

RECHERCHES SUR DES ANTAGONISTES NATURELS D'*HETERODERA AVENAE* DANS DIVERSES CONDITIONS DE CULTURES DE BLE DUR, *TRITICUM DURUM*, EN TUNISIE

I. Mensi¹, S. Kallel¹ et N. Namouchi Kachouri²

¹Institut National Agronomique de Tunisie

²Institut National de Recherches Agronomiques de Tunisie

Résumé. Un travail a été conduit pour mettre en évidence la diversité de la microflore associée au nématode à kyste des céréales, *Heterodera avenae*, dans quatre régions céréalières de la Tunisie. L'isolement des microorganismes associés a visé principalement les champignons inféodés au stade œuf ou larve embryonnée (stade L1 et L2) qui constitue l'inoculum potentiel du nématode dans le sol. L'isolement a abouti à l'identification de douze champignons: *Pochonia chlamydosporia*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Diplodia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Pithomyces* sp., *Pythium* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Trichothecium* sp. et *Rhizopus* sp. Dans toutes les régions prospectées, *P. chlamydosporia* est le plus fréquemment associé aux femelles et aux kystes. Les sols de la région du Kef sont suppressifs avec un taux de mortalité élevé des œufs qui coïncide avec la plus haute fréquence de ce champignon ovide. Un essai *in vitro* a montré que *P. chlamydosporia* parasite plus de 70% des œufs et constitue ainsi un agent potentiel de lutte contre *H. avenae*. Son association avec la bactérie *Rhizobium radiobacter* a montré, en outre, une efficacité supérieure sur la mortalité des œufs et larves du nématode.

Mots-clés: Antagonistes de nématodes, bactéries, champignons, lutte biologique, nématode à kyste des céréales.

Summary. Activity of natural antagonists on *Heterodera avenae* in different cultural conditions of wheat, *Triticum durum*, in Tunisia. An investigation was conducted to determine the diversity of the microflora associated with the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four cereal regions in Tunisia. The isolation focused mainly on fungi associated with eggs and first and second stage juveniles as these constitute the potential inoculum of the nematode in the soil. Twelve different species of fungi were identified. They were: *Pochonia chlamydosporia*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Diplodia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Pithomyces* sp., *Pythium* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Trichothecium* sp., and *Rhizopus* sp. In all surveyed regions, *P. chlamydosporia* was the most common species associated with females and cysts. The suppressive soils with high eggs mortality were found in Kef region and were related with the highest frequency of the ovicidal fungus, *P. chlamydosporia*. An *in vitro* test on the pathogenicity of *P. chlamydosporia* on eggs of *H. avenae* demonstrated that more than 70% of the eggs were infected. Therefore, *P. chlamydosporia* constitutes a potential agent of biocontrol. The association between *P. chlamydosporia* and the bacterium *Rhizobium radiobacter* showed the greatest efficiency in killing eggs of this nematode.

Key words: Bacteria, biological control, fungi, cereal cyst nematode, nematode antagonists.

Le nématode à kyste, *Heterodera avenae* Woll., est un endoparasite sédentaire des racines de céréales. En Tunisie, ce nématode peut réduire la production du blé dur, *Triticum durum* Desf., avec des pertes de rendement variant de 26 à 96% et des seuils de nuisibilité très bas de l'ordre d'un œuf ou larve/g de sol (Namouchi-Kachouri *et al.*, 2009). La rotation culturale et l'utilisation de variétés résistantes constituent les moyens actuels de lutte. D'autres alternatives comme la lutte biologique sont à explorer avec pour candidats les antagonistes naturels de ce nématode.

La régulation naturelle des populations d'*H. avenae* a été mise en évidence pour la première fois sur des monocultures de céréales en Angleterre (Collingwood, 1962) où ce phénomène est très répandu comme dans d'autres pays d'Europe septentrionale (Kerry *et al.*, 1982b; Stirling, 1991). Les plus importants champignons parasites d'*H. avenae* sont *Nematophthora gynophila* Kerry et Crump et *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare, Gams et Evans (= *Verticillium chlamydosporium* Goddard) (Kerry 1982).

