

COMPORTEMENT DE LA COMMUNAUTÉ DES CHAMPIGNONS PRÉDATEURS ISOLÉE DANS LA RHIZOSPHERE D'AGRUMES INFESTÉE PAR *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS*

S. Kallel¹ et M. Labiadh

Institut National Agronomique de Tunisie, 1087 Mahrajène, Tunisie

Résumé. Douze souches de champignons prédateurs isolés à partir de la rhizosphère des arbres des *Citrus* infestés par *Tylenchulus semipenetrans* ont été identifiées et évaluées sur leur capacité de croissance, leur activité prédatrice et leur interaction avec les racines des *Citrus*. L'étude montre que les espèces *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. musiformis*, les trois souches du genre *Meristacrum* et *Monacrosporium rutgeriensis* ont une croissance rapide alors que *A. dactyloides* et *Monacrosporium cionopagum* ont une croissance lente et ceci à différentes températures testées 16,5, 20, 25 et 30 °C. Seules les deux souches de *Meristacrum* SKAN MC et MCCB ont pu croître à la température extrême de 35 °C. En outre, *M. cionopagum*, a montré le meilleur pourcentage de capture à 25 °C, en effet il a pu capturer plus de 80% de larves de *T. semipenetrans* en 72 heures. Par ailleurs, les racines des *Citrus*, ont montré un effet attractif sur la vitesse de croissance de la majorité des champignons prédateurs isolés (les *Meristacrum* SKAN MC, MCCB, les deux souches *A. conoides* RGA, C, *A. oligospora* LA, *A. dactyloides* ADCB et *M. cionopagum* CBM).

Mots-clés: *Citrus* sp., nematode des *Citrus*, antagonistes naturels, lutte biologique.

Summary. Behaviour of the community of nematode trapping fungi isolated from the rhizosphere of *Citrus* naturally infested with *Tylenchulus semipenetrans*. Twelve strains of nematode trapping fungi were isolated from the rhizosphere of *Citrus* naturally infested by *Tylenchulus semipenetrans*. The fungi were identified and evaluated for their growth ability, their predation activity and their interaction with *Citrus* roots. The study showed that the fungus species *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. musiformis*, three strains of the fungus *Meristacrum* sp. and *Monacrosporium rutgeriensis* grew rapidly, while *A. dactyloides* and *Monacrosporium cionopagum* had slow growth at 16,5, 20, 25 and 30 °C. Only two strains of *Meristacrum* (SKAN MC and MCCB) grew at the extreme temperature of 35 °C. *Monacrosporium cionopagum* gave the highest percentage (80%) capture of the second stage juveniles of *T. semipenetrans* after 72 hours at 25 °C. Further, the roots of *Citrus* affected the growth speed of the majority of the nematode trapping fungi isolated: *Meristacrum* (SKAN MC, MCCB), *A. conoides* (RGA, C), *A. oligospora* (LA), *A. dactyloides* (ADCB) and *M. cionopagum* (CBM).

Keywords: Biological control, *Citrus* sp., *Citrus* nematodes, natural antagonists.

Le nématode des *Citrus*, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, est un nématode semi-endoparasite sédentaire inféodé aux racines des *Citrus*. Ce nématode provoque plusieurs dégâts, principalement une perte de vigueur des plantes, des chloroses, une diminution de la surface foliaire, une défoliation et des die-back (Kallel et Abdelwahed, 2004). Ce parasite associé aux racines du bigaradier, porte-greffe le plus utilisé dans la région méditerranéenne, est largement distribué dans le monde, dans le bassin méditerranéen et dans la plupart des vergers du Cap bon principale région agrumicole en Tunisie qui en sont infestés.

Plusieurs moyens de lutte ont été étudiés contre ce ravageur. A cet égard, la lutte chimique a été considérée longtemps le seul moyen pour diminuer la population des nématodes phytoparasites en général. Cependant, elle est difficile à mettre en œuvre sur les plantes pérennes tel que les *Citrus*, surtout que les matières actives

sont incapables d'éradiquer le parasite dans le sol étant donné qu'elles sont inefficaces contre les œufs des nématodes. De plus, elle affecte considérablement le potentiel biotique des micro-organismes utiles du sol étant donné, son large spectre d'action. Par ailleurs, les résidus chimiques qui persistent dans les sols traités se sont avérés nocifs pour l'environnement, la santé humaine et animale. La reconversion des vergers de Maltaise dans la région du Cap bon, où l'infestation par le nématode est généralisée malgré la production de plants indemnes de la pépinière, n'est possible que par l'utilisation de porte greffes résistants tel que le *Poncirus trifoliata* (Kallel *et al.*, 2006) ou certains de ces hybrides et/ou la mise en œuvre des moyens de lutte biologique durable (Sikora et Schuster, 1989). La connaissance des ennemis naturels du nématode permet de concevoir dans les vergers infestés une stratégie de lutte à la fois efficace et respectueuse de l'environnement, dans le but de diminuer la population de nématode au dessous du seuil de tolérance de l'arbre. A coté de la bactérie hyperparasite *Pasteuria* (Fattah *et al.*, 1989; Walter et Kaplan, 1990; Elekçioğlu, 1995; Sorribas *et al.*, 2000; Gené *et al.*,

¹ Auteur correspondant, e-mail: Kallel.sadreddine@inat.agrinet.tn

2005), plusieurs champignons parasites et prédateurs sont associés au nématode des *Citrus* (Stirling et Mankau, 1977; Walter et Kaplan, 1990; Gené *et al.*, 2005). Les *Myzocytiium*, *Rhizophidium*, *Meria coniospora* (Stirling et Mankau, 1977), *Haptoglossa heterospora*, *Catenaria anguillulae* sont les principaux champignons parasites des larves de *T. semipenetrans*. Par contre, *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquandii* et *Pochonia clamydosporia* sont liés aux œufs du nématode (Walter et Kaplan, 1990; Gené *et al.*, 2005). Les champignons prédateurs de *T. semipenetrans* les plus fréquents, appartiennent aux genres *Arthrobotrys* (*A. conoides*, *A. dactyloides*, *A. oligospora*, *A. arthrobotryoides*, *A. javanica*, *A. superba* et *A. musiformis*), *Monacrosporium* (*M. gephyropagum*) et *Dactylaria* (Stirling et Mankau, 1977; Walter et Kaplan, 1990; Gené *et al.*, 2005). Etant donné, qu'après l'éclosion, la juvénile (J2) de *T. semipenetrans* peut rester plus de 2 semaines dans le sol avant d'infester les racines nourricières. Les champignons prédateurs lorsqu'ils sont actifs paraissent les plus intéressants pour diminuer l'inoculum du nématode dans le sol. Les champignons prédateurs se développent en tant que saprophytes grâce à leurs mycéliums végétatifs et en tant que parasites en formant des structures pour piéger les nématodes comme les anneaux constricteurs et les hyphes adhésifs. Cependant, l'efficacité de capture est tributaire de plusieurs facteurs principalement les facteurs abiotiques tels que la température, le pH et la salinité (Kallel *et al.*, 2008) et les facteurs biotiques notamment les antagonistes du sol (Labiadh et Kallel, 2008). Tous les travaux effectués sur la rhizosphère des arbres des *Citrus* infestés par le nématode se sont restreints à des études descriptives des microorganismes associés à *T. semipenetrans* sans aborder les interactions entre ces champignons et les autres organismes du sol affectant leurs activités. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, qui a pour but d'étudier l'activité des ennemis naturels du *T. semipenetrans*, principalement les champignons prédateurs se trouvant dans la rhizosphère des *Citrus*, afin de comprendre l'équilibre entre les antagonistes et *T. semipenetrans* dans la rhizosphère des *Citrus*. Pour ce faire notre travail s'intéresse à deux grands volets, le premier comportera l'étude de la croissance et l'activité prédatrice des souches de champignons et le deuxième portera sur l'étude de leur interaction avec les racines des *Citrus*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture et origines des deux souches. Les champignons faisant l'objet de cette étude ont été isolés de la rhizosphère des *Citrus*, à partir de trois biotopes différents des régions agrumicoles de la Tunisie, le Cap bon situé au Nord Est, Ras El djebel au Nord et le Sahel à l'Est de la Tunisie. Ces champignons sont maintenus au laboratoire de l'I.N.A.T sur un milieu gélosé Corn Meal Agar (CMA) (8,5 g de Corn Meal Agar et 8,5 g d'agar

dans un litre d'eau distillée). Les souches de champignons sont repiquées sur milieu CMA, sous hotte stérile, en prélevant une conidie sous loupe binoculaire avec une aiguille portant à son extrémité un bout de gélose (B'Chir et Namouchi, 1988). Les boîtes sont maintenues à l'étuve sous une température de 25 °C. Au bout de quelques jours, le champignon envahit toute la boîte. Cette technique est répétée au moins une fois par mois pour garder de jeunes souches pour les essais.

