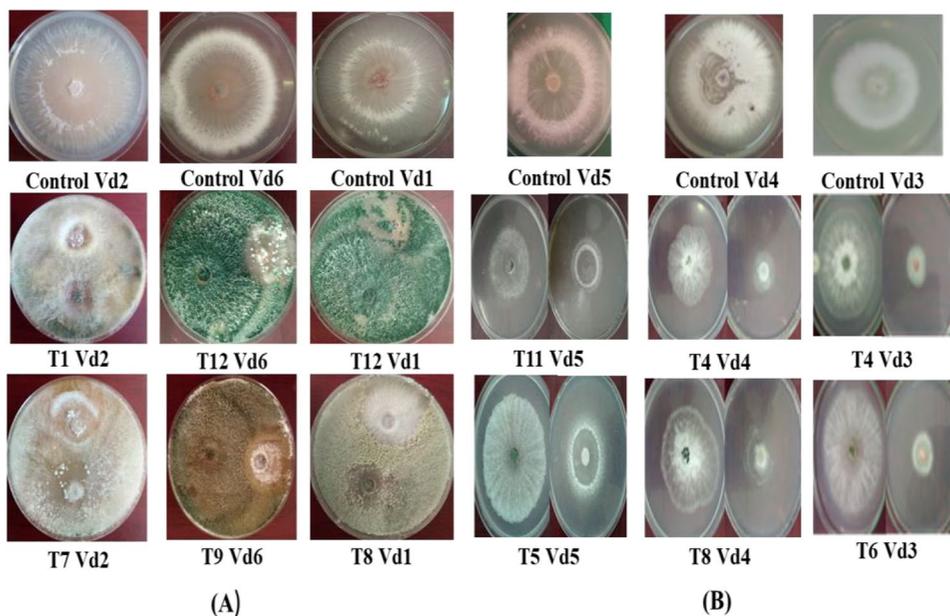
growth of pathogens. These isolates limited radial and aerial growth, the result indicates that the percentage of inhibition depending on the concentration of filtrate of *Trichoderma* used. We noted with interest that mycelium growth of the pathogen *V. dahliae* was more inhibited at the concentration of 20% than the concentration of 10%. For the majority of filtrates tested, the analysis of variance showed a significant difference in the inhibition of mycelial growth obtained at the concentration 10% and 20%. The percentage of inhibition was varying from 0% to 62.50% and from 0 to 75% at the tested concentrations 10% and 20% respectively. Among the filtrate tested, T7 was the most effective against the pathogen *V. dahliae*, compared to other isolates, this performing isolate exerted the highest antifungal activity on the most strain of *V. dahliae* with an inhibition percentage of 75% against Vd2 at the concentration of 20%. Meanwhile, a lower inhibition was noticed for filtrate T7 with 9.75% and 26.82% at the concentrations 10% and 20% against isolate Vd8. Besides, some strains were sensitive and significantly more affected by the tested filtrates, such as Vd2 which was more than 50% inhibited by 6 tested filtrates among 15 filtrates at the concentrations of 20% (Fig. 4).

### Identification of VOCs by GC/MS Analysis

A total of 33 VOCs were detected through GC–MS in the hexanic and methanolic extracts of T2, the chromatogram of the hexanic extract revealed the presence of several peaks whose the most intense are alkanes such as Undecane, Octadecane, Eicosane, Z-14-Nonacosane, Tetratriacontane, 1-Bromo-11-iodoundecane, amides such as 13-Docosenamide, (Z), Hexadecanamide, and 9-Octadecenamide (Z) (Fig. 5). Whereas the methanolic extract contains mainly ketone compounds such as Cyclopentanone, 2-methyl, esters of fatty acids such as (Tetradecanoic acid, propyl ester, and 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester), fatty acids such as Tetradecanoic acid, oleic acid, n-Hexadecanoic acid (palmitic acid), and amides are also present like 9-Octadecenamide, (Z), cis-11-Eicosenamide, and 13-Docosenamide, (Z) (Fig. 6).

### Results of qualitative screening of *Trichoderma* spp. for extracellular enzymes

The majority of isolates tested were able to produce chitinases, proteases, and cellulases at different



**Fig. 3** **A** Effect of *Trichoderma* isolates on the mycelial growth of *V. dahliae* by dual culture technique after seven days of incubation. T: *Trichoderma*; Vd: *Verticillium dahliae*. **B**

Influence of volatile metabolites emitted by *Trichoderma* isolates on the mycelial growth of *V. dahliae*

**Table 1** Assessment of antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against *V. dahliae* and comparison between the means of direct and indirect confrontation assay by paired t test

Isolates of <i>Trichoderma</i>	Average percentage inhibition (%)			
	Dual culture assay	Indirect confrontation	Sig	Significance
T1	52.99 ± 0.33	55.61 ± 1.77	0.213	n.s
T2	54.63 ± 1.39	56.83 ± 0.55	0.294	n.s
T3	56.03 ± 0.81	59.37 ± 2.019	0.049	*
T4	53.04 ± 1.12	62.12 ± 0.86	0.001	*
T5	54.19 ± 0.81	59.42 ± 0.12	0.048	*
T6	55.24 ± 0.45	58.33 ± 0.48	0.240	n.s
T7	52.66 ± 0.62	58.35 ± 0.23	0.009	*
T8	51.51 ± 0.59	63.12 ± 0.61	0.000	**
T9	59.96 ± 0.45	61.38 ± 1.03	0.565	n.s
T10	54.92 ± 1.07	62.34 ± 0.57	0.012	*
T11	50.93 ± 0.40	57.62 ± 0.31	0.000	**
T12	68.86 ± 1.39	59.88 ± 0.67	0.024	*
T13	59.10 ± 0.51	62.25 ± 0.94	0.236	n.s
T14	51.78 ± 1.03	65.93 ± 0.74	0.000	**
T15	58.00 ± 0.80	55.26 ± 0.52	0.252	n.s

Notes: Values are average of 3 replicates followed by standard deviation ±, \*\*Highly significant ( $P=0.000$ ), \*Significant ( $p<0.05$ ), n.s. not significant ( $p\geq 0.05$ )

degrees. The enzymatic activities of different isolates were estimated according to the diameter of the clearing zone discolored around colonies or/ and color intensity. Among 15 isolates tested, two isolates T12 and T8 were found with very high cellulase activity with a diameter of 80 mm and 74 mm respectively around the colonies after only 3 days of incubation followed by isolates T2, T6, and T1. On the other hand, isolates T9, T11, and T1 were efficient in protein hydrolysis; these isolates showed very high protease activity on skim milk agar, whereas, T5, T8, and T12 showed very high chitinase activity with a clear zone diameter estimated at 85, 85, and 80 mm respectively (Table 2, Fig. 7).

