



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université SAAD DAHLEB BLIDA 1



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biotechnologie**

**Mémoire de fin d'Etudes**

**Pour l'obtention du Diplôme Master2  
en**

**Biologie des interactions plantes microorganismes  
Sujet :**

**Etude de l'effet de biostimulation de la croissance de l'orge par  
quelques souches endophytes de *Clonostachys rosea*.**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> BOUSSILA Fatma**

**Devant le jury composé de :**

<b>KRIMI Z.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U.S.D.B<sub>1</sub></b>	<b>Présidente</b>
<b>MOHAMED MAHMOUD F.</b>	<b>MAA</b>	<b>U.S.D.B<sub>1</sub></b>	<b>Promotrice</b>
<b>BERRAF A.</b>	<b>MAA</b>	<b>U.S.D.B<sub>1</sub></b>	<b>Examinatrice</b>
<b>MAROK-ALIM D.</b>	<b>MAA</b>	<b>U.S.D.B<sub>1</sub></b>	<b>Examinatrice</b>

**Promotion: 2014/2015**

## **Remerciement**

*Je tiens d'abord à exprimer mes remerciement à*

*Professeur KRIMI Zoulikha pour sa bienveillance de présider ma soutenance, et pour d'avoir m'accepter dans son laboratoire de phytopathologie et d'avoir mis notre disposition les moyens nécessaire pour réaliser ce travail.*

*Madame MOHAMED MAHMOUD Fadhéla enseignante à l'Université Blida 1 qui est à l'origine de ce sujet. Ses idées et ses conseils ont été essentiels et enrichissants pour l'aboutissement de ce modeste mémoire.*

*Je tiens également à remercier les membres du jury, Dr BERRAF A et Mme MAROK ALIM. D qui m'ont fait l'honneur en acceptant d'examiner mon travail.*

*J'adresse aussi mes remerciements à Selma l'ingénieure du laboratoire de phytopathologie pour leur aide et leur encouragement.*

*Je tiens à remercier profondément Mme CHELOUFI.*

*En fin, je voudrais remercier tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et l'ensemble des personnes, qui m'ont aidé, de près ou de loin, à réaliser ce travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents*

*A ma grande mère*

*A mon frère unique Mohamed*

*A mes deux sœurs Sarah et Aya*

*A mes cousines Amina, Karima, Asma et Wahiba*

*A tous les membres de ma famille sans aucune exception.*

*A ma très chère copine Meriem ma deuxième sœur ; le bon dieu te garde pour moi mon ange. Je te souhaite la bonne réussite dans ta vie.*

*A tous mes amis et la promo de biologie des interactions plantes microorganismes.*

## Liste des figures

page

<b>Figure 1 :</b> Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes.....	4
<b>Figure 2 :</b> l'hyperparasitisme de <i>Clonostachys catenulatum</i> .....	11
<b>Figure 3 :</b> Boîtes de Pétri contenant des isolats pour l'expérimentation cultiver sur le milieu de culture PDA.....	17
<b>Figure 4 :</b> inoculation des graines d'orge par les isolats fongique du <i>Clonostachys rosea</i> .....	21
<b>Figure 5 :</b> Dispositif expérimental en bloc complet, représentatif de l'essai <i>in planta</i> d'inoculation de l'orge ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) par les isolats du <i>Clonostachys rosea</i> .....	22
<b>Figure 6 :</b> les isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> ne produisent pas l'AIA.....	26
<b>Figure 7 :</b> Les trois isolats du <i>Clonostachys rosea</i> ne produisent pas l'HCN.....	27
<b>Figure 8 :</b> Production d'NH <sub>3</sub> par les trois isolats du <i>Clonostachys rosea</i> .....	28
<b>Figure 9 :</b> Solubilisation du phosphore bicalcique par les isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> .....	30
<b>Figure 10 :</b> Production de protéase par les isolats fongiques.....	31
<b>Figure 11 :</b> les isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> ne produisent pas la pectine.....	32
<b>Figure 12 :</b> les isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> ne produisent pas la cellulase.....	32
<b>Figure 13 :</b> plants d'orge après six semaines de l'inoculation.....	33

<b>Figure 14 :</b> Effet des isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur la longueur moyenne de la partie aérienne.....	34
<b>Figure 15 :</b> Effet de l'inoculation des isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids frais moyen de la partie aérienne.....	34
<b>Figure 16 :</b> Effet de l'inoculation des isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids sec moyen de la partie aérienne.....	35
<b>Figure 17 :</b> la longueur de la racine après six semaines de l'inoculation par les isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> .....	36
<b>Figure 18 :</b> Effet des trois isolats fongiques sur la longueur moyenne de la partie racinaire.....	36
<b>Figure 19 :</b> Effet des trois isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids frais moyen de la partie racinaire.....	37
<b>Figure 20 :</b> Effet des trois isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids sec moyen de la partie racinaire.....	37
<b>Figure 21 :</b> colonisation racinaire des plants d'orge par les champignons du genre <i>Clonostachys rosea</i> sur un milieu PDA.....	38
<b>Figure 22 :</b> Taux de colonisation racinaire par les isolats du genre <i>Clonostachys rosea</i> .....	39
<b>Figure 23 :</b> observation des coupes des racines d'orge sous le microscope optique.....	39

# Sommaire

**Introduction.....1**

**Chapitre 1 : synthèse bibliographique sur l'application endophytiques dans la promotion de la croissance des plantes et la culture de l'orge comme cas d'étude.....3**

1. Les champignons endophytes.....3
2. Colonisation naturelle des tissus des plantes par les champignons.....5
3. Intérêt des champignons endophytes dans la promotion de la croissance des plantes .....6
4. *Clonostachys rosea* .....11
5. Cas d'étude : L'orge (*Hordeum Vulgare* L.).....13

**Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

## **Matériel**

1. Matériel végétal.....16
2. Matériel biologique.....17
3. Le sol.....17

## **Méthodes**

1. Purification des souches.....17
2. Production *in vitro* des métabolites secondaires.....18
3. Production des enzymes.....19
4. Evaluation de la promotion de la croissance.....20
5. Lecture des résultats.....22
6. Colonisation racinaire.....23

**Chapitre 3 : Résultats et interprétations.....25**

**Chapitre 4 : Discussion.....40**

**Conclusion.....44**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Résumé

*Clonostachys rosea* est un champignon endophyte commun dans le sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition sur les racines et dans le sol. La mise en évidence de la production *in vitro* de quelques métabolites secondaires par trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* (G133, Sn319112, Sn181022) a été évaluée par la synthèse de quelques métabolites (phytohormones et enzymes) ainsi que leurs effets sur la biostimulation de la croissance de l'orge. Les essais réalisés ont montré que nos isolats n'ont pas la capacité de produire l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (HCN), mais ils produisent l'ammoniaque. Les tests qualitatifs enzymatiques, ont démontrés que les isolats produisent la phosphatase et la protéase et ne produisent pas la pectinase et cellulase. L'expérimentation a montré que la souche Sn319112 a un effet positif sur les paramètres de la croissance de la partie aérienne par rapport au témoin. Alors que le témoin présente une dominance nette dans le développement de la partie racinaire avec un meilleur développement de la souche G133 par rapport aux d'autres isolats fongiques du *Clonostachys rosea*.

**Mots clés :** *Clonostachys rosea*, Endophyte, Métabolites secondaires, L'orge, Biostimulation.

## Abstract

*Clonostachys rosea* a common fungus in the soil is known as a high competitor saprophyte on plant roots and in soil. The in vitro study of the production of some secondary metabolites with the three isolates of *Clonostachys rosea* (G133, Sn319112, and Sn181022) was evaluated by the synthesis of some metabolites (phytohormones and enzymes) and their effects on the bio-stimulation of the growth of barley. Our study showed that the three isolates did not have the ability to produce indole acetic acid (IAA) and hydrogen cyanide (HCN), but they produce ammonia. Enzymatic qualitative tests have shown that isolates of *clonostqchys rosea* produce phosphatase and protease and do not produce the pectinase and cellulose. Experimentation has shown that the strain Sn319112 of *Clonostachys rosea* has a positive effect on the parameters of the growth of the aerial part compared to control. While the control has a clear dominance in the development of the root portion with a better development of the strain G133 compared to other fungal isolates *Clonostachys rosea*.

**Keywords:** *Clonostachys rosea* Endophyte, secondary metabolites, Barley, Biostimulation.

## ملخص

كلونوستاشيس غوزي هو نوع من الفطريات الداخلية مشترك في التربة باعتبارها رمامة المعترف بقدرتها المرتفعة من المنافسة على الجذور والتربة. قمنا بتسليط الضوء لإظهار إنتاج لبعض المركبات الثانوية في المختبر من قبل ثلاثة عزلات فطرية ( Sn3119112, Sn181022, G133 ) من خلال تجميع بعض نواتج الأيض (الهرمونات النباتية والإنزيمات) وآثارها على التحفيز الحيوي لنمو الشعير. أظهرت المحاولة أن العزلات لدينا لم يكن لديها القدرة على إنتاج حمض الأندول الخليك (وسيانيد الهيدروجين ولكنها تنتج الأمونياك. وقد أظهرت الاختبارات النوعية الأنزيمية العزلات أنتجت الفوسفات والبروتياز لم تنتج البكتيناز والسيلولاز. كما أظهرت التجارب أن العزلة Sn319112 لها تأثير إيجابي على نمو الجزء الهوائي للنبتة مقارنة بالشاهد. بينما يظهر أن العزلات الثلاث ليس لديها تأثير على الجزء السفلي للنبتة و أن الشاهد يفوقها في السيطرة على هذا الجزء مع تطوير أفضل من سلالة G133 مقارنة بالعزلات الفطرية الأخرى.

الكلمات المفتاحية: كلونوستاشيس غوزي، فطر داخلي، المركبات الثانوية، الشعير، تنبيه بيولوجي.

# **Introduction**

Les ressources naturelles sont de plus en plus menacées suite à une exploitation non raisonnée. L'agriculture est un secteur qui a participé en partie dans l'altération des potentialités naturelles du milieu par l'ensemble des pratiques culturales adoptées, telle que l'utilisation irrationnelle des ressources d'eau et l'usage intensif des différents intrants. Aujourd'hui, il est devenu impératif d'adopter de nouvelles approches pour réaliser un développement durable et assurer le recyclage et le renouvellement des ressources naturelles. **(Mansouri, 2011).**

A cet égard l'homme a pensé se retourner vers la nature et chercher les vertus d'intérêt économique chez les microorganismes à travers les associations que forment ces derniers avec leurs hôtes, et en particulièrement les plantes. Cette partie discrète de notre monde connue par certaines potentialités écologiques, procure, par ses associations symbiotiques, aux plantes hôtes des vertus bénéfiques d'une importance capitale en agronomie. Parmi ces associations symbiotiques, on trouve celles qui se forment entre les plantes et les champignons appelés endophytes qui vivent dans les espaces intercellulaires des tissus sains. **(Mansouri., 2011).**

Les champignons endophytes sont les champignons qui colonisent les tissus vivants des plantes, sans causer aucun symptôme apparent, ils sont estimés au nombre de 1.5 millions d'espèces et seulement environ 75.000 d'entre elles sont décrites **(Manoharachary et al., 2005)**. Ils reçoivent la nutrition et la protection de la plante hôte et, en retour, ils améliorent la compétitivité ainsi que la résistance de celle-ci aux différents agents pathogènes tels les bactéries, champignons, parasites, insectes... ainsi qu'aux différents types de stress abiotiques (la sécheresse, les hautes températures, la salinité...) **(Saikkonen et al., 1998)**.

Grâce à cette protection, les champignons endophytes ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme étant une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs **(Zhang et al., 2006)**.

Certains champignons endophytes peuvent être des mycoparasites; ils peuvent produire des enzymes dégradant les parois cellulaires, qui leur permettent de percer des trous dans les champignons phytopathogènes et d'extraire des nutriments pour leurs croissance **(Cao et al., 2009)**. Parmi ces endophytes on a le cas de *Clonostachys* spp. et plus spécialement l'espèce *Clonostachys rosea*.

*Clonostachys* spp. est un champignon saprophyte de la famille des Bionectriaceae, il présente une haute capacité de compétition sur les racines des plantes en décomposition. On le rencontre régulièrement sur une extraordinaire gamme d'habitats, variant de la région subarctique, région tempérée, région tropicale et région désertique. *C. rosea* a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et insectes morts, sur les nématodes et sur de nombreux champignons **(Schroers et al., 1999)**.

Lors des interactions bénéfiques entre une plante et cet endophyte, divers mécanismes sont impliqués : le mycoparasitisme, l'antibiose, la compétition pour les nutriments, la production des enzymes, et la résistance induite **(Sutton et al. 1997)**.

Plusieurs champignons endophytes ont montré leur efficacité dans la stimulation de la croissance de cultures économiquement importantes par le biais de l'augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs, la fixation d'azote, la production d'essentiels substances de croissance en particulier les phytohormones et la production des sidérophores. En plus, la présence de ces endophytes facilite la prolifération des poils racinaires qui contribuent potentiellement à l'absorption des nutriments et des vitamines par la plante (**Ratul et al., 2012**) parmi ces plantes on a la plante de l'orge.

L'orge (*Hordeum vulgare L.*) est une céréale à grande importance économique en Algérie mais sa production, en quantité et en qualité, reste toujours limitée malgré les grands investissements mis en place pour la protection, la préservation et l'exploitation de cette culture (**Rachedi., 2003**). Les études sur les endophytes de l'orge et leurs effets bénéfiques sur la croissance de cette plante sont moins élucidées. Cependant, il y a un manque de recherche et de synthèse sur les champignons endophytes qui colonisent ces racines en particulier (**Murphy., 2013**).

L'orge est une plante qui vit dans les mêmes conditions que le palmier dattier pour cela nous avons utilisés des champignons endophytes isolés à partir de cette plante pour évaluer leurs effets sur l'orge.

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité de trois isolats fongiques du genre *Clonostachys* spp. dans la promotion de la croissance de l'orge, à travers une étude réalisée *in vitro* par la production de quelques métabolites secondaires ; l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (HCN), l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>) et par la production de quelques enzymes (la phosphatase, la protéase, la pectinase et la cellulase).

La deuxième étape, menée sous serre, porte sur l'inoculation de la semence de l'orge (*Hordeum vulgare.L.*) par les champignons du genre *Clonostacys* spp. et la détermination de leurs effets de biostimulation végétale par l'évaluation de quelques paramètres de croissance de l'orge (hauteur des tiges, longueurs des racines, le poids frais et sec de la partie aérienne et racinaire).

## **Synthèses bibliographique**

## 1. Les champignons endophytes

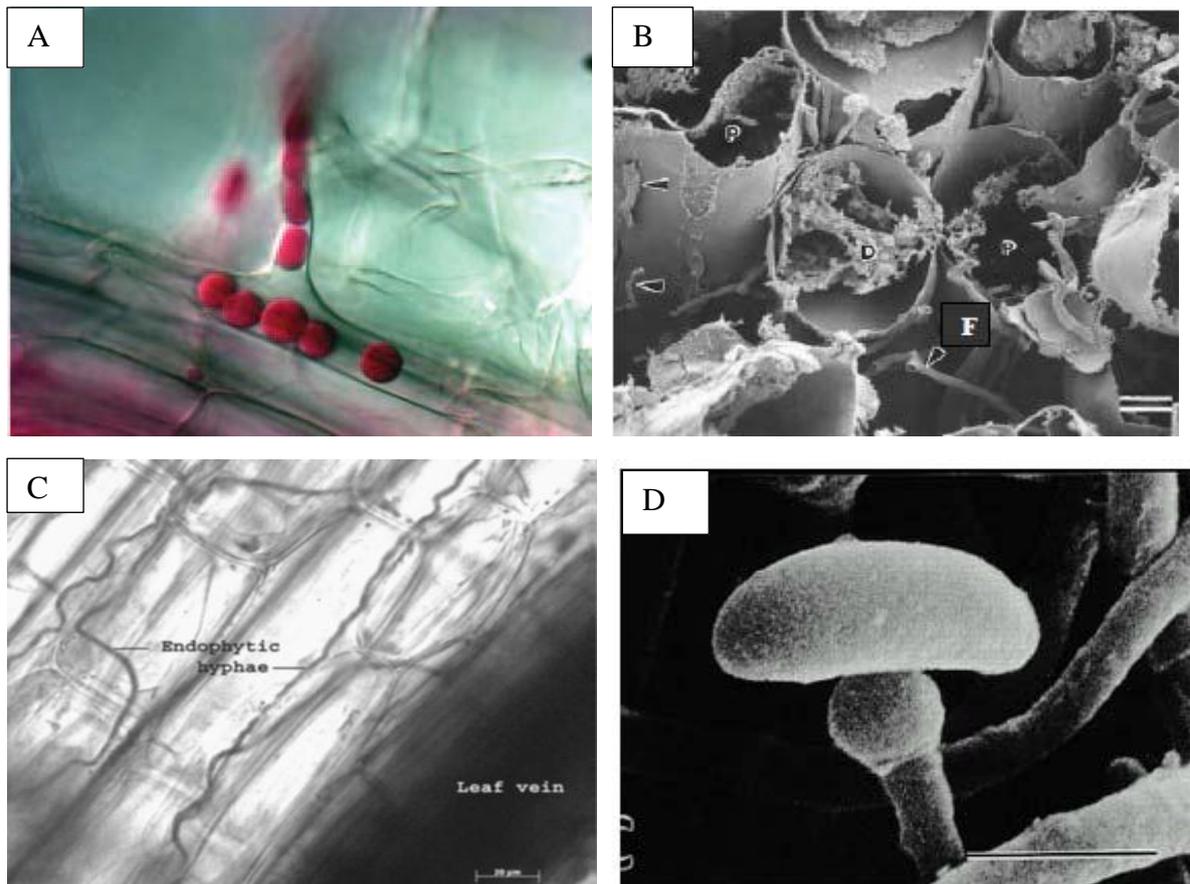
### 1.1. Définition

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de **Petrini (1991)** qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux interne à un certain moment de leurs vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte. Les premières descriptions de ces microbes remontent à la fin du 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècle (**Hyde et Soytong., 2008; Staniek et al., 2008**).