Isolement des champignons de la rhizosphère. Les échantillons prélevés de la rhizosphère des *Citrus* sont homogénéisés au laboratoire par agitation et malaxage dans le sac de plastique qui a servi à la conservation. Des échantillons de sol et de racine de bigaradier infestés par *T. semipenetrans* sont prélevés séparément à l'aide d'une spatule désinfectée et déposés au milieu des boîtes de Pétri de 85 mm contenant un milieu d'eau gélosé (WA).

Pour chaque parcelle trois boîtes contenant du sol et trois boîtes contenant des racines constituent les répétitions. Après quelques jours, les hyphes mycéliens des champignons croissent, les œufs de *T. semipenetrans* éclosent et les juvéniles du nématode à côté des nématodes bactériophages se déplacent sur l'eau gélosé. Les champignons prédateurs forment des pièges qui capturent les nématodes et des conidiophores qui supportent des conidies. Les conidies situées sur des conidiophores émis d'un piège capturant les juvéniles de *T. semipenetrans* sont prélevées et déposées sur milieu CMA. Différentes souches de champignons prédateurs sont alors purifiées par des repiquages successifs sur des boîtes de CMA. À partir de la rhizosphère de *Citrus* infestées par *T. semipenetrans*, douze souches de champignons prédateurs ont été isolées, appartenant aux genres *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* et *Meristacrum*, et des champignons parasites appartenant au genre *Paecilomyces* et *Myzocytiium*.

Identification des champignons. Les douze souches de champignons prédateurs sont identifiées par des caractères morphologiques et morphométrique sur des préparations microscopiques colorées, conformément à la clé d'identification établie par Peloille (1979). La technique de coloration consiste à mettre un bout de gélose d'une culture du champignon sur la lame puis, une goutte de bleu coton est déposée, l'objet est par la suite couvert par une lamelle. La préparation est ensuite déposée sur une plaque légèrement chauffée afin de faire fondre la gélose permettant l'observation sous microscope. La taille du conidiophore, le nombre de conidies portées sur le conidiophore et l'aspect du conidiophore ont été pris en considération, ainsi que la longueur, la largeur et le nombre de cellules contenu dans les conidies mais aussi la taille des chlamydospores et le type de piégeage élaboré par le champignon. Les caractéristiques morphométriques des souches ont été examinées et mesurées à l'aide d'un microscope OLYMPUS AX9602.

Effet de la température sur la croissance des champignons. La croissance des différentes souches de champignons a été mesurée aux températures de 16,5 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C et 35 °C. Les différentes souches sont ensemencées par la technique de repiquage monoconoidale sur un milieu CMA. Cinq boîtes de Pétri renfermant une conidie de chaque souche de champignon sont ensuite incubées à la température testée. Le diamètre des hyphes est mesuré tous les jours. Pour les températures extrêmes de 35 °C, une rondelle de milieu CMA contenant l'hyphe de 9 mm de diamètre prélevée par un emporte-pièce, de chaque champignon prédateur a été déposée au milieu de la boîte de Pétri contenant un milieu CMA. Le champignon est considéré inhibé lorsque l'éclosion des conidies ou la croissance mycélienne est arrêtée pendant les 9 premiers jours d'incubation. La souche de champignon prédateur est alors transférée à 25 °C et le diamètre des hyphes est mesuré journalièrement.

Efficacité de capture des champignons prédateurs. L'efficacité de piégeage des champignons prédateurs a été évaluée sur sept espèces de champignons CBM, MS, RGA, LAT, MCRJ, ARJ et ADCB. Le taux de capture est évalué par l'inoculation de boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre contenant un milieu WA, complètement occupé par le champignon prédateur, avec 0,5 ml de suspension contenant environ 50 juvéniles de *T. semipenetrans*. Les répétitions sont constituées de cinq boîtes de Pétri pour chaque champignon. Le suivi du taux de capture se fait toutes les 48 heures par le comptage des nématodes capturés, des nématodes immobiles et des nématodes libres.

Les juvéniles faisant l'objet de cette étude ont été extraites à partir des masses d'œufs de *T. semipenetrans* prélevées à l'aide d'une aiguille à partir de racines d'arbres de bigaradier provenant de vergers infestés de la région du Cap Bon (Nabeul). Les masses d'œufs de nématode sont ensuite placées dans un tamis à mailles de 1 mm sur une double épaisseur de papier cellulosique; les tamis eux-mêmes ont été disposés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant de l'eau distillée puis mis à incuber à 25 °C. Les J₂ émergeant après les premières 48 heures ont été écartés. Les J₂ fraîchement éclos après les 48 heures suivantes ont été récupérés.

Attractivité des racines de Citrus aurantium aux champignons prédateurs. Une rondelle de milieu CMA contenant l'hyphe de 9 mm de diamètre prélevée à l'emporte-pièce, de chaque champignon prédateur a été déposée séparément, au milieu d'une boîte de Pétri contenant un milieu WA. Dans cette même boîte de Pétri, de part et d'autre du bout d'hyphe, un bout de radicelle de bigaradier de 30 mm de longueur a été déposé alors que l'autre côté reçoit un bout de plastique de même longueur. Une fois déposé sur le milieu gélosé, une faible force est assignée avec une pince de manière à ce que la radicelle ou le morceau de plastique soit intimement en

contact avec le milieu. Le rayon de l'hyphe du champignon prédateur est mesuré de chaque côté tous les 24 heures.

Les racines utilisées dans cette étude ont été obtenues à partir des graines de bigarades prélevées au mois de mars 2008 de la région du Cap bon. Les fruits sont trempés pendant trois heures dans de l'eau de Javel à 2%. Puis, les graines ont été récupérées et lavées dans de l'eau distillée stérile. Ces graines ont été ensuite désinfectées dans une solution de CaOCl à 35 g/litre d'eau distillé stérile pendant 18 heures. Après désinfection, les graines ont été relavées plusieurs fois dans de l'eau distillée stérile. Les graines de bigaradier ont été disposées dans des boîtes de Pétri sur du papier filtre Whatman imbibé d'eau distillée stérile. Pendant la période de germination, seules les boîtes de Pétri contenant des graines saines ont été gardées. Après 46 jours, les graines germées ont été prélevées et les radicules de 30 mm de longueur de chaque graine renfermant la coiffe et la zone pilifère ont été découpées sous flux laminaire avec une lame stérile.

Occupation de la rhizosphère par les champignons prédateurs. A la fin de la croissance des différentes espèces de champignons prédateurs, des morceaux de racines de bigaradier, issues du même lot ayant servi à l'essai précédent, ont été déposés dans des boîtes de Pétri. Après 7 et 15 jours, les racines ont été observées et prélevées puis fixées à la Navachine, déshydratées à l'éthanol et incluses dans de la paraffine. Des coupes longitudinales de 16 à 20 µm d'épaisseur collodionnées sont colorées au Hématoxyline et au Picro indigo carmin (Kallel *et al.*, 2005) puis montées entre lames et lamelles dans du baume de Canada. L'observation des différentes coupes histologiques a été réalisée sous microscope.