#### Determination of protease activity

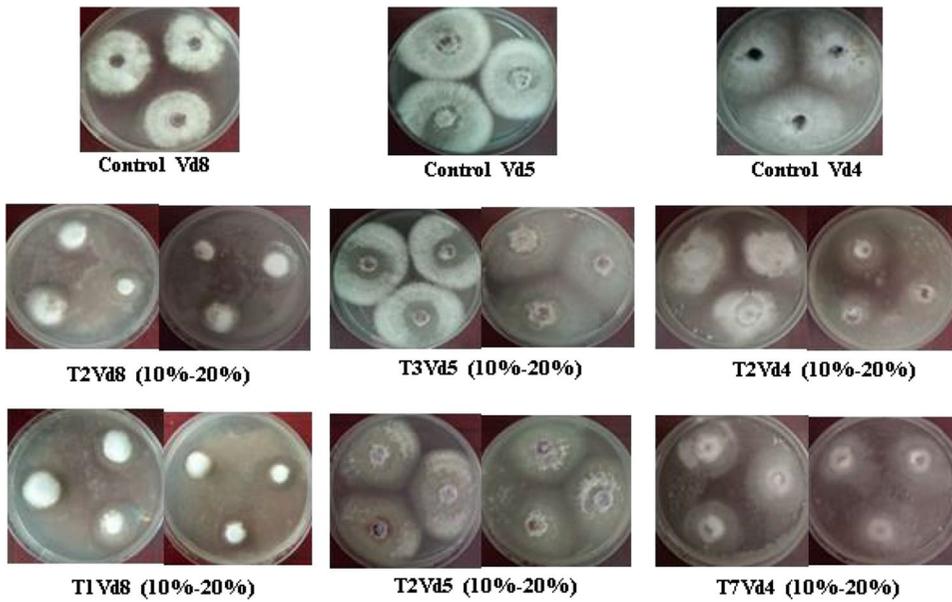
Results of enzyme assay showed that the proteolytic activity of four isolates tested (T4, T6, T10, and T12) varied from 0.015 to 0.019  $\mu\text{mol/ml/min}$  at pH10; the highest level of proteolytic activity was marked for T6 with a value of 0.019  $\mu\text{mol/ml/min}$  followed by T10 and T4 with 0.017  $\mu\text{mol/ml/min}$  and 0.016  $\mu\text{mol/ml/min}$ , respectively. In contrast, a low enzyme activity was observed by T12 with a value 0.015  $\mu\text{mol/ml/min}$ .

#### Determination of chitinase activity

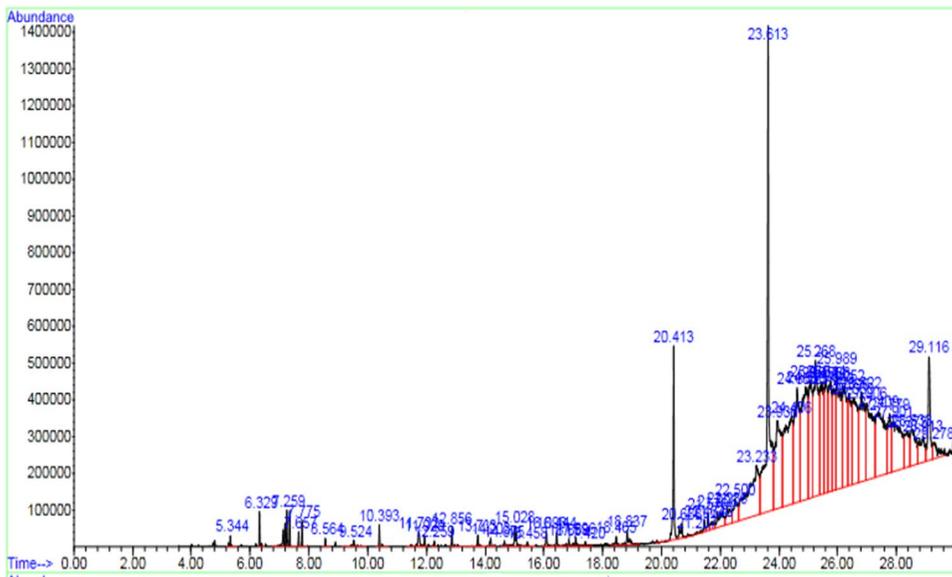
In the present study, the production of chitinases was carried out by using colloidal chitin as a substrate. Highest enzyme activities were exhibited by isolates T2 and T10 with chitinolytic enzyme activity (0.043  $\mu\text{M/ml/min}$ ) and (0.034  $\mu\text{mol/ml/min}$ ) respectively, after 5 days of incubation, while the minimum value of chitinolytic activity (0.005  $\mu\text{mol/ml/min}$ ) was recorded by T12.

#### Discussion

This study was a contribution for antagonistic activity of some autochthon *Trichoderma* species isolated from rhizosphere of olive. Isolates of *Trichoderma* were identified based on morphological characters. Microscopic identification was focus on conidiophores branching, the shape and color of conidia, phialide and conidiophores shape, and formation of chlamydo-spore. Phenotypic results were compared to a taxonomic key of the genus *Trichoderma* as described by Rifai (1969); Bissett (1984; 1991a, b); Gams and Bissett (1998); and Chaverri et al. (2003). However, characters observed revealed several morphological differences between *Trichoderma* isolates. Based on macroscopic



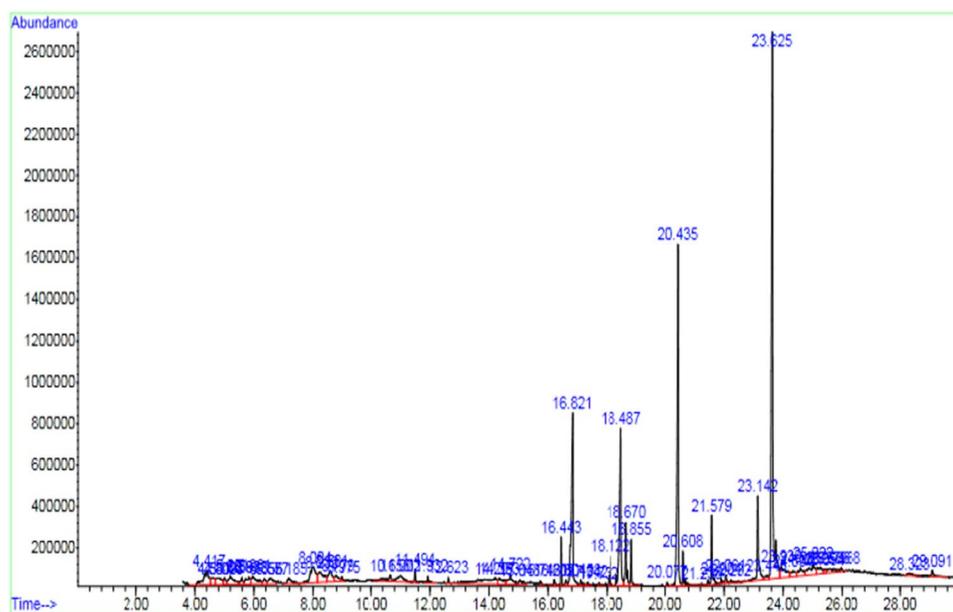
**Fig. 4** Effect of filtrates from cultures of *Trichoderma* isolates on mycelial growth of *V. dahliae* after 4 days of incubation



**Fig. 5** Chromatogram of volatile compounds produced by *strain* T2 in Hexanic extract obtained through Gas chromatography-mass spectrometry

and microscopic characteristics, *Trichoderma* isolates were divided into four groups namely *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. koninji*, and *T. longibrachiatum*. The description of species was in agreement and in

conformity with the findings of Bisset (1991a, b), Samuels (1996), Gams and Bissett (1998) and (2002), Samuels et al. (2002), Choi et al. (2003), and Shah et al. (2012) who recorded the similar observations.