En 1866, Anton De Bary, inventa le terme endophytes (**Moricca et Ragazzi, 2008**), qui est composé de deux mots grecs, endon signifiant au sein et phyton désignant plante, et qui désignait tout organisme survenant dans les tissus de plantes (**Hyde et Soytong., 2008 ; Staniek et al., 2008**).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolé en tant qu'endophytes (**Figure 1**), ce sont des champignons qui peuvent croitre de façon intra et/ou intercellulaires (**Strobel et al., 2004 ; Pimentel et al., 2011**) dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules épidermiques, sans causer aucun symptôme apparent chez l'hôte (**Vega et al., 2008 ; Moricca et Ragazzi., 2008**). Les rôles écologiques des champignons endophytes sont variés, il peut être pathogènes latent, ou des mutualistes, antagonistes des ennemies des plantes, stimulent la croissance de celles-ci et entre en compétition nutritionnelles avec des pathogènes végétaux (**Clay et al., 1985 ; Carroll., 1986**). La communauté endophytique doit être importante dans les plantes pour jouer ces rôles écologiques (**Espinosa-Gardia et Langeneim., 1990**).

Dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes qu'on considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides... (**Maheshwari., 2006 ; Moricca et Ragazzi., 2008**).



**Figure 1** : Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes.

**A** : le type de colonisation de *Piriformospora indica* dans les racines de l'orge hyphe de l'endophyte entre dans les racines via les poils absorbants des plants de 10 jours. Les champignons forment des chlamydospores piriformes dans les poils absorbants et se regroupent dans les cellules du rhizoderme (Waller et al., 2005). **B** : *Fusarium moliniforme* endophyte infectant des cellules radiculaires de Maïs. F : hyphe (YATES et al., 1997). **C** : Hyphe de l'endophyte *Neotyphodium lolii* dans la feuille de ray-grass (*Lolium perenne*) à 400× (Cheplick et Faeth., 2009). **D** : Conidie de *Neotyphodium* sp. isolé à partir de féтуque (Clement et al., 2001).

## 1.2. Diversités et classification

La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota* (Saar et al., 2001); ils représentent un groupe très diversifié avec une estimation de 1.5 millions d'espèces (Zabalgoitia, 2008 ; Fernandes et al., 2009) et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante, dont les multiples couches des tissus sont utilisé comme habitat, Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour, des plantes allant des grands arbres ( Frohlich et al, 2000; Alva et al., 2002 ; Oses et al., 2008),

palmier, les graminées marines et même à partir des lichens (**Li et al., 2007**). Et aussi, à partir de plante poussant dans les forêts aussi bien tropicales, tempérées que boréales (**Stone et al., 2004**).

En 2007, les estimations ont démontré que plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites, et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites. Seulement, l'utilisation de l'identification moléculaire pour faire la distinction entre les cultures stériles isolées au laboratoire ainsi que l'exploration de nouveaux environnements telles les forêts tropicales qui pourraient révéler une grande diversité d'endophytes ont et vont permettre l'identification de nouvelles espèces (**Saar et al., 2001 ; Zabalgozcoa., 2008**).

### **1.2. Mode de reproduction et de transmission**

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (**Selosse et Schardl., 2007**); ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines. Ceci est communément appelé transmission verticale (**Saikkonen et al., 2004a ; Saikkonen et al., 2004b**). Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (**Saikkonen et al., 2010**). Le second se fait via les spores (**Clay., 1986**) ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement, c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (**Saikkonen et al., 2004a ; Saikkonen et al., 2004b**) pour infecter d'autres plantes (**Arnold et al., 2003; Gallery et al., 2007**). Pour les endophytes non systémiques des plantes ligneuses, la transmission se fait horizontalement provoquant généralement des infections locales très limitées, mais ils peuvent être trouvés aussi dans les grains et les glands mais la transmission verticale est rare (**Saikkonen et al., 1998**).

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction (la reproduction sexuée et la reproduction asexuée). Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (**Saikkonen et al., 2004a**).

## **2. Colonisation naturelle des tissus des plantes par les champignons**

Les champignons endophytes peuvent coloniser les plantes par la transmission horizontale lorsque l'inoculum est transporté vers d'autres plantes ou verticalement lorsqu'ils colonisent les semences. La transmission horizontale est le mécanisme prédominant de la dispersion des espèces endophytes (**Gallery et al., 2007**).

Ces champignons endophytes disséminent systématiquement tout au long de la plante et habitent surtout dans les parties aérienne, les vaisseaux conducteurs, les espaces intercellulaires et dans plusieurs cas, ils colonisent l'intérieur des cellules. Ils peuvent également être retrouvés dans les semences (Peixoto-Neto et al., 2002).

Les endophytes possèdent une gamme d'hôte réduite limitée par une seule espèce végétale, tandis que d'autres sont largement répandus (Sherwood-Pike et al., 1986; Pétrini., 1986). *Neotyphodium spp* ont une gamme d'hôte limitée par une ou deux espèces de plantes. D'autres champignons endophytes tels que *Alternaria spp.*, *penicillium spp.*, ou *piriformospora spp.* ont une large gamme d'hôte qui comportent différents genres ou familles (Waller et al., 2005).

Les espèces de *Neotyphodium spp.* et *Epichloë spp* colonisent systématiquement les espaces intercellulaires des feuilles, des tiges, et des semences de leurs plantes hôtes. Certaines endophytes peuvent être trouvées dans des parties spécifiques de la plante telles que les racines, les feuilles ou les rameaux, bien que d'autres puissent coloniser plusieurs parties de la plante (Stone et al., 2004).

### 3. Intérêt des champignons endophytes dans la promotion de la croissance des plantes

#### 3.1. Production des substances bioactives

Les endophytes peuvent produire des substances bioactives *in vitro* et *in planta*, ces métabolites sont importants pour la symbiose. Beaucoup d'exemples de métabolites importants qui peuvent être produits par les champignons endophytes cultivables ou par la colonisation des plantes hôtes. Ils produisent diverses substances qui réalisent des activités anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-cancer et aussi de promotion de croissance par des phytohormones (Lazarovits et Nowak., 1997 ; Suryanarayanan et al., 2009). Certaines endophytes produisent nombreuses composés organiques volatiles avec une activité de synergisme contre les bactéries et les champignons (Mitchell et al., 2010).

#### 3.2. Solubilisation du phosphore

Le phosphore inorganique (Pi) est ainsi associé chimiquement au calcium, formant des complexes de phosphates mono, di et tribasique ( $\text{CaPO}_4$ ),  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ . Les sels de phosphate de sodium et de potassium sont en grande partie biodisponibilité décroissante pour les sels moins solubles du phosphate de calcium (disponibilité : phosphate monocalcique > phosphate

dicalcique > phosphate tricalcique (**Lall., 1991**). Dans les sols agricoles, la dissolution du phosphate inorganique est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol en effet, on trouve dans les sols un nombre important de microorganismes du sol, incluant des bactéries, des champignons et des algues (**Richardson., 2001 ; Sundara et al., 2002**). Bien que ces microorganismes soient généralement liés à la surface des particules des sols, c'est surtout au niveau de la rhizosphère que leur activité est la plus élevée. En effet, au niveau de la rhizosphère, les exudats racinaires, tels que les acides organiques, constituent d'excellentes sources d'éléments nutritifs pouvant supporter la croissance des microorganismes, ce qui explique leur densité plus forte au niveau du sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique (**Kluepfel., 1993 ; Singh et Amberger., 1998**). Cependant, la population et la distribution des microorganismes solubilisant le phosphore au sein de la microflore totale est variable. Le nombre de bactéries et de champignons dissolvant les phosphates varie de 0,5 % - 0,1 % à 26 % - 39 % de la microflore totale. Les champignons solubilisent plus efficacement les phosphates que les bactéries, en plus, une grande partie des champignons conservent cette propriété tandis que la majorité des bactéries la perdent après plusieurs repiquages successifs (**Sperber., 1958; Kucey et al., 1989 ; Zoysa et al., 1998** ).

Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (**Hinsinger., 2001**). Les acides produits par les microorganismes vont faire baisser le pH du milieu et ainsi dissoudre les phosphates naturels, la quantité d'acide produite par ces microorganismes et la baisse de pH varient en fonction du genre et de l'espèce microbienne. Ainsi Martinez-Cruz et ses collaborateurs (1990) ont indiqué l'existence de trois niveaux de pH pour une même souche d'*Aspergillus niger*. Chaque niveau correspond à la dissolution du phosphate de fer à un pH inférieur à 2,1 suivis du phosphate d'aluminium à pH 3 et enfin le phosphate de calcium est dissout à pH 4,8. Les travaux d'**Illmer et Schinner, (1992)** ont montré que la dissolution des phosphates naturels n'est pas absolument liée à une baisse de pH. En effet, certains microorganismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore et en libérant le phosphore lié aux argiles et aux oxydes de fer et d'aluminium (**Violante et al., 1996 ; Vasquez et al., 2000**). En effet, plusieurs expériences réalisées en serres et aux champs, ont montré une forte croissance et une augmentation intéressante de la production des plantes inoculées avec des microorganismes solubilisant le phosphore. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (**Richardson., 2001**).

**Cline et ses collaborateurs (1982)** ont montré que l'acidification artificielle du milieu de culture par l'ajout d'acide minéral industriel, a provoqué une dissolution inférieure à celle obtenue en utilisant les microorganismes, ce qui suggère que les acides organiques sont plus efficaces dans la dissolution des phosphates inorganiques que les acides minéraux et permettent par conséquent une meilleure nutrition phosphatée des plants à partir des phosphates inorganiques. La production des acides organiques au niveau de la rhizosphère sont essentiellement par des microorganismes rhizosphériques et des racines de certaines plantes. Ainsi, tous les facteurs agissant sur les microorganismes rhizosphériques occasionnent des variations de la solubilisation des phosphates inorganiques (**Cline et al., 1982**).

### **3.3. Production des phytohormones**

Les phytohormones, incluent principalement les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique, gibbérellines, et de l'éthylène, induire des réponses physiologiques importantes à différents stades de développement de la plante à des concentrations basses (**Lee Asy et al., 2008**).

La sécrétion des gibbérellines par les champignons endophytes a été mise en évidence par de nombreuses recherches qui montrent l'importance de ces métabolites produites par les endophytes dans la promotion et le développement des plantes, spécialement lors des conditions du stress nutritionnels (**Muhammad et al., 2010**).

Les champignons endophytes ont la capacité de produire les auxines qui sont des hormones végétale, impliquées dans plusieurs aspects de la croissance et le développement des plantes. Elles contrôlent d'importants processus physiologiques comprenant l'élongation et la division cellulaire, différenciation des tissus et les réponses à la lumière. L'acide indole acétique (AIA) est la principale auxine produite par les plantes. Cette hormone est produite au niveau des apex et sa concentration est la clé de la régulation de la croissance et le développement de la plante (**Müller., 2003 ; Davies., 2004**).

L'acide gibberillique est synthétisée par *Gibberella fujikuroi*, *Sphaceloma manihoticola*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Sphaceloma sp*; *Rhizobium phaseoli*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas sp* et *Phaeosphaeria sp*; alors que l'AIA est synthétisé par *pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium sp* et *erwinia sp*. (**Cihangir et Aksöz, 1993 ; ahmad et al., 2008**).

### **3.4. Production des sidérophores**

L'acquisition du fer par les microorganismes dans les sols organiques présente une difficulté depuis que la constante de solubilité de l'oxyde ferrique est environ  $10^{-38}$ . Ainsi à pH 7, la concentration du fer disponible ne dépasse pas  $10^{-17}$ M, ce qui est faible par rapport des exigences de la flore microbienne et la croissance des plantes. Pour résoudre ce problème, les microorganismes possèdent un système de transport du fer de grande affinité. Ils synthétisent et secrètent des particules à faibles poids moléculaires pour la chélation et la solubilisation du fer, ces molécules sont nommés 'sidérophores' (**Lindsay et al., 1982; Abd-alla et Omar., 1998**).

Les sidérophores produites par les microorganismes peuvent stimuler d'une façon directe la croissance des plantes par augmentation de la disponibilité du fer soluble dans le sol, autour des racines ou indirectement par l'inhibition de la croissance des pathogènes quant au phénomène de compétition pour le fer (**Marek-Kozaczuk et al., 1996**).

Dans le sol, les racines des plantes coexistent naturellement avec des champignons qui peuvent produire des sidérophores capables de séquestrer le fer soluble disponible et par conséquent s'interfèrent avec la croissance et les fonctions de la plante. Les sidérophores sont produit pendant les conditions d'épuisement du fer pour la solubilisation de fer ferrique extracellulaire. La nomenclature des sidérophores est généralement basée sur leurs formes chargées par le fer et le préfixe déferri ou desferri est utilisé pour indiquer la forme du fer libre. La plupart des espèces du genre *Aspergillus* sont connus par leur production de plusieurs types de sidérophores et beaucoup de travaux sur l'isolement et la caractérisation des ces sidérophores ont été publié (**Dube et al., 2000**).

### 3.5. Production d'enzyme

Les enzymes des endophytes fongiques sont souvent isolés à partir des plantes médicinales (*Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* et *Cathranthus roseus*), sont utilisés dans les produits alimentaires, les boissons, les confiseries, les textiles et les industries du cuir pour simplifier la transformation des matières premières. Ils sont souvent plus stables que les enzymes dérivées d'autres sources. Les enzymes des endophytes sont des agents de dégradation des polysaccharides disponibles dans les plantes hôtes. L'utilisation d'un simple milieu solide permet la sélection rapide de grandes populations de champignons pour la présence ou l'absence des enzymes spécifiques. Comme d'autres organismes envahisseurs des tissus des végétaux, les champignons endophytes produisent des hydrolases extracellulaires ; comme un mécanisme de résistance contre l'invasion des pathogènes et pour obtenir la nutrition de l'hôte, de telles enzymes comprennent une pectinase, cellulase lipase laccase du champignon endophyte *Monotospora sp.*, xylanase, les

phosphatases et la protéinase. L'éventail des enzymes produites diffère entre les champignons et souvent dépend de l'hôte et les facteurs écologiques (**Maccheroni et Azevedo., 1998**).

Les enzymes pectiques sont induits en présence des substances par les mycètes pathogènes et endophytes. Les pectinases microbiennes sont importantes dans le processus phytopathologiques, symbiose entre le microorganisme et la plante et dans la décomposition de la matière végétale morte. La dégradation du tissu de centre serveur par des phytopathogènes commence généralement par la production des enzymes pectinolytiques, qui sont les enzymes principales impliquées dans l'attaque d'usine. Si un endophyte peut dégrader les substances pectiques, ceci implique que le mycète est susceptible d'être un microbe pathogène latent (**Choi et al., 2005 ; Santos et al., 2012**).

### **3.6. Production d'HCN**

Les cyanides sont des métabolites secondaires de plusieurs microorganismes. Ils peuvent être produits directement à partir de la glycine ou à partir des glycosides cyanogènes. Deux rôles possibles peuvent être attribués aux cyanides, un rôle délétère. L'action bénéfique est liée à la lutte biologique, soit par induction des mécanismes de défense des plantes ou par antagonisme (**Bakker et Schippers., 1987**).

Les endophytes ont été attribué à la production des métabolites diffusibles et volatils et leur présence dans les tissus de la plante peut influencer la production de ces métabolites volatils par la plante (**Rini et Sulochana., 2007 ; Baysal et al., 2008**). Des études ont clairement démontré l'efficacité relative des endophytes dans la production des métabolites comme l'HCN qui sont impliqués dans la promotion de la croissance des plantes et la résistance systémique induite (**Nandhini et al., 2012**).

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère peuvent également avoir un effet bénéfique indirect sur la plante. Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment le champignon tellurique *Clonostachys rosea* dont l'effet global favorise la croissance des plantes.

## **4. *Clonostachys rosea***

### **4.1. Définition**

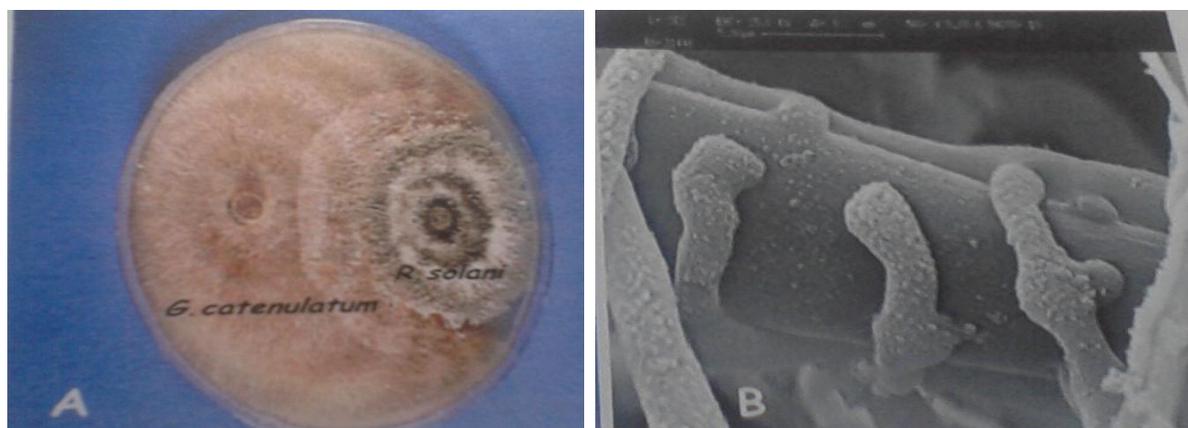
*Clonostachys rosea* est un champignon commun du sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition. Il est rencontré régulièrement sur une gamme d'habitats et d'hôte très large (**John et al, 1997**).

*Clonostachys rosea* a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et insectes morts, sur les nématodes et sur de nombreux champignons, (**Schroers et al, 1999**).

L'état sexuelle comprend petite globuleux à sous-périthèces qui produisent des asques justesse massue (de meiosporangia) avec ascospores ellipsoïdales (méiospores). L'état asexuée produit des phialides qui sont disposés en tourbillons et qui donnent lieu à des propagules asexuées appelées conidies. L'état sexuelle est principalement connu dans des régions tropicales du monde, tandis que l'état asexuée semble avoir une distribution plus large avec de nombreux isollements de milieux tempérés (**Rossman et al., 1999**).