Analyses statistiques. Les données chiffrées sont analysées par le logiciel SPSS. Les moyennes relatives à la croissance des champignons à différentes températures (16,5, 20, 25, 30 et 35 °C) sont comparées par le test de Duncan après l'analyse de la variance à la probabilité de $P = 0,05$. Les valeurs de taux de capture sont préalablement transformées par la fonction Arc Tangente puis soumises à l'analyse de la variance et une comparaison multiple de moyenne par le test Student-Newman-Keuls (SNK) à la probabilité de $P = 0,05$. Les données relatives à l'attractivité des racines sont soumises au test T de Student au seuil de 0,05.

RESULTATS

Identification des champignons. Les mesures morphométriques et le système de piégeage ont permis de montrer que les souches appartiennent au genre *Arthrobotryx* (*A. musiformis*, *A. oligospora*, *A. dactyloides*, *A. conoides*), au genre *Monacrosporium* duquel nous avons isolé deux souches, *M. rutgeriensis* et *M. cionopagum*, et trois

souches du genre *Meristacrum*. Les différentes souches de champignons prédateurs de nématodes, isolées de la rhizosphère des *Citrus* de différentes régions agrumicole de Tunisie (Tableau I), sont déposées sous le code de ARJ pour *A. musiformis*, LAT et LA pour *A. oligospora*, AD et ADCB pour *A. dactyloides*, RGA et C pour *A. conoides*, le genre *Monacrosporium* duquel nous avons isolé deux souches, MS pour *M. rutgeriensis* et CBM pour *M. cionopagum* et trois souches MCRJ, SKANMC et MCCB pour le genre *Meristacrum* dans la collection de l'Institut National Agronomique de Tunisie.

Etude de l'effet de la température sur la croissance des champignons. La cinétique de la croissance des champignons prédateurs à différentes températures 16,5; 20; 25 et 30 °C, diffère d'une souche de champignon prédateur à l'autre. Deux groupes de champignons prédateurs sont présents dans la rhizosphère des *Citrus*, un ensemble de

champignons à croissance rapide formé par les *Meristacrum* (MCRJ, SKANMC, MCCB), *A. oligospora* (LAT, LA), *A. conoides* (C, RGA), *M. rutgeriensis* (MS) et *A. musiformis* (ARJ) et un ensemble à croissance lente constitué d'*A. dactyloides* (AD, ADCB) et *M. cionopagum* (CBM) (Fig. 1). La durée de développement pour envahir toute la boîte de Pétri à 25 °C est de 8 à 11 jours pour les champignons à croissance rapide et de 25 à 29 jours pour les champignons à croissance lente.

Chaque souche de champignon prédateur a montré une gamme de températures optimales de croissance différente l'une de l'autre: 30 °C pour les souches de *Meristacrum* et *A. conoides*, entre 25 et 30 °C pour *M. rutgeriensis* et les deux souches d'*A. dactyloides*, entre 20 et 30 °C pour *A. musiformis* et les *A. oligospora* et 25 °C pour *M. cionopagum* (Tableau II).

A 35 °C, la germination des conidies n'a pas eu lieu pour toutes les souches de champignons sauf les deux

Tableau I. Les souches de champignons prédateurs isolées de la rhizosphère des *Citrus* en Tunisie.

| Nomenclature | Abréviation | Régions |
|------------------------------------|-------------|---------------------------|
| <i>Monacrosporium rutgeriensis</i> | MS | Sahel(Sidi Bou ali) |
| <i>Monacrosporium cionopagum</i> | CBM | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| <i>Arthrobotrys musiformis</i> | ARJ | Bizerte (Ras Djebel) |
| <i>Arthrobotrys oligospora</i> | LAT | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| | LA | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| <i>Arthrobotrys dactyloides</i> | ADCB | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| | AD | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| <i>Arthrobotrys conoides</i> | RGA | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| | C | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |
| <i>Meristacrum</i> sp. | SKAN MC | Cap Bon (Nabeul) |
| | MCRJ | Bizerte (Ras Djebel) |
| | MCCB | Cap Bon (Menzel bouzelfa) |

Tableau II. Variation de la durée de la croissance mycélienne (en jours), en fonction de la température, de *Meristacrum* (MCRJ, SKANMC, MCCB), d'*Arthrobotrys oligospora* (LAT, LA), d'*A. conoides* (C, RGA), de *Monacrosporium rutgeriensis* (MS), d'*A. musiformis* (ARJ), d'*A. dactyloides* (AD, ADCB) et de *Monacrosporium cionopagum* (CBM) aux températures de 16,5, 20, 25 et 30 °C.

| Champignon | Température en °C | | | | |
|------------|-------------------|-----------|----------|----------|-------|
| | 16,5 | 20 | 25 | 30 | 35 |
| MS | 14,214 a* | 7,857 b | 6,583 c | 6,5c | - |
| MCRJ | 6,71 a | 5,29 b | 4,17c | 3,5 d | - |
| SKAN MC | 8,93 a | 6,29 b | 4,57 d | 3,5 e | 5,71c |
| MCCB | 9,58 a | 6,21 b | 4,5 d | 3,5 e | 5,5 c |
| ARJ | 13,28 a | 5,071 b | 4,5 b | 5 b | - |
| LA | 10,1 a | 4,643 b | 4,625 b | 4,5 b | - |
| LAT | 9,7 a | 4,571 c | 5,25 b | 4,5 c | - |
| RGA | 12,5 a | 6,643 b | 6,4 b | 4,8 c | - |
| C | 12,5 a | 6,571 b | 6,5 b | 5,5 c | - |
| AD | 38,917 a | 17,786 b | 16,333 c | 15,5 c | - |
| ADCB | 40,917 a | 21,583 b | 18 c | 18,375 c | - |
| CBM | 49,833 a | 19,857 bc | 17,1 c | 21,333 b | - |

*Les chiffres dans les différentes lignes précédant des lettres différentes sont significativement différents selon le test de Duncan à la probabilité P = 0,05.

souches appartenant au genre *Meristacrum* provenant du Cap bon; SKAN MC et MCCB (Fig. 2A). Les mêmes boîtes de champignons prédateurs qui ne se sont pas développés après 9 jours à la température de 35 °C, ont été mise à la température de 25 °C optimale de croissance mycélienne, seul le genre *Meristacrum* provenant de la région Ras El Djebel (Bizerte) a montré une reprise d'activité après 3 jours et a envahit toute la boîte de Pétri au bout de 9 jours (Fig. 2A). Il n'y a pas eu de

reprise à 25 °C pour les *Arthrotrrys* et les *Monacrosporium*, ce qui montre que la température de 35 °C non seulement elle inhibe la germination mais aussi elle est létale pour les conidies de ces champignons.

Les deux souches de *Meristacrum*, SKAN MC et MCCB se sont développées à 35 °C, à partir du mycélium et ont pu envahir tout le milieu au bout de 13 jours (Fig. 2B). Les hyphes d'*A. conoides* (RGA) ont pu croître à cette température extrême mais ce champignon

