

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : sciences agronomique

Spécialité : protection de végétaux

Intitulé

Etude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir de
Citrus limon vis à vis *penicillium digitatum*

Présenté par : GUERBOUZ Mohamed Said

KHOUDOUR Haizia

Soutenu le:

Devant le jury :

Président : ZIOUCHE Sihem

M.C.B

UNIV BBA

Encadrant: LAIB Djamel Eddine

M.A.A.

UNIV BBA

Examineur :SAYAH Tahar

M.A.A

UNIV BBA

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah tout puissant pour le courage et toute la patience qu'il nous a donné pour surmonter toutes les difficultés rencontrées durant tout notre cursus scolaire et universitaire.

On adresse nos remerciements à :

Madame ZIOUCHE Sihem Maitre de conférence à l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. d'avoir accepté de présider le jury.

Monsieur SAYAH Tahar Maitre de conférence à l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. d'avoir accepté d'examiner notre travail.

On adresse nos plus vifs remerciements à Monsieur LAIB djamel eddine qui nous a proposé cet intéressant thème de travail. On a beaucoup apprécié ses qualités scientifiques, humaines et surtout son

optimisme tout le long du parcours. On le remercie pour son aide, sa disponibilité, ses précieux conseils.

Ce fut un plaisir et une chance de travailler avec lui.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail de près ou de loin.



Dédicaces

Je dédie ce Modeste travail aux deux êtres les plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour A mon père pour sa patience avec moi et encouragement A ma source de bonheur, ma mère.

*Je dédie aussi ce Modest travail A ma chère âme HAYAT, que dieu ait pitié d'elle mes sœur MBARKA
et*

SABAH, mes frères : AZIZ, ZIN EDDINE, BADR EDDINE, BASEM, FAUDIL pour leurs aides, soutien moral et leur encouragement tout au long de mes années d'études, que Dieu les protèges.

Je dédie mon cher ami : HAFSSA et tous mes collègues de la promotion pour leur aide.



Dédicaces

Je dédie ce travail:

*A la prunelle de mes yeux, celle qui m'a soutenu jour et nuit
pour qu'elle me voit toujours au sommet et comme une
étoile filante: A toi ma chère mère.*

*A vous mes chers parents, le déluge d'amour éternel et les
sacrifices symbolique*

A mes frères et sœurs,

A toute la famille GUERBOUZ Et NOUACER.

A Tous mes amis

A tous ceux que j'aime

Liste des figures

Figure 1. Arbuste de citronnier	5
Figure 2. Feuilles de citronnier.....	5
Figure 3. Fleurs de citronnier.....	6
Figure 4. Fleurs de citronnier.....	6
Figure 5. Lavage des échantillons sous l'eau courante.....	14
Figure 6. Coupage des échantillons en segments 5*5mm.....	14
Figure 7. Stérilisation superficielle des segments foliaires.....	15
Figure 8. Transfert des segments dans des boites de pétri contenant un milieu PDA.....	15
Figure 9. Incubation pendant 21 jours.....	16
Figure 10. Isolement et purification des colonies fongiques endophytes du citron.....	16
Figure 11. Fréquence de colonisation des champignons endophytes de <i>Citrus limon</i>	17
Figure 12. Taux d'inhibition du champignon <i>Penicillium digitatum</i> par les champignons endophytes du citron.....	17

Table de matières

Remerciements

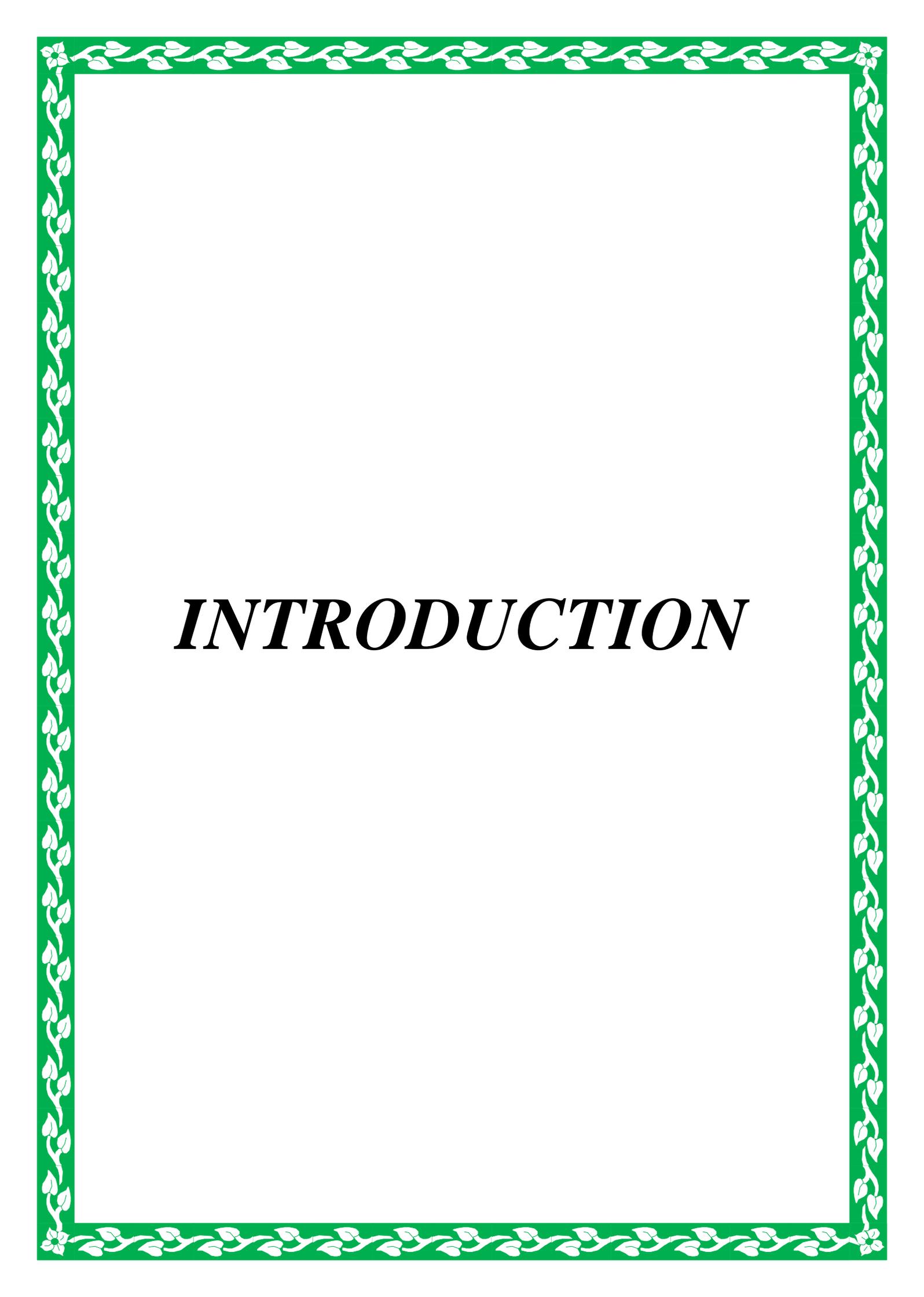
Dédicaces

Liste de figures

I. Introduction.....	1
II. Synthèse bibliographique.....	2
II.1.Les champignons endophytes.....	2
II.1.1.Définition	2
II.1.2.Caractéristiques générales	2
II.1.3.Classification	2
II.1.4.L'interaction endophyte-plante hôte.....	3
II.1.5.L'importance de champignons endophytes	4
II.2.Le Citronnier <i>Citrus limon</i>	5
II.2.1.Description.....	5
II.2.2.Taxonomie	7
II.2.3.Composition chimique	7
II.2.4. Principaux maladies et ravageurs.....	7
II.2.4.1.Maladies.....	7
II.2.4.1.1 Maladies bactériennes.....	8
II.2.4.1.1.1. Le stubbornne :(<i>Spiroplasma citri</i>)	8
II.2.4.1.1.2.Le chancre bactérien des agrumes :(<i>Xanthomonas coprestris</i> PV . <i>Citri</i>)	8
II.2.4.1.1.3. Bactériose.	8
II.2.4.1.2. Maladies cryptogamiques.....	9
II.2.4.1.2.1.Le Mal secco : (<i>Deuterophoma tracheiphila</i>)	9
II.2.4.1.2.2.La fumagine.....	9
II.2.4.1.2.3.La gommose.....	9
II.2.4.1.2.4. Pourriture verte.....	9
II.2.4.1.2.5. Pourriture molle des racines.....	10
II.2.4.1.2.6. Pourriture noire du Fruit.....	10
II.2.4.1.2.7. Anthracnose :(<i>Colletotrichum sp</i>)	10
II.2.4.1.3.Maladies causées par les virus.....	10
II.2.4.1.3.1.La Tristeza.....	10
II.2.4.1.3.2.Les psoroses : agent causal <i>Citri</i> vir <i>psorosis</i>	11
II.2.4.1.3.3.L'exocortis.....	11
II.2.4.2. Les ravageurs.....	11
II.2.4.2.1 Acariens.....	11
II.2.4.2.1.1. L'araignée rouge.....	11
II.2.4.2.1.2. L'acarien des bourgeons (<i>Aceria sheldoni</i>).	11

Table de matières

II.2.4.2.2. Nématodes.....	12
II.2.4.2.3 Insectes.....	12
II.2.5. Distribution géographique de la plante.....	12
II.2.6. Utilisation.....	13
III. Matériel et méthodes.....	14
III.1. Matériel biologique.....	14
III.1.1. Matériel végétal.....	14
III.2. Méthodes.....	14
III.2.1. Isolement et purification des champignons endophytes de <i>Citrus limon</i>	14
III.2.2. Calcul de la fréquence de colonisation.....	16
III.2.3. Identification morphologique des champignons endophytes de <i>Citrus Limon</i>	16
III.2.4. L'activité antifongique par la technique de double culture.....	17
IV. Résultats et discussion.....	17
IV.1. Résultats.....	17
IV.1.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du <i>Citrus limon</i>	17
IV.1.2. Discussion.....	18



INTRODUCTION

I. Introduction

Les maladies des plantes sont à l'origine de pertes importantes en agriculture, tant quantitatives (pertes de rendements à la récolte ou au court du stockage) que qualitatives (production de toxines fongiques, d'arômes ou d'odeurs indésirables) (Oerke, 2006).