Grâce à sa haute aptitude saprophytique, ce champignon est actuellement utilisé comme un agent de la lutte biologique. **Sutton et al, (1997)** ont signalé que *C. rosea* est fréquemment associé aux kystes des nématodes et aux sclérototes des champignons de l'espèce *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis spp*, *Verticillium spp*, et d'autres champignons du sol et matériel végétal tel que racines, fruits, semences.

Les espèces de *Clonostachys* ont été également signalées comme des agents impliquant le mycoparasitisme contre les champignons pathogènes, il y a des preuves d'inhibition de pathogène avec contact direct des hyphes sans pénétration, qui peut être considéré comme mycoparasitisme indirect. Cependant il y a des études qui montrent la pénétration des hyphes de *Clonostachys catenulatum* en *Rhizoctonia solani* sans la formation d'appressorium, le plus souvent les hyphes de *Clonostachys catenulatum* s'enroulent autour des hyphes de l'hôte. Certaines activités enzymatiques peuvent être également impliquées, car il existe des observations de la destruction des cellules de pathogènes, où l'activité enzymatique de chitinase a été clairement démontrée. (**Figure 2**) (**Lahdenperä., 2000**).



**Figure 2** : l'hyperparasitisme de *Gliocladium catenulatum* (**Lahdenperä., 2000**).

**A** : croissance et sporulation de *Gliocladium catenulatum* sur *Rhizoctonia solani* dans la double culture sur le milieu PDA. **B** : l'interaction entre les hyphes de *Gliocladium catenulatum* et *Rhizoctonia solani*, l'appressorium de *Gliocladium catenulatum* est attaché aux hyphes de *Rhizoctonia solani* qui montrent que l'hypersparasitisme est impliqué.

#### 4.2. Classification

D'après **Schroers, (1999)** *clonostachys rosea* est appartenue à la classification démontrée dans le **tableau 1**.

**Tableau 1** : Classification de *clonostachys rosea*.

Embranchement	<i>Mycètes</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Bionectriaceae</i>
Genre	<i>Clonostachys</i>
Espèces	<i>Clonostachys rosea</i>

#### 4.3. Pouvoir antagoniste de *clonostachys rosea*

*C.rosea* est actuellement utilisé en formulation commerciale comme un agent de la lutte biologique contre des champignons telluriques. (**Sutton et al., 1997**) ont signalés que le champignon est fréquemment associé aux kystes des nématodes et aux sclérotés des champignons de l'espèce *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis spp*, *Verticillium spp*, et d'autres champignons du sol et matériel végétal tel que racines fruits, semence et autres. *C.rosea* a été testé avec succès comme agent de lutte biologique de maladies fongiques causées par des champignons tel que : *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis sclerotoides*, *Verticillium dahliae* et sur certaines espèces de *Botrytis* (**Schoroers et al., 1998**).

Le traitement des semences du pois chiche (*Cicer arietinum*) contre l'infection de *Botrytis cineria* avec *C.roseum* et *Trichoderma* spp a permis une bonne levée de la culture (**Burgess et Keane., 1997**).

*C. rosea* peut coloniser rapidement les surfaces extérieures et intérieures profondes (l'épiderme et des cellules corticales) des plantes comme la carotte, le concombre, le blé et l'orge, ce qui conduit à des réponses de défense induites (**Lübeck et al., 2002 ; Chatterton et al., 2008**).

## 5. Cas d'étude : L'orge (*Hordeum Vulgare* L.)

### 5.1. Présentation générale de la plante

L'orge commune (*Hordeum vulgare* L.) est une céréale à paille. C'est une monocotylédone qui appartient à la famille des *Poacées* et à la sous famille des *Festucoïdées*. Le genre *Hordeum*, auquel appartient l'orge cultivée, se caractérise par des épillets uniformes groupés par trois, avec un central flanqué de deux latéraux, disposés alternativement à chaque étage du rachis (**Von Bothmer et Jacobsen, 1985**). L'espèce *Hordeum vulgare* L. est diploïde et possède sept paires de chromosomes (**Rasmusson, 1987**). Elle peut être annuelle ou vivace. L'orge est la céréale la plus rustique, elle présente une germination rapide et un système racinaire plus important que celui de blé (résistance à la sécheresse). Sa culture prédomine dans les régions arides et semi arides (**Clement-Grandcourt., 1971**).

Sa classification est basée sur la fertilité des épillets latéraux, la densité de l'épi et la présence ou l'absence des barbes (**Grillot., 1959**).

**Grillot (1959)**, classe les orges selon le degré de fertilité des épillets et la compacité de l'épi en deux groupes : le groupe d'orge à six rangs dont les épillets médians et latéraux sont fertiles et le groupe d'orge à 2 rangs dont les épillets médians seuls sont fertiles.

Quant à **Soltner (2005)**, classe les orges selon leur milieu de culture en trois groupes qui sont :

- ✓ Orges d'hiver dont le cycle de développement varie de 240 à 265 jours, s'implantent en automne. Ces orges ont besoin pour assurer leur montaison de température vernalisante et qui manifestent un degré plus ou moins élevé de résistance au froid hivernal.
- ✓ Les orges de printemps dont le cycle de développement est très court (environ 120 à 150 jours), s'implantent au printemps. Ces orges n'ont aucun besoin de vernalisation pour assurer leur montaison.

- ✓ Les orges alternatives qui sont intermédiaires au plan de la tolérance au froid, entre les orges d'hiver et celles de printemps.

Systematique :

D'après **Burni (2003)** la position taxonomique de l'orge (*Hordeum vulgare L.*) est la suivante :

**Tableau 2** : classification de l'orge.

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Monocotylédones
Ordre	Graminales
Famille	Gramineae
Tribu	Hordée
Genre	<i>Hordeum</i>
Espèce	<i>Hordeum Vulgare L.</i>

### 5.2. Caractères écologiques

L'orge est une espèce très rustique et peut donc être cultivée dans les zones marginales à sols plus ou moins pauvres, là où le blé ne peut donner de résultats satisfaisant. En outre, cette espèce est assez intéressante compte tenu de sa tolérance au sel et à la sécheresse en raison de son enracinement plus profond et plus puissant (**Belaid., 1996**).

L'orge végète à partir de 4°C à 5°C et supporte les fluctuations de la température des hauts plateaux. La température la plus favorable à sa germination se situe entre 16°C et 20°C. L'orge d'hiver est moins résistant au froid que le blé mais plus résistant que l'avoine. On constate à -8°C des dégâts foliaires, certaines plantes sont tuées à -12°C et les dégâts sont très importants à -16°C (**Soltner., 1979**).

### 5.3. Les maladies d'orge

Les maladies qui attaquent l'orge sont dues à plusieurs types de pathogènes : Champignons, bactéries, virus, nématodes. Les plus répandues dans le monde et en Algérie sont les maladies fongiques ces maladies peuvent être regroupées selon les symptômes qu'elles induisent et les ressemblances taxonomiques des pathogènes. Les principales maladies fongiques sont regroupées dans le **tableau 3**.

**Tableau 3 : Principales maladies fongiques de l'orge (Zillinsky., 1983).**

Les maladies		Le pathogène	Les symptômes généraux
Rouilles	Rouilles noire	<i>Puccinia graminis</i>	Des pustules jaunes orange à rouge foncé apparaissent sur le limbe et la gaine des feuilles, la tige et les glumes.
	Rouille naine	<i>Puccinia hordei</i>	
	Rouille jaune	<i>Puccinia striiformis</i>	
Helminthosporioses	Helminthosporioses	<i>Helminthosporium Sativum</i>	Taches bigarrures et stries foliaires, brûlure des semis et des épis.
	Rayure réticulée	<i>H. teres</i>	
	Strie foliaire	<i>H. graminieum</i>	
	Taches helminthosporienne	<i>H. tritici-repentis</i>	
Septorioses	Taches septorienne	<i>Septoria tritici</i>	Bigarrures foliaires dans les quelles apparaissent des petits pycnides foncés.
	Taches septorienne des glumes	<i>Septoria nodorum</i>	
Charbons et caries	Charbon nu	<i>Ustilago nuda</i>	Les grains sont remplacés par des masses charbonneuses de spores. Ces masses peuvent être poudreuses, recouvertes d'une membrane grisâtre ou prendre la forme des grains qu'elles ont remplacé.
	Faux charbon nu	<i>Ustilago nigra</i>	
	Charbon couvert	<i>Ustilago hordei</i>	
	Carie commune et carie naine	<i>Les Tilletia</i>	









## **Matériels et Méthodes**

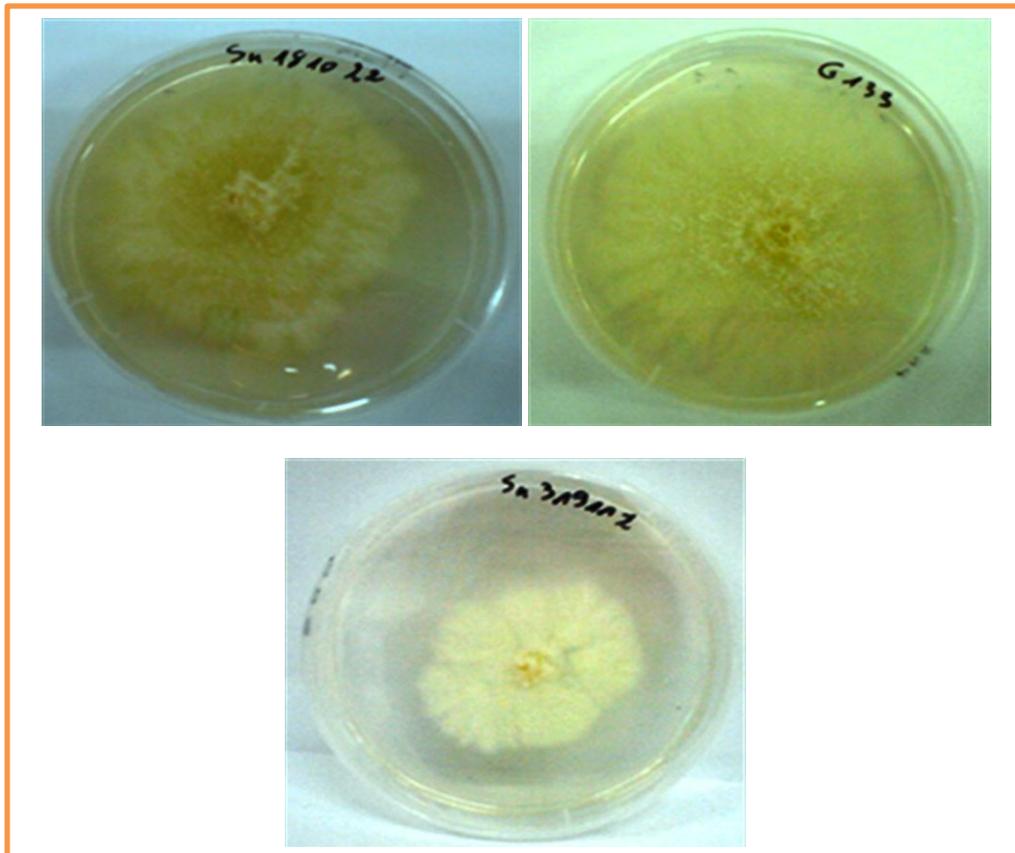
La présente étude a pour objectif d'évaluer *in planta* l'efficacité de trois champignons endophytes racinaires du genre *Clonostachys* spp dans la promotion de la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) tout en mettant en évidence la production *in vitro* des métabolites secondaires (production des phytohormones tel que l'AIA et la production d'HCN) et la production de quelques enzymes (phosphatase, protéase, pectinase, cellulase).

### 1) Matériel biologique

Les trois souches endophytes du genre *Clonostachys* spp (G133, Sn319112, Sn181022) utilisés dans la présente étude font partie de la collection du laboratoire de phytopathologie (département de Biotechnologie) (**Figure 3**).

### 2) Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des grains d'orge (*Hordeum vulgare* L.), de variété Rihane 03. La semence de cette espèce est issue de CNCC (Centre National de Contrôle et de Certification) des semences d'El-harrach.



**Figure 3 :** Boîtes de Pétri contenant des isolats pour l'expérience cultivés sur le milieu de culture PDA.

### 3) Le sol

Le substrat utilisé pour l'expérience est un mélange de 2/3 sable et 1/3 tourbe, le sol a été désinfecté par la chaleur ; dans des sachets en papier à une température de 250° pendant 1 heure (**Rapilly., 1986**) dans le but d'éliminer le maximum de microorganismes telluriques, puis déposée dans des pots étiquetés munis d'un orifice de drainage à raison de 500g par pot.

## Méthodes

### 1. Purification des souches

La purification de ces champignons du genre *Clonostachys* spp a été réalisée après plusieurs repiquages par des transplantations successives de disques mycéliens des isolats testés sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) (**Jonsthor et Booth., 1983**) (Annexe 1).

## 2. Production, in vitro, des métabolites secondaires par les champignons du genre *Clonostachys* spp

### 2.1. Production d'acide indole acétique (AIA)

Le milieu solide LBT de Luria Bertani additionné au tryptophane (**Bric et al., 1991**) (Annexe 1) a été utilisé pour détecter la production d'AIA par les champignons du genre *Clonostachys* spp. Une membrane d'hémicellulose stérilisée à l'autoclave à 110°C pendant 20 min a été déposée sur le milieu de culture LBT et l'inoculation a été faite directement sur la membrane (trois répétitions pour chaque champignon). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 7 jours. Les membranes contenant les colonies montrant une bonne croissance sont prélevés et sont saturés dans une boîte de Pétri stérile en les plongeant directement dans le réactif de Salkowski (Annexe 1). Le témoin est représenté par une boîte de Pétri sans inoculum. Les champignons qui synthétisent de l'AIA sont identifiées par la formation d'un halo rouge brique ou marron.

### 2.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La production d'HCN par les champignons endophytes a été évaluée en utilisant la méthode de **Kloepper et al, (1991)** avec quelques modifications. Sur un milieu PDA additionné de 4,4g/l de glycine (Annexe 1), les disques mycéliens sontensemencés, des disques de papier Wattman n°1 saturés en picrate alcalin (2,5 g d'acide picrique + 12,5g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 1L d'eau) sont déposés dans les couvercles des boîtes de pétri, ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 7 jours. Le virage de la couleur du jaune vers le brun clair indique la production d'HCN. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque champignon, le témoin négatif est représenté par une boîte de pétri sans inoculum.

### 2.3. Production d'ammoniaque

L'ammoniaque peut avoir un effet inhibiteur, principalement sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogènes par l'alcalinisation du milieu (**Bounoua., 2008**). Selon **Dye, (1962)** ce test a été réalisé en cultivant les souches dans de l'eau peptonée dans des tubes, l'incubation est réalisée à 30°C pendant 4 jours. Après l'incubation, 1ml de réactif de **Nessler** a été ajouté à chaque tube. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub> (**Cappucino et Sherman., 1992**) (Annexe 1).

### 3. Production d'enzymes

#### 3.1. Phosphatase

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur le milieu Pikovskaya (PVK) bicalcique solide ; additionné de bleu de bromophénol (**Pikovskaya., 1948**) (Annexe 2). Des disques mycéliens issues de précultures fraîches sont repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK à raison de trois répétitions pour chaque souche fongique. Une boîte de pétri contenant le milieu PVK sans inoculum sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. La décoloration du milieu de Pikovskaya autour des spots est un indicateur d'une solubilisation des phosphates.

#### 3.2. Protéase

L'activité protéolytique a été déterminée en utilisant du lait écrémé agar (**Sunish Kumar et al., 2005**) (Annexe 2). On dépose les disques mycéliens sur ce milieu ; à raison de trois répétitions pour chaque souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. Après 2 jours d'incubation à 28°C, une zone claire autour de la colonie indique une activité protéolytique positive (**Smibert et Krieg., 1994**).

#### 3.3. Pectinase

Selon **Cattelan et al., (1999)**, on détermine la production de pectinase par les champignons endophytes. On utilise le milieu M9 agar (**Miller., 1974**) additionné de 10g de pectine et majoré de 1,2g d'extrait de levure (Annexe 3). On dépose les disques mycéliens sur milieu gélosé ; en raison de trois répétitions par boîte et une boîte sans champignons sert comme témoin incubé à 28°C pendant 2 jours. La présence d'un halo clair autour de la colonie indique une réponse positive pour la production de pectinase.

#### 3.4. Cellulase

La production de cellulase est déterminée par la méthode de **Cattelan et al., (1999)** en utilisant le milieu M9 agar (**Miller., 1974**) additionné de 10g de CMC et majoré de 1,2g d'extrait de levure. On dépose les disques mycéliens sur le milieu, trois répétitions ont été effectuées pour chaque champignon, le témoin négatif est représenté par une boîte de pétri sans inoculum. La présence d'un halo clair autour de la colonie indique une réponse positive pour la production de cellulase (Annexe 3).