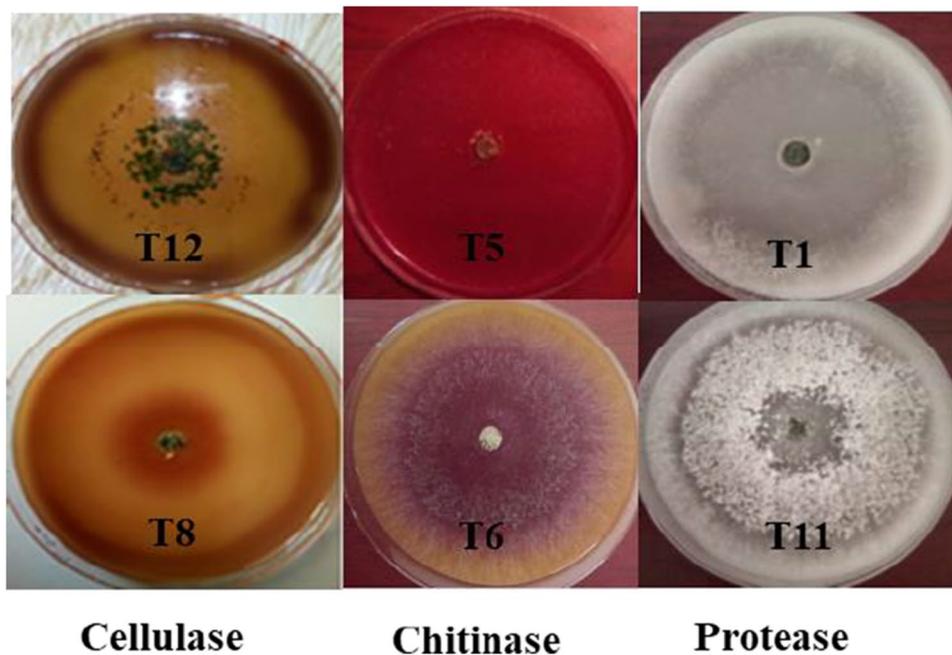
**Fig. 6** Chromatogram of volatile compounds produced by T2 in Methanolic extract obtained through Gas chromatography–mass spectrometry

**Table 2** Qualitative screening of *Trichoderma* spp. for active biomolecules

<i>Trichoderma</i> isolates	Activity of hydrolytic enzymes		
	Chitinase	Protease	Cellulase
T1	+++	++++	+++
T2	++++	++	+++
T3	+++	+++	++
T4	++	++	+++
T5	++++	+++	+++
T6	++++	++	+++
T7	+++	+++	++++
T8	++++	++	++++
T9	++++	++++	++++
T10	++++	+++	+++
T11	++	++++	++++
T12	++++	+++	++++
T13	++++	+++	+++
T14	++++	++++	+++
T15	++	+++	+++

– Isolates showing no enzyme activity, + Isolates showing very low enzyme activity, ++ Isolates showing low enzyme activity, +++ Isolates showing high enzyme activity, ++++ isolate showing very high enzyme activity

The results of dual culture revealed that all the isolates of *Trichoderma* inhibited mycelial growth of the pathogen *V. dahliae* in different levels. Among them, T12 showed the highest inhibition of the radial growth within 7 days of post-inoculation, while the other isolates were less antagonistic as its shows only average inhibitory. The inhibition shown by the antagonists may be due to the competition for limiting nutrients results in biological control of fungal phytopathogens (Chet et al. 1997). Various investigators reported antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against several soil-borne pathogens under in vitro conditions. In this regard, Lee et al. (2001) assessed the inhibitory effect by *T. harzianum* and *Pseudomonas putida* against basal rot pathogen. Moreover, El-Mougy and Abdel-Kader (2018) reported antagonistic activity of *T. viride* and *T. harzianum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*; for this study, *T. viride* and *T. harzianum* exhibited percentage inhibition with 95.5% and 92.6% when its confronted against *Fusarium oxysporum*. Moreover, Debbi et al. (2018) reported that four *Trichoderma* isolates collected in Western Algeria displayed biocontrol activity by direct confrontation against two isolates of *Fo* f. sp. *Lycopersici* (FOL), and *Fo* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL) indicating inhibition percentage ranging from 62.8



**Fig. 7** *Trichoderma* isolates with high production of extracellular enzymes on selective solid medium

to 70.6%. Furthermore, some isolates of *Trichoderma* invade and sporulate on *V. dahliae* colonies after 7 days of incubation, showing their highest mycoparasitic capacity towards *V. dahliae* pathogen. Similar phenomenon was observed by Benhamou and Chet (1996) during confrontation between *T. harzianum* and soil-borne fungus, *Pythium ultimum*. In addition, mycelium lysis was observed in the confrontation zone between the pathogen *V. dahliae* and *Trichoderma* species suggesting the ability of these isolates to produce enzymes involved on cell wall degradation process and lysis of the mycelium during the mycoparasitic activity. Our result was supported by Amira et al. (2018) who observed Mycoparasitic reaction of *T. harzianum* Ths97 against *F. solani* Fso14. Moreover, the development of helicoidal hyphae by some *Trichoderma* species around *Verticillium dahliae* hyphae was observed. These coiled cell structures are commonly seen in various mycopathosystems (Moraga-Suazo et al. 2011; Amira et al. 2017).

The screening in vitro of production of extracellular enzymes revealed that *Trichoderma* isolates had the ability in hydrolyzing protein, cellulose, and chitin. Therefore, the mycoparasitic effect was demonstrated. Our results are in agreement with the work of Anita et al. (2012) who reported various extracellular

enzymatic activities such as cellulolytic, chitinolytic, and proteolytic in substantial quantity from *T. atroviride*. Moreover, Harman et al. (2004) suggested that *Trichoderma* isolates are able to produce cell wall degrading enzymes such as cellulase, xylanase, pectinase, glucanase, lipase, amylase, arabinase, protease, and chitinases that are the most important lytic enzymes playing a key role in the degradation of cell walls of other plant pathogenic fungi (Harman et al. 2004). It has been reported that diffusible compounds or antibiotics produced by *Trichoderma* strains inhibit the growth of other microorganisms. Most *Trichoderma* strains produce volatile and non-volatile toxic metabolites that prevent colonization by antagonized microorganisms; among these metabolites, the production of harzianic acid, alamethicins, tricholin, peptaibols, antibiotics, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, massoiltactone, viridin, gliovirin, glisoprenins, heptelidic acid, and others have been described (Vey et al. 2001).

Our study demonstrated that the volatile metabolites produced by *Trichoderma* isolates exerted inhibitory effects on pathogen *V. dahliae*. The indirect confrontation assay revealed that *Trichoderma* isolates reduce pathogen growth in different levels. The isolate T8 and T9 were among effective isolates showing higher inhibitory effect against *V. dahliae*.

Moreover, isolate T2 was able to produce VOCs which may affect the mycelial growth of *V. dahliae*, suggesting that VOCs emitted by T2 have antifungal effects against olive wilt pathogen, *V. dahliae*, or cause abnormal changes of pathogen as reported by Elsherbiny et al. (2020) and Intana et al. (2021).

Our results support the previous studies carried out by Carrero-Carrón et al. (2016) on biocontrol of Verticillium wilt in olive which indicated that three isolates of *Trichoderma asperellum* demonstrated effective potential and reduced variably the mycelial growth of five isolates of *V. dahliae* ranging from 21 to 95% after ten days. Ruangwong et al. (2021) also reported that the VOCs of *T. asperelloides* TSU1 inhibited the mycelial growth of fungal pathogens, namely, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium incarnatum*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *N. cubana*, and *Sclerotium rolfii*, with a percentage inhibition range of 38.88–68.33%. Identification of volatile substances through GC–MS revealed the ability of *T. asperelloides* to produce antifungal volatile substances; 17 VOCs were detected; among them, fluoro(trinitro) methane, 2-phenylethanol and 2-phenylethanol showed antifungal activity against fungal pathogens. In similar studies, species of *Trichoderma* have been demonstrated to act against different plants fungal diseases by producing diffusible volatile metabolites which suppressed the hyphal growth of fungal pathogens (Hernandez Castillo et al. 2011; Kamala and Indira 2012).