Parmi ceux-ci *Penicillium digitatum*, qui est considéré comme l'un des espèces fongiques les plus dommageables pour l'agriculture actuelle

Le contrôle de cette maladie repose en grande partie sur l'utilisation des fongicides (Leroux et al., 1999).

Ces produits chimiques sont rentables, mais leur utilisation massive a créé des problèmes tels que le phénomène de résistance, la pollution de l'environnement et des effets indésirables sur la santé humaine et sur les auxiliaires (Ali et al., 2012).

Les risques et les problèmes associés à l'utilisation de produits chimiques conduisent à une réglementation environnementale de plus en plus stricte des pesticides (Pavela et al., 2007).

Il y a donc un besoin urgent de développer des alternatives efficaces respectueuses de l'environnement, plus sûres, faciles à utiliser et ont le potentiel de remplacer les pesticides ou fongicides de synthèse (Tapondjou et al., 2005).

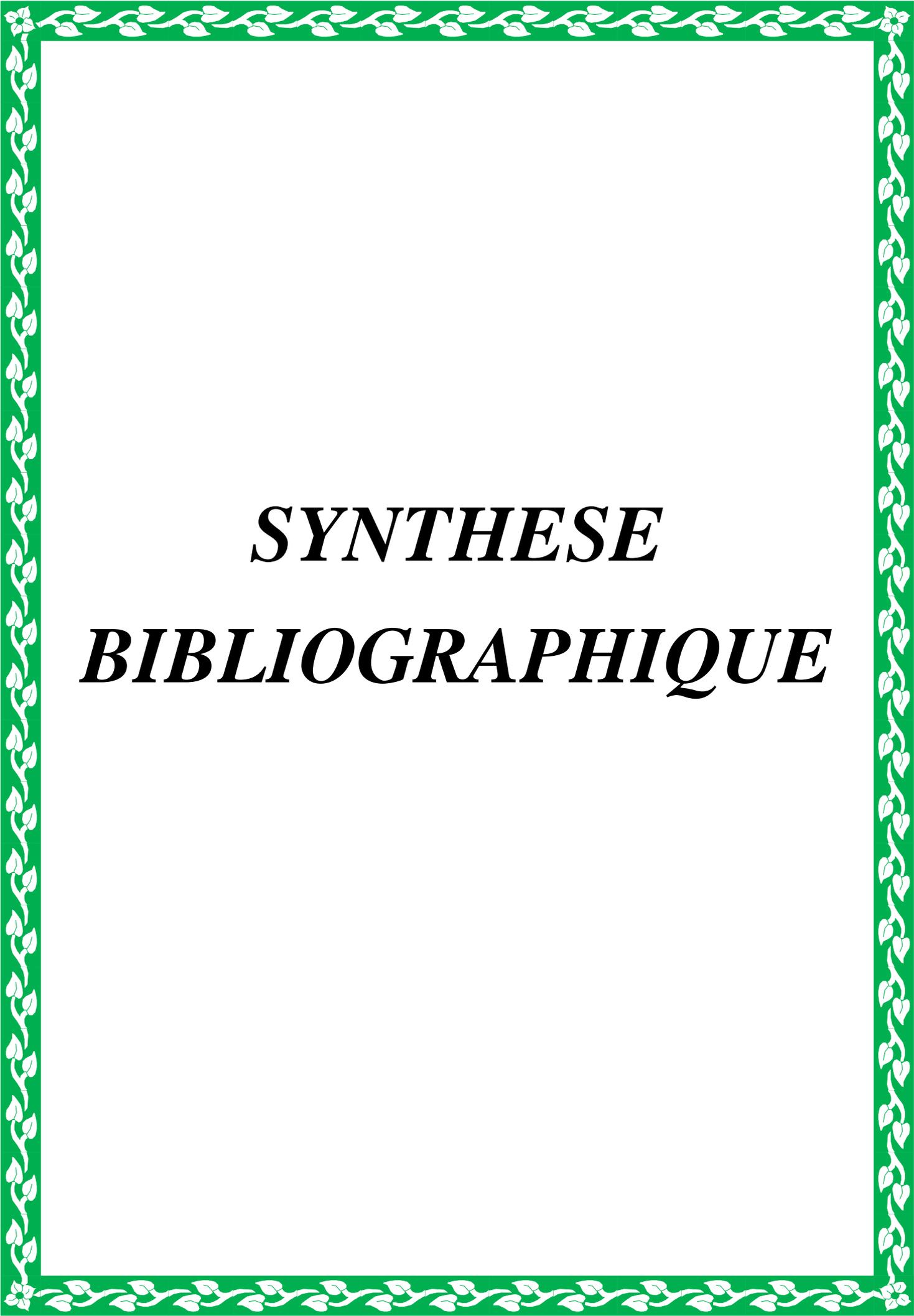
Parmi ces alternatives, les champignons endophytes qui sont considérés actuellement comme un des groupes biologiques les plus prometteurs en matière de protection des plantes contre un bon nombre de pathogènes (Vega et al., 2009).

Dans ce contexte, la présente étude est focalisée dans la bioprospection des capacités antifongiques des taxons fongiques endophytes isolés à partir du citron *Citrus limon* vis-à-vis *Penicillium digitatum*.

Ce travail est structuré en 3 parties:

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique mettant l'accent sur : les champignons endophytes, *le citronnier*
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisées.
- Ainsi qu'une troisième partie démontrant les résultats obtenus en ce qui concerne les différentes expériences effectuées.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

II. Synthèse bibliographique

II.1. Les champignons endophytes

II.1.1. Définition

Les champignons endophytes sont des microorganismes colonisant les tissus végétaux internes sans causer des symptômes apparents sur la plante hôte (Porras Alfaro et Bayman, 2011).

II.1.2. Caractéristiques générales

Les champignons endophytes, sont presque présents dans toutes les plantes (Wang et Dai, 2011), présentent une grande diversité et sont majoritairement issus du phylum *Ascomycota* (Arnold, 2007).

Ces microorganismes colonisent l'espace intercellulaire ou intracellulaire, au moins pour une partie de leur vie sans causer des symptômes d'infection apparents (Kaul et al., 2012).

Deux modes de transmission ou moyen de colonisation d'un autre individu végétal à partir de l'hôte initial sont observés chez les champignons endophytes (Arnold, 2007).

La transmission verticale se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte progéniture de l'hôte primaire par la pénétration d'un hyphes de champignon endophyte dans une graine, un grain de pollen ou une propagule de la plante hôte (Currie et al., 2014).

La transmission horizontale se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte n'ayant la plupart du temps pas de lien avec l'hôte primaire par la dissémination de spores par un vecteur de dispersion. Après germination, l'hyphes pénètre et colonise le nouvel hôte soit par les stomates soit par pénétration directe au travers de l'épiderme (Clay et al., 2002).

II.1.3. Classification

Selon Rodriguez et al. (2009). Les champignons endophytes se subdivisent en 4 classes :

Les endophytes de classe 1 sont constitués par des champignons appartenant à la famille des Clavicipitaceae (*Ascomycota*) englobant 37 genres et 4 espèces *Balansia*, *Ephelis*, *Epichloë* et *Neotyphodium* spp.

Les endophytes de classe 2 sont en majorité constitués d'*Ascomycota* (uniquement des *Pezizomycotina*), mais ils comprennent également quelques représentants des *Basidiomycota* (*Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina*).

Ils présentent un spectre d'hôte large et peuvent coloniser toutes les parties de la plante et croissent de manière extensive dans le milieu intercellulaire principalement. La transmission est le plus souvent verticale, mais il y a parfois transmission horizontale.

Les endophytes de classe 3 sont en majorité constitués d'*Ascomycota*, en particulier les Pezizomycotina, (familles des Sordariomyceta, Dothideomyceta, Pezizomyceta, Leotiomyceta et Eurotiomyceta). on trouve également des *Basidiomycota*, plus souvent présents dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires. Ils peuvent coloniser les parties aériennes des plantes tropicales d'une plante mais de manière très localisée. et leur transmission est strictement horizontale.

Les endophytes de classe 4 appartiendraient aux *Ascomycota* du sous embranchement des Pezizomycotina en particulier les ordres des Pleosporales, Pezizales et Helotiales et présentent un large spectre d'hôte, bien qu'on les retrouve souvent associés à des arbustes ou arbres, en particulier les espèces de conifères. Ils ne colonisent uniquement que les racines de la plante, de manière extensive. Ils sont caractérisés par la nature de leurs hyphes septées et de couleur sombre de par la présence de mélanine. Ce sont les Dark Septate Endophyte (DSE).