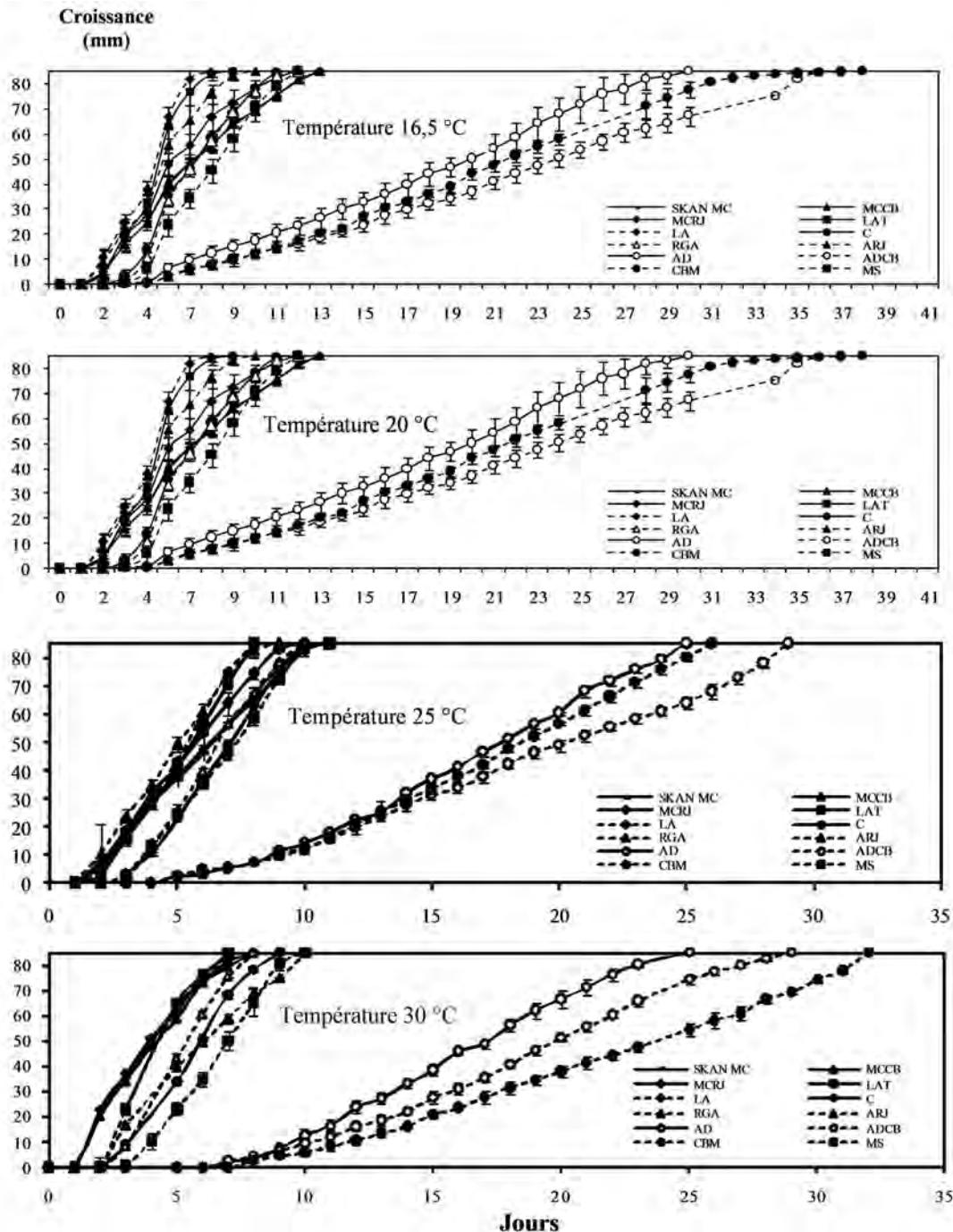


Fig. 1. Evolution de la croissance mycélienne de *Meristacrum* (MCRJ, SKANMC, MCCB), d'*Arthrotrrys oligospora* (LAT, LA), d'*A. conoides* (C, RGA), d'*A. musiformis* (ARJ), d'*A. dactyloides* (AD, ADCB), de *Monacrosporium rutgeriensis* (MS) et de *M. cionopagum* (CBM) aux températures de 16,5, 20, 25, 30°C. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à P = 0,05.

n'a pu envahir que 70% de la boîte au bout de 24 jours, puis sa croissance s'est arrêtée (Fig. 3B). La croissance mycélienne de ce champignon a été rétablie à 25 °C. Le transfert à une température de 25 °C, a permis la croissance mycélienne d'*A. conoides* (C) ainsi que les deux souches de *A. dactyloides* (AD et ADCB) qui ont pu occuper le milieu après 10 jours, 24 et 29 jours respectivement (Fig. 2B). La température de 35 °C a inhibé irrémédiablement, le développement des hyphes d'*A. oligospora* (LAT, LA), de *M. rutgeriensis* (MS), d'*A. musiformis* (ARJ) et de *M. cionopagum* (CBM). En effet, ces champignons n'ont pas pu croître même après leur transfert à 25 °C, la température optimale de croissance.

Etude de l'efficacité de capture des champignons prédateurs. *Monacrosporium cionopagum* a montré le meilleur pourcentage de capture à 25 °C sur le milieu agar. En effet, ce champignon prédateur a pu capturer plus que 80% des juvéniles de *T. semipenetrans* en 72 heures, contrairement aux autres champignons ayant un pourcentage de piégeage élevé mais tardif, puisque la majorité

d'entre eux n'ont pu atteindre 80% de larves piégées qu'après 9 jours d'incubation (Fig. 3). Après 24 heures d'incubation à 25 °C, on observe une différence significative entre *M. cionopagum* ainsi que le champignon du genre *Meristacrum* (MCRJ) et les autres souches de champignons. En effet, *M. cionopagum* a pu, en 24 heures, capturer 34% des juvéniles présentes dans la boîte, dû à une rapidité dans la formation d'un grand nombre de pièges seulement en 24 heures. Dans le même contexte on trouve aussi le champignon du genre *Meristacrum* MCRJ qui a capturé en 24 heures 28% de larves alors que les autres souches de champignons prédateurs oscillent entre 5 et 9% de pourcentage de capture des J2.

L'attractivité des racines de Citrus aurantium aux champignons prédateurs. La comparaison entre les valeurs moyennes des mesures effectuées selon le test t, a montré qu'il y a une différence significative entre la vitesse de croissance des souches de champignons SKAN MC, MCCB, RGA, C, LA, ADCB et CBM du côté où la racine a été déposée et celle où le bout de plastique à

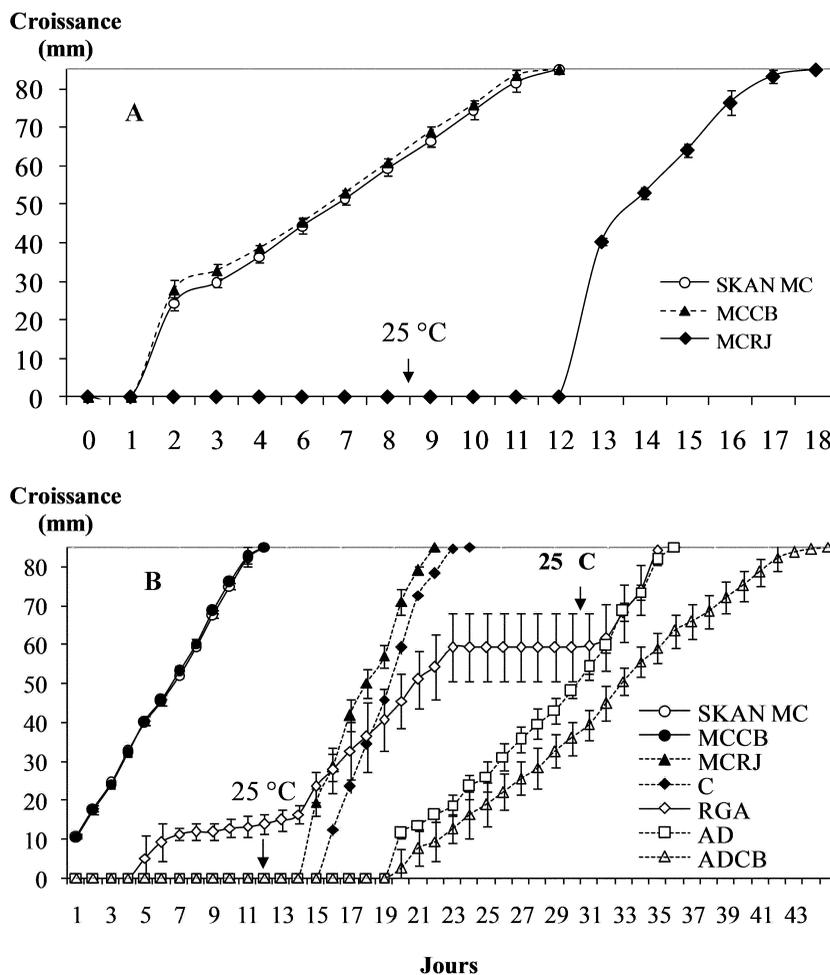


Fig. 2. Evolution de la croissance mycélienne à partir de conidies (A) et à partir de mycelium (B) de culture de *Meristacrum* (MCRJ, SKANMC, MCCB), d'*A. oligospora* (LAT, LA), d'*A. conoides* (C, RGA), de *M. rutgeriensis* (MS), d'*A. musiformis* (ARJ), d'*A. dactyloides* (AD, ADCB) et de *M. cionopagum* (CBM) à la température de 35 °C. Le transfert des cultures après arrêt de la croissance à 25 °C est marqué par une flèche. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à P = 0,05.