Most of volatile compounds produced by T2 exerted antifungal activity against plant pathogens. It has been reported that Siddiquee et al. (2012) identified more than 278 volatile compounds from liquid cultures of *T. harzianum* using GC–MS; these compounds are part of different chemical groups such as normal saturated hydrocarbons (C7–C30), cyclohexane, cyclopentane, fatty acids, alcohols, esters, sulfur-containing compounds, simple pyrane, and benzene derivatives. Similar compounds were detected in chromatograms of our extracts, suggesting that isolated T2 has the ability to restrict pathogen growth by production of VOCs. Eicosane was also produced by isolate T2, this compound has antifungal activity as reported Karanja et al. (2012) and Nandhini (2015). On the other hand, several volatile compounds with antifungal activities were detected in hexanic and methanolic extracts such as benzenethanol, toluene, alcohols, phenols, cyclohexane,

palmitic acid, Octadecenoic acid, Palmitic acid, and limonene. Many works revealed the antifungal effect of these compounds such as the finding of Pohl et al. (2011) who reported that Fatty acids (e.g., Palmitic acid and Octadecenoic acid) are known to possess antibacterial and antifungal activities. Furthermore, Dubey et al. (2011) report the production of palmitic acid by *T. virens* and *T. harzianum*. In addition, compounds such as methoxyacetic acid and benzene were also detected; these compounds have been demonstrated to exhibit antimicrobial activities (Sohrabi et al. 2014). Benzene derivatives were produced by isolate T2. Raza et al. (2015) reported that the majority of benzenes, alcohols, and phenols have antifungal activity. Moreover, in a previous study, Burke and Nair (1989) reported the antimicrobial activity of benzene metabolites and showed that substituted olefinic (allyl) benzene compounds exhibited important antimicrobial (antibacterial and antifungal) activity against a variety of bacteria and fungi. Khethr et al. (2008) reported that the terpenoid and limonene were the main components in species *Trichoderma*, which were observed as effective biological control agents. In similar studies, Vinale et al. (2014) demonstrated that Pyrones, koniginins (complex pyrans), and nitrogen heterocyclic compounds, as well as butenolides, hydroxy-lactones, diketopiperazines, and peptaibols have been identified as fungal metabolites of the fungi of genus *Trichoderma*. Moreover, alkanes with antifungal activity were also detected such as cyclohexane and cyclopentane; studies of Siddiquee et al. (2012) support our results. They separated and identified more than 278 volatile compounds from liquid cultures of *T.harzianum* by GC/MS, among them: cyclohexane, cyclopentane, fatty acids, alcohols, esters, sulfur-containing compounds, and simple pyranes and benzene derivatives. Besides that, other alkanes were identified such as dodecane which has a role as antifungal agent (Hsouna et al. 2011). Undecane is an alkane compound which has antimicrobial agents (Gibka and Styczynska 2009) and tetratetracotane which has antioxidant property (Kumar et al. 2010; Ertas et al. 2014). Furthermore, amides such as 13-Docosenamide, (Z)- were detected; this compound has been reported as antimicrobial activity (Sharmila et al. 2017).

Our study was in agreement with a previous findings conducted by Cherukupally et al. (2017) and Meena et al. (2017) who reported that volatile and

non-volatile compounds produced by *T. harzianum* and *T. viride* have biocontrol activity against *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. Moreover, Moya et al. (2018) reported that *Trichoderma* VOCs would weaken the cell walls of phytopathogens, which could then be further affected by hydrolytic enzymes. The volatile and non-volatile metabolites produced by *T. harzianum* have been shown to be responsible for the inhibitory activity against root pathogens (El-Katatny et al. 2006; Ratnakumari et al. 2011).

The mixture of secondary compounds tested shows antibiotic effect and antagonistic potential against all isolates of *V. dahliae* compared with the control treatment, the greater inhibition was observed with the use of the culture filtrates T7 exhibited the greater inhibition level at the concentration 20%, the present study suggests that production of secondary compounds with antibiotic properties were effective against *V. dahliae* pathogens; however, antibiosis is one among the main mechanism of action involved in biocontrol. These results indicate that *Trichoderma* species can effectively suppress *Verticillium* wilt pathogens. Our results were compared with those obtained previously, according to a study carried out by Marques et al. (2017) which indicated maximum inhibition rates against *V. dahliae*, using culture filtrates from *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum*, and the greatest capacity for inhibition of *V. dahliae* was recorded to the species *T. brevicompactum* (CEN1245); moreover, Jamdar et al. (2013) and Isaias et al. (2014) observed a greater inhibitory effect against this pathogen, using filtrates from *T. harzianum*, *T. koningii*, and *T. koningiopsis*. Thrane et al. (2000) studied also two antagonistic *Trichoderma* spp. that produced different kinds of lytic enzymes in liquid culture medium. The effects of filtrate concentrations of *T. harzianum* revealed that the aqueous extracts of *T. harzianum* reduced the mycelia growth of *V. dahliae*. The results of the present study indicated that metabolites produced by *Trichoderma* isolates were toxic and fungistatic against *V. dahliae*. Our results are in agreement with those of Anita et al. (2012) who observed a rapid decrease in the growth of the pathogen with a linear increase in concentrations of the metabolites.

On the other hand, several studies report chitinolytic activity exhibited by *Trichoderma* spp. Our result was supported by Shahzad et al. (2019) who reported, among nine strains of *Trichoderma* tested, *T. longibrachiatum* TMK21 showed the highest enzyme activity (0.017  $\mu\text{mol/ml/min}$ ) while *Trichoderma virens* TMK8 showed the least enzyme activity (0.0014  $\mu\text{mol/ml/min}$ ). However, our results showed low proteolytic activity compared with isolates of *Trichoderma* tested by You et al. (2016) who reported proteolytic activity ranged between 0.02 and 0.20 U/mL.

In the present study, results indicated that the *Trichoderma* strains tested can act through various mechanisms, including antibiosis, mycoparasitism, and production of volatile compounds, suggesting that effective inhibitory effect can be shown when different modes of action were associated. In addition, synergism has been reported in *Trichoderma*, hydrolytic enzymes, and antibiotics such as peptaibols may act synergistically and lead to increase up activities of metabolites produced against phytopathogenic fungi (Schirmböck et al. 1994; Kubicek et al. 2001).

## Conclusion

In conclusion, the present study clearly demonstrates that *Trichoderma* isolates obtained in ecosystem niche of olive shown high ability in vitro to reduce mycelia growth of the pathogen *Verticillium dahliae* by different modes of action including mycoparasitism, antibiosis, and production of antifungal volatile compounds; furthermore, the screening of lytic enzymes revealed their potential for excretion of extracellular lytic enzymes such as chitinases, proteases, and cellulases; therefore, it could be used for integrated disease management for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive. Moreover, the effectiveness of these promising candidates would be proved in agricultural field to protect olive against diseases caused by *Verticillium dahliae*, as well as their impact as biocontrol agent would be revealed.