II.1.4.L'interaction endophyte-plante hôte

Selon les espèces concernées, le résultat d'une interaction plante-endophytes peut aller de l'antagonisme au mutualisme (Zabalgoitia, 2008).

Les champignons endophytes englobent des saprophytes latentes, des espèces mutualistes et des pathogènes latents (Zabalgoitia, 2008).

Parmi les champignons endophytes les pathogènes latents qui sont co-évolués avec leurs hôtes et ne sont donc pas très virulents, ne causent aucun symptôme à leurs hôtes, mais si la plante est stressée ou bien la sénescence des feuilles commence, la sporulation de ces agents pathogènes commence (Sieber, 2007).

Plusieurs études récentes confirment que certaines espèces endophytes sont également décomposeurs de la litière (Promputtha et al., 2010; Chaverri et Gazis, 2011; Purahong et Hyde, 2011; Sun et al., 2011; Hirose et al., 2013).

Il est à signaler que certains des endophytes ont la capacité de continuer à exister en tant que saprophytes dans les feuilles mortes (Unterseher et al., 2013).

L'association mutualistique des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes est asymptomatique (Ting, 2014), agissant contre les prédateurs, les agents pathogènes, les herbivores et les insectes nuisibles (Lacava et Azevedo, 2014).

Ces champignons endophytes augmentent la résistance des plantes aux agents pathogènes par la production des agents antimicrobiens et des régulateurs de croissance. Ils améliorent également la tolérance du stress biotique et abiotique (Lacava et Azevedo, 2014). En retour, les plantes hôtes fournissent la structure spatiale, la protection contre la dessiccation, les éléments nutritifs, la fourniture des photosynthétats et dans le cas de la transmission verticale, la diffusion dans la prochaine génération des plantes hôtes (Clay, 1988; Wolock-Madej et Clay, 1991; Knoch *et al.*, 1993; Saikkonen *et al.*, 1998; Faeth et Fagan, 2002; Rudgers *et al.*, 2004).

II.1.5. L'importance de champignons endophytes

En général, les champignons endophytes pourraient jouer un rôle important dans la physiologie de la plante en conférant la résistance aux insectes et aux nématodes, la tolérance à la sécheresse, la protection contre les agents phytopathogènes (Arnold *et al.*, 2007; Brosi *et al.*, 2011).

L'inoculation du champignon endophyte *M. anisopliae* à l'intérieur des plantes de *Brassica napus* provoque un pourcentage de mortalité respective de 35,56.7 et 63.3 après 2,3,4 semaines des larves phytophages de *Plutella xylostella*. En comparaison avec des larves qui se nourrissent des plantes non inoculées par ce champignon où le pourcentage de mortalité a varié en fonction des mêmes dates d'observation de façon respective (15,18.3 et 11.7) (Batta, 2013).

Le champignon endophyte de la tomate *Fusarium oxysporum* souche 162 induit la résistance systématique contre le nématode *Meloidogyne incognita* (Martinuz *et al.*, 2012) et *R. similis* dans la banane par application combinée avec le champignon *Paecilomyces lilacinus* souche 251 et la bactérie *Bacillus firmus* (Mendoza et Sikora, 2009).

L'inoculation de plantes de *Dichanthelium lanuginosum* avec le champignon endophyte *Curvularia* sp. leur confère une tolérance de la sécheresse où des plantes non inoculées ne peuvent pas survivre (Redman *et al.*, 2002). Des constatations similaires sont observées chez *Cucumis sativus* inoculé par *Paecilomyces formosus* LHL10 où la croissance est améliorée (Khan *et al.*, 2012b).

Le champignon endophyte *Phoma* sp. isolé à partir *Arisaema aerubescens* produit le 3,6,7-trihydroxy- α -tétralone, cercosporamide, β -sitostérol, le trichodermine à activité antifongique contre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum*

gloeosporioides et *Magnaporthe oryzae* et antibactérienne contre les bactéries pathogènes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas oryzae* (Wang et al.,2012).

II.2.Le Citronnier *Citrus limon*

II.2.1.Description

Le citronnier est un arbuste de taille moyenne qui atteindra entre 3 à 6 m de haut (Figure.1)caractérisé également par une croissance rapide, une production de nombreuses branches et une fructification abondante, plus importante en hiver (de 60 à70% de production annuelle de l'arbre) (Dubois, 2006).

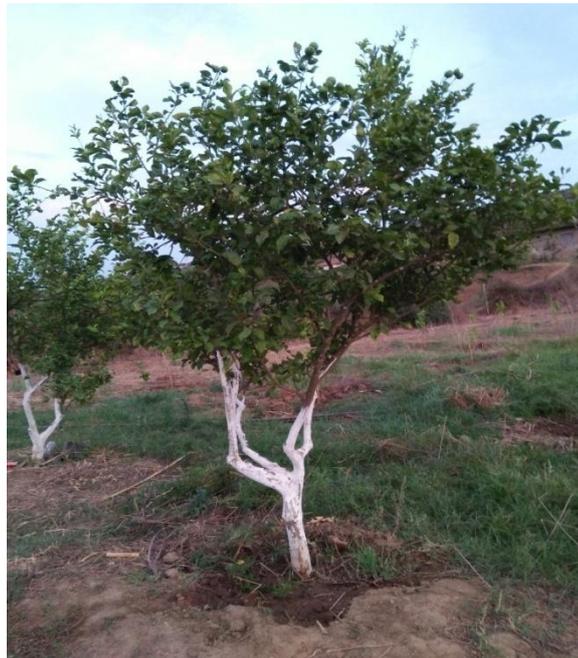


Figure 1.Arbuste de citronnier (Originale ,2020).

Ses feuilles sont persistantes, vert foncé et luisantes,plus pâles sur leur reversont une forme en fuseau odorantes, de 6 à 11 cm de long, sont alternes, dentelées et leur pétiole est parfois ailé (Figure.2).



Figure 2.Feuilles de citronnier (Originale ,2020).

Synthèse bibliographique

Les fleurs sont plutôt de petites tailles, à 5 pétales blancs, légèrement cireuse, elle dégage un parfum très agréable (Figure.3).



Figure 3.Fleurs de citronnier (Originale ,2020).

Les fruits sont jaunes, plus ou moins acides en fonction de la variété, de forme ovale, avec une peau fine et colorée en jaune à maturité (Figure.4).Les racines sont relativement superficielles et supportent mal la concurrence de plantes voisines.(Dubois, 2006 ;Blancke, 2001).



Figure 4.Fleurs de citronnier (Originale ,2020).

II.2.2. Taxonomie

La position taxonomique de citronnier, d'après Swingle (1948) se présente comme suit :

Ordre : Géraniales

Famille : Rutaceae

Sous Famille : Aurantioïdea

Tribu : Citreae

Sous Tribu : Citrinae

Genre : Citrus

Espèce : *Citrus limon*

II.2.3. Composition chimique

Le citron renferme différents types de flavonoïdes antioxydants permettent, entre autres, de neutraliser les radicaux libres du corps et, ainsi, prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques. Les principaux flavonoïdes contenus dans le citron sont l'ériocitrine et l'hespérétine extraits de l'écorce du citron ou de son jus qui pourraient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages liés au stress oxydatif (Miyake et al., 1998).

Les principaux limonoïdes que renferment les agrumes sont la limonine et la nomiline retrouvés principalement dans les pépins mais aussi dans le jus (Miller et al., 2004). Les limonoïdes possèdent une certaine capacité antioxydante (Yu et al., 2005).

Les citronniers sont riches en fibres solubles, principalement en pectine, que l'on retrouve dans l'écorce et dans la membrane blanche autour et qui diminue le cholestérol sanguin et réduit l'incidence des maladies cardiovasculaires (Coats, 1991).

Les protéines présentes dans l'extrait de jus de citron pourraient améliorer la réponse immunitaire (Gharagozloo et Ghaderi, 2001) et d'arrêter la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro* (Gharagozloo et al., 2002).

Le citronnier comporte également les lipides, glucides, le Calcium, le Phosphore, le Fer, le Sodium, le Potassium, la vitamine A et l'acide ascorbique (Morton, 1987).

II.2.4. Principaux maladies et ravageurs

II.2.4.1. Maladies

Les agrumes sont exposés à une large gamme de maladies cryptogamiques, bactériennes et virales qui peuvent affecter les feuilles, les racines, les fruits, et le xylème.

II.2.4.1.1 Maladies bactériennes

II.2.4.1.1.1. Le stubbornne :(*Spiroplasma citri*)

C'est la maladie la plus répandue et la plus grave, surtout lorsqu'elle est associée à une autre virose principalement la psorose et transmise soit en pépinière par greffage ou bien dans le verger à partir des arbres malades à des arbres sains par les cicadelles. Selon Fajinmi et *al.* (2011), ce mycoplasme présente les symptômes et dégâts suivantes :

- Aspect de feuilles de saule.
- Rameaux courts et coudés.
- Le limbe a tendance à s'enrouler de chaque côté de la nervure médiane.
- Les feuilles deviennent chlorotiques et tombent.
- Les fruits affectés sont généralement glandiformes avec variation dans l'épaisseur de la peau.
- En cas d'attaque grave, la pulpe est atteinte et devient aigre-amère avec une odeur désagréable.

II.2.4.1.1.2. Le chancre bactérien des agrumes :(*Xanthomonas coprestris* PV .*Citri*)

Le chancre des agrumes est une maladie bactérienne provoquée par la bactérie par *Xanthomonas coprestris*. pv. *citri*. Cette maladie infecte toutes les parties aériennes de la plante.