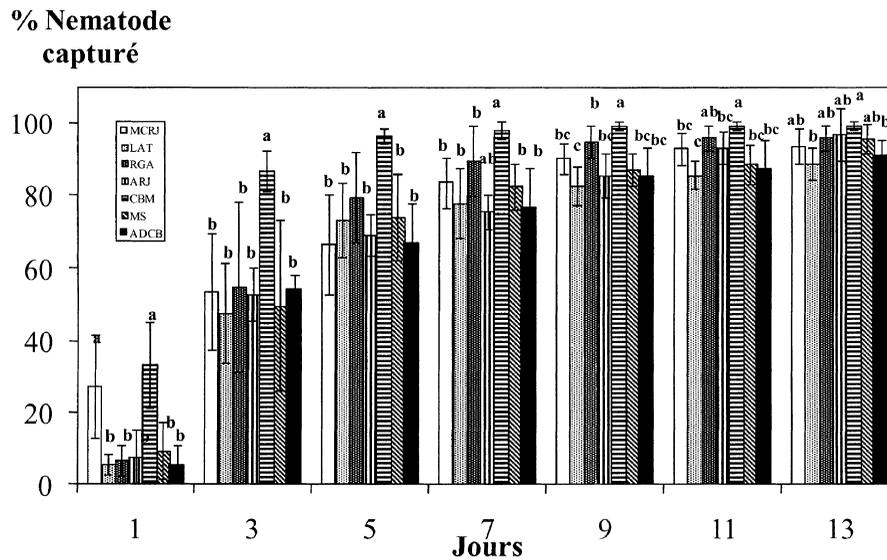


Fig. 3. Evolution du pourcentage de capture des J2 de *Tylenchulus semipenetrans* pour différents champignons prédateurs: *Meristacrum* (MCRJ), *A. oligospora* (LAT), *A. conoides* (RGA), *M. rutgeriensis* (MS), *A. musiformis* (ARJ), *A. dactyloides* (ADCB) et *M. cionopagum* (CBM) à la température de 25 °C. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à P = 0,05. Les différentes lettres au niveau des diagrammes montre que les moyenne sont significativement différentes à la probabilité de P=0,05 selon Student Newman et Keuls.

été déposé (Fig. 4). Ce qui confirme la présence d'un effet attractif exercé par la plante sur la majorité des souches de champignons prédateurs. Par contre pour MCRJ, LAT, AD, ARJ et MS il ne semble pas y avoir de phénomène d'attraction.

Pétri contenant chacune une souche de champignon prédateur, ont montré la formation de conidiophores et d'hyphes tout autour de la racine de bigaradier avec une importante différence dans l'occupation de la rhizosphère des champignons prédateurs. *Monacrosporium cianopagum* et les trois souches de *Meristacrum* ont montré une formation abondante d'hyphes et de conidies (Figs 5G, H et I), en effet il y à formation d'un manchon protecteur tout autour de la racine. Alors que

L'occupation de la rhizosphère par les champignons prédateurs. Les observations sous loupe binoculaire des racines, après 7 jours de leur dépôt dans des boîtes de

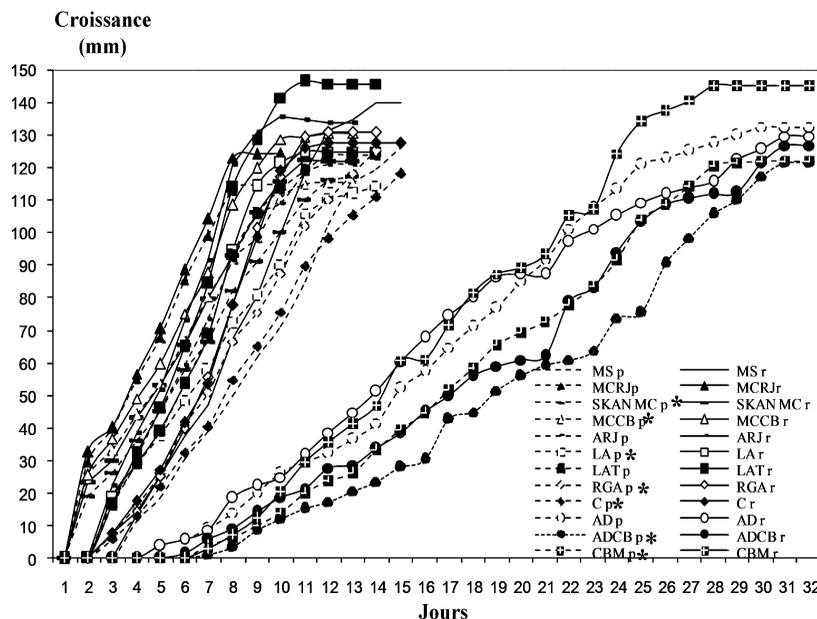


Fig. 4. Comparaison de l'évolution du pourcentage de croissance de *Meristacrum* (MCRJ), d'*A. oligospora* (LAT), d'*A. conoides* (RGA), de *M. rutgeriensis* (MS) et d'*A. (ARJ)*, d'*A. dactyloides* (ADCB) et de *M. cionopagum* (CBM) en présence d'une racine de Bigaradier (r) par rapport à celui en présence d'un bout de plastique (p) à la température de 25 °C. Les moyennes présentant le symbole (*) sont significativement différentes selon le test t à la probabilité de P = 0,05.