Nematophthora gynophila infeste les femelles et inhibe la formation des kystes. *Pochonia chlamydosporia* parasite aussi bien les œufs immatures que les larves L1 ou L2 enchorionnées (Irving et Kerry, 1986). Ces deux champignons contribuent ainsi à une diminution de l'inoculum du nématode dans le sol qui est généralement efficiente après 3 à 5 années de monoculture (Jaffee *et al.*, 1992a, b; Kerry et Crump, 1998). Jaffee *et al.* (1993) ainsi que Kerry et Crump (1998) ont modélisé les relations quantitatives entre les champignons parasites ou nématophages et leurs hôtes qui conditionnent l'efficacité de ces interactions. La stratégie "conservatrice" de lutte biologique consistant à favoriser la régulation naturelle des populations du nématode est progressive et ne s'établit dans le sol qu'à long terme; ce qui rend difficile son application. On pourrait lui substituer la stratégie "inondative" par inoculations artificielles de ces agents biologiques déjà présents dans le sol et préalablement multipliés sur milieu artificiel, en vue de combattre, au moment opportun, les

nématodes (Kerry et Crump, 1998).

Cette étude a pour but: *i*) d'évaluer les taux de mortalité des œufs ou de larves enchorionnées dans les femelles et les kystes d'*H. avenae* provenant de différentes régions céréalières de Tunisie; *ii*) d'identifier les antagonistes biologiques potentiels d'*H. avenae* dans ces régions; *iii*) de déterminer la toxicité de *P. chlamydosporia* à l'égard des œufs et larves d'*H. avenae*, seul ou en association avec la bactérie *Rhizobium radiobacter*.

MATERIELS ET METHODES

Localités, échantillonnage et extraction des nématodes. L'échantillonnage des racines de céréales naturellement infestées par *H. avenae* est effectué dans quatre régions céréalières localisées dans deux étages bioclimatiques différents: Béja en sub-humide; Kef, Séliana et Zaghouan en semi-aride. Le choix de ces régions est réalisé d'après les résultats de Namouchi-Kachouri (2008) qui a montré que le taux de parasitisme exercé sur ce nématode est beaucoup plus important en régions de climat sub-humide et semi-aride qu'en régions de climat aride (Kairouan).

Ces étages bioclimatiques se distinguent par les températures et les précipitations moyennes annuelles. A l'étage bioclimatique sub-humide, la température moyenne annuelle est de 18 °C et les précipitations moyennes annuelles varient de 300 à 1000 mm. A l'étage bioclimatique semi-aride, la température moyenne annuelle est de 8 °C en hiver et 26 °C en été avec une moyenne annuelle de 18 °C et une pluviométrie annuelle de 450 mm. Les sols de ces différents sites présentent des caractéristiques granulométriques différentes. Ils sont sablonneux à Kairouan, Séliana et Zaghouan, limoneux à Béja et Kef.

Les échantillons des racines de céréales (blé dur, blé tendre ou orge) sont collectés entre Mars et Avril à partir de treize champs: quatre dans la région de Béja, deux dans la région du Kef, deux dans la région de Séliana et cinq dans la région de Zaghouan. L'échantillonnage est réalisé sur les zones de culture attaquées par *H. avenae* qui se traduisent par une croissance inégale des plantes et un système racinaire très ramifié. Les racines sont prélevées entre 0 et 15 cm de profondeur à l'aide d'une sape. Une dizaine d'échantillons de sol sont prélevés dans chaque champ; chaque échantillon étant constitué de cinq prises élémentaires. Tous les échantillons sont soigneusement emballés dans des sachets en matière plastique puis stockés à 4 °C.

Les racines de céréales collectées sont nettoyées délicatement avec un léger jet d'eau pour éliminer la matière organique et les particules du sol. Ces racines sont examinées par la suite sous loupe binoculaire. Toutes les femelles d'*H. avenae* sont séparées soigneusement des racines en utilisant une aiguille et elles sont récupérées à l'aide d'un pinceau dans de l'eau distillée stérile.

L'analyse des kystes est faite à partir d'échantillons de

sols provenant des mêmes parcelles et collectés après la culture précédente de céréale. Ces échantillons sont séchés à l'air libre et conservés au laboratoire. L'extraction des kystes est effectuée avec l'appareil de Fenwick (1940).