## Declarations

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Aarti T, Meenu S (2015) Role of volatile metabolites from *Trichoderma citrinoviride* in biocontrol of phytopathogens. *Int J Res Chem Environ* 5:86–95
- Agrawal T, Kotasthane AS (2012) Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus* 1(1):73
- Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO (2007) Solubilization on insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci* 2(4):301–307. <https://doi.org/10.3923/jss.2007.301.307>
- Amira MB, Lopez D, Mohamed AT, Khouaja A, Chaar H, Fumana B, Ribeiro S (2017) Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biol Control* 110:70–78
- Anees MR, Azim S, Ur Rehman M, Jamil S, El Hendawy NA, Al Suhaiban NA (2018) Antifungal potential of *Trichoderma* strains originated from North Western regions of Pakistan against the plant pathogens. *Pak J Bot* 50(5):2031–2040
- Anita S, Ponnurugan P, Ganesh Babu R (2012) Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of phomopsis canker disease. *Afr J Biotech* 11(45):10350–10357. <https://doi.org/10.5897/ajb12.599>
- Anke H, Kinn J, Bergquist KE, Sterner O (1991) Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biol Met* 4(3):176–180
- Bach E, Seger GD, dos S, Fernandes G, de C, Lisboa BB, Passaglia LMP (2016) Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Appl Soil Ecol* 99:141–149
- Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem* 19:451–457
- Bedine Boat MA, Sameza ML, Iacomi B, Tchameni SN, Boyom FF (2020) Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-off pathogens. *Biocontrol Science and Technology* 30(3):228–242
- Benhamou N, Chet I (1996) Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86:405–416
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J (2002) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51(2):215–229
- Bissett J (1984) A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J Bot* 62(5):924–931
- Bissett J (1991a) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69(11):2357–2372
- Bissett J (1991b) A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian journal of botany*, 69(11), 2373–2417.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE (1991) Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl Environ Microbiol* 57:535–538
- Burke BA, Nair MG (1989) Antimicrobial/antifungal compositions. United States Utility Patent, US4876277
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553–556
- Carrero-Carrón I, Trapero-Casas JL, Olivares-García C, Monte E, Hermosa R, Jiménez-Díaz RM (2016) *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium wilt* in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Prot* 88:45–52
- Chaverri P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ (2003) *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* 95:1100–1140
- Cherukupally R, Amballa H, Reddy BN (2017) In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. *Ann Plant Sci* 6:1784–1789
- Chet I, Inbar J, Hadar I (1997) Fungal antagonists and mycoparasites. The mycota IV: environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin, 165–184
- Choi IY, Hong SB, Yadav MC (2003) Molecular and morphological characterization of green mold, *Trichoderma* spp isolated from oyster mushrooms. *Mycobiology* 31(2):74–80
- Coley-Smith JR, Ridout CJ, Mitchell CM, Lynch JM (1991) Control of button rot of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. Harzianum* or toclofos-methyl. *Plant Path* 40(3):359–366
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Valverde-Corredor A, Jiménez-Díaz RM (2006) Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96(5):485–495
- Debbi A, Boureghda H, Monte E, Hermosa R (2018) Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *front. Microbiol* 9:282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282>
- de Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Thomma BP (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 109(13):5110–5115
- De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernandez-Castillo D, Aguilar CN (2018) Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science* 4(2):237–243
- Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans Br Mycol Soc* 57:41–48. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80078-5)

- Díaz RJ, Casas JT, Boned J, Landa BB, Cortés JN (2009) Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. Boletín De Sanidad Vegetal Plagas 35(4):595–615
- Dubey SC, Tripathi A, Dureja P, Grover A (2011) Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. Indian J Agric Res 81(5):455–461
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems- an introduction. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds) *Botrytis, Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp 1–8
- El-Katatny M, Abdelzaher H, Shoulkamy M (2006) Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). Arch Phytopathol Plant Prot 39(4):289–301. <https://doi.org/10.1080/03235400500222396>
- El-Mougy NS, Abdel-Kader MM (2018) Biocontrol measures against onion basal rot incidence under natural field conditions. J Plant Pathol. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00237-8>
- Elshehbiny EA, Amin BH, Aleem B, Kingsley KL, Bennett JW (2020) *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest Potato tubers. J Agric Food Chem 68(31):8163–8171
- El-Sobky MA, Fahmi AI, Eissa RA, El-Zanaty AM (2019) Genetic characterization of *Trichoderma* spp. isolated from different locations of Menoufia Egypt and assessment of their Antagonistic Ability. *J Microb Biochem Technol*, 11(1).
- Ertas A, Yilmaz MA, Firat M (2014) Chemical profile by LC-MS/MS, GC/MS and antioxidant activities of the essential oils and crude extracts of two *Euphorbia* species. Nat Prod Res 3:1–6
- Fradin EF, Thomma B (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. alboatrum*. Mol Plant Pathol 7(2):71–86. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x>
- Gams W, Bissett J (1998) Morphology and identification of trichoderma In: Kubicek CP and Harman GE, Eds., *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. London: Taylor & Francis Led, 1, 3–34.
- Gams W, Bissett J (2002) Morphology and identification of *Trichoderma* and *Gliocladium*, 3–31.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2(2):113–118
- Gharbi Y, Triki MA, Trabelsi R, Fendri I, Daayf F, Gdoura R (2015) Genetic structure of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive tree in Tunisia using AFLP, Pathogenicity and PCR markers. Plant Pathol 64:871–879
- Ghosh SK, Banerjee S, Sengupta C (2017) Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic fungi. J Biopest 10(2):105–112
- Gibka AJ, Styczynska K (2009) Gliniski M (2009) Antimicrobial activity of undecan-3-one, undecan-3-ol and undec-3-yl acetate. Centr Eur J Immunol 34:154–157
- Gupta RR, Singal R, Shanker A, Kuhad RC, Saxena RK (1994) A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. J Gen Appl Microbiol 40:255–260
- Hajiegharai B, Torabi-giglou M, Mohammadi MR, Davari M (2008) Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil born plant pathogenic fungi. Afr J Biotech 7(8):967–972
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:597–607
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2:43–56
- Hemerly A (2016) Genetic controls of biomass increase in sugarcane by association with beneficial nitrogen-fixing bacteria. Plant and Animal Genome Conference XXIV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158:17–25
- Hernandez Castillo FD, Berlanga Padilla AM, Gallegos Morales G, Cepeda Siller M, Rodriguez Herrera R, Aguilar Gonzales CN, Castillo Reyes F (2011) *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. Am J Agric Biol Sci 6(3):410–417
- Howe TGB, Ward JM (1976) The utilization of Tween 80 as carbon source by *Pseudomonas* B. J G Microbiol 92:234–235
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J (2009) Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. Biol Control 51:409–416
- Hsouna AB, Trigie M, Mansour RB, Jarraya RM, Damak M, Jaoua S (2011) Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. Int J Food Microbiol 148(1):66–72
- Huang XQ, Zhang N, Yong XY, Yang XM, Shen QR (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. Microbiol Res 167:135–143
- Intana W, Kheawleng S, Sunpapao A (2021) *Trichoderma asperellum* T76–14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum*. J Fungi 7(1):46
- Isaias CO, Martins I, Silva JBT, Silva JP, Mello SCM (2014) Ação antagonística e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. Summa Phytopathol 40:(1)34–41
- Islam MM, Hossain DM, Rahman MME, Suzuki K, Narisawa T, Hossain I, Harada N (2016) Native *Trichoderma* strains isolated from Bangladesh with broad spectrum antifungal action against fungal phytopathogens. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49(1–4):75–93
- Jamdar Z, Mohammadi AH, Mohammadi S (2013) Study of antagonistic effects of *Trichoderma* species on growth of *Verticillium dahliae*, the causal agent of *Verticillium* wilt of pistachio under laboratory condition. J Nuts 4(4):53–56