## 4. Evaluation de la promotion de la croissance de l'orge

### 4.1. Préparation des colonies fongiques pour l'inoculation de la semence d'orge

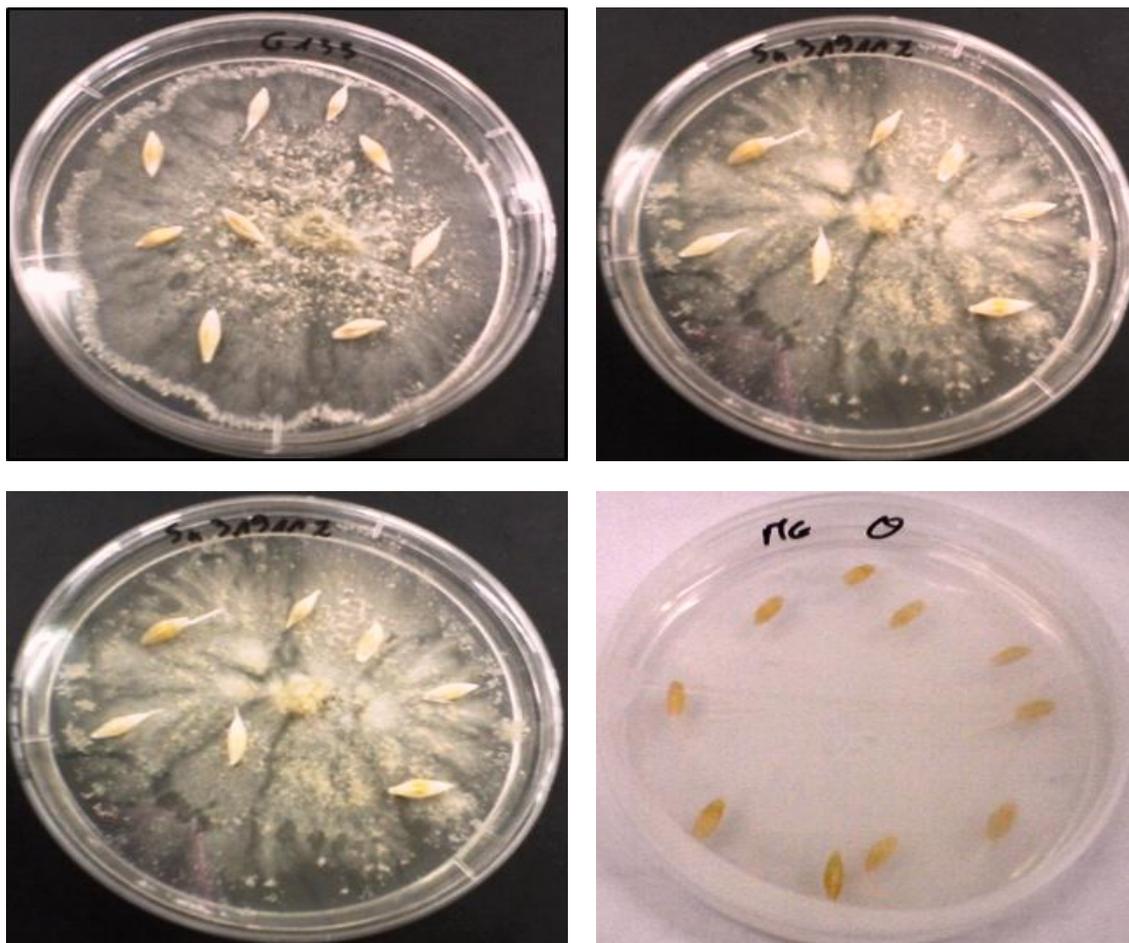
Les colonies fongiques du genre *Clonostachys* spp à inoculer ont été préparées à partir de culture préalablement purifiées. Les disques mycéliens sont directement repiqués dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1). Ces boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours.

### 4.2. Désinfection de la semence

Pour la désinfection de la semence de l'orge, nous avons suivi le protocole de **Macià-Vicente et al., (2008)**, la semence est désinfectée à l'eau de javel 12° avec une goutte de Twine 20 pendant une heure en agitation continue, la désinfection est suivie de 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile puis les graines sont séchées sur du papier Wattman stérile entre deux becs Bensun.

### 4.3. Mise en germination et inoculation des semences d'orge par les isolats fongiques

Les semences de l'orge préalablement désinfectées ont été directement placés dans les boîtes de pétri contenant les champignons endophytes (**Monfort et al., 2005**). Pour chaque champignon endophyte, 5 boîtes avec 8 à 9 graines par boîte ont été maintenues. Pour le témoin négatif, les graines ont été placées directement sur un milieu PDA sans inoculum (**Figure 4**). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72 heures.



**Figure 4 :** inoculation des graines d'orge par les isolats fongique du *Clonostachys rosea*

#### 4.4. Mise en place de la culture sous serre

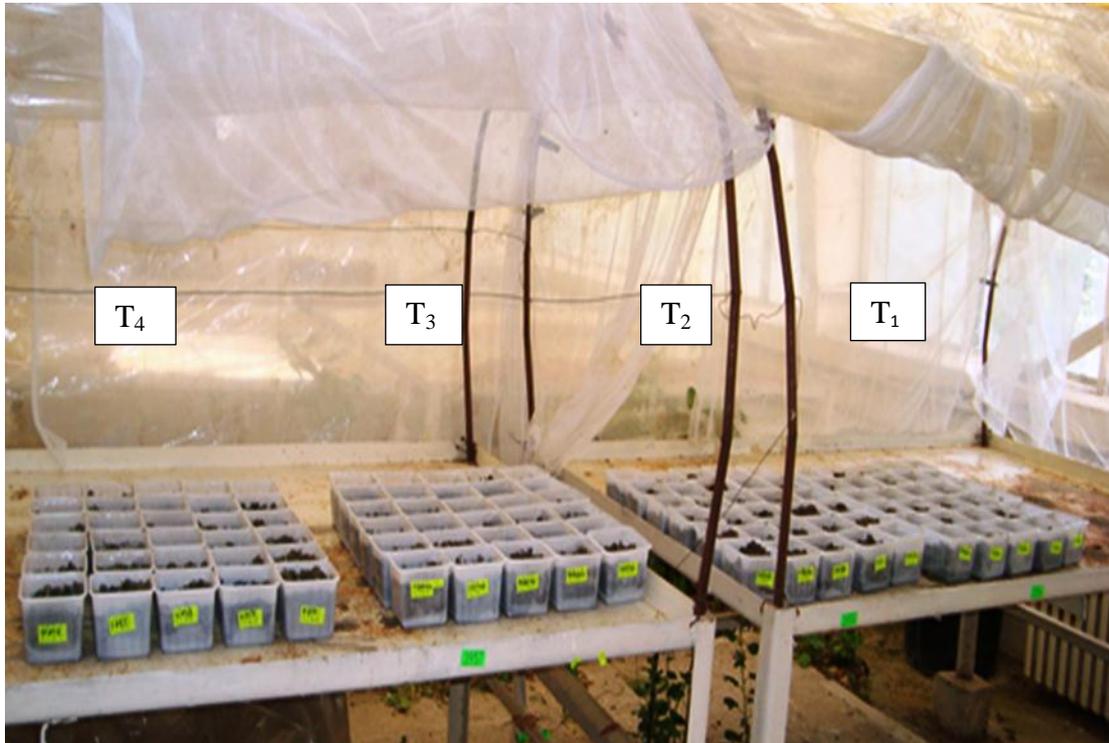
Les graines germées sont transplantées aseptiquement dans des pots ainsi préparés, sont répartis à raison de 30 pots par traitement pour l'évaluation de la promotion de la croissance et 1 pot pour tester le pouvoir colonisateur des champignons. Chaque pot contient 500g du substrat stérile et une seule semence germée.

#### 4.5. Dispositif expérimentale de l'essai sous serre

L'essai de la promotion de la croissance de l'orge ont été conduits sous serre ; selon un dispositif expérimental en bloc complet, le nombre de traitements était de 120 plants. Le dispositif est constitué de quatre traitements dont le nombre de répétitions pour chaque traitement est de 30 dans l'objectif d'avoir des résultats fiables et minimiser les risques

d'erreur. Pour chaque traitement, 1 pot a été ajouté pour l'évaluation ultérieure de la capacité de la colonisation racinaire par les champignons du genre *Clonostachys* spp (**Figure 5**).

Les plants inoculés sont arrosés régulièrement avec de l'eau stérile pendant une période de six semaines, avec une fréquence d'arrosage de deux fois par semaine.



**Figure 5** : Dispositif expérimental en bloc complet, représentatif de l'essai *in planta* d'inoculation de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) par les isolats du *Clonostachys rosea*.

**T<sub>1</sub>** : Le témoin (semence d'orge sans inoculum). **T<sub>2</sub>** : semences de l'orge germées en présence d'une souche du *Clonostachys rosea* (Sn181022). **T<sub>3</sub>** : Semences de l'orge germées en présence d'une souche du *Clonostachys rosea* (Sn319112). **T<sub>4</sub>** : Semences de l'orge germées en présence de la souche (G133) du *Clonostachys rosea*.

## 5. Evaluation de la promotion de la croissance de l'orge

Pour évaluer les effets des champignons du genre *Clonostachys* spp sur la biostimulation de l'orge, nous avons mesurés les paramètres de croissance relative au développement de la partie aérienne et racinaires.

## 5.1. Paramètre de croissance

Après six semaines qui suit la transplantation ; des mesures des paramètres de croissance ont été effectuées.

### 5.1.1. La longueur de la partie aérienne

La longueur de la partie aérienne a été mesurée à l'aide d'une règle à partir du collet jusqu'au sommet de la tige principale puis la moyenne a été calculée pour chaque traitement.

### 5.1.2. La longueur du système racinaire

La longueur du système racinaire a été mesurée à partir de la fin de l'extrémité basale du collet jusqu'à la fin de chevelu racinaire.

### 5.1.3. Poids frais et sec de la partie aérienne et racinaire

Toutes les plantes ont été coupées au niveau du collet et pesées immédiatement pour éviter les pertes en eau. Une fois le poids frais des deux parties est notés, les fragments sont déposées dans du papier aluminium et placée dans le four Pasteur à une température de 105°C pendant 48 heures pour évaluer le poids sec des deux parties, aérienne et racinaire.

## 6. Colonisation racinaire par les champignons du genre *Clonostachys rosea*

### 6.1. Test de confirmation de la colonisation racinaire sur milieu de culture en boîtes de Pétri :

A la fin de l'expérimentation et dans le but de vérifier le pouvoir colonisateur des champignons du genre *Clonostachys* spp. nous avons jugé nécessaire d'estimer le taux de colonisation des racines par les trois souches du *Clonostachys rosea*. Tout d'abord, on procède à une désinfection de la surface des racines en les trempant dans une solution d'hypochlorite à 1% pendant une minute suivie par trois rinçages à l'eau distillée stérile et sécher sur papier filtre (Macià-Vicente et al., 2008).

Les racines sont ensuite coupées en fragments d'environ 1cm puis placées sur milieu PDA supplémenté d'une goutte de triton à raison de 10 fragments par boîtes, le nombre de répétitions pour chaque traitement est de trois. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 10 jours. La colonisation a été évaluée quotidiennement pendant 10 jours pour déterminer le taux de colonisation (TC) (Petrini et al., 1992), selon la formule :

$$\text{Taux de colonisation (TC)} = \frac{\text{nombre des fragments avec endophytes}}{\text{Nombre total des fragments}} \times 100$$

### 6.2. Test de confirmation de la colonisation racinaire sous microscope :

Ce test est réalisé par la technique de double coloration qui consiste :

Tout d'abord, on réalise des coupes minces de racines (coupes longitudinale et coupes transversales) suivi par à une désinfection de la surface de ces coupes à l'aide d'un trempage dans l'eau de Javel pendant 10 à 15 min suivie par un rinçage avec de l'eau distillée stérile pendant 10 à 20 min. Les coupes sont ensuite placés dans une solution d'acide acétique pendant 1min suivie par le rinçage par l'eau distillée stérile pendant 10 à 20 min ensuite sont colorées dans une solution de vert de méthyle 5 à 10 min après les rincés par l'eau distillée stérile, et à la fin les coupes de racines sont placés dans une solution de rouge Congo pendant 10 min et rincé par l'eau distillée stérile. L'observation des coupes est réalisée au microscope optique Gx32.

## **Résultats**

## **1. Production in vitro des métabolites secondaires par *Clonostachys rosea***

### **1.1. Production d'acide indole acétique (AIA)**

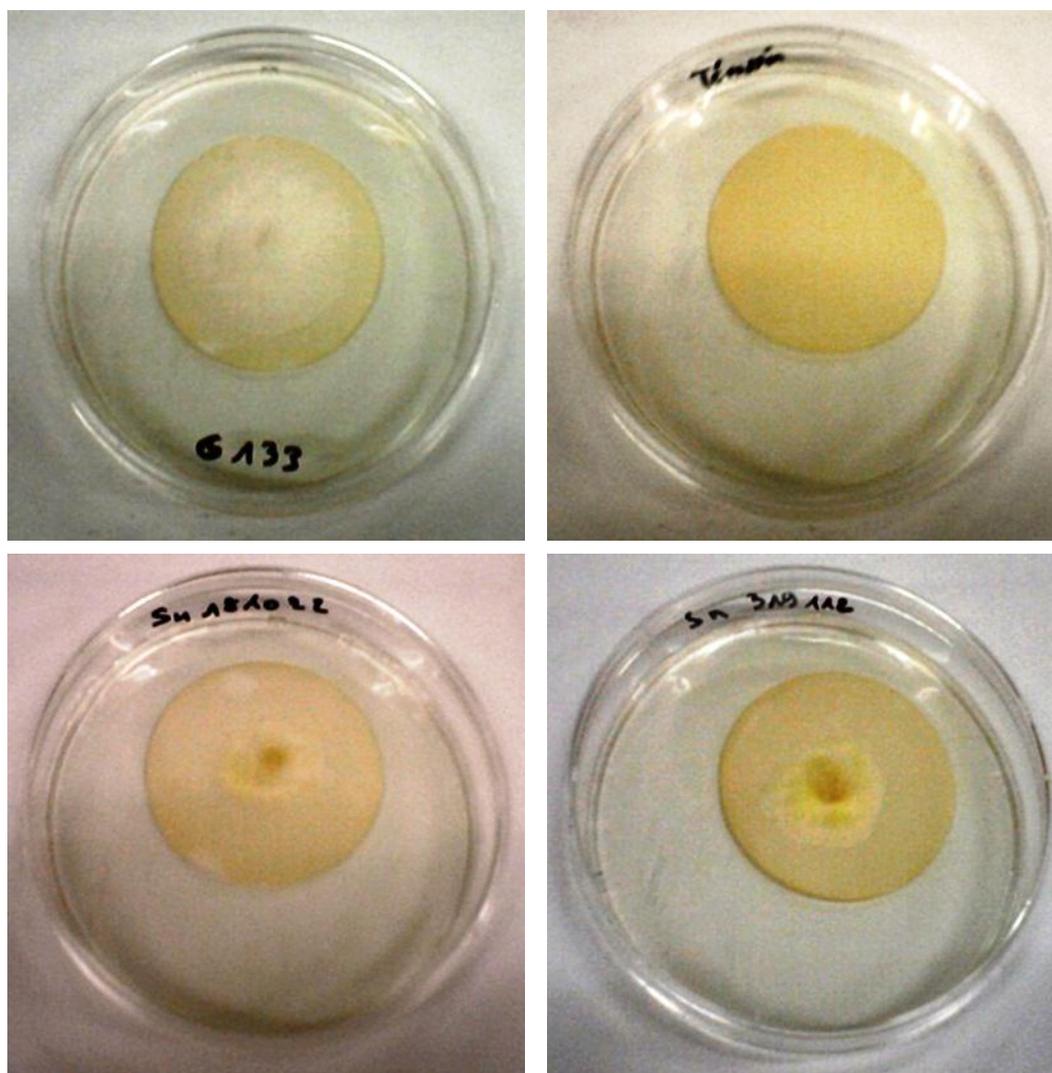
Les isolats fongiques du genre *Clonostachys rosea* n'ont pas la capacité de produire l'acide indole acétique malgré l'addition d'un réactif révélateur (le réactif de Salkowsky) (**Figure 6**) (**Tableau 4**).

### **1.2. Production d'acide cyanidrique (HCN)**

Les trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* (G133, Sn319112, Sn181022) n'ont produit pas l'acide cyanhydrique ; révélé par la couleur du papier Wattman qui reste jaune (**Figure 7**) (**Tableau 4**).

### **1.3. Production d'ammoniaque**

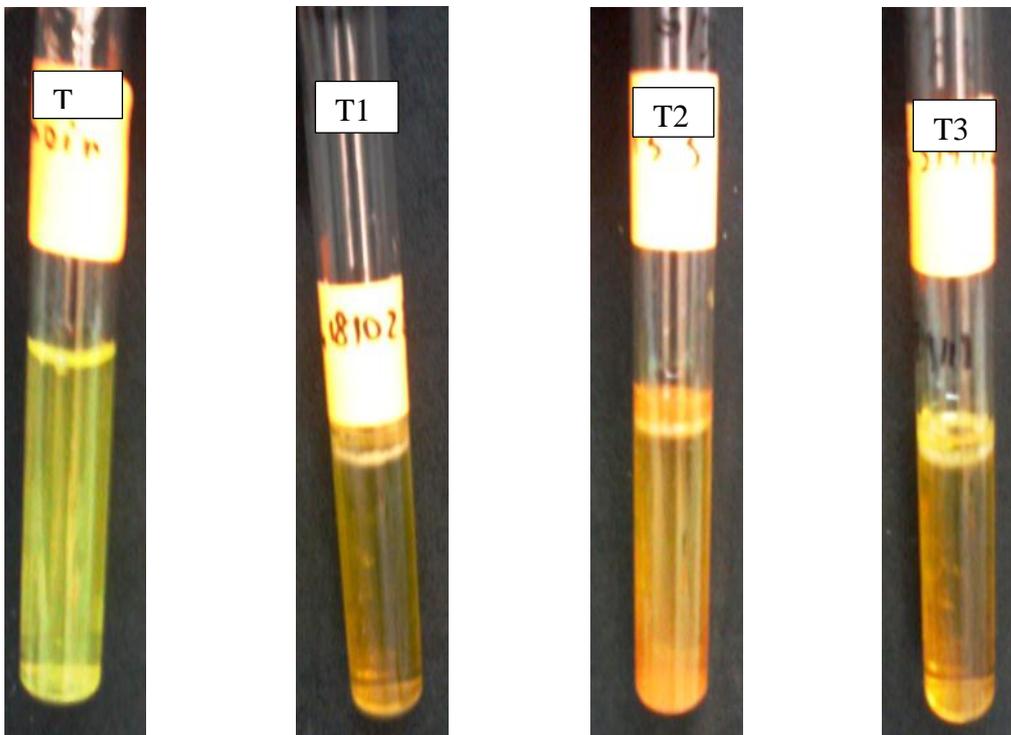
Les trois isolats fongiques du genre *Clonostachys rosea* (G133, Sn319112, Sn181022) produisent l'ammoniaque qui est révélée par l'apparition d'une couleur jaune ou orange (**Figure 8**) (**Tableau 4**).