Détermination de la mortalité des nématodes. De chaque échantillon (racines ou sol), une centaine de femelles ou de kystes sont prélevés. Une moitié est utilisée pour déterminer le taux de mortalité des œufs et des larves. L'autre est utilisée pour déterminer le niveau d'infection par les antagonistes visés, champignons et bactéries. Les femelles ou les kystes sont immergés dans des tubes Eppendorf remplis d'une solution de bleu de Meldola à 1‰ qui a la particularité de traverser la cuticule des nématodes morts et d'en colorer le contenu (Ogica et Estey, 1974). Après 24 heures, les femelles ou les kystes sont écrasés entre lame et lamelle avec une goutte d'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant. Les œufs et les larves enchorionnées colorés et non colorés sont dénombrés sous microscope optique.

Isolement et identification des champignons. L'isolement des champignons est effectué sur une cinquantaine de femelles ou de kystes désinfectés dans une solution de NaOCl à 1% pendant une minute et rincés cinq fois avec de l'eau distillée stérile. Ceux-ci sont ensuite placés, dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre, sur milieu gélosé WA (20 g d'agar dans un litre d'eau distillée) à raison de dix femelles ou kystes par boîte. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque parcelle. Toutes ces manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire afin d'éviter les contaminations externes. Après 72 heures d'incubation à 22 °C, les boîtes sont examinées sous loupe binoculaire toutes les 48 h pendant les dix premiers jours, une fois par semaine ultérieurement. Au bout de 25 jours, le pourcentage d'infection des femelles et des kystes par les champignons ou les bactéries a été calculé. Les champignons, qui se sont développés à partir des femelles ou des kystes, ont été isolés et purifiés sur milieu gélosé. A partir de ces isolats, des cultures monospores sont effectuées sur milieu Corn Meal Agar (8,5 g de Corn Meal Agar et 8,5 g d'agar dans un litre d'eau distillée) et incubées à 22 °C pour l'identification.

L'identification des champignons isolés est faite sur des critères macroscopiques et microscopiques. Les observations macroscopiques, réalisées sur les cultures maintenues sur milieu Corn Meal Agar, concernent la couleur, l'aspect et le diamètre de la culture. Les observations microscopiques (optique de type Leica BM) sont faites sur des fragments d'agar contenant les formes de fructification, colorées au bleu coton, placées entre lame et lamelle et fixées par un passage rapide sur la flamme d'une lampe à alcool. Les observations concernent la morphologie du mycélium, des conidies, des conidiophores et des chlamydospores. Les genres des différents champignons isolés sont identifiés selon la

clef de Barnett et Hunter (1978). *Pochonia chlamydosporia* a été identifié par le diamètre d'une vingtaine de conidies, de chlamydospores et par la longueur d'une dizaine de phialides, selon Olivares-Bernabeu et López-Llorca (2001).

Isolement et purification des bactéries. L'isolement des bactéries a été effectué de la même manière que pour les champignons. Les colonies bactériennes associées aux œufs sont purifiées par une série de dilutions et de repiquages sur le milieu de culture Nutrient (16 g de Nutrient Broth et 12 g d'agar dans un litre d'eau distillée) conservées au froid. Conservées au froid, les cultures bactériennes n'ont pas été identifiées.

Toxicité de P. chlamydosporia. La toxicité à l'égard d'*H. avenae* de la souche de *P. chlamydosporia*, isolée lors de cette étude, est évaluée seule ou en association avec la bactérie *Rhizobium radiobacter*. La souche ZJ1041 de *R. radiobacter* a été précédemment isolée de la rhizosphère des céréales et elle est associée aux femelles d'*H. avenae* des régions de culture échantillonnées. Identifiée au Centre d'Identification Moléculaire des Bactéries (CIMB) de l'Institut Pasteur de Paris selon la technique de l'amplification et du séquençage du gène *rrs* codant ARNr 16S (Namouchi-Kachouri, 2008), cette souche est maintenue au laboratoire de nématologie de l'INRAT sur milieu Nutriment Agar.

Dix femelles d'*H. avenae* sont placées dans chaque boîte de Petri et soumises à quatre traitements différents (témoin, *P. chlamydosporia*, *R. radiobacter*, *P. chlamydosporia* et *R. radiobacter*). Le dispositif expérimental est mené en aléatoire et chaque traitement est répété cinq fois. Pour les deux essais avec *R. radiobacter*, les femelles

sont préalablement immergées pendant 24 h, en tube Eppendorf, dans 1 ml de la suspension bactérienne. La mortalité des œufs et des larves enchorionnées est évaluée après 5, 10 et 15 jours d'incubation à 22 °C, par des colorations périodiques au bleu de Meldola à 1‰.