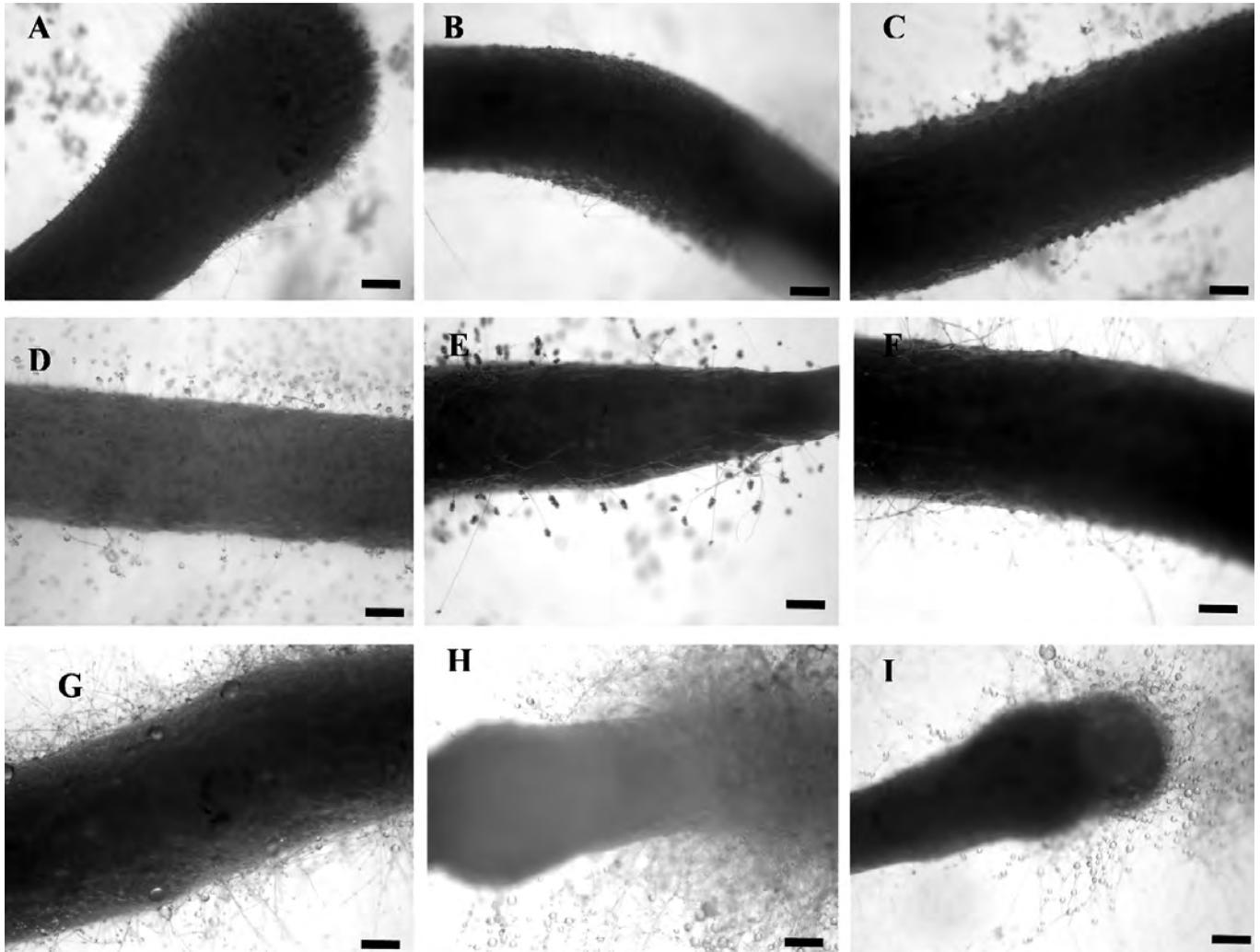


Fig. 5. Aspect des racines après 7 jours d'incubation dans des boîtes contenant des champignons prédateurs. Racine entourée par: (A) *Arthrobotrys dactyloides* AD; (B) *Arthrobotrys musiformis* ARJ; (C) *Arthrobotrys conoides* RGA; (D) *Arthrobotrys dactyloides* ADCB; (E) *Arthrobotrys oligospora* LAT; (F) *Monacrosporium rutgeriense* MS; (G) *Monacrosporium cionopagum*; (H) et (I) les deux souches appartenant au genre *Meristacrum* MCRJ et SKAN MC. (Barre 1 mm).

les champignons prédateurs *A. dactyloides* (AD et ADCB), *A. musiformis* (ARJ) et *A. conoides* (RGA et C) (Figs 5A, B et C) ont montré une abondance moins importante que celle des champignons *M. rutgeriense* (MS) et *A. oligospora* (LA et LAT) qui ont une abondance modérée (Figs 5D, E et F).

Les observations microscopiques des racines incubées avec les champignons prédateurs durant 7 et 15 jours ont montré la présence de toutes les souches de champignons prédateurs au niveau des cellules épidermiques et du cortex de la racine après 7 jours de contact et au niveau des tissus vasculaires après 15 jours.

En effet ceci a permis de confirmer que les champignons prédateurs ont pu pénétrer à l'intérieur de l'épiderme et atteindre le cortex (Fig. 6A) en premier temps pour ensuite se propager jusqu'au tissu vasculaire de la racine de bigaradier (Fig. 6C).

Comme il a été noté la présence d'appressorium au niveau des cellules racinaires lorsque le champignon se

propage dans l'épiderme (Fig. 6F). Pour *A. musiformis* ARJ, les poils absorbant de la racine ont été colonisés par des hyphes après 7 jours (Fig. 6I). Des hyphes ressemblant à des organes de piégeage ont été observés chez seulement les deux souches *A. dactyloides* ADCB (Fig. 6D) et *A. oligospora* LAT (Fig. 6E) respectivement après 15 et 7 jours du contact des racines avec ces champignons ainsi que des hyphes vacuolisés au niveau des tissus vasculaires ont été trouvés chez la souche SKAN MC après 15 jours (Fig. 6G).

Mais aussi des cellules épidermiques détruites ou décortiquées ont été observées chez les souches *A. oligospora* LA, *M. cionopagum* CBM (Fig. 6H) et l'espèce du genre *Meristacrum* SKAN MC, alors que chez *A. conoides* RGA et *A. dactyloides* AD et ADCB les cellules épidermiques étaient intactes après 7 et même après 15 jours (Fig. 6B). Au niveau de ces cellules détruites, chez le *M. cionopagum* CBM, une grande colonisation hyphale a été observée.