- Jie WG, Bai L, Yu WJ, Cai BY (2015) Analysis of interspecific relationships between *Funneliformis mosseae* and *Fusarium oxysporum* in the continuous cropping of soybean rhizosphere soil during the branching period. *Biocontrol Sci Technol* 25:1036–1051
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP, Tjamos EC (2012) Verticillium wilt: a major threat to olive production current status and future prospects for its management. *Plant Dis* 96:304–329
- Johnson LF, Curl EH (1972) Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens. Burgess Publishing Co., Minneapolis: pp.v+247
- Kamala TH, Indira S (2012) Biocontrol properties of indigenous Trichoderma isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia Solani*. *Afr J Biotechnol* 11(34):8491–8499. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1938>
- Karanja E, Boga H, Muigai A, Wamunyokoli F, Kinyua J, Nonoh J (2012) Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected novel *Streptomyces* species isolated from selected Kenyan national parks. In: Scientific conference proceeding
- Keswani C, Mishra S, Sarma BK (2014) Unraveling the efficient application of secondary metabolites of various *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:533–544
- Khethr FBH, Ammar S, Saïdana D, Daami M, Chriaa J, Liouane K, Mahjoub MA, Helal AN, Mighri Z (2008) Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Trichoderma* sp. growing in Tunisia. *Ann Microbiol* 58:303. <https://doi.org/10.1007/BF03175334>
- Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M (2001) Trichoderma: from genes to biocontrol. *J Plant Pathol* 83:11–23
- Kumar PP, Kumaravel S, Lalitha C (2010) Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitexnegundo*. *Afr J Biochem Res* 4(7):191–195
- Lalngaihawmi, Bhattacharyya A (2019) Study on the different modes of action of potential Trichoderma spp from banana rhizosphere against *Fusarium oxysporum* fsp cubense. *Int J Curr Microbiol App Sci* 8(01):1028–1040. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.801.112>
- Lee JT, Bae DW, Park SH, Shim CK, Kwak YS, Kim HK (2001) Occurrence and biological control of postharvest decay in onion caused by fungi. *Plant Pathol J* 17(3):141–148
- Li YT, Hwang SG, Huang YM, Huang CH (2018a) Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Prot* 110:275–282
- Li Z, Wang T, Luo X, Li X, Xia C, Zhao Y, Cui Z (2018b) Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum*. *Biol Control* 126:36–44
- López AC, Alvarenga AE, Zapata PD, Luna MF, Villalba LL (2019) *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilexparaguariensis* St. Hil. *Mycology*. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1606860>
- López-Escudero FJ, Mercado-Blanco J (2011) *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344:1–50. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
- Lunge AG, Patil AS (2012) Characterization of efficient chitinolytic enzyme producing *Trichoderma* species: a tool for better antagonistic approach. *Int J Sci Environ Technol* 1(5):377–385
- Marques E, Martins I, Mello SCM (2017) Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotrop* 18(1):0418. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0418>
- Meena M, Swapnil P, Zehra A, Dubey MK (2017) Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. *Arch Phytopathol Plant Prot* 50(14):629–648
- Meera T, Balabaskar P (2012) Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *Int J Food Agric Vet Sci* 2(1):113–120
- Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Parrilla-Araujo S, Jiménez-Díaz RM (2003) Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis* 87(12):1487–1494
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Mohiddin FA, Bashir I, Padder SA, Hamid B (2017) Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Trichoderma* species. *J Pharmacogn Phytochem* 6(6):563–569
- Moraga-Suazo P, Opazo A, Zaldúa S, González G, Sanfuentes E (2011) Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in Pinus radiata Seedlings. *Chilean J Agric Res* 71:412–417
- Moya P, Girotti JR, Toledo A, Sisterna MN (2018) Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenopeziza teres*, the causal agent of barley net blotch. *J Plant Protect Res* 58:45–53
- Murthy N, Bleakley B (2012) Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Internet J Microbiol*, 10(2), e2bc3.
- Naing KW, Anees M, Kim SJ, Nam Y, Kim YC, Kim KY (2014) Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Ann Microbiol* 64(1):55–63
- Nandhini SU (2015) Gas chromatography–mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine *Streptomyces*. *Asi J Pharm Clin Res* 8:244–246. Ng LC, Ngadin A, Azhari M, Zahari NA (2015) Potential of *Trichoderma* spp. as biological control agents against bakanae pathogen (*Fusarium fujikuroi*) in rice. *Asian J Plant Pathol* 9:46–58
- Noori MSS, Saud HM (2012) Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *J Plant Pathol Microbiol* 3:120. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000120>
- Pegg GF, Brady BL (2002) *Verticillium* Wilts. CABI Publishing, New York
- Pérez-Artés E, García-Pedrajas MD, Bejarano-Alcázar J, Jiménez-Díaz RM (2000) Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *Eur J Plant Pathol* 106(6):507–517

- Ratnakumari YR, Nagamani A, Bhramaramba S, Kumar R, Kumar U, Shaik M (2011) Non-volatile and volatile metabolites of antagonistic *Trichoderma* against collar rot pathogen of *Mentha arvensis*. *Int J Pharm Biomed Res* 2(2):56–58
- Pohl CH, Kock JL, Thibane VS (2011) Antifungal free fatty acids: a review. *Sci Against Microb Pathog Curr Res Technol Adv* 1:61–71
- Raza W, Yuan J, Wu YC, Rajer FU, Huang Q, Shen QR (2015) Biocontrol traits of two *Paenibacillus polymyxa* strains SQR-21 and WR-2 in response to fusaric acid, a phytotoxin produced by *Fusarium* species. *Plant Pathol* 64:1041–1052. <https://doi.org/10.1111/ppa.12354>
- Rifai MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116:1–56
- Ruangwong OU, Wonglom P, Suwannarach N, Kumla J, Thaochan N, Chomnunti P, Sunpapao A (2021) Volatile organic compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: impact on plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi* 7(3):187
- Russell DW, Sambrook J (2001) Molecular cloning: a laboratory manual (Vol. 1, p. 112). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100(8):923–935
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94(1):146–170
- Saravanakumar K, Arasu VS, Kathiresan K (2013) Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquat Bot* 104:101–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.09.001>
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Kubicek CP (1994) Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptidol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60(12):4364–4370
- Shah S, Nasreen S, Sheikh PA (2012) Cultural and morphological characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease of *Pleurotus* spp. In Kashmir. *Res J Microbiol* 7:139–144
- Shahzad M, Nadeem A, Muhammad A, Shafiq UR, Muhammad A, Lixin Z, Muhammad A (2019) Chitinolytic activity of the indigenous *trichoderma* spp. from the north west of Pakistan against the fungal phytopathogens. *Pak J Bot* 51(2). [https://doi.org/10.30848/PJB2\(37\)](https://doi.org/10.30848/PJB2(37))
- Sharmila M, Rajeswari M, Jayashree I (2017) GC-MS analysis of bioactive compounds in the whole plant of ethanolic extract of *Ludwigia perennis*L. *Int J Pharm Sci Rev Res* 46(1):124–128
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48:21–43
- Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Hasan MdM (2012) Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *J Chromatogr Sci* 50:358–367
- Singh HB, Singh BN, Singh SP (2012) Exploring different avenues of *Trichoderma* as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate—an overview. *Rev Plant Pathol* 5:315–426
- Sivan A, Elad Y, Chet I (1984) Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74(4):498–501
- Sivasithamparam K, Ghisalberti EL (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1, London 139–192
- Sohrabi M, Zhang L, Zhang K, Ahmetagic A, Wei MQ (2014) Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clin Microbiol Open Acc* 3:151
- Song M, Yun HY, Kim YH (2014) Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*. *J Gins Res* 38:136–145
- Thrane C, Jensen DF, Tronsmo A (2000) Substrate colonization, strain competition, enzyme production *in vitro*, and Biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. *Eur J Plant Pathol* 106:215–225. <https://doi.org/10.1023/A:1008798825014>
- Tondje PR, Roberts DP, Bon MC, Widner T, Samuels GL, Ismaiel A, Begoude AD, Tchana T, Nyemb-Tshomb E, Ndounbe-Nkeng M, Bateman R, Fontem D, Hebban KP (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol Control* 43:202–212
- Vey A, Hoagland RE, Butt TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Bristol, pp 311–346
- Vinale F, Nigro M, Sivasithamparam K, Flematti G, Ghisalberti EL, Ruocco M, Varlese R, Marra R, Lanzuise S, Eid A, Woo SL, Lorito M (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* 347:123–129
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol J* 8:127–139
- Whipps JM (1997) Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne diseases. *Modern soil microbiology.*, 525–546.
- Whipps JM, Lumsden RD (2001) Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9–22.
- You J, Zhang J, Wua M, Yang L, Chen W, Li G (2016) Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biol Control* 101:31–38
- Zhang F, Chen C, Zhang F, Gao L, Liu G, Chen L, Fan X, Liu C, Zhang K, He Y, Chen C, Ji X (2017) *Trichoderma harzianum* containing l-aminocyclopropane-l-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and diminished adverse effect caused by *Fusarium oxysporum* in soybean. *J Plant Physiol* 210:84–94