**Figure 6 :** les isolats fongiques du *Clonostachys rosea* ne produisent pas l'AIA.



**Figure 7 :** Les trois isolats du *Clonostachys rosea* ne produisent pas l'HCN.

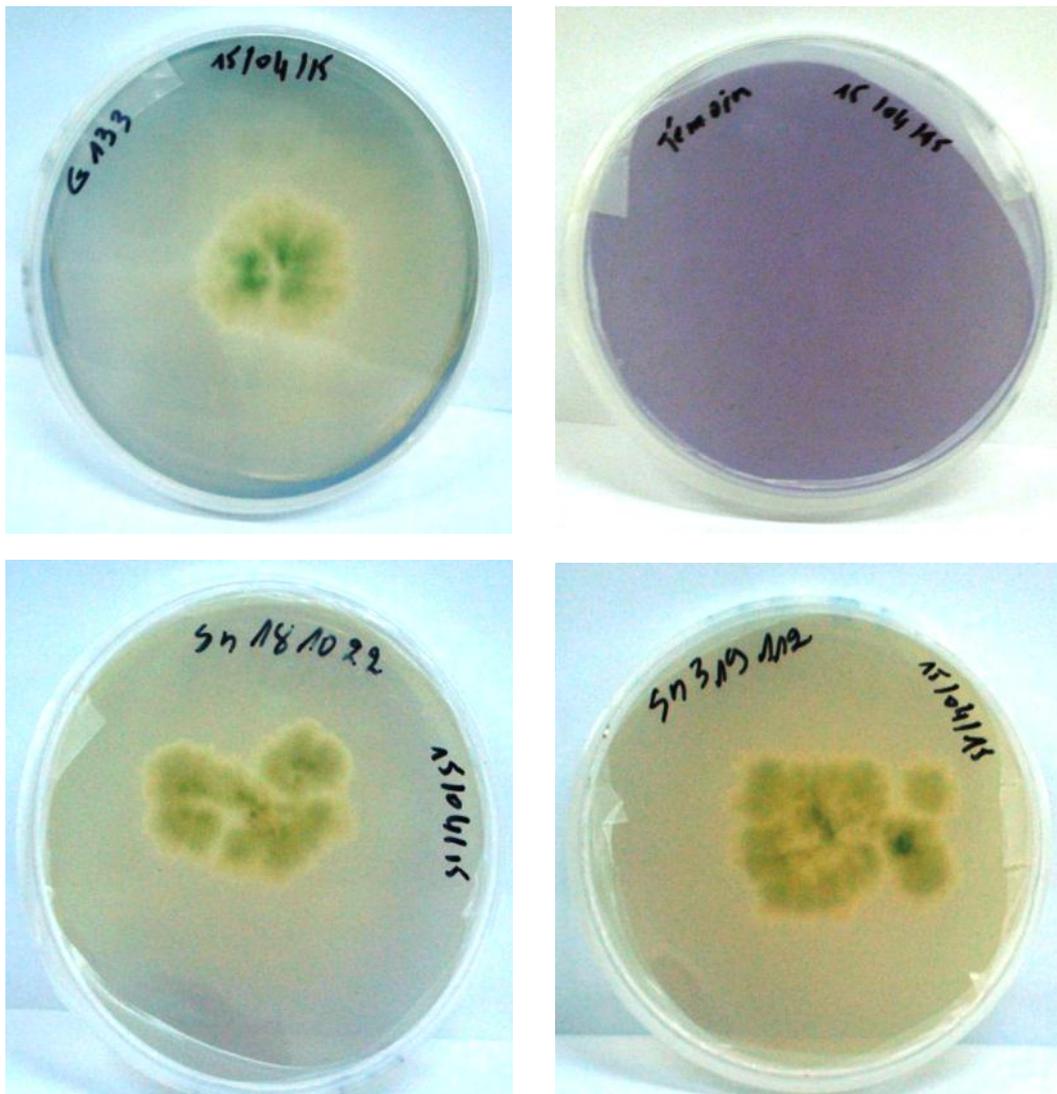


**Figure 8 :** Production d' $\text{NH}_3$  par les trois isolats du *Clonostachys rosea*.

## 2. Production d'enzymes

### 2.1. Production de phosphatase

Le test de solubilisation du phosphore montre que les trois isolats fongiques G133, Sn319112 et Sn181022 étaient capables de solubiliser le phosphore inorganique sous forme bicalcique. La solubilisation de phosphore est présentée par un changement de couleur du milieu de culture (**Figure 9**) (**Tableau 4**).



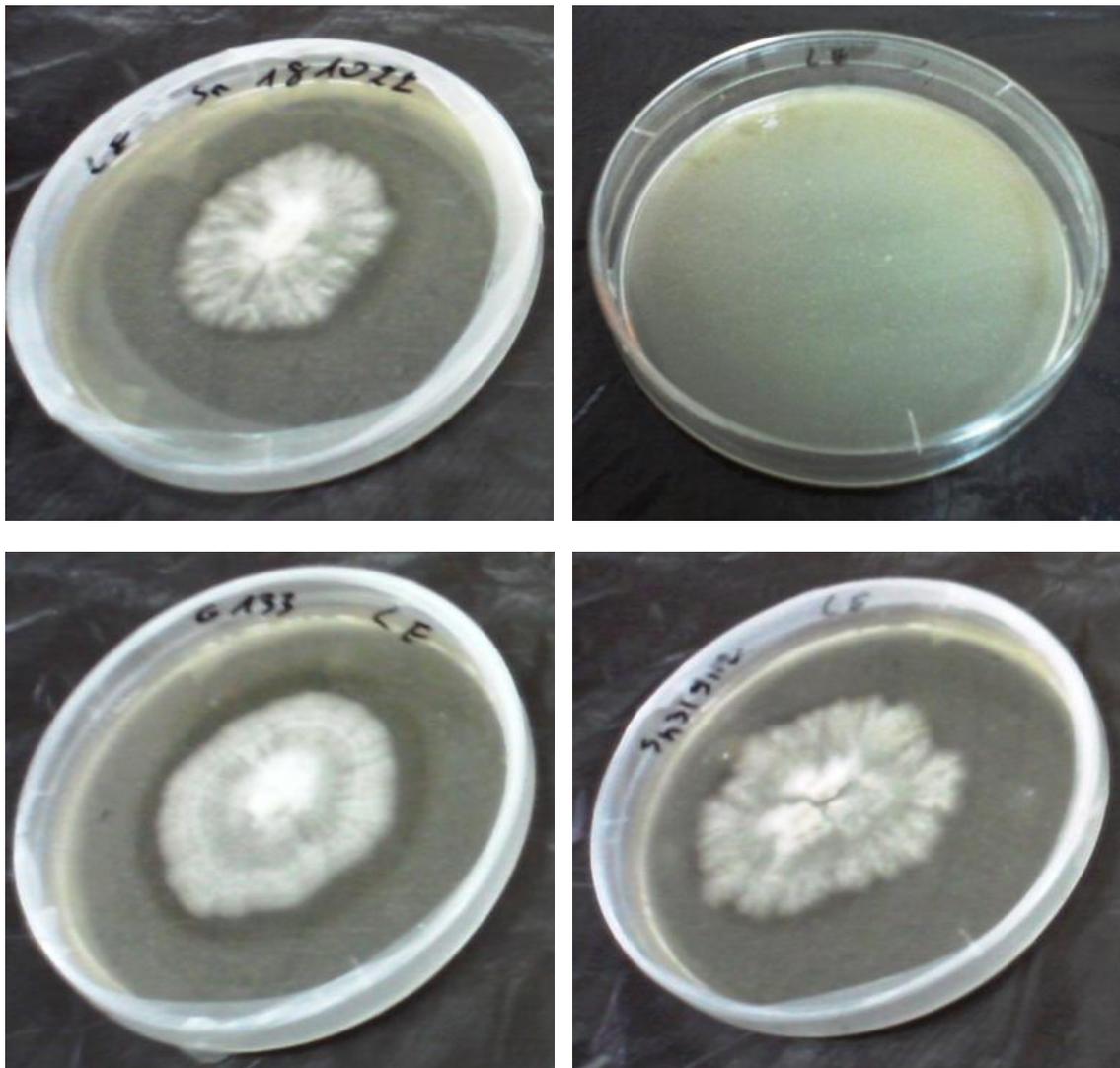
**Figure 9:** Solubilisation du phosphore bicalcique par les isolats fongiques du *Clonostachys rosea*.

## 2.2. Production de protéase

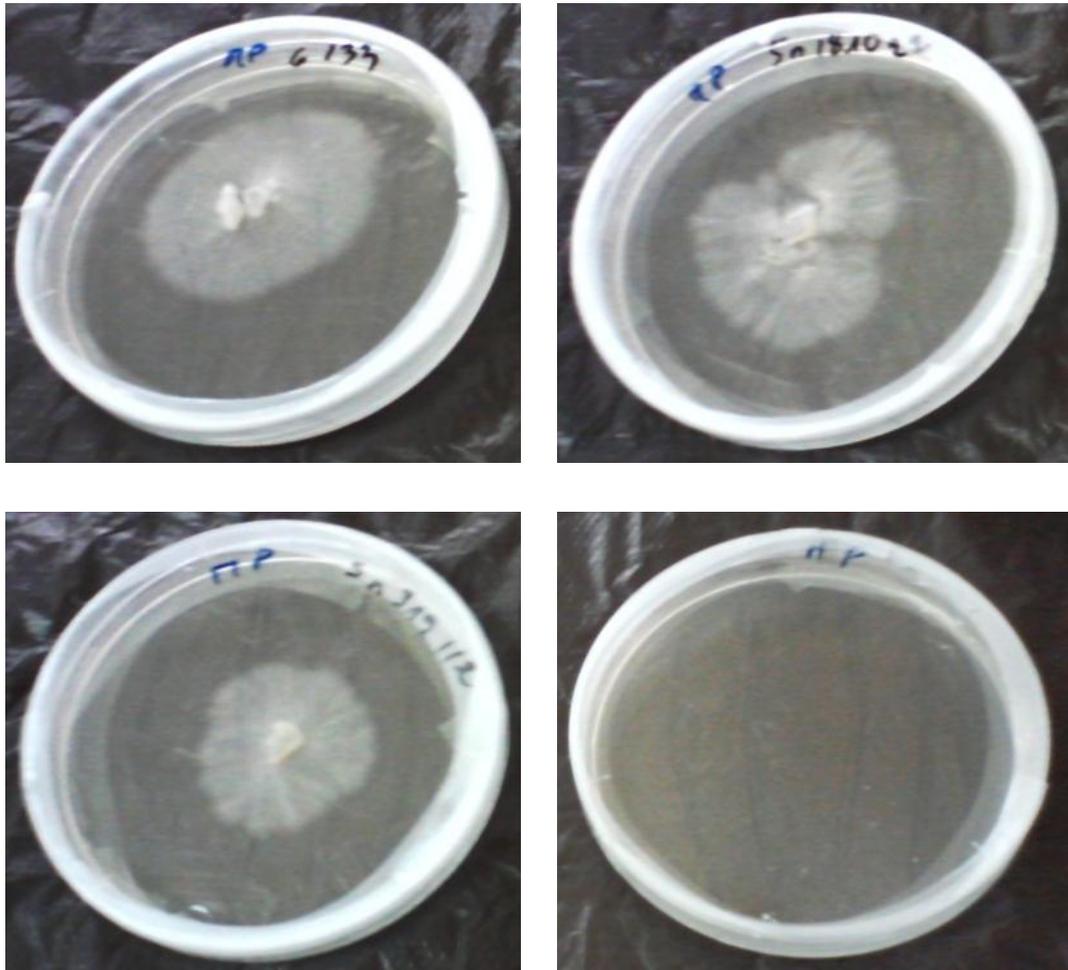
Les trois isolats fongiques produisent la protéase après 48 heures d'incubation, qui se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**Figure 10**) (**Tableau 4**).

## 2.3. Production des pectinases

D'après ce test on a constaté que les trois isolats fongiques n'ont pas la capacité de produire la pectinase qui dégrade la pectine (**Figure 11**) (**Tableau 4**).



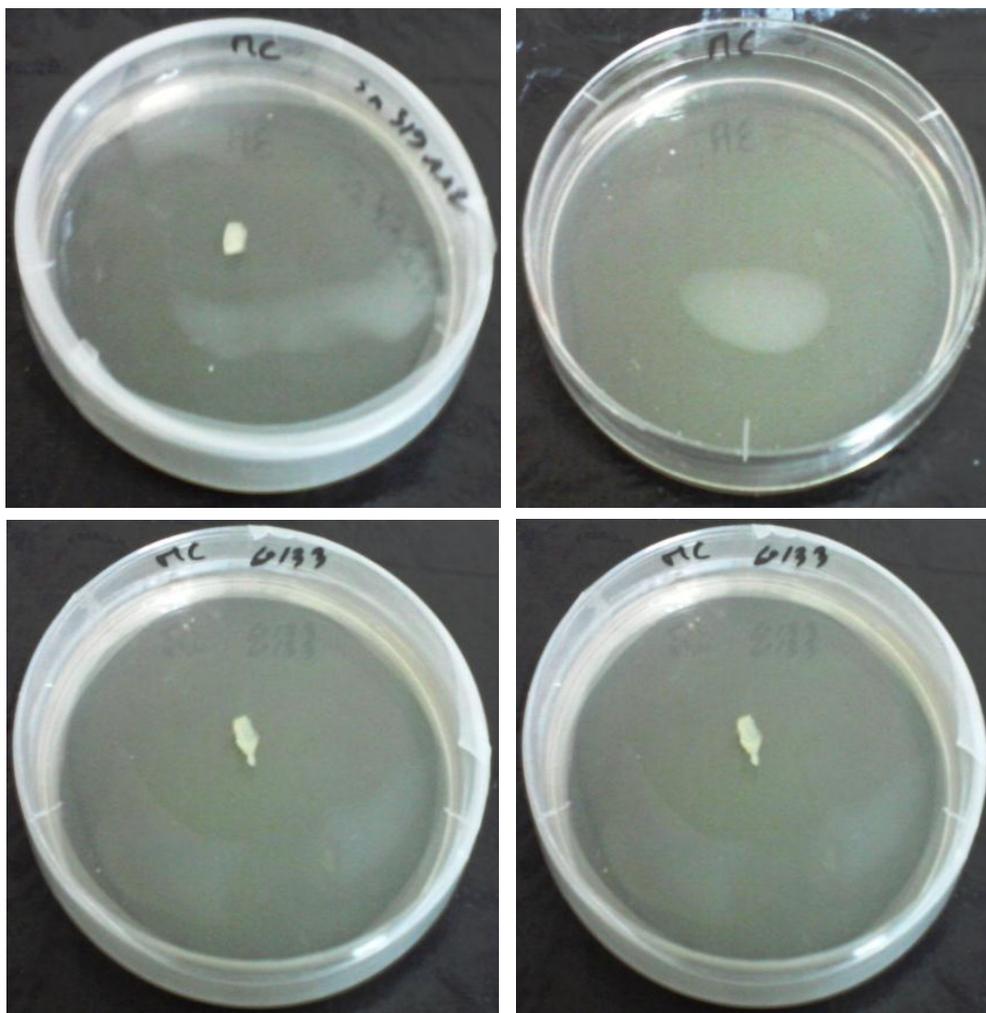
**Figure 10 :** Production de protéase par les isolats fongiques.



**Figure 11** : les isolats fongiques du *Clonostachys rosea* ne produisent pas la pectine.

#### 2.4. Production des cellulases

Les trois isolats fongiques n'ont pas la capacité de produire la cellulase qui dégrade la cellulose (**Figure 12**) (**Tableau 4**).



**Figure 12:** les isolats fongiques du *Clonostachys rosea* ne produisent pas la cellulase.

**Tableau 4 :** production des métabolites secondaires et des enzymes

Isolats fongiques	Métabolite secondaire			Enzyme			
	AIA	HCN	NH <sub>3</sub>	P	Pc	Pr	Ce
Sn181022	-	-	+	+	-	+	-
Sn319112	-	-	+	+	-	+	-
G133	-	-	+	+	-	+	-

+ : production.

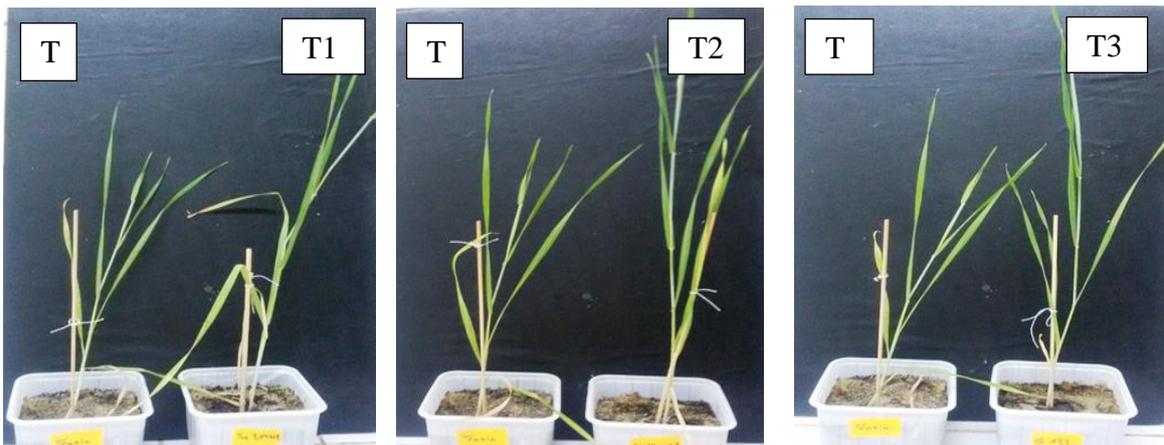
- : pas de production.