Elle provoque des symptômes qui se traduisent par :

- Des petites taches translucides et lésions des feuilles, tiges, et fruit des arbres.
- Développement de pustules brun et liégeuses sur la tige des plantules.
- Eruptions verticalement et horizontalement, formant plaquettes rectangulaires (Gottwald et *al.*,2002).

II.2.4.1.1.3. Bactériose.

Causée par *Pseudomonas syringae* qui peut provoquer de sévère dommage en année humide et froide (Loussert, 1989).

Elle se manifeste par présence de taches brun rouge sur les rameaux accompagnée d'un exsudat bactérien, ces taches peuvent apparaître également après la cueillette ce qui fait perdre beaucoup de la valeur et la qualité du fruit (Colombo, 2004).

II.2.4.1.2. Maladies cryptogamiques

II.2.4.1.2.1. Le Mal secco : (*Deuterophoma tracheiphila*)

Appelé aussi le dessèchement infectieux. C'est une maladie cryptogamique causée par *Deuterophoma tracheiphila* (ACTA, 1990). Elle est dû à un excès de sel dans le sol et se développe dans les tissus conducteurs et entrave la circulation de la sève (Jamoussi, 1955).

Les premiers symptômes se manifestent par une légère chlorose qui ne frappe pas, en général toute la plante, mais se cotonne dans certains secteurs de l'arbre et une coloration des rameaux malade avec le jaune châtain et le bois de l'arbre avec le jaune marron (Passinetti, 1952).

II.2.4.1.2.2. La fumagine

Selon Loussert (1989), cette maladie est due à l'installation de *Capnodium citri* qui se développe sur le miellat déposé sur les feuilles et les rameaux après une forte attaque des insectes homoptères comme, les cochenilles, les pucerons et les aleurodes. Les champignons forment une couche noirâtre et opaque sur les feuilles et les fruits ce qui diminue fortement l'activité photosynthétique. Si l'infection sur les feuilles se succèdent plusieurs années, la vigueur de l'arbre diminue.

II.2.4.1.2.3. La gommose

Appelée encore maladie du collet, la gommose est provoquée par un champignon qui appartient au groupe Péronosporales, du genre *Phytophthora* (Jamoussi, 1955). Son développement est favorisé par les sols mal drainés et l'humidité excessive (Polese, 2008).

Selon Ricci et *al.* (1990) ; Ippolito et *al.* (2004), ce champignon provoque :

- Des boursouflures et des plaques transparentes jaune clair d'épaisseur variable au niveau de l'écorce.
- Des exsudations de gomme au niveau du tronc et des branches et entraîne un jaunissement et flétrissement des feuilles sur les nervures.
- Affaiblissement des racines.
- Décoloration marron clair des fruits avec mycélium blanc sur la surface.

II.2.4.1.2.4. Pourriture verte

Causée par *Penicillium digitatum*. Elle est facilement détectable en raison de sa couleur caractéristique verte/ gris. Au début de l'attaque, l'écorce du fruit s'éclaircit et devient molle. Ensuite un duvet blanc se forme, puis s'étend de jour en jour et des spores vertes apparaissent dessus. A la fin, tout le mycélium est recouvert de spores

vertes d'où le nom de pourriture verte elle est responsable des pertes économiquement significatives et dans le monde (Bancroft et *al.*, 1984 ; Eckert et Eaks, 1989).

II.2.4.1.2.5. Pourriture molle des racines

Cette pourriture est due à *Armillaria mellea*, qui s'installe de préférence sur les arbres affaiblis. La maladie apparaît généralement dans des foyers localisés et s'étend, de plus en plus, dans les plantations (Jamoussi, 1955).

Selon Guillaumin et Legrand (2005), ce champignon présente des symptômes après son installation qui sont :

- Un jaunissement et flétrissement des feuilles.
- Dépérissement progressif de l'arbre
- Une formation des rhizomorphes violacés sur la surface de la racine qui stimulent de petites racelles; ils sont constitués par des faisceaux de filaments mycéliens dont la couche externe durcit et forme une carapace de couleur brun clair avec des écailles brunes

II.2.4.1.2.6. Pourriture noire du Fruit

Causée par *Alternaria citri* qui est un pathogène de blessures (grattages d'épiderme, plaie de coupe du pédoncule), mais il pénètre surtout dans les fruits par les ouvertures naturelles (ombilic, cicatrice styloïde, craquelures de base du pédoncule). Peu visible extérieurement, car le champignon s'installe en profondeur et nécrose la pulpe, sauf dans le cas d'une attaque sur lésions accidentelles. Elle provoque une pourriture noire du fruit, décoloration noire des graines et des taches brunes circulaires qui s'agrandissent, fusionnent et provoquent la pourriture des fruits (Isshiki et *al.*, 2001).

II.2.4.1.2.7. Anthracnose : (*Colletotrichum sp*)

C'est une maladie qui ne provoque pas des dommages particulièrement importants. Elle se manifeste sur les jeunes rameaux, les feuilles et les fruits. La pluie et l'humidité atmosphérique ainsi que les erreurs de taille sont des facteurs qui favorisent le développement de ce champignon (Colombo, 2004).

II.2.4.1.3. Maladies causées par les virus

II.2.4.1.3.1. La Tristeza

Maladie transmise par greffage et par insectes vecteurs comme le puceron, c'est une maladie qui est considérée comme la plus dangereuse des viroses des agrumes parce qu'elle est responsable de la mort de plusieurs millions d'arbres dans les pays où elle s'est propagée. (Loussert, 1989)

Les symptômes se traduisent par des nécroses des vaisseaux du liber, tant dans la partie souterraine que dans la partie aérienne (Jamoussi, 1955). En effet, le virus commence ses attaques sur le cheveluradicaire (Klotz et Fawcett, 1952), puis la nécrose gagne de proche en proche la partie aérienne et à la fin, l'arbre dépérit et meurt (Fajinmi et al., 2011).

II.2.4.1.3.2. Les psoroses : agent causal *Citricolletia psorosis*

On rassemble sous le nom de la psorose, un groupe des maladies à virus désignés sous le nom de *Citricolletia psorosis* dont il existe plusieurs variétés, chacune étant responsable d'une forme de Psorose. Elle se transmet surtout par greffage (Jamoussi, 1955).

Cette maladie présente des symptômes caractéristiques qui se traduit par une décoloration du limbe, des feuilles et des nervures centrales par une couleur vert clair ou des taches jaunâtres qui sont visibles au verger et apparaît au printemps sur les jeunes feuilles (Loussert, 1989).

II.2.4.1.3.3. L'exocortis

Maladie à viroïde transmise par greffage et par les outils de taille, elle se manifeste uniquement sur les arbres greffés au niveau du porte-greffe sensible. (Loussert, 1989)

Cependant, cette maladie ne cause pas actuellement de grave dommage, car le bigaradier est tolérant à l'exocortis contrairement au citrange qui est affecté par cette maladie. Ses symptômes se traduisent par un écaillage plus ou moins prononcé de l'écorce du porte-greffe, le greffon n'étant pastouché. (Loussert, 1989).

II.2.4.2. Les ravageurs

II.2.4.2.1 Acariens

Plusieurs espèces d'acariens sont connues comme des parasites d'agrumes. Parmi ces ravageurs on trouve :

II.2.4.2.1.1. L'araignée rouge

D'après Colombo (2004), Cet acarien tétranychidés favorise ses attaques lorsque le temps est particulièrement chaud et humide, il provoque l'apparition des cloques et une chute importante des feuilles et des fruits, aussi un ralentissement de la croissance à cause de sa soustraction de la sève au niveau de la plante.

II.2.4.2.1.2. L'acarien des bourgeons (*Aceria sheldoni*).

C'est un phytopte qui s'attaque aux bourgeons des agrumes, entre les sépales et les jeunes fruits ainsi que dans les autres endroits dissimulés de la plante, il provoque des excroissances et des malformations au niveau des feuilles, des fruits et des bourgeons (Bayer, 2018).

II.2.4.2.2. Nématodes

Ce sont des verres microscopiques qui vivent dans le sol et qui attaquent les racines en causant de graves dommages qui se traduisent par un jaunissement des feuilles. Leurs attaques sont localisées au niveau des racines et radicelles des arbres sur lesquelles ils provoquent de grave dommages qui se traduisent par des nécroses et jaunissement des feuilles (Paraloran, 1971).

Généralement dans les sols déjà contaminés par les nématodes, l'humidité élevée de la terre et sa température sont autant des conditions qui favorisent son infestation. (Loussert, 1989)

II.2.4.2.3 Insectes

Les insectes se développent sur les organes de l'arbre sont nombreux. Non seulement ils causent de graves dégâts, mais ce sont des vecteurs de maladies virales et bactériennes. Parmi les plus importants de la classe des insectes nous citons :

La mineuse des feuilles (*Phyllocnistis citrella*)

C'est un lépidoptère qui appartient à la famille des Gracillidae et à la sous famille des Phyllocitinae (Balachowsky, 1935).

Cet insecte s'attaque principalement aux jeunes pousses situés à l'extérieur de la ramure. La larve pond ses œufs à l'intérieur du limbe en formant des galeries argentées qui se nourrissent au sucre des feuilles, cela entraîne un ralentissement de la photosynthèse (Courboulex, 2010). Par la suite, les tissus attaqués se nécrosent ce qui entraîne dans la plupart des cas la chute des feuilles (Aubert, 1994).