Analyses statistiques. Les taux de mortalité des œufs et des larves enchorionnées dans les femelles et les kystes d'*H. avenae* sont comparés par le test d'analyse des variances ANOVA du logiciel SPSS 11.0. Les différences significatives sont établies à $P = 0,05$ avec une comparaison des taux de mortalité entre kystes ou larves et entre régions par le test Duncan, des traitements *in vitro* par le test de Student Newman et Keuls.

RÉSULTATS

Appréciation de la mortalité des œufs et larves enchorionnées. La coloration des femelles et des kystes au bleu de Meldola a fourni différents aspects de leur contenu: des œufs non colorés dont on distingue la segmentation cellulaire ou la présence d'embryons larvaires - ces œufs sont dits viables (Fig. 1 A et B). Les œufs (morts ou non viables) peuvent se présenter sous deux aspects: les uns, avec une ou deux vacuoles, ne sont pas colorés (Fig. 1D) et se sont avérés être envahis par des bactéries; d'autres, à moitié vides (Fig. 1F), sont de couleur violette (Fig. 1 C et F), avec la présence d'hyphes fongiques.

Taux de mortalité des œufs et des larves enchorionnées. Dans les quatre régions prospectées, les taux de mortalité des œufs d'*H. avenae* dans les quatre régions sont plus

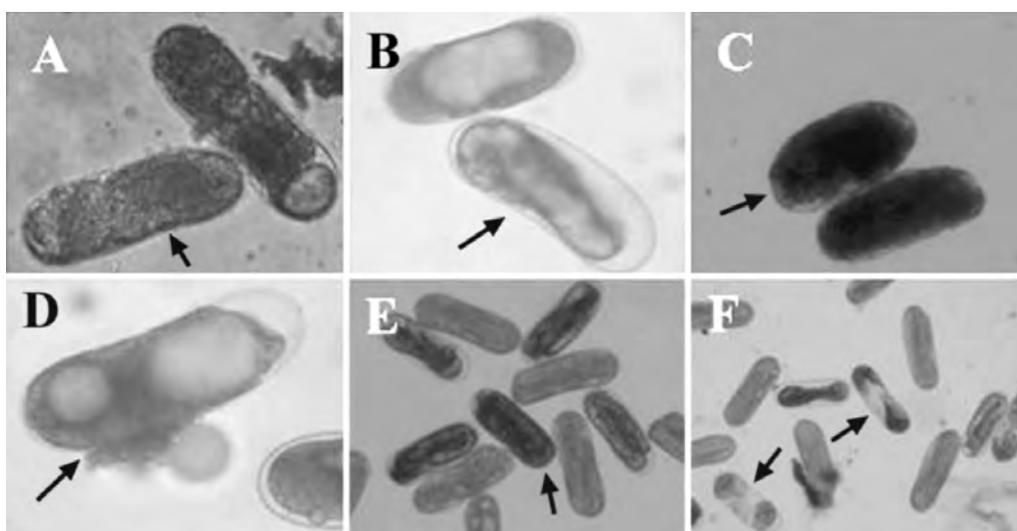


Fig. 1. Aspect des œufs ou des larves enchorionnées d'*Heterodera avenae* après coloration au bleu de Meldola à 1‰: A, œuf viable à contenu segmenté non coloré (clair); B, œuf viable non coloré (clair) embryonné (L1 ou L2 enchorionnée); C, œuf non viable segmenté coloré avec du bleu de Meldola à 1‰ (foncé); D, œuf non viable et non coloré (clair) à contenu vacuolisé; E, œuf embryonné coloré (foncé) non dégradé (non viable); F, œufs colorés (foncé) avec embryons dégradés. Les œufs sont indiqués par une flèche.

importants dans les femelles (au moins 80%) que dans les kystes (maximum de 30%). Les taux de mortalité des œufs dans les femelles diffèrent entre les régions. Ils sont les plus importants et au maximum dans les régions de Séliana (97%) et Kef (99%) et seulement de 80% dans les régions de Béja et de Zaghouan (Fig. 2A). Entre régions, aucune différence significative n'a été observée dans les taux de mortalité des œufs à l'intérieur des kystes qui varient de 17% (Séliana) à 26% (Béja) (Fig. 2A).