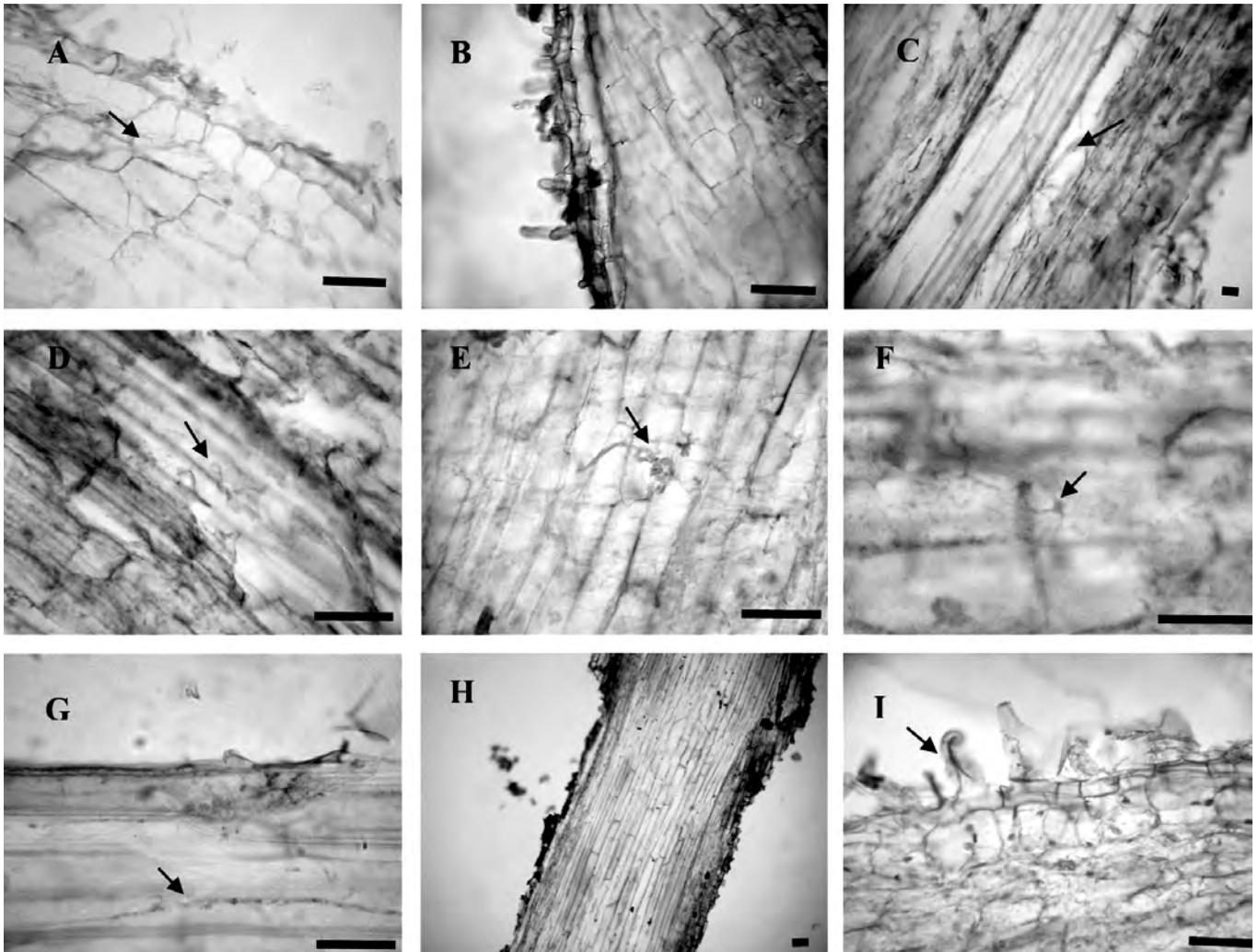


Fig. 6. Observations microscopiques des racines après 7 et 15 jours d'incubation dans des boîtes contenant des champignons prédateurs. A: hyphe du champignon *Arthrobotrys conoides* C, qui se propage de l'épiderme jusqu'au cortex de la racine après 7 jours de contact ($\times 400$) (barre 100 μm). B: epiderme intact de la racine en contact avec le champignon *Arthrobotrys dactyloides* ADCB après 7 jours de contact ($\times 400$) (barre 100 μm). C: aspect de la racine après 15 jours de mise en incubation avec le champignon *Arthrobotrys dactyloides* ADCB, noté la présence des hyphes dans les tissus vasculaires ($\times 100$) (Barre 100 μm). D: la présence des hyphes ressemblant à des organes de piègeages chez le champignon *Arthrobotrys dactyloides* ADCB après 15 jours ($\times 1000$) (barre 50 μm), mais aussi, chez E: *Arthrobotrys oligospora* LAT après 7 jours d'incubation ($\times 1000$) (barre 50 μm). F: la formation d'appressorium au niveau des cellules épidermiques par le champignon *Monacrosporium rutgeriense* MS après 7 jours ($\times 1000$) (Barre 50 μm). G: hyphe vacuolisée du champignon du genre *Meristacrum* SKAN MC dans les tissus vasculaires des racines de bigarade ($\times 1000$) (barre 50 μm). H: aspect de la racine après 15 jours d'incubation avec le champignon *Monacrosporium cionopagum* CBM ($\times 100$) (barre 100 μm). I: Les poils absorbants colonisés par les hyphes du champignon *Arthrobotrys musiformis* après 7 jours d'incubation ($\times 400$) (barre 100 μm).

DISCUSSION

Douze souches de champignons prédateurs ont été isolées à partir de la rhizosphère des Citrus de la Tunisie et identifiées. Sept souches appartenant au genre *Arthrobotrys*, *A. musiformis* (ARJ), *A. oligospora* (LAT et LA), *A. dactyloides* (AD et ADCB) et *A. conoides* (RGA et C). Deux souches appartenant au genre *Monacrosporium*, *M. cionopagum* (CBM) et *M. rutgeriense* (MS), et trois souches appartenant au genre *Meristacrum* (SKAN M, MCCB et MCRJ). Les champignons prédateurs de *T. semipenetrans* les plus fréquemment isolés, appar-

tiennent aux genres *Arthrobotrys* (*A. conoides*, *A. dactyloides*, *A. oligospora*, *A. arthrobotryoides*, *A. javanica*, *A. superba* et *A. musiformis*), *Monacrosporium* (*M. gephyropagum*) et *Dactylaria* (Stirling et Mankau, 1977; Walter et Kaplan, 1990; Gené *et al.*, 2005). Aucune de ces études n'a mentionné la présence de champignon *M. rutgeriense* et des champignons appartenant au genre *Meristacrum* dans la rhizosphère des Citrus.

Ces souches de champignons ont montré une différence au niveau de leur vitesse de croissance vis-à-vis des températures testées 16,5, 20, 25 et 30 °C. Les champignons *A. dactyloides* et *M. cionopagum* ont une

vitesse de croissance lente contrairement aux autres champignons prédateurs isolés de la rhizosphère des *Citrus*. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Monoson (1968) qui a comparé la croissance mycélienne d'*A. musiformis*, *A. oligospora*, *A. dactyloides*, *M. bembicoides* et *M. cionopagum* en fonction de la température et la présence des champignons mycophages.

Chaque souche de champignon a sa propre température optimale de croissance aux environs de 25 °C. Alors que la température de 35 °C a inhibé la germination de tous les champignons ainsi que la croissance de la majorité d'entre eux sauf pour les deux souches de *Meristacrum* SKAN MC et MCCB. Ces résultats confirment que l'optimum de développement des champignons prédateurs est situé entre 20 et 25 °C (Cayrol *et al.*, 1972; Peloille *et al.*, 1984; Namouchi, 1986; Nabil, 1993). La différence de développement des trois souches de *Meristacrum* à la température extrême 35 °C, est expliquée par l'origine de la région d'isolement des souches de champignons. En effet, les deux souches de *Meristacrum*, SKAN MC et MCCB, sont toutes deux isolées à partir de la région du Cap bon alors que la souche MCRJ a été isolée de la région de Ras El Djebel (Bizerte). Ces champignons hyphomycètes ne se multipliant que par la voie végétative conidienne présentent donc une grande adaptation environnementale avec leur milieu (Kallel *et al.*, 2008).

Les températures extrêmes qui surviennent pendant la période estivale à l'occasion des coups de sirocco diminuent d'une manière importante la population de *T. semipenetrans* (Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004; Kallel et B'Chir, 2004). Ces résultats montrent que pendant la saison estivale, où la température extrême enregistrée dans le sol atteint les 34 °C, les seuls champignons actifs dans le sol sont les deux souches de *Meristacrum* SKAN MC et MCCB. Il paraît, contrairement à la thèse avancée par Duncan et Cohn (1990), que la diminution importante de la période estivale est plutôt liée aux facteurs abiotiques essentiellement la température sous climat méditerranéen, qu'aux facteurs biotiques puisque les antagonistes sont également affectés. Les antagonistes naturels tels que les champignons prédateurs paraissent les plus actifs pendant la période printanière et automnale, périodes qui correspondent à une multiplication importante du nématode des *Citrus*. La meilleure activité prédatrice s'effectue à des températures aux alentours de 25 °C (Nabil, 1993; Ribeiro et Ferraz, 2000).

Bien que *M. cionopagum* ait montré une vitesse de croissance lente, mais il paraît nettement le plus efficace dans le piégeage des larves de *T. semipenetrans* par rapport aux autres souches de champignons prédateurs surtout qu'il confirme les résultats de Quinn (1987) qui a obtenu 77% de nématodes bactériophages piégés par *M. cionopagum*.

Quant à l'étude de l'interaction entre les racines de *Citrus* et les champignons prédateurs, il s'est avéré qu'il y a un effet attractif produit par les racines de *Citrus au-*

rantium sur les souches SKAN MC, MCCB, RGA, C, LA, ADCB et CBM. Par contre sur MCRJ, LAT, ARJ, AD et MS il ne semble pas y avoir de phénomène d'attraction. Des résultats similaires ont été obtenus par Bordallo *et al.* (2002) sur *A. oligospora*, qui montrent que les substances produites par les racines sont les seules responsables du tropisme de la croissance des champignons prédateurs. La caractérisation de ces substances, menée par Jansson *et al.* (1988), montre que ce sont des petites molécules avec une masse moléculaire ne dépassant pas les 200 Da, ce qui suggère qu'ils peuvent être des exsudats racinaires. Ce chimiotropisme, pourrait avoir une conséquence sur l'abondance et l'occupation spatiale des champignons prédateurs dans la rhizosphère, ainsi les racines ne seront pas uniformément protégées contre les attaques des nématodes phytoparasites (Persmark et Jansson, 1997). Les champignons prédateurs ont colonisé les racines de bigaradier et ils ont pu pénétrer à l'intérieur de l'épiderme et atteindre le cortex après 7 jours d'incubation. Ceci confirme l'étude de Bordallo *et al.* (2002) qui a été le premier travail montrant qu'un champignon prédateur de nématode est capable de coloniser des cellules racinaires. Mais contrairement aux résultats de Bordallo *et al.* (2002), les hyphes des champignons prédateurs se sont propagés jusqu'au tissu vasculaires de la racine de bigarade après 15 jours d'incubation. Ceci pourrait être expliqué par l'utilisation de racines excisées et par la capacité des champignons prédateurs de coloniser les tissus vasculaires des racines et des matières organiques mortes lors de leur phase saprophytique. La colonisation des racines par *M. cionopagum*, *A. oligospora* et les souches appartenant au genre *Meristacrum*, a induit une destruction des cellules épidermiques. Ceci pourrait être partiellement expliqué par la réponse des champignons au chimiotropisme exercé par les racines mais aussi par la croissance intracellulaire et l'abondance des hyphes dans les cellules des racines.