### 3. Evaluation de la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) par *Clonostachys rosea*

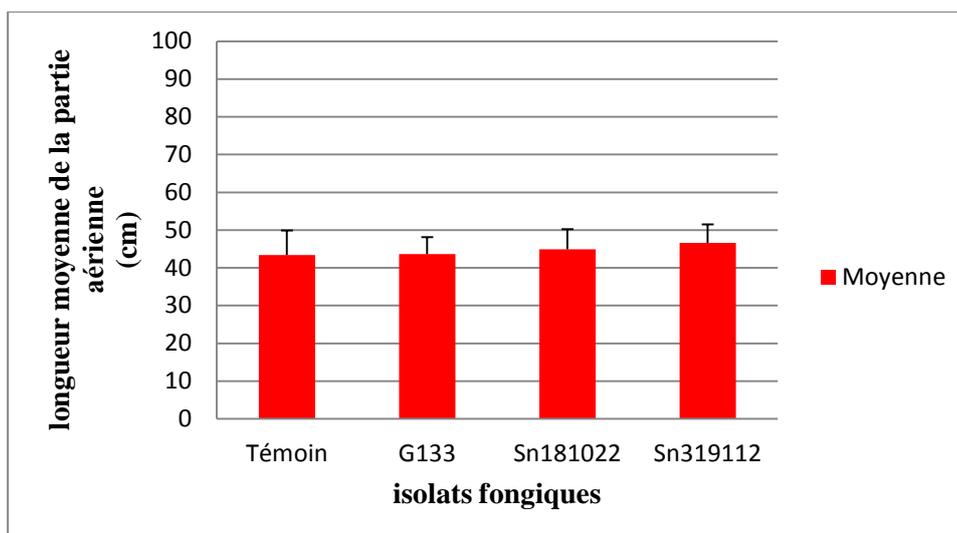
#### 3.1. Effet des isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sur le développement de la partie aérienne

##### 3.1.1. Effet des trois isolats du *Clonostachys rosea* sur la longueur moyenne de la partie aérienne

D'après nos résultats, nous avons remarqué que l'inoculation de la semence de l'orge par les champignons du *Clonostachys rosea* a engendré une différence nette de la longueur de la partie aérienne de trois traitements par rapport au témoin (**Figure 13**)



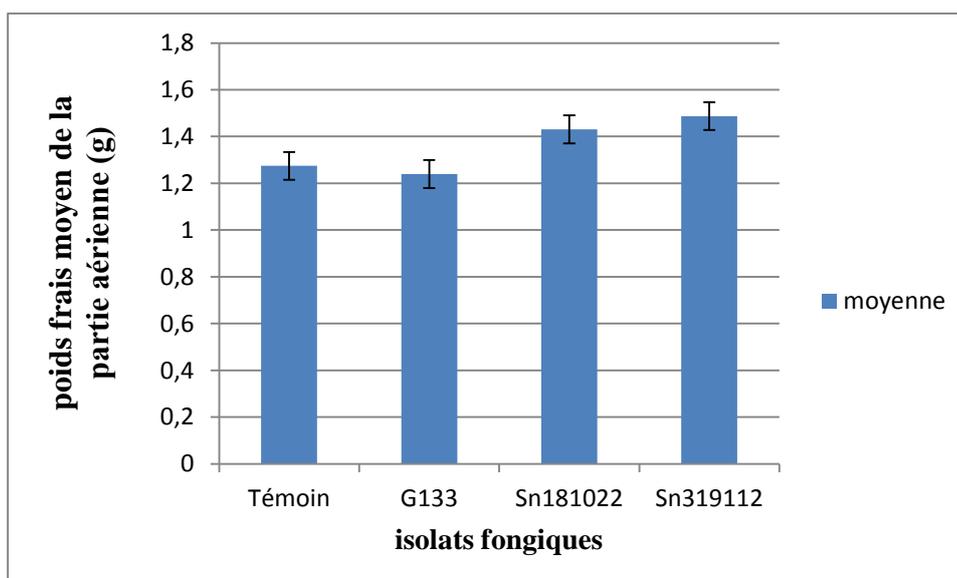
**Figure 13** : plants d'orge après six semaines de l'inoculation.



**Figure 14 :** Effet des isolats du *Clonostachys rosea* sur la longueur moyenne de la partie aérienne.

D'après la **figure 14**, nous avons trouvé que la meilleure longueur de la partie aérienne a été enregistrée chez les plantes inoculées par la souche Sn319112 avec une longueur de 46,62 cm par rapport au témoin 43,34 cm. Ceci nous ramène à dire que la souche Sn319112 a un effet bénéfique sur la longueur de la partie aérienne.

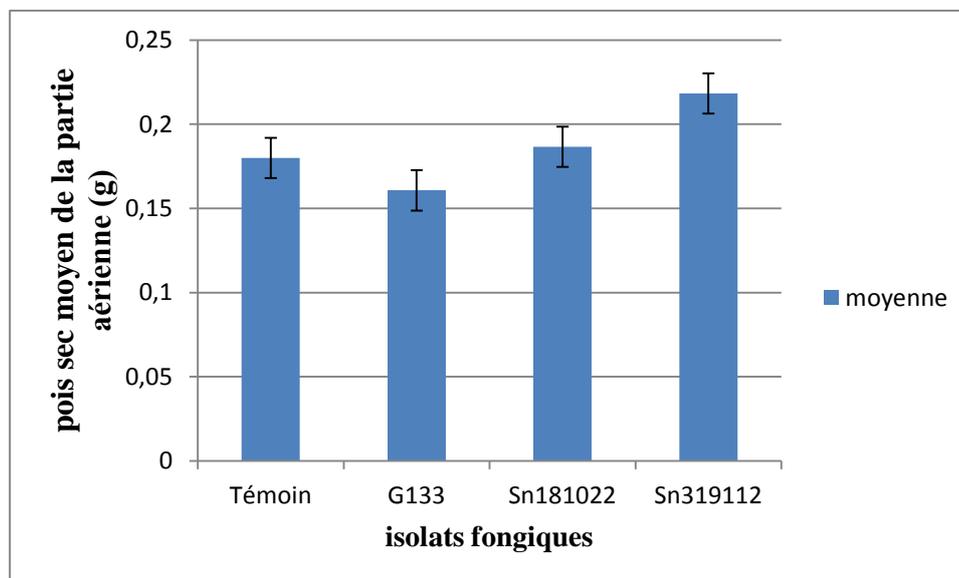
### 3.1.2. Effet des isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie aérienne



**Figure 15 :** Effet de l'inoculation des isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie aérienne.

En ce qui concerne le poids frais moyen de la partie aérienne, l'analyse de **la figure 15** a montré que le meilleur poids frais est enregistré chez la souche Sn319112 avec un poids de 1,48 g par rapport au témoin (1,27 g).

### 3.1.3. Effet des trois isoats du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie aérienne



**Figure 16 :** Effet de l'inoculation des isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie aérienne.

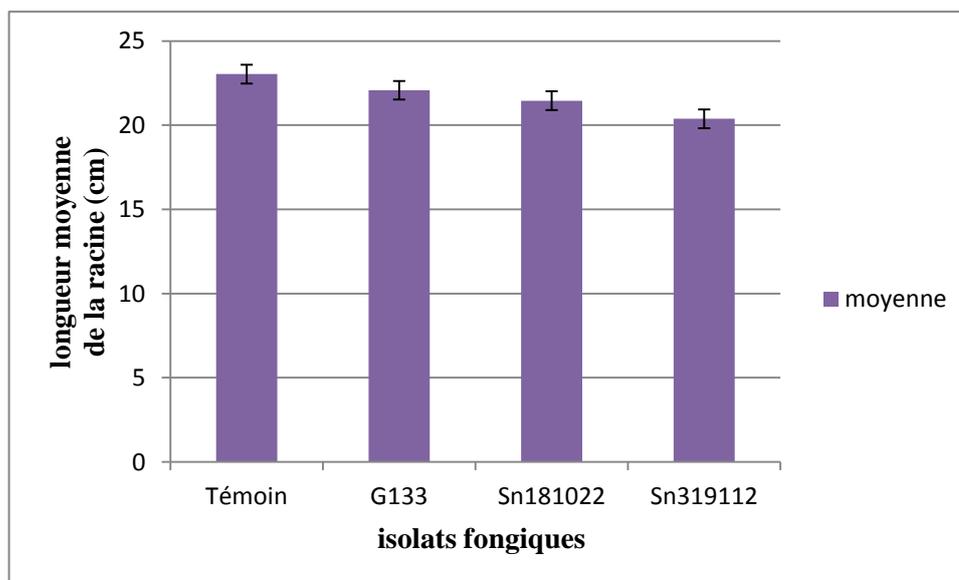
Les résultats obtenus dans **la figure 16** montrent que le poids sec moyen de la partie aérienne est plus élevé chez la souche Sn319112 avec une valeur de 1,28 g par rapport au témoin 1,18 g, alors que la souche G133 présente le plus faible poids.

## 3.2. Effet des champignons du genre *Clonostachys* sur la partie racinaire

### 3.2.1. Effet isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sur la longueur moyenne de la racine



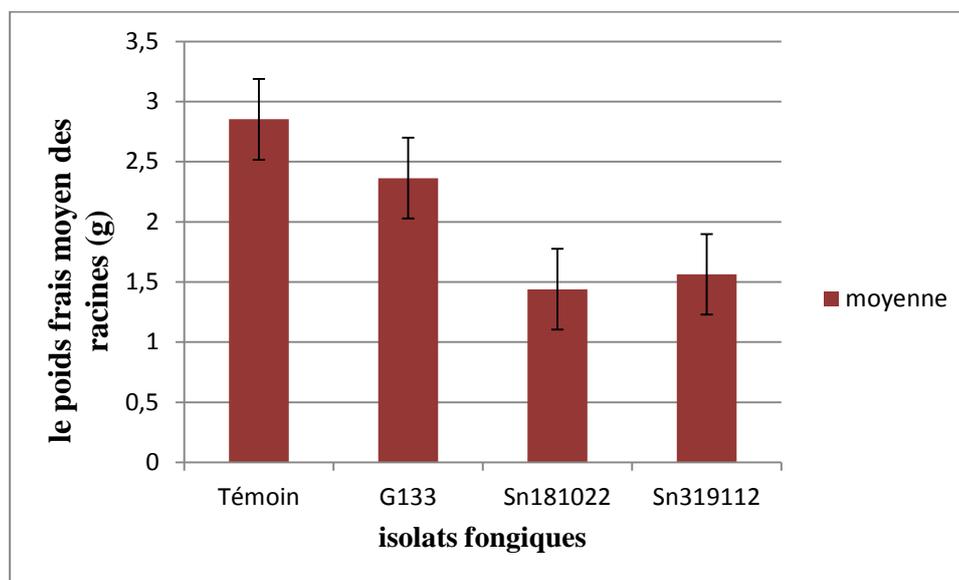
**Figure 17 :** la longueur de la racine après six semaines de l'inoculation par les isolats fongiques du *Clonostachys rosea*.



**Figure 18 :** Effet des trois isolats fongiques sur la longueur moyenne de la partie racinaire.

On observe sur **la figure 18**, que les témoins présentent une meilleure longueur de la partie racinaire (23,03) alors que la souche G133 présente une valeur plus élevée (22,06) par rapport aux autres isolats fongiques. Ceci nous ramène à dire que les trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* n'ont pas un effet sur le développement racinaire.

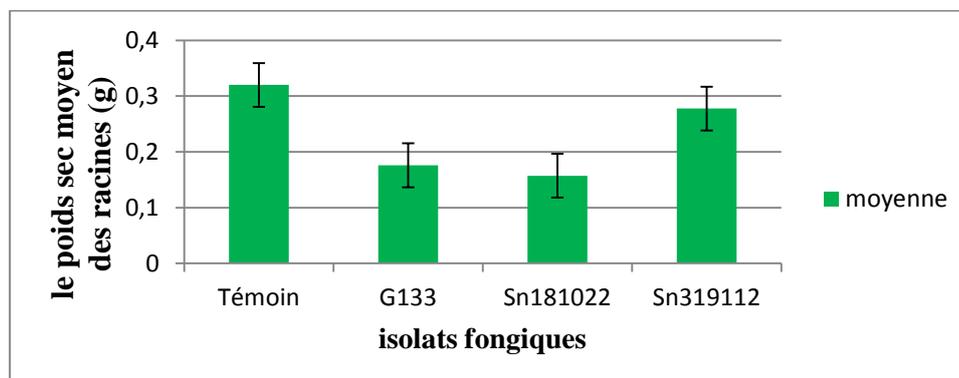
### 3.2.1. Effet des trois souches du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie racinaire



**Figure 19 :** Effet des trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie racinaire.

Concernant le poids frais moyen de la partie racinaire (**figure 19**), on remarque que les témoins présentent un poids frais moyen de la partie racinaire plus élevé que les autres isolats fongiques (2,85 g). Alors que la souche G133 présente une valeur plus élevée (2,36 g) par rapport aux autres isolats fongiques.

### 3.2.2. Effet des trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie racinaire.

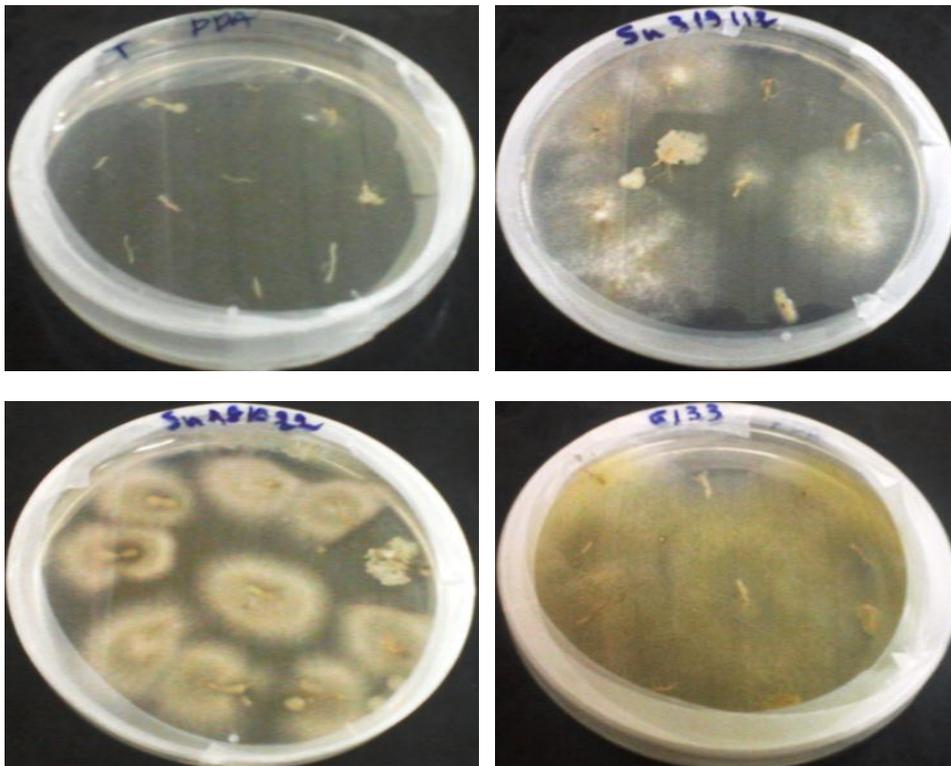


**Figure 20 :** Effet des trois isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie racinaire.

D'après la **figure 20**, on remarque que l'inoculation par les trois souches du *Clonostachys rosea* présente une diminution du poids sec moyen de la partie racinaire par rapport aux témoins. L'illustration montre aussi que la meilleure souche fongique est Sn319112 qui présente un poids sec élevé (0,27 g).

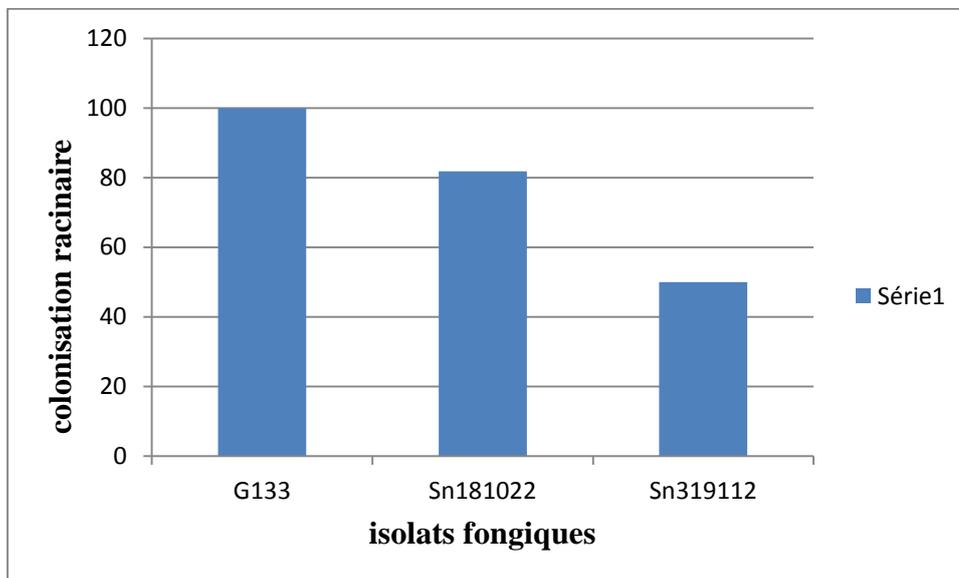
#### 4. Colonisation racinaire par les champignons du genre *Clonostachys rosea*

Pour l'évaluation du taux de la colonisation des racines de l'orge par les trois champignons endophytes, des fragments de racines désinfectés ont été placés sur un milieu PDA et après 10 jours d'incubation, le taux de la colonisation racinaire par les trois champignons a été déterminé. Selon les résultats obtenus, nous remarquons une colonisation intense des fragments des racines traités par les endophytes testés (**Figure21**) avec un taux de la colonisation racinaire qui dépasse 50% pour les trois souches fongiques testées.



**Figure 21** : colonisation racinaire des plants d'orge par les champignons du genre *Clonostachys rosea* sur un milieu PDA.