Le taux de mortalité des larves dans les femelles est faible et comparable dans les quatre régions prospectées. Il ne dépasse pas 1% à Béja ou Zaghouan et il est nul à Kef ou Séliana (Fig. 2B). Le taux de mortalité des larves dans les kystes est par contre plus variable s'éta-geant de 1% (Séliana, Zaghoua) à 5% (Béja) et 15% (Kef), ce qui suppose l'action d'antagonistes biologiques sur ces larves dans cette région ou de tout autre facteur toxique pour ce stade de développement du nématode.

Mise en évidence de colonies mycéliennes et bactériennes. L'incubation des femelles et des kystes d'*H. avenae* sur milieu de culture à 22 °C a révélé différentes colonies mycéliennes et bactériennes avec une différence dans l'importance de l'infection et sa cinétique entre champignons et bactéries. Ainsi pour la population de Kef, l'infection par les champignons passe entre 3 et 25 jours de 14 à 80% alors que pendant la même période

l'infection par les bactéries passe de 4 à 70%. La plupart des champignons apparaissent entre le 9^{ème} et le 11^{ème} jour (Fig. 3A) alors que les bactéries sont visibles entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jour (Fig. 3B).

Après 25 jours d'incubation, aucune différence significative n'est décelée dans les infections des différentes

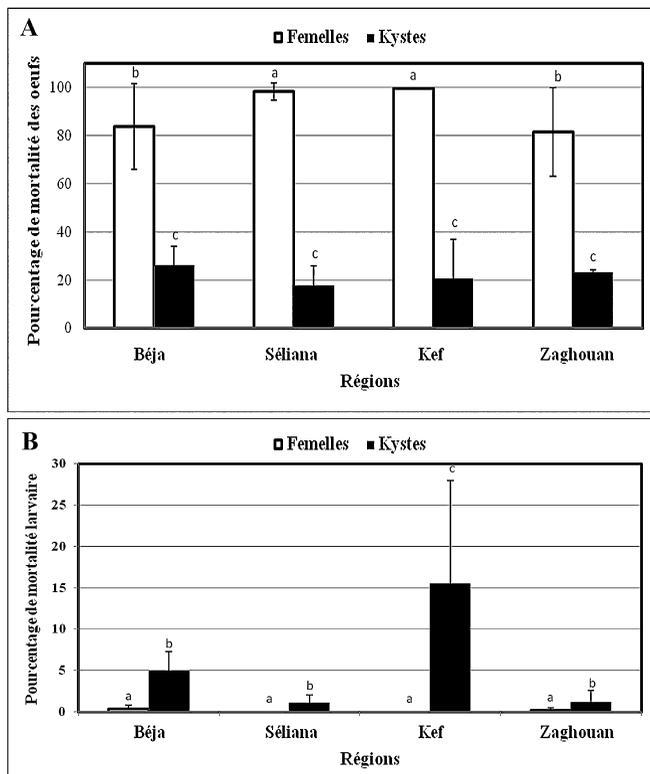


Fig. 2. Taux de mortalité des œufs (A) et des larves (B) d'*H. avenae* dans les différentes régions prospectées. Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P = 0,05.