Les aleurodes sont des homoptères dont leurs larves qui sont d'une taille minuscule de l'ordre de 0.8 à 1mm de diamètre (Piguet, 1960)

La mouche méditerranéenne des fruits Considérée comme étant l'insecte le plus nuisible sur les agrumes. D'après Piguet (1960), ce diptère possède à l'état larvaire une armature buccale constituée de deux solides crochets qui lui permettent de dilacérer la pulpe des fruits. Cela provoque l'apparition de taches chlorotiques isolées qui donnent naissance à un point mou qui devient rapidement brun et pourrit. Son attaque se traduit souvent par le murissement précoce puis la chute des fruits.

II.2.5. Distribution géographique de la plante

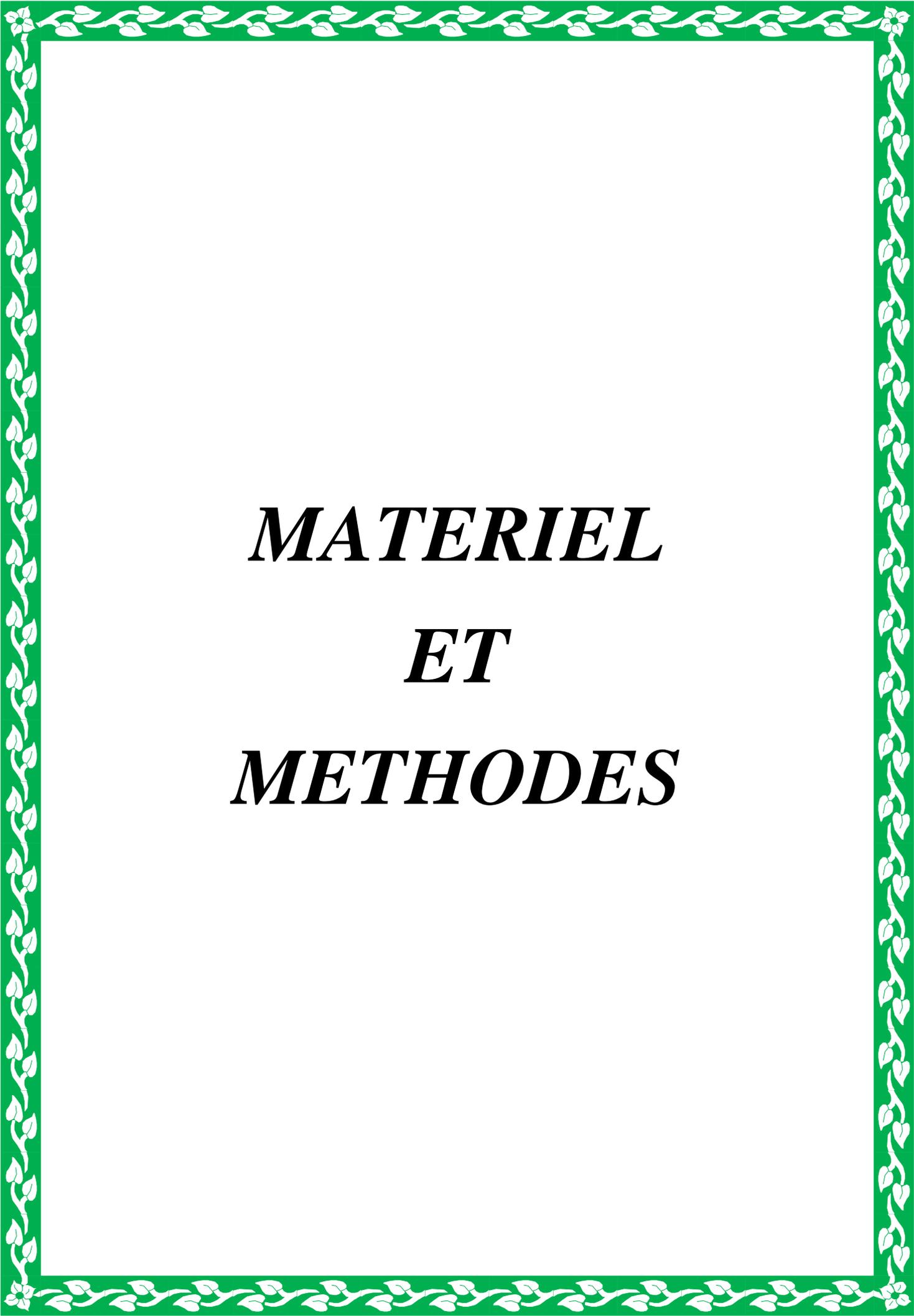
La production et la consommation mondiale d'agrumes ont connu une période de forte croissance depuis le milieu des années 80. Les citrons sont généralement produits sous des climats plus froids, tels que l'ouest des États-Unis, l'Espagne, l'Italie et l'Argentine. Ils sont également adaptés à des climats secs (Égypte, Iran,

Inde, etc.). Les grands pays producteurs sont le Mexique et le Brésil (Spren et *al.*, 2010).

II.2.6. Utilisation

Les citrons ne sont pas consommés frais, mais ils peuvent être présents sur toutes les tables autour de la méditerranée indépendamment du fait qu'on sert de la viande, de la volaille ou du poisson. Le jus de citron est pressé pour parfumer toute grillade ou frites. En cuisine, c'est le zeste du fruit qui est recherché. Le citron pelé ou finement graté donne sa propre saveur qui est très prisée en cuisine et en pâtisserie, pour la fabrication de la limonade. Le jus de citron est également utilisé pour chasser les fourmis et permet de conserver les fruits et les légumes qui s'oxydent facilement à l'air. La pulpe restant après extraction du jus commercial est une importante source d'huile essentielle, de pectines et d'acide citrique qui sont utilisés pour des formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

En cosmétologie, le citron est utilisé pour resserrer les pores, il passe pour éclaircir la peau, résorber les comédons et s'utilise en masque antirides ou pour donner de l'éclat aux cheveux. En médecine, il est utilisé comme antiseptique naturel mais il est aussi connu pour d'autres actions : anti-rhumatismale, anti-scorbique, anti-fatigue, diététique, digestive, expectorante, contre les effets causés par les allergies, en parfumerie, il entre dans la composition de nombreux parfums.



MATERIEL
ET
METHODES

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel biologique

III.1.1. Matériel végétal

Des feuilles du citron *Citrus limon* sont collectées avec un scalpel à partir de 5 plantes saines dans la région de Beni bechir, Skikda, Algérie Latitude 36°46'20° N et Longitude 6°57'30° E à Skikda en Janvier 2020.

III.2. Méthodes

III.2.1. Isolement et purification des champignons endophytes de *Citrus limon*

L'isolement des champignons endophytes a été effectué après 48 heures suivant le prélèvement de l'échantillon en utilisant le protocole décrit par Li et al. (2015) avec des légères modifications.

Les échantillons sont :

- Lavées soigneusement sous l'eau courante pour éliminer les particules du sol (Figure .5)



Figure 5. Lavage des échantillons sous l'eau courante

- Coupées en segments de 5X5 mm pour les feuilles avec une lame de rasoir stérilisée à la flamme (Figure.6)



Figure 6. Coupage des échantillons en segments 5*5mm

Matériel et méthodes

- Subissent une stérilisation superficielle pour l'élimination des hyphes et des spores des champignons épiphytes ;cette étape est réalisée par l'immersion dans l'éthanol à 75% pendant 1 min puis rincés 2 fois dans de l'eau distillée stérile pendant quelques minutes pour éliminer le produit stérilisant en excès(Figure.7)



Figure 7. Stérilisation superficielle des segments foliaires

- Les segments sont ensuite séchés sur un papier filtre stérile dans des conditions aseptiques puis transférés uniformément et d'une manière aseptique dans des boîtes de pétri contenant un milieu PDA(Figure.8)

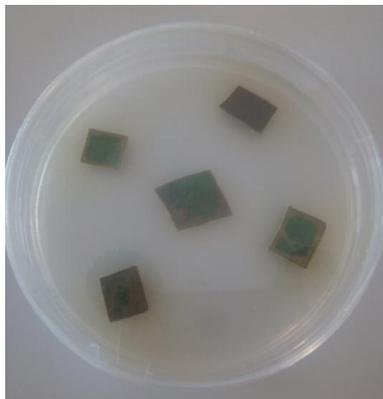


Figure 8. Transfert des segments dans des boîtes de pétri contenant un milieu PDA

- Ces boîtes sont scellées en utilisant un para film diagonal puis incubées à température ambiante (25-30 C°) pendant 21 jours pour assurer la croissance des champignons endophytes (Figure .9) .



Figure 9. Incubation pendant 21 jours

- Les champignons émergents ou sortant des extrémités des segments (tissu végétal) sont isolés immédiatement et repiqués dans un nouveau milieu PDA sans antibiotiques pour obtenir des cultures pures après incubation à 25°C pendant 3 à 6 jours (Figure.10).



Figure 10. Isolement et purification des colonies fongiques endophytes du citron

III.2.2.Calcul de la fréquence de colonisation

La fréquence de colonisation (FC): La fréquence de colonisation ou d'infection, exprimée en % est calculée en se basant sur la méthode de Fisher et Petrini (1987), donnée comme suit:

$$FC \% = (N_c / N_t) \times 100$$

Sachant que:

N_c : le nombre de segments colonisés par une espèce ou un groupe fongique.