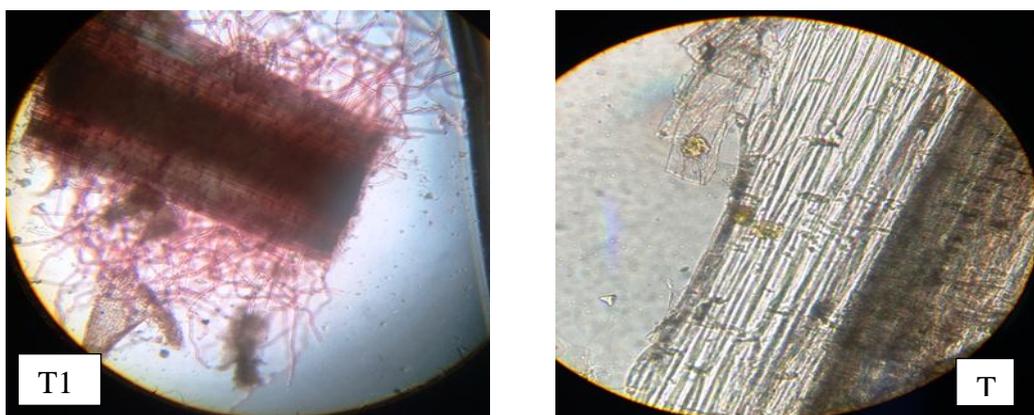
Les fragments traités avec la souche G133 a enregistré le taux le plus marqué (100%) suivie par la souche Sn181022 (81.81%) tandis que la souche Sn319112 a enregistré le taux de colonisation le plus faible (50%) (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Taux de colonisation racinaire par les isolats du genre *Clonostachys rosea*.

### Technique de double coloration

L'observation des coupes des racines d'orge par le microscope optique (**Figure 23**) confirme la capacité des souches de *Clonostachys* pour coloniser une gamme variée des plantes.



**Figure 23 :** observation des coupes des racines d'orge sous le microscope optique.

**T :** Témoin (coupes des racines sans inoculum) ; **T1 :** coupes de racines inoculées par l'isolat (G133) du *Clonostachys rosea*.



## **Discussion**

La rhizosphère ainsi que les racines des plantes renferment une collection de microorganismes qui peuvent avoir un impact positif sur la croissance et la santé des plantes (**Ahmad et al., 2008**).

Plusieurs champignons non pathogènes ont été révélés promoteurs de la croissance des plantes. Ils ont été rapportés d'être bénéfiques pour plusieurs cultures non seulement par la promotion de la croissance mais aussi par la protection contre les stress biotiques et abiotiques (**Shivanna et al., 1996**). Les champignons endophytes établissent une relation plus étroite avec leur plante hôte et peuvent de ce fait interagir plus longtemps avec la plante (**Hallmann et al., 1997**).

*Clonostachys rosea* est un antagoniste fongique, très efficace réduit le développement d'une gamme très large de pathogènes (**Jensen et al., 2004 ; Ndiaye., 2007**). Il a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et les insectes morts, sur les nématodes et sur de nombreux champignons (**Schroers et al., 1999**).

Cet antagoniste peut agir par plusieurs mécanismes d'actions, le mycoparasitisme, la compétition pour les nutriments disponibles, l'activité enzymatique, l'antibiose et la résistance induite (**Sutton et al., 1997**).

Notre étude menée sur l'évaluation de l'effet des trois champignons du genre *Clonostachys* spp. (G133, Sn319112, Sn181022) de promouvoir la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare* L.), et leurs capacités *in vitro* de produire quelques métabolites secondaires a révélée des résultats plus au moins satisfaisants.

Le test *in vitro* de la production de métabolites plus spécialement l'AIA et l'HCN a révélé que les trois isolats de *Clonostachys* spp. (G133, Sn319112, Sn181022) sont incapables de synthétiser la phytohormone et le composé volatile mais il est possible qu'elles produisent d'autres métabolites comme l'ammoniaque qui est produite par ces trois isolats du genre *Clonostachys* spp..

L'ammoniaque peut avoir un effet inhibiteur, principalement sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogènes par l'alcalinisation du milieu (**Bounoua., 2008**). Donc l'ammoniaque peut stimuler la croissance indirectement par leur utilisation dans la lutte biologique.

Le test de la solubilisation du phosphore montre que les trois isolats fongiques solubilisent le phosphate. Cette solubilisation est indiquée par un changement de couleur du milieu de culture. La solubilisation du phosphore est souvent rapportée par la production des acides organiques et l'abaissement du pH du milieu. L'inoculation par des microorganismes solubilisateurs du

phosphore augmente la productivité de plusieurs cultures économiquement importantes telles que le blé, la luzerne et le soja (**Ratul et al., 2012**).

La Protéase ; est une enzyme qui dégrade les protéines, elle est produite par les trois isolats fongique du genre *Clonostachys rosea*. Le test de pectinase a révélé que les trois isolats fongiques n'ont pas la capacité de produire cette enzyme malgré que *Clonostachys rosea* soit capable de produire d'autres enzymes tel que les chitinases, les glucanases, les protéases (**Lorito et al., 2010**). Les trois isolats fongiques n'ont pas la capacité de produire la cellulase.

*Clonostachys rosea* est un mycoparasite dans lequel les enzymes dégradant les parois des cellules telles que les chitinases et les sérine-protéases jouent un rôle important par le parasitisme des pathogènes fongiques de plantes (**Geremia., 1993; Carsolio, 1994**) Un total de 55 gènes codant pour des enzymes de dégradation des parois cellulaires ont été identifiés, y compris 32 glucanases, 14 protéases, et 9 chitinases. En outre, 19 gènes codant des transporteurs ABC ont été identifiés qui pourraient être impliqués dans la détoxification des métabolites toxiques sécrétées par le champignon pathogène (**Kosawang et al., 2014**).

Un groupe d'agents de lutte biologique (ABC) a inclus les champignons mycotrophes tels que *Trichoderma* spp. et *Clonostachys* spp. qui ont la capacité de parasiter et tuer d'autres champignons (mycoparasitisme) et d'utiliser la biomasse fongique morte (saprophyte) (**Druzhinina et al., 2011**). Ces champignons peuvent parasiter les champignons phytopathogènes directement par sécrétion dans la paroi cellulaire des enzymes dégradant les chitinases, les  $\beta$ -1,3-glucanases, des  $\beta$ -glucanases et 1,6-protéases, et des antibiotiques tels que peptaïbols, la gliotoxine, viridin et 6-pentyl-2 H -pyranne-2-one (**Lorito et al. , 2010 ; Druzhinina et al., 2011 ; Mukherjee et al 2012**), mais aussi grâce à la concurrence pour l'espace et les nutriments.

Des tests réalisés au laboratoire en France ont permis de sélectionner une souche de *Clonostachys rosea* capable de contrôler le développement des maladies du bois de la vigne causée par *Eutypa lata* et *Phaeomoniella chlamydospora*. Parmi d'autres micro-organismes testés en protection des plaies de taille seule la souche de *Clonostachys rosea* semble intéressante pour pouvoir contrôler le développement d'*Eutypa lata* et de *Phaeomoniella chlamydospora* (**Anonyme., 2005**).

Des travaux de recherche effectués par **Ndiaye (2007)** ont montré que le traitement du compost avec *C. rosea* peut protéger efficacement la culture du niébé en réduisant significativement le taux d'infection de *Macrophomina phaseolina*.

Selon **Sutton (1994)**, *C. rosea* est efficace aussi bien à basse température (10 – 15°C) qu'à haute température (20 – 25°C) en supprimant *Botrytis cinerea* sur les fruits de 85% à 100%.

Des résultats très satisfaisants de *C. rosea* contre l'agent causal de la pourriture grise des fruits *Botrytis cinerea* en traitement des fruits en conservation ont été signalés au Brésil (**Sutton et al., 1997**).

La souche ACM941 de *C. rosea* utilisé en traitement des semences, colonise la rhizosphère et les racines et permet une augmentation du développement de la plante. En outre, il réduit significativement l'infection des plantules par un complexe de champignons tels qu'*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* et *Sclerotinia sclerotiorum*, qui causent la fonte de semis sur le pois (*Pisum sativum*) (**Xue., 2002**).

Le test *in planta* de la promotion de la croissance par l'utilisation des trois isolats du *Clonostachys rosea* (G133, Sn319112, Sn181022).

La souche Sn319112 est induit une phytostimulation des plants de l'orge. Cette augmentation de la croissance s'est traduite par une augmentation de la biomasse aérienne. Alors qu'elle n'a pas un effet sur la croissance de la partie racinaire par contre **Ravnskov et al., 2006** a montré que *C.rosea* lk726 a un effet stimulateur de la croissance des plants de tomate grâce principalement à une solubilisation plus accrue du phosphore .

**James et William (2007)** ont breveté le 27 Septembre 2007 au Canada la souche *C. rosea* 88-710, apte à inciter la vigueur, la santé, la croissance et le rendement des végétaux. En effet, sous forme d'inoculum, le champignon peut agir en symbiose avec les bactéries *rhizobium* pour stimuler et produire un effet additionnel sur le développement de nodules fixateurs d'azote des légumineuses et sur l'augmentation de la croissance des fèves, du soja, des pois et de l'alfalfa notamment.

*Clonostachys rosea* est considéré comme un agent de lutte biologique efficace contre plusieurs phytopathogènes ce qui confirme les résultats de **Hamel et Samet (2011)** que les souches de *Clonostachys* spp . ont un pouvoir mycoparasitaire à l'égard des souches de trois champignons pathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* et *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*) donc c'est un agent de biocontrol très efficace.

D'après le test de colonisation racinaire sur boîte de pétri et sous microscope optique *clonostachys rosea* est bien colonisé les racines d'orge ce que peut conférer à la plante une plus

---

grande capacité à tolérer les conditions du stress. Le taux de colonisation racinaire par les trois isolats du *Clonostachys rosea* était élevé qui atteint 100 % pour la souche G133 et 81,81 % par Sn181022. La colonisation des racines d'orge par ce champignons peut lui attribue plusieurs d'avantages tels l'inhibition de l'activité des microorganismes phytopathogènes qui limitent la productivité des végétales ainsi que la compétition avec les phytopathogènes pour l'espace.

## **Conclusion**

*Clonostachys rosea* est une espèce de champignon dans la famille Bionectriaceae. Il colonise les plantes vivantes comme un endophyte, et digère la matière dans le sol comme un saprophyte. Il est également connu comme un parasite d'autres champignons et des nématodes. Il produit un large éventail de composés organiques volatils qui sont toxiques pour les organismes, y compris d'autres champignons, les bactéries et les insectes, et est d'intérêt dans la lutte biologique.

Certaines espèces de *Clonostachys* peuvent également favoriser la croissance des plantes et de susciter la résistance induite qui peut protéger les plantes contre l'attaque pathogène.

Au terme de notre étude on a constaté que :

Les trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sont révélés non producteurs de métabolites secondaires *in vitro* impliqués dans la promotion de la croissance végétale, ils ne produisent pas l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (HCN). Par contre, ils synthétisent l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>).

Les trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* ont la capacité de solubiliser les Phosphates par la production des Phosphatase. La production du Protéase a été retrouvée chez les trois isolats fongiques, alors que la Pectinase et la cellulase n'ont pas été produite par les isolats du *Clonostachys rosea*

La souche Sn319112 a un meilleur développement de la partie aérienne quelle que soit le paramètre de la croissance (de la longueur, le poids frais et le poids sec). Les trois souches fongiques de *Clonostachys rosea* n'ont pas un effet sur la biostimulation de la croissance de la partie racinaire.

## Conclusion

---

*Clonostachys rosea* est utilisé beaucoup plus dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes. Il est considéré comme un champignon très efficace dans le biocontrôle.

# **Annexes**

## **Annexe 1**

### **Milieux de cultures utilisés.**

#### **Milieu de culture PDA (Jonsthor et Booth., 1983)**

Pomme de terre	200g
Dextrose	15g
Agar	20g

pH= 6,8

#### **Milieu de culture Luria-Bertani enrichi avec du tryptophane (Bric et *al.*, 1991)**

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
L-tryptophane	1,02g
Agar	20g

pH= 6,7

La préparation de réactif de Salkowski est opérée sous une haute aspiratoire réservée pour la manipulation des produits chimiques (en mélangeant).

#### **Milieu de culture de production d'HCN (Kloepper et *al.*, 1991).**

Milieu PDA + 4,4g de glycine

#### **Milieu de production de l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>) (Cappucino et Sherman., 1992)**

Peptone	10 g
NaCl	5 g
L'eau distillée stérile	1 L

## **Annexe 2**

### **Milieu de culture PVK (pikovskaya., 1948)**

(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5g
Extrait de levure	0,5g
Phosphate bicalcique	5g
KCl	0,2g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1g
Glucose	10g
Agar	17g
MnSO <sub>4</sub>	trace
FeSO <sub>4</sub>	trace
Bleu bromophénol	4ml/l
Eau distillée	1L

pH= 6,7

### **lait écrémé Agar (Sunish Kumar et *al.*, 2005)**

Caséine	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Solution de 7% de lait écrémé	100ml
Eau distillée	1L
Agar	15g

pH=7,5

### **Annexe 3**

#### **Milieu minimum M9 Agar (Miller., 1974)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
NaCl	0,5g
NH <sub>4</sub> Cl	1g
Eau doublement distillée	1L
Agar	20g

pH= 6,8.

#### **Milieu de production de pectinase (Cattelan et *al.*, 1999)**

Milieu minimum M9 agar + 10 g de pectine + 1,2 g d'extrait de levure.

#### **Milieu de production de cellulase (Cattelan et *al.*, 1999)**

Milieu minimum M9 agar + 10g de CMC + 1,2g d'extrait de levure.

## Annexe 2

### Résultats de la partie in planta

Effet des isolats du *Clonostachys rosea* sur la longueur moyenne de la partie aérienne :

	Moyenne	Ecartype
Témoin	43,3448276	6,52
G133	43,6206897	4,47
Sn181022	44,8965517	5,32
Sn3119112	46,6206897	4,86

Effet de l'inoculation des isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie aérienne.

	Moyenne	Ecartype
Témoin	1,27448276	0,29
G133	1,23965517	0,25
Sn181022	1,43068966	0,37
Sn3119112	1,48724138	0,28

Effet de l'inoculation des isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie aérienne :

	Moyenne	Ecartype
Témoin	0,18	0,048
G133	0,16068966	0,037
Sn181022	0,18655172	0,047
Sn3119112	0,21827586	0,037

**Effet des trois isolats fongiques sur la longueur moyenne de la partie racinaire :**

	<b>Moyenne</b>	<b>Ecartype</b>
<b>Témoin</b>	23,0344828	8,85
<b>G133</b>	22,0689655	7,78
<b>Sn181022</b>	21,4482759	8,2
<b>Sn319112</b>	20,3793103	6,49

**Effet des trois isolats fongiques du *Clonostachys rosea* sur le poids frais moyen de la partie racinaire :**

	<b>Moyenne</b>	<b>Ecartype</b>
<b>Témoin</b>	2,85275862	1,29
<b>G133</b>	2,36310345	0,86
<b>Sn181022</b>	1,43931034	0,46
<b>Sn319112</b>	1,56344828	0,59

**Effet des trois isolats du *Clonostachys rosea* sur le poids sec moyen de la partie racinaire :**

	<b>Moyenne</b>	<b>Ecartype</b>
<b>Témoin</b>	0,32	0,16
<b>G133</b>	0,17586207	0,08
<b>Sn181022</b>	0,15724138	0,08
<b>Sn319112</b>	0,27758621	0,09

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Abd-alla M. et Omar S., 1998.** Wheat straw and cellulolytic fungi application increases nodulation, nodule efficiency and growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) grown in saline soil. *Biology and fertility of soils*. 25:58-65.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS., 2008:** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163: 173-181,.
- Alva P., McKenzie E. H. C., Pointing S. B., Pena-Muralla R. and Hyde K. D., 2002.** Do sea grasses harbour endophytes? *Fungal Diversity Research Series*. 7: 167-178.
- Anonyme., 2005. Maladies du bois - Moyens de lutte contre les maladies du bois Institut Français de la Vigne et du Vin.**
- Arnold A. E., Mejia L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A., 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 15649-15654.
- Bakker A. et Schippers B., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and pseudomonas sp-mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. biochem.* 19:451-457.
- Baysal O., Caliskan M. et Yesilova O., 2008.** An inhibitory effect of a new *Bacillus Subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum f. sp. Radices-lycopersici*. *Physiological and Molecular plant Pathology*. 73:25-32.
- Belaid D., 1996.** Aspect de la céréaliculture Algérienne, cours d'agronomie. Algérie 130p.
- Bounoua M.D., 2008.** Essais d'utilisation des *Pseudomonas spp.* Et *Bacillus spp.* Dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporium f.sp. lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahliae* sur l'olivier. Thèse de Magister en Biotechnologie, Université d'Oran.

**Burgess, D. R., Keane, P. J. 1997.** Biological control of *Botrytis cineria* on chickpea seed with *Trichoderma spp* and *Gliocladium roseum*: indigenous versus non-indigenous isolates. In plant disease. 46: 910-918.

**Burnie G., 2003.** Botanica, édition facnie marn I.S.B.N. Australie.

**Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X., 2009.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology*.59: 584-592.

**Cappuccino, J.C. and Sherman N, Microbiology., 1992.** A Laboratory Manual, 3 Edn, Benjamin/cummings Pub. Co. New York. 125–179.

**Carrol G.C., 1986.** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In Fokkema NJ, Van den Hueval J (eds):“Microbiology of the Phyllophere. Proceedings of the Fourth International Symposium of the Phylloplane.” New York: Cambridge university press.

**Carsolio C, Gutierrez A, Jiménez B, M Van Montagu, Herrera-Estrella A., 1994.** *Caractérisation des ech-42, un Trichoderma harzianum endochitinase gène exprimé au cours mycoparasitisme Proc Natl Acad Sei USA.91 : 10903-10907.*

**Cattelan A.J, Hartel P.G, Fuhrmann J.J., 1999.** Screening of plant growth - promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J.* 63:1670-1680.

**Chatterton S, Jayaraman J, Punja ZK., 2008.** La colonisation des plants de concombre par le champignon de biocontrôle *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Contrôle de Biol.* 46: 267-278.

**Cheplick, G. P. Faeth, S H., 2009.** Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis. ed by Oxford University Press, Inc. New York 252pp.