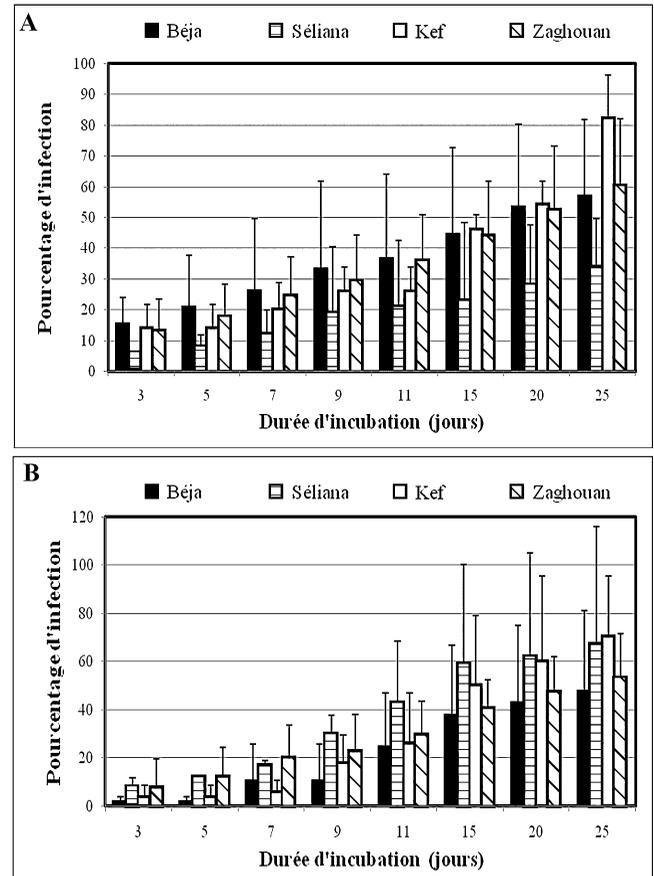


Fig. 3. Evolution de l'apparition des champignons (A) et des bactéries (B) associés aux femelles d'*H. avenae* dans les quatre régions prospectées. Les barres correspondent aux intervalles de confiance (P = 0,05).

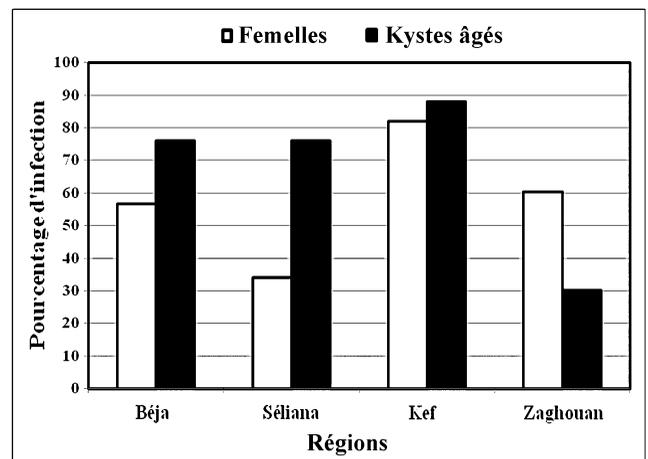


Fig. 4. Niveaux d'infection d'*H. avenae* par les champignons en fonction du stade de développement du nématode dans les différentes régions prospectées, après 25 jours d'incubation à 22 °C.