Les souches de champignons prédateurs se propagent entre les cellules des racines soit par une pénétration directe soit par la formation d'appressorium, qui est un organe de fixation et de pénétration qu'élaborent les champignons pour faciliter leur pénétration. Ces structures ont été observées dans le cas de *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*), (Lopez-Illorca *et al.*, 2002) ainsi que pour *A. oligospora* (Bordallo *et al.*, 2002) dans les racines. En outre la présence des structures ressemblant à des organes de piégeage pourrait être dû à l'habitude des champignons prédateurs de former des pièges pour capturer les nématodes phytoparasites. Tout ceci montre que l'habilité des champignons prédateurs a colonisé les racines de bigaradier pourrait jouer un rôle important dans l'installation et le maintien des champignons prédateurs à un niveau suffisant afin de garantir une meilleure efficacité contre les nématodes phytoparasites (Bordallo *et al.*, 2002). En effet, ces champignons prédateurs pourraient avoir un rôle important sur la protection des racines des

Citrus non seulement par la prédation des nématodes phytoparasites mais aussi par l'induction de modifications des cellules de la paroi racinaire et améliorerait la défense de la plante contre les nématodes et les champignons phytopathogènes (Monfort *et al.*, 2005; Bordallo *et al.*, 2002).

Plusieurs études se sont intéressées à décrire les antagonistes y compris les champignons prédateurs associés aux nématodes et particulièrement le nématode des *Citrus* mais très peu ont abordé les aspects interactifs entre ces organismes. Il est évident qu'un microorganisme élevé dans des conditions aseptiques en absence de toute concurrence présente une efficacité importante. Par contre, son efficacité dans les conditions naturelles est beaucoup plus faible puisqu'il est confronté à un équilibre biologique ce qui pourrait expliquer le peu de microorganisme commercialisé de nos jours (Meyer et Roberts, 2002). Les champignons prédateurs de nématodes sont très actifs dans le sol, ils entretiennent leur activité prédatrice grâce aux nématodes bactériophages (Quinn, 1987).

LITERATURE CITEE

- B'Chir M.M. et Namouchi N., 1988. Effet de *Bacillus pumilus* sur *Monacrosporium salinum*, un champignon prédateur de nématode. *Revue de Nématologie*, 11: 263-266.
- Bordallo J.J., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J., Persmark L. et Asensio L., 2002. Colonization plant roots by egg-parasitic nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, 154: 491-499.
- Cayrol J.C., Roudaillac P. et B'Chir M.M., 1972. Etude préliminaires sur les possibilités d'utilisation des champignons nématophages comme moyen de lutte biologique en champignonnière. *Revue de Zoologie Agricole et de Phytologie Végétale*, 71: 118-138.
- Duncan L.W et Cohn E., 1990. Nematode parasites of *Citrus*. Pp. 321-346. In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (Luc M., Sikora R.A. et Bridge J., eds). CAB International, Wallingford, UK.
- Ellekcioglu I.H., 1995. Occurrence of *Pasteuria* bacteria as parasites of plant-parasitic nematodes in the east Mediterranean region of Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 23: 213-215.
- Fattah F.A., Saleh H.M., Aboud H.M., 1989. Parasitism of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by *Pasteuria penetrans* in Iraq. *Journal of Nematology*, 21: 431-433.
- Gene J., Verdejo-Lucas S., Stchigel A.M., Sorribas F.J. et Guarro J., 2005. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 721-731.
- Jansson H.B., Johansson T., Nordbring-Hertz B., Tunlid A. et Odham G., 1988. Chemotropic growth of germ tubes of *Cochliobolus sativus* to barley roots or root exudates. *Transactions of the British Mycological Society*, 90: 647-650.
- Kallel S. et Abdelwahed A., 2004. Relation entre la défoliation des agrumes en vergers du Cap Bon et les dégâts associés au nématode des Citrus, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Revue de l'INAT*, 19: 43-57.
- Kallel S. et B'Chir M.M., 2004. Variation saisonnière et effet de la température sur l'inoculum potentiel du sol de *Tylenchulus semipenetrans*. *Nematologia Mediterranea*, 32: 31-41.
- Kallel S., Louhichi A., B'Chir M.M. et Van Oostveldt P., 2005. Structure du site trophique induit par *Tylenchulus semipenetrans* sur bigaradier observé en microscopie photonique, confocale et électronique à transmission. *Nematologia Mediterranea*, 33: 171-178.
- Kallel S., Louhichi A. et B'Chir M.M., 2006. Résistance de *Citrus aurantium* induite par le *Poncirus trifoliata* vis-à-vis de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Nematology*, 8: 671-679.
- Kallel S., Elfékih S., Abdelwahed A. et B'Chir M.M., 2008. Etude comparative de l'adaptation de deux souches du champignon prédateur *Monacrosporium salinum* à la variation de facteurs abiotiques. *Nematologia Mediterranea*, 36: 191-195.
- Labiadh M. et Kallel S., 2008. Complexité de l'utilisation des champignons prédateurs de *Tylenchulus semipenetrans* dans les vergers de Citrus. *Proceeding du Symposium Méditerranéen sur la Protection Phytosanitaire des Agrumes*. Rabat, Maroc, 9-11 Juin 2008, 355-370.
- Lopez-Illorca L.V., Bordallo J.J., Salinas J., Monfort E. et Lopez M.L., 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron*, 33: 61-67.
- Meyer S.L.F. et Roberts D.P., 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology*, 34: 1-8.
- Monfort E., Lopez-Llorca L.V., Janson H.B., Salinas J., On Park J. et Sivasithamparam K., 2005. Colonisation 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 Biology and Biochemistry*, 37: 1229-1235.
- Monson H.L., 1968. Trapping effectiveness of five species of nematophagous fungi cultured with myceliophagous nematodes. *Mycologia*, 60: 788-801.
- Nabil H., 1993. Etude des facteurs déterminant la variabilité de l'agressivité de *Monacrosporium salinum* à l'égard des nématodes. Thèse de troisième cycle, Fac. Des sciences, Tunis, Tunisie, 92 pp.
- Namouchi N., 1986. Les possibilités et les limites de l'utilisation des hyphomycètes prédateurs en lutte biologique contre les *Meloidogyne* spp. Sous abris serres. Mémoire de troisième cycle INAT, Tunis, Tunisie, 105 pp.
- Pelloile M., 1979. Etude des hyphomycetes prédateurs de nématode rencontrés sur une prairie du Limousin: Morphologie - physiologie, fréquence et distribution. Thèse de Doctorat en Sciences Philosophie de l'Université de Rennes, France, 106 pp.
- Pelloile M., Franckowski J.P. et Cayrol J.C., 1984. Etude de quatre souches de *Monacrosporium* en vue de leur utilisation en lutte biologique contre les nématodes phytophages. *Oecologia Applicata*, 5: 245-257.
- Persmark L. et Jansson H.B., 1997. Nematophagous fungi in the rhizosphere of agricultural crops. *FEM Microbiology Ecology*, 22: 303-312.
- Quinn M.A., 1987. The influence of saprophytic competition on nematode predation by nematode-trapping fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49: 170-174.

- Ribeiro R.C.F. et Ferraz S., 2000. Evaluation of *Monacrosporium* spp. on the control of *Meloidogyne javanica* in tomato plants. *Summa Phytopathologica*, 26: 62-68.
- Sikora R.A. et Schuster R.P., 1989. Formulation of fungal egg parasites in alginate and their influence on biological control of *Globodera pallida*. *Journal of Nematology*, 21: 588.
- Sorribas F.J., Verdejo-Lucas S., Forner J.B., Alcaide A., Pons J. et Ornat C., 2000. Seasonality of *Tylenchulus semipene-*
trans Cobb and *Pasteuria* sp. in citrus orchards in Spain. *Journal of Nematology*, 32: 622-632.
- Stirling G.R. et Mankau R., 1977. Biological control of nematode parasites of citrus by natural enemies. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 3: 843-847.
- Walter D.E. et Kaplan D.T., 1990. Antagonists of plant parasitic nematodes in Florida *Citrus*. *Journal of Nematology*, 22: 567-573.

Acceptée pour publication le 16 Septembre 2010.