**Choi, Y.W., I.J Hodgkiss and K.D. Hyde, 2005.** Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *J. Agricultural Technol.*, 1: 55-66.

**Cihangir N, Aksöz N., 1993:** *Aspergillus niger*'den gibberellique asit eldesive uygun fizyolojik koşullarin saptanmasi. *Doğa* 17: 63-74,.

**Clay K., Hardy T.N., Hammond J.R., 1985.** Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia* 66, pp 1-5.

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

**Clement. G et Prats. J ., 1971.** Les céréales C.D.T d'enregistrement agricole. pp 9-239.

**Clement, S. L., L. R. Elberson, N. N. Youssef, C. M. Davitt, and R. P. Doss., 2001.** Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Science* 41:570–576.

**Cline G. R., Powell P., Szanizlo P. J., Reid C. P. P., 1982.** Comparison of the abilities of hydroxyamic, synthetic, and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: pp 1158-1164.

**Davies P.J., 2004.** *Biosynthesis, Signal production, Action!*, 3rd edn, Springer, New York.

**Druzhinina EST, et al., 2011.** *Trichoderma: la génomique des succès opportuniste.* *Nat Rev Microbiol.* 9: 749 - 759.

**Dube H., Vala A. et Vaidya S., 2000.** Chemical nature and ligand binding properties of siderophores produced by certain *Aspergillus* from marine habitats. *Natural Academy of Science Letters.* 23:98-100.

**Dye, D. W. (1962).** The inadequacy of the usual determinative tests for identification of *Xanthomonas* spp. *NZT. Sci* 5:393 - 416.

**Espinosa-Garcia F. J. et Langenheim J. H., 1990.** The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population-diversity and spatial patterns *New Phytol.* 116, pp 89-97.

**Frohlich J., Hyde K. D. and Petrini O., 2000.** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* . 104: 1202-1212.

- Gallery R. E., Dalling J. W. and Arnold A. E., 2007.** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology*. 88: 582-5.
- Geremia RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardiles W, Vila SB, M Van Montagu, Herrera-Estrella A., 1993.** La caractérisation moléculaire du gène codant pour la protéinase, PRB1, liée à mycoparasitisme par *Trichoderma harzianum* *Mol Microbiol* 8: 603-613.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:895-914.
- Hinsinger P., 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant and soil*. 237: 173-195.
- Grillot G., 1959.** La classification des orges cultivées. *An. Am. Plantes*. 4 :446-486.
- Hamel Y, Samet F., 2011.** Evaluation du pouvoir antagoniste *in vitro* de quelques souches endophytes vis-à-vis des champignons d'origine telluriques.
- James S. et William G. B., 2007.** Production et utilisation d'endophytes sous forme de nouveaux produits inoculant pour améliorer la vigueur, la santé, la croissance, le rendement des plantes en réduisant les contraintes environnementale et pour diminuer la dépendances vis-à-vis des pesticides chimiques utilisés dans la lutte. 88.
- John, C. S., Li, D. W., Peng, G., Yu, H. And Zhang, P., 1997.** *Gliocladium roseum*: a Versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops in *Plant Disease*, 81: 13 p
- Jonshton A., et Booth C., 1983.** *Plant pathologist's pocket book*. 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 439p.
- Khan S., Hamayun M., Kim H., Yoon H., Lee I., Kim J., 2009.** Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World Journal of Microbiology* 25(5): pp. 829-833.
- Klopper J.W., Rodrigo R.K., McLroy J.A. et Collins D.J. 1991.** Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plant with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant and soil*. 136: 95-102.

- Kosawang C, Karlsson M, Velez H, Rasmussen PH, Collinge DB, Jensen B, Jensen DF., 2014.** Zéaralénone désintoxication par la zéaralénone hydrolase est important pour la capacité antagoniste des *Clonostachys rosea* contre mycotoxines produites *Fusarium graminearum* fongique Biol. 118: 364-373.
- Kluepfel D. E., 1993.** The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphère. Ann. Rev. Phytopathol. 31: pp. 441-472.
- Kucey R.M.N., Jansen H.H., Legget M.E., 1989.** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Adv. Agron. 42: pp. 199-223.
- Lall S.P., 1991.** Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. Proceedings of Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Guelph, Ontario, Canada, pp. 21-36.
- Lahdenperä, M,L., 2000.** “The mode of action of *Gliocladium Catenulatum* J1446”. Verdera. fi.
- Lazarovits G. et Nowak J., 1997.** Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. Hort. Sci. 32: pp. 188-192.
- Lee Asy., Ma Z, Ge L, et al., 2008.** Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. Anal Chim Acta 610: 274-281.,
- Li, H.Y., Qing, C., Zhang, Y.L. and Zhao, Z.W., 2005.** Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. World J. Microb. Biotechnol. 21: pp. 1515-1519.
- Li W. C., Zhou J., Guo S. Y. and Guo L. D., 2007.** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity. 25: 69-80.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E., 2010.** La recherche translationnelle sur Trichoderma: de «omique au champ. Annu Rev Phytopathol. 48: 395 - 417.
- Lu H., Zou W.X, Meng J.C., Hu J., Tan, R.X., 2000.** New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science 151(1): pp. 67-73.

**Lübeck M, Knudsen IMB, Jensen B, Thrane U, C Janvier, Jensen DF., 2002.** GUS et GFP transformation de la souche de lutte biologique *Clonostachys rosea* IK726 et l'utilisation de ces gènes marqueurs dans les études écologiques. *Mycol Res.* 106: 818-826.

**Lindsay W. et Schawab A., 1982.** The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition.* 5:821-840.

**Maccheroni, W. and J.L. Azevedo, 1998.** Synthesis and secretion of phosphates by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. **J. Macià-Vicente J.G., Mendgen K., Lopez-Llorca L.V., 2008.** Colonization of barely roots by endophytic fungus and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Canadian journal of Microbiology.* 54:600-609.

**Macià-Vicente J.G., Mendgen K., Lopez-llorca L.V., 2008.** Colonisation of barely roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Canadian journal of Microbiology.* 54:600-609.

*Gen. Appl. Microbiol.*, 44: 381-387.

**Maheshwari R., 2006.** What is an endophytic fungus. *Current Science.* 90: 1039.

**Manoharachary C., Sridhar K., Singh R., Adholeya A., Suryanarayanan T. S., Rawat S. and Johri N., 2005.** Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science.* **89:** 58-71.

**Mansouri A., 2011.** Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*. Desf): Occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. Thèse de Magistère.

**Marek-kozaczuk M., Deryto M. et Skorupska A., 1996.** The insertion mutants of *Pseudomonas* sp.267 defective in siderophore production and their effect on clover (*Trifolium pretense*) nodulated with *Rhizobium leguminosarum* Trifolli. *Plant soil.* 179:269-274.

**Mitchell A.M., Strobel G.A., Moore E., Robison R., Sears J., 2010.** Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 156: pp. 270-277.

**Monfort E., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J., Park J.O. et Sivasithamparam K., 2005.** Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and development of root-rot. *Soil Biol. Biochem.* 37:1229-1235.

**Moricca S. and Ragazzi A.** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 2008; **98**: 380-386.

**Muhammad H., Khan S., Iqbal I., Ahmad B. et Lee I., 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.

**Müller L J. (2003).** From auxin homeostasis to understanding plant pathogen and plant symbiotic interaction: editor's research interests. *Journal of Plants Growth Regulators* 23: 1-8.

**Murphy B., 2013.** Fungal Infection in Barely Roots-Friend and Foe. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), *Endophytes for plant protection: the state of the art, Proceedings of the 5 th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe.* pp.102.

**Nandhini S., Sendhilvel et Babu S., 2012.** Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, the wilt pathogen. *J. Biopest.* 5(2):178-185.

**Ndiaye, M., 2007.** Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. PhD. Thesis. Wageningen University the Netherlands. P 114.

**Ndiaye, M., Termorshuizen, A. J. and van Bruggen A. H. C. 2007.** Combined effects of solarization and organic amendment on charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in the Sahel. *Phytoparasitica* 35:392-400.

**Peixoto-Neto P.A.S., Azvedo J.L., Araújo W.L., 2002.** Microrganismos endofíticos. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: pp. 62-76.

**Petrini O., 1986.** Taxonomy of endopytic fungi of aerial plant tissues. In; *Microbiology of the Phyllosphere* (Ed. by N. Fokkema & j. van den Heuvel), Cambridge university Press, London, pp. 175-187.

**Petrini O., Stone J., Carroll F.E., 1992.** Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can. J. Bot.* 60: pp. 789-796.

**Pikovskaya R.I., 1948.** Mobilization of phosphorus in soil concentration with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya.* 17: 362-370.

**Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica Junior M. R. and Pastore G. M., 2011.** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* .

**Rachedi M., 2003.** Les céréales en Algérie II. Gestion des risques modulation des objectifs des producteurs céréaliers. *Rev. Céréaliculture*, n°38 (1<sup>er</sup> Semestre). Ed. ITGC, Alger, 19-25.

**Rapilly F., 1986.** Les techniques de mycology en pathologie végétale. *Annales des épiphytes* 19 (No.H.S). p. 1-102

**Rasmusson D., 1987.** Barely crop. An SSA/ASA Monograph series number 56. Madison, Eds ASA.Pp. 250.

**Ratul N., Sharma G.D., et Madhumita B., 2012.** Efficiency of Tricalcium Phosphate Solubilization by Two Different endophytic *penicilium sp.* Isolated from Tea (*Camellia Sinsensis* L.). *Europ. J. Exp. Biology.* 2(4):1354-1358.

**Ravnskov, S., Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Bødker, L., Jensen, D. F., Karlinski, L., and Larsen J., 2006.** Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3453 – 3462.

**Richardson A.E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, pp. 897-906.

**Rini C. et Sulochana K., 2007.** Usefulness of *Trichoderma spp.* And fluorescent Pseudomonads (*Pseudomonas fluorescens*) against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture*. 44:79-82.

**Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R., 2001.** Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter* . 19: 249-260.

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

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

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

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

**Schroers, H-J., Samuels, G. J., Seifert, A. K., Gams, W., 1999.** Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. Rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*. 91: 365 - 385.

**Selosse M. A. and Schardl C. L., 2007.** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* .173: 452-458.

**Sherwood-Pike M., Stone J.K., Carrol G.C., 1986.** *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir. *Canadian journal of Botany* M, pp. 1849-1855.

- Shivanna M.B., Meera M.S., Hyakumachi M., 1996.** Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root of wheat. *Crop Protection*. 15:497-504.
- Singh C.P. et Amberger A., 1998.** Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Biorource Technology*. 68: pp. 13-16.
- Smibert, R. M., Krieg, N. R., 1994.** Phenotypic characterization. in methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, 611-651.
- Soltner D., 1979.** Les grandes productions végétales. Collection sciences et techniques agricoles, 10<sup>ème</sup> édition, 427p.
- Soltner D., 2005.** Les grandes productions végétales. 20<sup>ème</sup> Edition. Collection science et techniques agricoles. Pp.472.
- Sperber J.I., 1958.** Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Austr. J. Agric. Res.* 9: pp. 782-788.
- Staniek A., Woerdenbag H. J. and Kayser O., 2008.** Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*. 3: 75-98.
- Stone J.K, White J.F., Jr. and Polishook J. D., 2004.** Endophytic fungi. In: biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods (Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S., eds). Elsevier Academic press, San Diego, USA. Pp. 241-270.
- Strobe G., 2006.** *Muscodor albus* and its biological promise. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: pp. 514-522.
- Sundara B., Natarajan V., Hari K., 2002.** Influence of phosphorus solubilizing Bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*. 77: pp. 43-49.
- Sunish Kumar R., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A.V., Venkateswarlu Y., Prakash O and Sakthivel N., 2005.** Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology*. 98:145-154.

**Sutton J. C., 1994.** Biological control of strawberry diseases. *Advances in Strawberry Research*. 13: 1-12.

**Sutton J. C., Li de W., Peng G., Yu H. and Zhang, P. 1997.** *Gliocladium roseum* – a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease*. 81: 316-328.

**Syryanarayanan T.S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M.B., Sasse F., Jansen R. Murali T.S., 2009.** Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23 (1-2): pp. 9-19.

**Vazquez P., Holguin G., Puente M. E., Lopez-Cortes A., Bashan Y., 2000.** Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*. 30: 460-468.

**Vega F. E., Posada F., Aime M. C., Ripoll M. P., Infante F., and Rehner S. A., 2008.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46: 72-82.

**Vinale F., Ghisalberti E., Flematti G., Marra R., Lorito M., Sivasithamparan k., 2010.** Secondary metabolites produced by a root-inhabiting sterile fungus antagonistic to *Waller F., Achatz b., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hückelhoven R., Neumann C., Von Wettstein D., franken P., Kogel k.H., 2005.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS USA* 102, pp. 13386-13391.

**Violante A., Rao M. A., De Chiara A., Gianfreda L., 1996.** Sorption of phosphate and oxalate by synthetic aluminium hydroxysulphate complex. *Eur. J. Soil Sci.* 47:pp. 241-247.

**Von Bothmer R., Jacobsen N., 1985.** Origin, taxonomy and related species. In: D. Rasmussen (éd). *Barley, Agronomy monographs*. 26:28-29.

**XUE A. G., 2002.** Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* Strain ACM941. *Phytopathology* 93: 329-335.

**Yates, I. E., Bacon, C. W., and Hinton, D. M., 1997.** Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis.* 81:723-728.

**Zabalgogea** I., 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish journal of Agricultural research* . 6: 138-146.

**Zilinsky F.J., 1983.** Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification. Centro internacional de mejaramiento de maiz y Trigo. México, 140p.

**Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X., 2006.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23: 753-771.

**Zoysa A.K.N., Loganathan P., Hedley M.J., 1998.** Phosphate rock dissolution and transformation in the rhizosphere of tea (*Camellia sinensis* L.) compared with other plant species. *European journal of Soil Science*. 49 (3): pp. 477-486.

## Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciement

Dédicaces Listes des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Sommaire

**Introduction.....1**

**Chapitre 1 : synthèse bibliographique sur l'application endophytiques dans la promotion de la croissance des plantes et la culture de l'orge comme cas d'étude**

1. Les champignons endophytes.....	3
1.1.Définition .....	3
1.2.Diversité et classification .....	3
1.3.Mode de reproduction et de transmission .....	5
2. Colonisation naturelle des tissus des plantes par les champignons.....	5
3. Intérêt des champignons endophytes dans la promotion de la croissance des plantes .....	6
3.1.Production des substances bioactives.....	6
3.2.Solubilisation du phosphore.....	6
3.3. Production des phytohormones .....	8
3.4.Production des sidérophores.....	8
3.5.Production d'enzyme.....	9
3.6.Production d'HCN.....	10
4. Caractères généraux de <i>Clonostachys rosea</i> .....	10
4.1.Classification .....	12

4.2. Pouvoir antagoniste de <i>clonostachys rosea</i> .....	12
5. Cas d'étude : L'orge ( <i>Hordeum Vulgare</i> L.).....	13
5.1. Présentation générale de la plante.....	13
5.2. Caractères écologiques .....	14

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

### Matériels

1. Matériel biologique .....	15
2. Matériel végétal.....	15
3. Le sol.....	15

### Méthodes

1. Purification des souches.....	15
2. Production, in vitro, des métabolites secondaires par les champignons du genre <i>Clonostachys</i> spp.....	16
2.1. Production d'acide indole acétique (AIA).....	16
2.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	16
2.3. Production d'ammoniac.....	16
3. Production d'enzymes.....	17
3.1. Phosphatase.....	17
3.2. Protéase .....	17

### 4. Evaluation de la promotion de la croissance de l'orge

4.1 Préparation des colonies fongiques pour l'inoculation de la semence d'orge.....	17
4.2 Désinfection de la semence.....	17
4.3 Inoculation de la semence d'orge par les trois souches du <i>Clonostachys rosea</i> .....	18
4.4. Mise en place de la culture sous serre.....	18
4.5. Dispositif expérimentale de l'essai sous serre.....	19

### 5. Evaluation de la promotion de la croissance de l'orge.....20

<b>5.1. Paramètre de croissance</b> .....	20
5.1.1. La longueur de la partie aérienne.....	20
5.1.2. La longueur du système racinaire.....	20
5.1.3. Poids frais et sec de la partie aérienne et racinaire.....	20
<b>6. Colonisation racinaire par les champignons du genre <i>Clonostachys rosea</i>..</b>	<b>20</b>
<b>6.1. Test de confirmation de la colonisation racinaire sur milieu de culture en boîtes de Pétri</b> .....	20
6.2. Test de confirmation de la colonisation racinaire sous microscope .....	21
<b>Chapitre 3 : résultats et interprétations.....</b>	<b>22</b>
<b>1. Production in vitro des métabolites secondaires par <i>Clonostachys rosea</i>.....</b>	<b>22</b>
1.1. Production d'acide indole acétique (AIA).....	22
1.2. Production d'acide cyanidrique (HCN).....	23
1.3. Production d'ammoniac.....	24
<b>2. Production d'enzymes.....</b>	<b>23</b>
2.1. Production de phosphatase.....	24
2.2. Production de protéase.....	25
<b>3. Evaluation de la croissance de l'orge (<i>Hordeum vulgare L.</i>) par <i>Clonostachys rosea</i></b>	
<b>3.1. Effet des isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> sur le développement de la partie aérienne.....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Effet des trois isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur la longueur moyenne de la partie aérienne.....	27
3.1.2. Effet des isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids frais moyen de la partie aérienne.....	28
3.1.3. Effet des trois isolats du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids sec moyen de la partie aérienne.....	29

3.2. Effet des champignons du genre <i>Clonostachys</i> sur la partie racinaire.....	30
3.2.1. Effet isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> sur la longueur moyenne de la racine.....	31
3.2.2. Effet des trois souches du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids frais moyen de la partie racinaire.....	31
3.2.3. Effet des trois isolats fongiques du <i>Clonostachys rosea</i> sur le poids sec moyen de la partie racinaire.....	29
<b>4. Colonisation racinaire par les champignons du genre <i>Clonostachys rosea</i>.....</b>	<b>32</b>
4.1. Test sur boîte de pétrie.....	32
4.2. Test sous microscope optique.....	33
<b>Discussion .....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>38</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