N_t : le nombre total des segments.

III.2.3. Identification morphologique des champignons endophytes de *Citrus Limon*

Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ à l'aide d'un microscope optique.

L'identification de souches fongiques a été basée sur la morphologie ou caractères phénotypiques (couleur, aspect) et la vitesse ou taux de croissance de la colonie, les caractéristiques des spores et les structures de reproduction si ces fonctions étaient perceptibles

III.2.4. L'activité antifongique par la technique de double culture

L'activité antifongique a été évalué par la technique de double culture (Rahman et al., 2009); un disque de gélose (6X6 mm) associé au mycélium des champignons endophytes âgées de 4 jours de chaque isolat

Un autre disque de gélose de la même taille de *P. digitatum* a également été placé à la périphérie mais à l'extrémité opposée de la même boîte de Pétri.

Tous les appariements ont été effectués en quatre exemplaires et incubés à 28 ° C.

L'activité antagoniste a été testée du premier au septième jour après incubation en mesurant le diamètre de la colonie endophyte en direction de la colonie antagoniste et le rayon d'endophyte dans la boîte de contrôle. Les deux lectures ont été transformées en pourcentage d'inhibition de croissance radiale (PIRG) en utilisant la formule suivante développée par (Skidmore et al ., 1976).

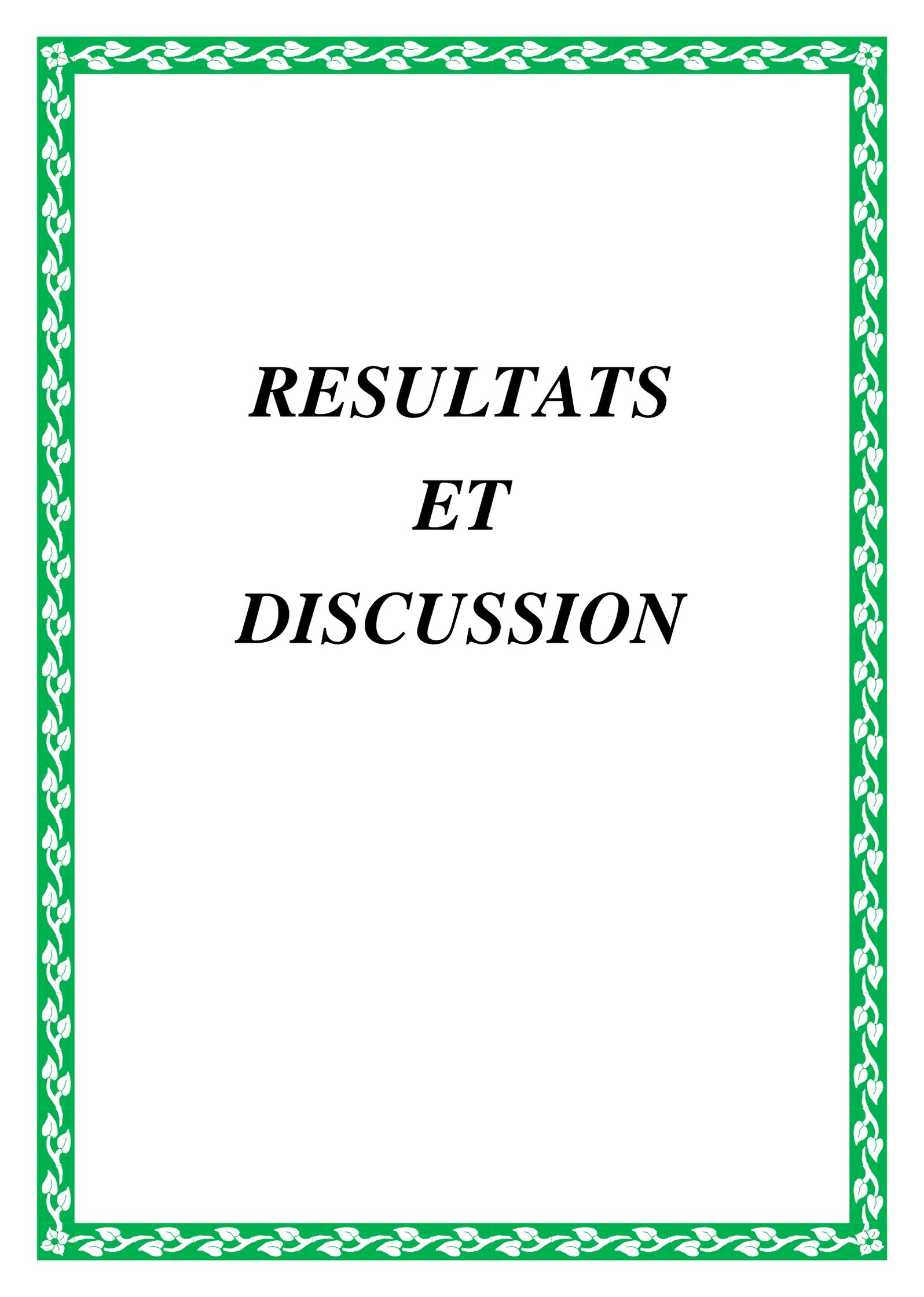
P.I. C. R. (%) = pourcentage d'inhibition de la croissance des colonies.

Dt = diamètre de la colonie de l'endophyte dans la plaque témoin

De = diamètre de la colonie de l'endophyte en direction de la colonie antagoniste

$$\text{P. I. C. R (\%)} = \frac{\text{Dt} - \text{De}}{\text{Dt}} \times 100$$

L'activité antifongique a été évaluée en fonction du pourcentage d'inhibition de la croissance radiale: 30 à 40%: faible activité; 50 à 60%: activité modérée; 60 à 70%: bonne activité;> 70%: excellente activité.



RESULTATS
ET
DISCUSSION

IV. Résultats et discussion

IV.1. Résultats

IV.1.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du *Citrus limon*

On a pu isoler 4 taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles (Figure 11).

Le genre le plus dominant est *Colletotrichum sp* avec une fréquence de colonisation totale de 55 % suivie par *Alternaria sp* 25%, *Nigrospora sp* 15% et *Nodulosporium sp* 5%.

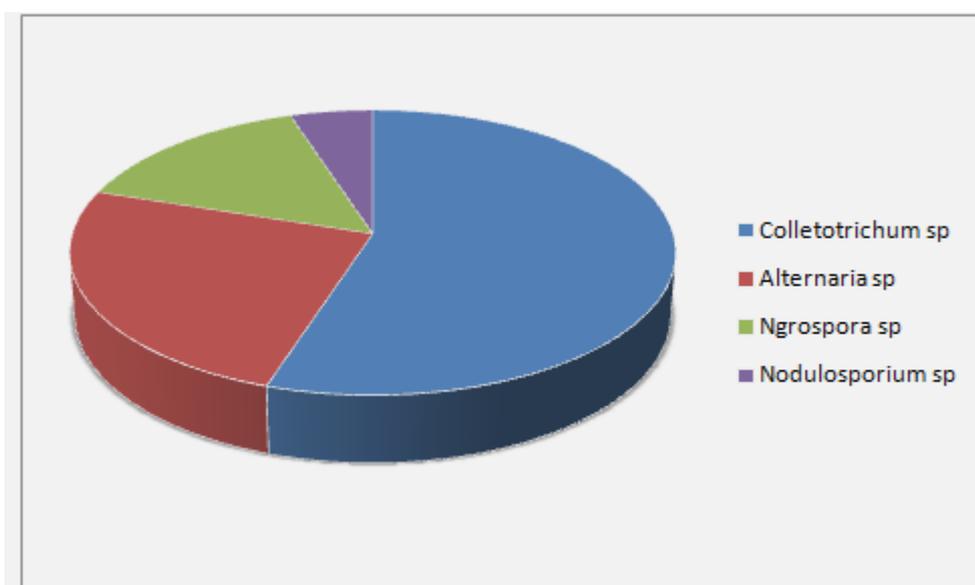


Figure 11. Fréquence de colonisation des champignons endophytes de *Citrus limon*

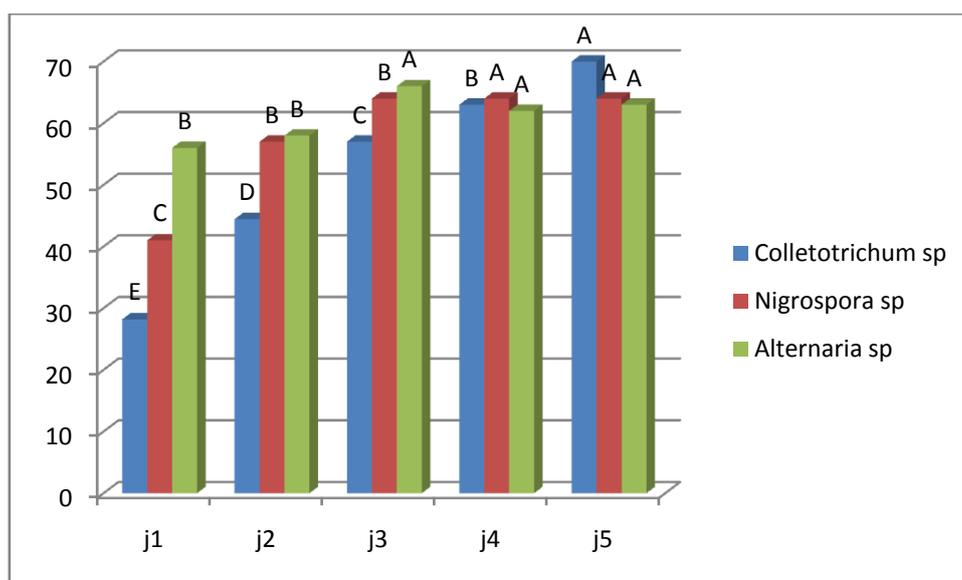


Figure 12. Taux d'inhibition du champignon *Penicillium digitatum* par les champignons endophytes du citron

Résultats et discussion

À partir des résultats obtenus (Figure.12) nous avons constaté que les 3 champignons endophytes *Colletotrichum sp*, *Alternaria sp*, *Nigrospora sp* sont dotés d'une activité antifongique variable vis-à-vis *P.digitalatum*,

Cette variation d'activité est déterminée également sur une échelle chronologique et en fonction des différentes concentrations.