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

---

## Résumés

---

## Résumé

En Agriculture, les agents phytopathogènes sont souvent responsables des dégâts et des pertes agronomiques et économiques considérables sur plusieurs cultures. Les traitements chimiques, bien que nocifs, mais ils restent largement utilisés. Afin de limiter ces maladies, l'utilisation de souches de *Trichoderma* spp. a montré ses effets antagonistes contre plusieurs espèces de champignons phytopathogènes et leur capacité à contrôler ces maladies et offre des perspectives prometteuses pour une agriculture durable et respectueuse de l'environnement.

Une collection de 20 isolats de *Trichoderma* spp. appartenant à différentes espèces sont été isolés à partir des sols rhizosphériques de l'olivier issus de quatre régions du nord Algérien: Boumerdes, Bouira, Bejaia et Tipaza. Ces dernières ont été identifiées par des moyens phénotypique et moléculaire. L'isolement à partir des branches et rameaux présentant les symptômes caractéristiques de la verticilliose vasculaire de l'olivier ont permis de sélectionner 11 isolats fongiques affiliés à l'espèce *V.dahlaie* dont 6 espèces sont assignés au pathotype non défoliant alors que le reste composent le pathotype défoliant. La croissance mycélienne des isolats antagonistes de *Trichoderma* spp. et de phytopathogènes de *V. dahlaie* a été évaluée dans différentes conditions physico-chimiques. Ces derniers ont montré une croissance optimale sur les milieux organiques spécifiquement le milieu PDA, sous une température de 25°C et à un pH=8 cependant le cycle alternatif de la lumière et d'obscurité (12h de lumière /12h d'obscurité) favorise mieux la croissance mycélienne du *V.dahliae*. Par ailleurs, les isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une croissance optimale sur le milieu PDA à un pH 5 et à 0.2 M en NaCl les qualifiant d'halotolérants.

Des tests ont été menés pour évaluer l'effet antagoniste *in vitro* de tous les isolats de *Trichoderma* spp. par confrontation directe, indirecte ainsi que l'effet des filtrats de cultures. Les résultats montrent que tous les isolats de *Trichoderma* ont une activité antagoniste contre les isolats de *V. dahliae*. Dans la confrontation directe, les isolats T12 et T9 ont donné les meilleurs pourcentages d'inhibitions moyens de 68.86% et 59.96% respectivement. Cependant, les tests de confrontation indirecte *in vitro* ont montré une réduction de la croissance radiale comprise entre 55.26 et 65.93%. De même, Les filtrats de culture ont plus ou moins inhibé la croissance mycélienne des isolats de *V. dahliae*. La plus importante inhibition a été obtenue avec le filtrat T7 qui a montré un pourcentage d'inhibition moyen de 48.15% à la dose 20%.

Les souches de *Trichoderma* spp. possèdent un vaste répertoire de métabolites secondaires et des composés volatiles (VOCs). D'autre part, les activités chitinolytiques et protéolytiques les plus élevées sont obtenues par les deux isolats T2 et T6 avec une activité de 0.043 U/ml et 0.019 U/ml respectivement. Les résultats montrent également la capacité des isolats de *Trichoderma* de solubiliser le phosphate, de produire l'ammoniaque, de fixer l'azote et de synthétiser des phytohormones telles que l'AIA et l'acide gibbérannique à des degrés différents. La souche T11 a montré une meilleure production d'AIA et d'acide gibbérannique avec une concentration de 21.15 µg/ml et 7.87µg/ml respectivement. Les analyses par GC-MS et par HPLC ont permis d'identifier de nombreuses molécules possédant des capacités PGP et antifongique.

L'essai de biocontrôle effectué sur l'olivier (variété Chemlal) a décelé une efficacité très intéressante de *Trichoderma aureoviridae* (T2), *Trichoderma harzianum* (T9) et *T. harzianum*(T12) à l'égard de *V. dahliae*. Cette constatation est basée sur la diminution significative de la gravité de la maladie par rapport au témoin (> 67%). Les données enregistrées ont également montré que *Trichoderma aureoviridae* (T2) à enregistré le pourcentage le plus élevé de réduction de la maladie (83,81%). Cette étude a montré que l'action des souches de *Trichoderma* testées ne se limite pas seulement à la protection de la plante mais aussi à la stimulation de la croissance de l'olivier.

**Mots clés:** *Trichoderma*, *V. dahlaie*, taux de croissance, activité antagoniste, métabolites secondaires.

## **Abstract**

In agriculture, plant pathogens are often responsible for considerable agronomic and economic damage and losses on several crops. Chemical treatments, although harmful, but they are still widely used. In order to limit these diseases, the use of strains of *Trichoderma* spp. has shown its antagonistic effects against several species of phytopathogenic fungi and their ability to control these diseases and offers promising prospects for sustainable and environmentally friendly agriculture.

A collection of 20 isolates of *Trichoderma* spp. belonging to different species are isolated from the rhizospheric soils of the olive tree, taken from four regions of northern Algeria: Boumerdes, Bouira, Bejaia and Tipaza and identified by phenotypic and molecular methods. The isolation from the branches and twigs which present the characteristic symptoms of vascular verticillium wilt of olive allowed to select 11 fungal isolates which were affiliated to the species *V. dahliae* of which 6 species were assigned to the non-defoliating pathotype whereas the rest of them were attributed to the defoliating pathotype. Mycelial growth of antagonistic isolates of *Trichoderma* spp. and phytopathogens of *V. dahliae* was evaluated under different physico-chemical conditions. The last one showed optimal growth on organic media, specifically the PDA medium, under a temperature of 25°C and at a pH=8, however the alternating cycle of light and dark (12h light / 12h dark) revealed the best mycelial growth of *V. dahliae*. Furthermore, isolates of *Trichoderma* spp. showed optimal growth on PDA medium at pH 5, the majorities were considered to be halotolerant, these isolates can grow on PDA at 0.2M in NaCl with good growth in the absence of salt.