Le taux d'inhibition maximale a été 69% pour *Colletotrichum sp*, 62 %pour *Alternaria sp*, 61% pour *Nigrospora sp*.

Pour le traitement de l'analyse de la variance (Anova) et le test de tukey ont révélé :

Une différence significative entre les taux d'inhibition de *P.digitalatum* par *Colletotrichum sp* pendant les 7 jours d'essai

Une différence significative entre les taux d'inhibition de *P.digitalatum* par *Nigrospora sp* pour le premier jour et les autres jours du test et entre les jours 2 , 3 et jours 5 et 6

Une différence non significatif entre jour 4 et jour 5 et entre jour 2 et jour 3

Une différence non significative entre les taux d'inhibition de *P.digitalatum* par *Alternaria sp* entre jour 1et jour 2 et entre jour 3 , jour 4 et jour 5

Une différence significatif entre le jour 1 et les jours 3,4 ,5

Une différence significatif entre le jour 2 et les jours 3,4 ,5

IV.1.2. Discussion

On a pu isoler 4 taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles *Colletotrichum sp.*, *Alternaria sp.*, *Nigrospora sp.*, *Nodulosporium sp.*

Le genre le plus dominant est *Colletotrichum sp* avec une fréquence de colonisation totale de 55 % suivie par *Alternaria sp* 25%,*Nigrospora sp* 15% et *Nodulosporium sp* 5%.

Comparativement à cette partie de notre étude quelques travaux ont porté sur l'isolement, l'identification des champignons endophytes du citron.

Douanla-Meli et al.(2013) ont pu isoler les champignons *Cercospora sp*, *Colletotrichum gloeosporioides* , *Diaporthe eucalyptorum* .,*Diaporthe phaseolorum.*, *Mycosphaerella sp*, *Passalora loranthi* , *Pestalotiopsis mangiferae* , *Pestalotiopsis microspora*,*Pestalotiopsis sp*, *Phoma sp*, *Stenella sp*, *Xylaria sp*, *Pseudopestalotiopsis theae* , *Zasmidium sp.*, *Phyllosticta capitalensis* .

Durán et al. (2005) ont pu isoler les champignons *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* *Nigrospora sphaerica*, *Nodulisporium sp*, *Sporormiella minima*, *Phyllosticta citricarpa* .

Résultats et discussion

Araújo et al.(2001) ont pu isoler *Colletotrichum fructicola* ,*Colletotrichum boninense* et *Cladosporium* sp

Huang et al.(2015) ont pu isoler les champignons endophytes *Diaporthe arecae* ,*Diaporthe biguttulata* ,*Diaporthe endophytica* ,*Diaporthe ovalispora* et *Diaporthe sojae*.

L'activité antifongique chez les champignons observé chez les champignons endophytes isolés à partir du citron *Citrus Limon* est due aux plusieurs mécanismes employés par ces derniers.

Les champignons endophytes utilisent soit une stratégie écologique d'hyperparasitisme pour protéger leurs plantes hôtes pendant laquelle l'agent pathogène est directement attaqué et détruit par un endophyte particulier (Tripathi et al., 2008),pendant laquelle ils parasitent les hyphes des champignons phytopathogènes en pénétrant ces derniers et en sécrétant des enzymes pour décomposer leurs parois cellulaires (Grosch et al., 2006),dans des conditions nutritives limitées (Benhamou et Chet, 1997).Ou par la production d'une variété de composés antimicrobiens de faible poids moléculaire, actifs à de faibles concentrations provoquant une anomalie de croissance des hyphes de l'agent pathogène (Ting, 2014.,Guo et al., 2000).



CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion

V. Conclusion

Dans ce modeste travail, nous avons pu mettre en évidence des champignons endophytes associés aux feuilles du citron

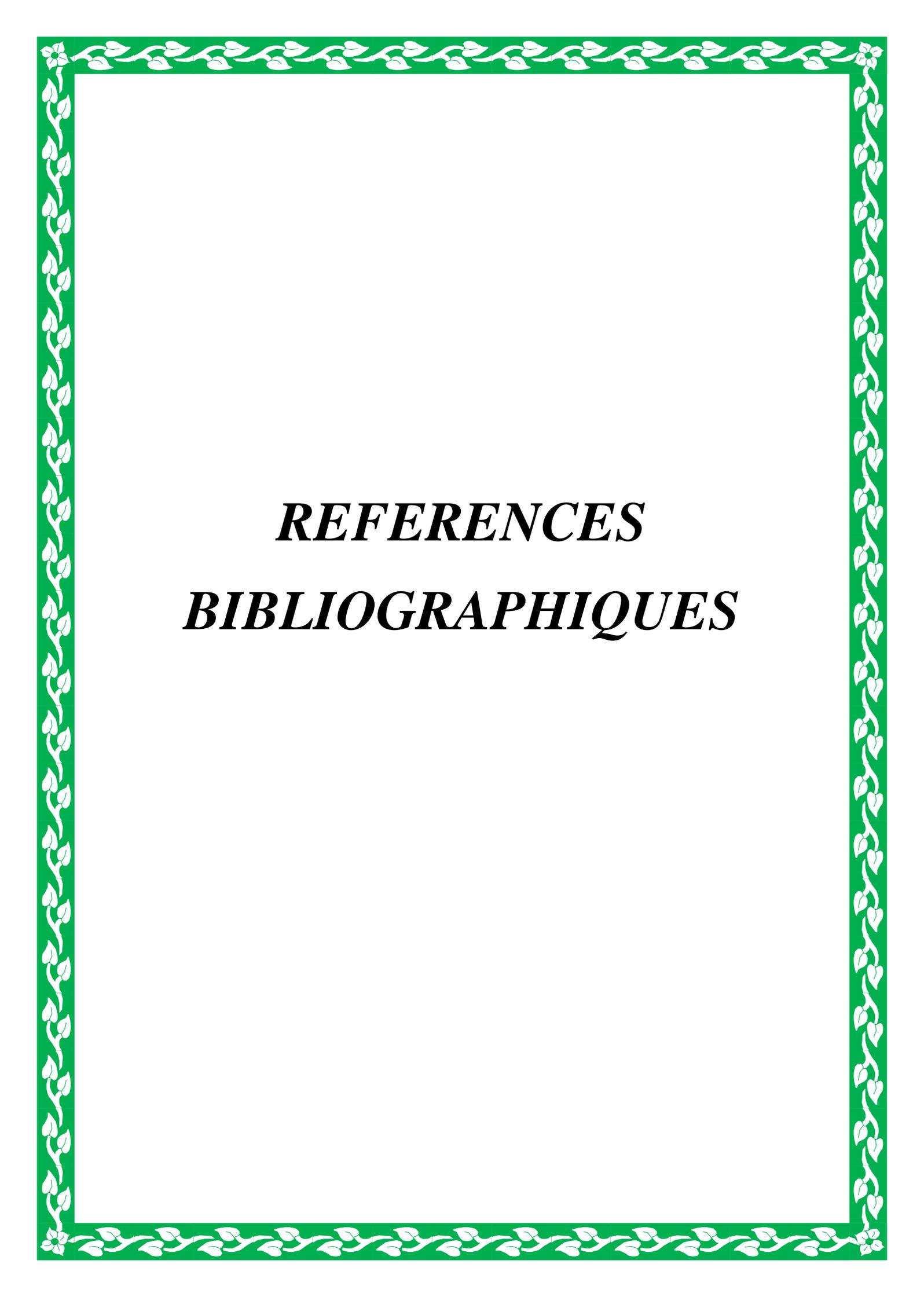
On a pu isoler 4 taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles du citron

Le genre le plus dominant est *Colletotrichum sp* avec une fréquence de colonisation totale de 55 % suivie par *Alternaria sp* 25%, *Nigrospora sp* 15% et *Nodulosporium sp* 5%.

Nous avons constaté que les 3 champignons endophytes *Colletotrichum sp*, *Alternaria sp*, *Nigrospora sp* sont dotés d'une activité antifongique variable vis-à-vis *P. digitatum*, avec un taux d'inhibition maximale a été 69% pour *Colletotrichum sp*, 62 %pour *Alternaria sp*, 61% pour *Nigrospora sp*

Il est recommandé dans les futures études de réaliser des travaux plus approfondis qui auront pour objectifs:

- Réaliser davantage des études sur la mycoflore endophyte du citron et également diversifier les parties du végétal à investiguer (racines, fruits, fleurs)
- Cibler d'autres champignons phytopathogènes afin d'évaluer le spectre d'action des champignons endophytes du citron.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

ACTA (Association de Coordination Technique Agricole), 1990. Guide pratique de défense des cultures. Reconnaissance des ennemis. Notions de protection des cultures. Ed. LE CARROUSEL ET ACTA .

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,

Albagnac, G., Varoquaux, P., Montigaud, J.C. (2002). Technologie de transformation des fruits, *Lavoisier*, Paris, 302-304.

Andéol Sénéquier-Crozet, Benjamin Canard ,2016 : Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique, thèse doctorat : 21-31

Arnold AE,2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev.* ; 21(2-3) : 51–66

Balachowsky, A., Mensil, L., 1935. Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Leurs mœurs, leur distribution. Insectes nuisibles aux arbres fruitiers, à la vigne, aux céréales et aux graminées de prairies. Paris. Imprimé sur les presses des établissements Busson. : 242-253.

Blancke R., 2001. Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.

Batta Y.A.,2013. Efficacy of endophytic and applied *Metarhiziumanisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop Protection.*, **44** :128-134.

Chaverri P., & Gazis R.O.,2011. Linking ex planta fungi with their endophytic stages: *Perisporiopsis*, a common leaf litter and soil fungus, is a frequent endophyte of *Hevea spp.* and other plants. *Fungal Ecology* ., **4**: 94-102.

Clay K, Schardl C,2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Nat.* ; 160 : S99–127

Colombo, A. 2004. La culture des agrumes. Vecchi S.A, Paris. 8548.133p.

Currie AF, Wearn J, Hodgson S, Wendt H, Broughton S, Jin L 2014. Foliar fungal endophytes in herbaceous plants : a marriage of convenience? In : *Advances in endophytic research* (Osone T.). : 61–81

Débuigine G. et Couplan F., 2008. Petit Larousse des plantes qui guérissent. Ed : Larousse, Paris. 895 p.

Dubois C., 2006. Les arbres fruitiers. Ed : Rustica, Paris. 127 p.

Duoss-Jennings, H. A., Schmidt, T. B., Callaway, T. R., Carroll, J. A., Martin, J. M., Shields-Menard, S.A. (2013). Effect of *Citrus* by products on survival of O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* serogroups within in vitro bovine ruminal microbial fermentations. *International Journal of Microbiology.* 1-5.

Références bibliographiques

- Faeth S.H., & Fagan W.F., 2002.** Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, **42**:360-368.
- Fajinmi A.A., Fajinmi O.B. and Amusa N.A., 2011.** An Overview of Citrus Virus Disease and its Control in Nigeria. *Journal of Advances in Developmental Research* (2), p: 151-157.
- Gottwald T.R., Graham J.H., Schubert T.S (2002).** Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* (42), p : 152-160.
- Guerin P, 1898 :** Sur la présence d'un champignon dans l'ivraie. *J Bot.*
- Guillaumin J. et Legrand P (2005).** L'armillaire et le pourridié agaric des végétaux ligneux, ed . INRA, 487 p
- Halliwell B., 1996 :** Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, Vol.16, pp : 33-50.
- Hirose D., Matsuoka S., & Osono T., 2013.** Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis. *Mycologia* ., 105:837-843.
- Ippolito A., Schena L., Nigro F., Soleti L., Yaseen T (2004) :** Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil. *European Journal of Plant Pathology* (110), p:833-843.
- Isshiki A.K, Akimitsu M., Yamamoto M., Yamamoto H (2001) :** Endopolygalacturonase Is Essential for Citrus Black Rot Caused by *Alternaria citri* but Not Brown Spot Caused by *Alternaria alternata*. (14), p: 749-757
- Kaul S., Gupta S., Ahmed M., & Dhar M.K., 2012.** Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*., **11**:487-505
- Khan A.L., Hamayun M., Ahmad N., Hussain J., Kang S.M., Kim Y.M., Adnan M., Tang D.S., Waqas M., Radhakrishnan R., Hwang Y.H., & Lee I.J., 2011a.** Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology*., **21**:893-902.
- Klotz L. J. et Fawcett H. S. 1952.** Maladies des Citrus, traduit de l'anglais par A. Comelli et J. Lemaître (I.F.A.C.), 152 p., 40 pl. en coul. Société d'édit. Techn. Coloniales.
- Kim Seunghyun. 2003 :** Antifungal activity of *Stereomyces* sp. against *Puccinia recondita* wheat leaf rust. *J. Microbial. Biotechnol.*, 1017-7825.
- Knoch T.R., Faeth S.H., & Arnott D.L., 1993.** Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia*., **95**:470-475.

Références bibliographiques

- Kusari S, Spiteller M, 2012.** Metabolomics of endophyticfungiproductingassociated plantsecondarymetabolites : progress, challenges and opportunities. *Metabolomics.*;(1866) : 241–66
- Lacava P.T.,&Azevedo J.L.,2014.**Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. *Advances in Endophytic Research.*,**13** :231-248.
- Lee ASY., Ma Z, Ge L, et al.,2008** : Simultaneousanalysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera*L.) water using high-performance liquid chromatography and liquidchromatography-tandem mass spectrometryaftersolid-phase extraction. *Anal Chim Acta* 610: 274-281.
- Loussert R., 1987.** Les agrumes, arboricultures. Ed. Mkalles–Mar Roukoz. Liban. Technique scientifique universitaire, 113 p
- Marchand L., 2002** : Cancer preventiveeffects of flavonoids – areview.*Biomed.Pharmacother.* Vol. 56, p : 296–301.
- MárioCesarJucoskiBier, Adriane Bianchi PedroniMedeiros, Carlos RicardoSoccol 2017** : FungalBiology chapitre Biotransformation of limonene by an endophyticfungususingsynthetic and orange residue-based media,137-144
- Mendoza A.R.,&Sikora R.A.,2009.**Biological control of *Radopholussimilis*in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyceslilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillusfirmus*. *Biocontrol.*,**54**:263-272.
- Minh Tu N.T., Thanh L.X., Une A., Ukeda H. et Sawamura M., 2002** : Volatileconstituents of Vietnamesepummelo, orange, tangerine and lime peeloils. *FlavourFragrance J.* Vol. 17, p 169 – 174
- Nakamura A, Umemura I, Gomi K et al.,2006:** Production and characterization of auxininsensitiverice by overexpression of a mutagenizedrice IAA protein. *Plant J* 46: 297-306 .
- Okon Y and Y. Kapulink. 1986** : Development and function of Azospirillum inoculation roots.*Plant &Soil*, 90, 3-16.
- ONS** :office national desstatistiques ,la production agricoleCampagnes 2017/2018
- Pandey A and S. Kumar.** Potential of *Azotobacter* and *Asozprillum*for upland agriculture: A review. *J. Sci.Ind. Res.*, 48,pp 134-144(1998).
- Parmar N and K. R. Dadarwal.** Rhizobacteriafrom the rhizosphere and rhizoplane of chickpea (*Cicer arietinum*L.). *J. Microbiol.*, 37, 205-210 (1997)
- Polese J. M (2008)** : La culture des agrumes. Édition artémis. p 94

Références bibliographiques

- Prompttha I., Hyde K.D., McKenzie E.H.C., Peberdy J.F., & Lumyong S., 2010.** Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?. *Fungal Diversity*, **41**:89-99.
- Purahong W., & Hyde D., 2011.** Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal diversity*, **47**: 1-7.
- Rahman M.M., Islam W., & Ahmad K.N., 2009.** Functional response of the predator *Xylocoris flavipes* to three stored product insect pests. *International Journal of Agriculture and Biology*, **11**:316-320.
- Rao A.V. et Rao L.G., 2007** : Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* Vol.55, p : 207 – 216.
- Ramful, D., Bahorunb, T., Bourdonc, E., Tarnusc, E., Aruoma, O.I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedoe extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* 278, p 75-87
- Ricci P., Pope C.F., Panabieres A., Marais F. et Augé G (1990).** Caractères comparés des espèces de *Phytophthora* pathogènes des agrumes. *EPPO Bulletin*. (1), p19–28.
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* **2009** ; 182(2) 314–30.
- Rudgers J.A., Miller T.E.X., Ziegler S.M., & Craven K.D., 2012.** There are many ways to be mutualist: endophytic fungus reduces plant survival but increases population growth. *Ecology*, **93**:565-574.
- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., & Sullivan T.J., 1998.** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology evolution and Systematics*, **29**:319-343.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice M., 2005.** : Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- Spreen T., Dwivedi P, et Goodrich-Schneider R., 2010.** Estimating the Carbon Footprint of Florida Orange Juice. International European Forum, February 8-12, 2010, Innsbruck-Igls, Austria 100461, International European Forum on Innovation and System Dynamics in Food Networks
- Sun X., Guo L.D., & Hyde K.D., 2011.** Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*, **47**:85-95.

Références bibliographiques

Ting A.S.Y.,2014.Biosourcing Endophytes as biocontrol Agents of Wilt Diseases.*Advances in Endophytic Research.*,**15**:283-296.

White JF, Reddy P V, Bacon C W. Microbial endophytes, 2000 : biotrophic endophytes of grasses : asystematicappraisal,pp 49–62

White Jr JF Jr., Torres MS, 2010. Is plant endophyte-mediateddefensivemutualism the result of oxidative stress protection? *PhysiologiaPlantarum* 138, pp 440 -446.

Whitelaw MA, 2000: Growth promotion of plants inoculatedwith phosphate solubilizing fungi. Edited by Donald L. Sparks. *Advances in Agronomy*, Academicpress 69,p 99-151.

Zabalgogezcoa I.,2008.Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research.*,**6**:138-146.

Internet

NCBI. National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34397.consulté>