Tests *in vitro* were conducted to assess the antagonistic effect of all isolates of *Trichoderma* spp. by direct and indirect confrontation as well as the effect of culture filtrates. The results show that all *Trichoderma* isolates have antagonistic activity against isolates of *V. dahliae*. Isolates T12 and T9 showed the most important results by direct confrontation test with an average percentage inhibition of 68.86% and 59.96% respectively. Moreover, indirect confrontation test showed a reduction in radial growth ranged between 55.26 and 65.93%. Similarly, the culture filtrates inhibited the mycelial growth of the *V. dahliae* isolates. The greatest inhibition was obtained with the T7 filtrate which showed an average percentage inhibition of 48.15% at the 20% dose.

The strains of *Trichoderma* spp. possess an extensive repertoire of secondary metabolites and volatile compounds (VOCs). On the other hand, the highest chitinolytic and proteolytic activities were obtained by two isolates T2 and T6 with an activity of 0.043 U/ml and 0.019U/ml respectively. The results also show the ability of *Trichoderma* isolates to solubilize phosphate, produce ammonia, fix nitrogen and synthesize phytohormones such as AIA and gibberellic acid to different degrees. The T11 strain showed the highest production of AIA and gibberellic acid with a concentration of 21.15µg/ml and 7.87µg/ml respectively. GC-MS and HPLC analysis have identified many molecules with PGP and antifungal capacities.

The biocontrol test carried out on the olive tree (Chemlal variety) showed that *Trichoderma aureoviridae* (T2), *Trichoderma harzianum* (T9) and *Trichoderma harzianum* (T12) gave very promising results to the regard to *V. dahliae*. This finding is based on the significant decrease in disease severity compared to the control (>67%). The recorded data also showed that *Trichoderma aureoviridae* (T2) recorded the highest percentage reduction in disease (83.81%). This study showed that the action of the strains of *Trichoderma* tested is not limited only to the protection of the plant but also to the stimulation of the growth of olive tree.

**Key Words:** *Trichoderma*, *V. dahliae*, Growth rate, antagonistic activities, secondary metabolites.

## ملخص

في المجال الزراعي، غالبًا ما تكون الفطريات الممرضة مسؤولة عن أضرار وخسائر زراعية واقتصادية كبيرة للعديد من المحاصيل. تستعمل مكافحة الكيمائية على نطاق واسع كوسيلة وقائية للحد من إنتشار هذه الأمراض ، إلا ان الاثار السلبية الكثيرة للمكافحة الكيمائية أدى الى التوجه والاعتماد على المكافحة البيولوجية باستعمال عزلات فطرية كحل بديل و وسيلة مستدامة لا تؤثر سلبًا على البيئة. أظهر استخدام سلالات *Trichoderma spp* نشاط مضاد ضد عزلات العديد من أنواع الفطريات الممرضة للنباتات وتوفر بذلك آفاقًا واعدة للزراعة المستدامة والصدقية للبيئة.

في هذه الدراسة تم عزل مجموعة من 20 فطر ينتمي الى سلالة *Trichoderma spp*. من تربة جذور أشجار الزيتون من أربع مناطق: بومرداس ، البويرة ، بجاية وتيبازة كما تم تحديد نوع عزلات *Trichoderma spp* من خلال الجمع بين النتائج المورفولوجية ،الفزيولوجية و تحليل تسلسل ADN لمنطقة ITS. كما اثبتت نتائج عزل الفطريات من أغصان اشجار الزيتون التي تظهر أعراض مطابقة للذبول الوعائي لأشجار الزيتون من تحديد 11 عزلة تنتمي الى سلالة *V.dahliae* منها 6 عزلات تنتمي الى النمط المرضي الغير المتساقط و الباقي يشكلون النمط المرضي المتساقط. إضافة الى ذلك تم تقييم نمو عزلات *Trichoderma spp* و *V. dahliae* تحت ظروف فيزيائية و كيميائية مختلفة. أظهرت نتائج هذا الاختبار نموًا مثاليًا لعزلات *V. dahliae* على الوسائط العضوية، وتحديدًا وسط PDA، تحت درجة حرارة 25 درجة مئوية ودرجة حموضة 8، في حين ان، الدورة المتناوبة للضوء والظلام (12 ساعة/12 ساعة داكنة) كشفت عن نمو أفضل لفطر *V. dahliae*. في حين أن ، عزلات *Trichoderma spp* أظهرت نموًا مثاليًا في وسط PDA عند درجة حموضة 5، ويمكن أن تنمو هذه العزلات بشكل أفضل على وسط PDA عند 0.2 مولار في كلوريد الصوديوم.

أظهرت النتائج أن جميع فطريات *Trichoderma spp* لها نشاط مضاد ضد عزلات *V. dahliae* عن طريق اختبار المواجهة المباشرة حيث ثبتت بشكل كبير نمو المسليوم مقارنة بالشاهد بمتوسط نسبة تثبيط تتراوح من 50.93 إلى 68.86%. سجلت العزلات T12 و T9 أكبر نسبة تثبيط بلغت 68.86% و 59.96% على التوالي، كما أن اختبار المواجهة غير المباشرة أظهرت ايضا انخفاضًا في نمو المسليوم يتراوح بين 55.26 و 65.93%. إضافة الى ذلك، فإن رشاحة فطر *Trichoderma spp* أثبتت تثبيط فعال لنمو فطر *V. dahliae* حيث تم الحصول على أكبر تثبيط للممرض من طرف رشاحة الفطر T7 بمتوسط نسبة تثبيط 48.15% عند جرعة 20%.

عزلات *Trichoderma spp* تمتلك القدرة أيضا على إفراز العديد من النواتج الايضية الثانوية والمركبات العضوية المتطايرة. من ناحية أخرى ، تم الحصول على أعلى نشاط للكيتين وتحلل البروتين من طرف العزلات T2 و T6 بنشاط يقدر بـ 0.043 U / ml و 0.019 U / ml على التوالي. أظهرت النتائج أيضًا قدرة عزلات *Trichoderma spp* على إذابة الفوسفات وإنتاج الأمونياك وتثبيت النيتروجين وإنتاج الهرمونات النباتية مثل AIA وحمض الجبريليك بدرجات مختلفة. أظهرت سلالة T11 إنتاجًا أفضل من AIA وحمض الجبريليك بتركيز 21.15 ميكروغرام/مل و 7.87 ميكروغرام/مل على التوالي. كما أثبتت نتائج تحليل GC-MS و HPLC وجود العديد من الجزيئات المضادة للفطريات و اخرى ذات قدرة على تحفيز نمو النباتات

أظهر اختبار المكافحة الحيوية الذي تم إجراؤه على شجرة الزيتون صنف (Chemlal) أن *T.aureoviridae* (T2) و *T.harzianum* (T9) و *T.harzianum* (T12) أعطت نتائج واعدة جدًا ضد *V. dahliae*. تستند هذه النتيجة إلى الانخفاض الكبير في شدة المرض (< 67%). كما أظهرت البيانات المسجلة أن *T.aureoviridae* (T2) سجلت أعلى نسبة انخفاض في المرض (83.81%). أظهرت هذه الدراسة أن تأثير سلالات *Trichoderma spp* المختبرة لا يقتصر دورها فقط على حماية النبات ولكن أيضًا على تحفيز نمو شجرة الزيتون.

**الكلمات المفتاحية:** *Trichoderma*، *V. dahliae*، معدل النمو، النشاط المضاد، المستقلبات الثانوية.