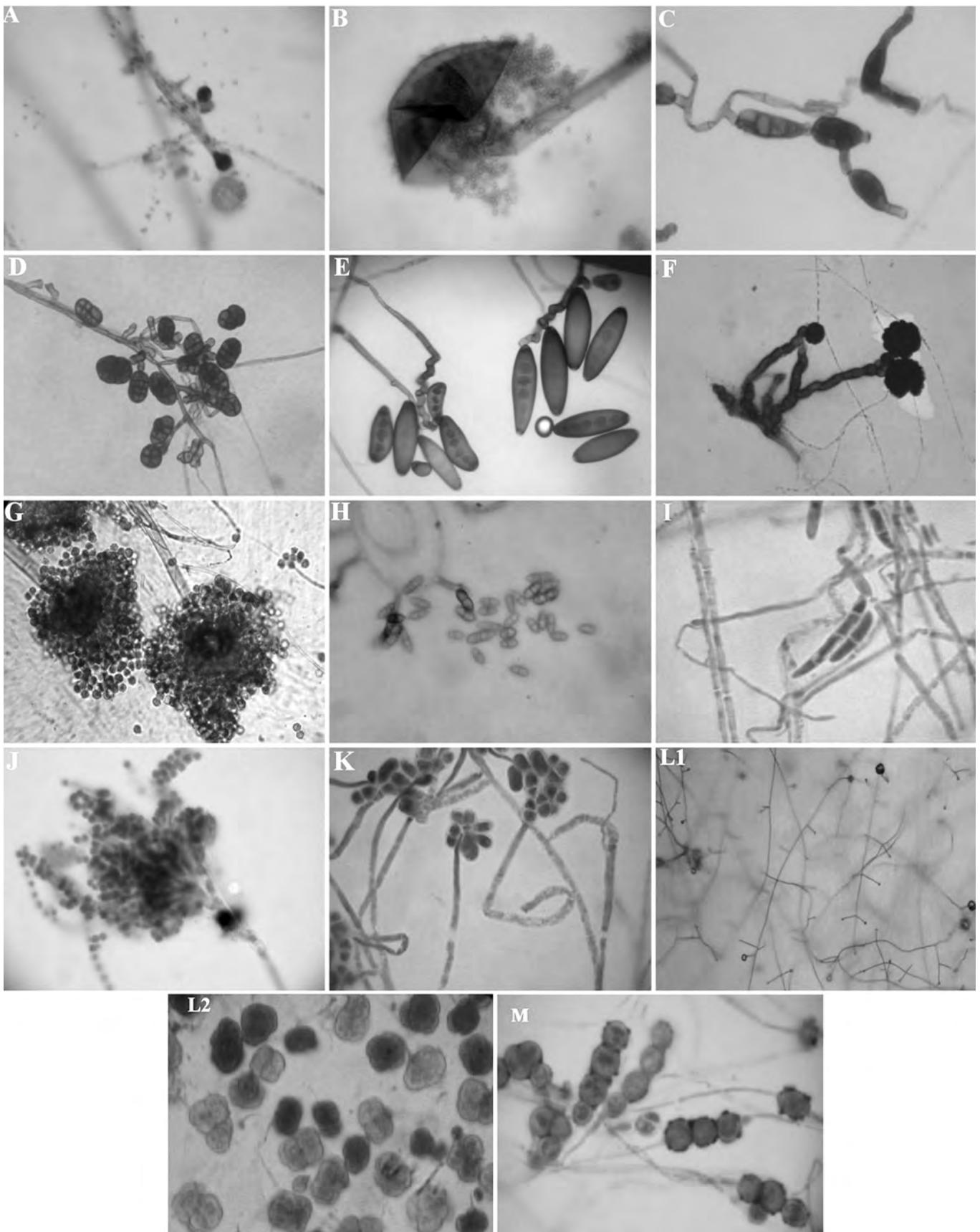


Fig. 5. Observations microscopiques des différents genres isolés à partir d'*H. avenae*. A, *Pythium* sp.; B, *Rhizopus* sp.; C, *Alternaria* sp.; D, *Pithomyces* sp.; E, *Drechslera* sp.; F, *Periconia* sp.; G, *Aspergillus* sp.; H, *Diplodia* sp.; I, *Fusarium* sp.; J, *Penicillium* sp.; K, *Trichothecium* sp.; L₁, conidie et conidiophore sur hyphe de *Pochonia chlamydosporia*; L₂, chlamydospore de *P. chlamydosporia*; M, champignon 1.

femelles par les bactéries (résultats non présentés). Le taux de colonisation moyen des femelles par les bactéries varie entre 47,16% et 67% à Béja et Séliana, respectivement. La colonisation des femelles par les champignons varie significativement selon les régions (Fig. 4). Le pourcentage le plus élevé de femelles infectées est enregistré à Kef (80%) et il est le plus bas à Séliana (34%). Des pourcentages d'infection intermédiaires sont enregistrés à Zaghouan (60%) et Béja (56%). A l'exception de la région de Zaghouan, l'infection par les champignons est toujours plus importante dans les kystes âgés avec un taux d'infection encore le plus élevé (88%) à Kef.

Champignons isolés. Seize champignons ont été isolés et douze identifiés, essentiellement au niveau du genre. La plupart de ces genres appartiennent à la classe des Deutéromycètes et à l'ordre des Hyphales. En se basant sur des critères morphologiques, *Pythium* sp. se caractérise par des hyphes non septés et des conidiophores non différenciés qui donnent naissance à des sporanges (Fig. 5A). *Rhizopus* sp. se caractérise par des hyphes non septés, des conidiophores à croissance continue qui donnent naissance à des sporanges (Fig. 5B). L'identification d'*Alternaria* sp. a été faite sur la morphologie des conidies multicellulaires, allongées, de couleur foncée généralement plus larges d'un côté que de l'autre et terminées à la base par un pédicelle. Les cloisons se forment à la fois dans le sens longitudinal et transversal (Fig. 5C). *Pithomyces* sp. se distingue d'*Alternaria* par des conidies pluricellulaires, à bordure elliptique, oblongues à pyriformes voire irrégulières (Fig. 5D). *Drechslera* sp. présente des conidies de couleur foncée, pluricellulaires, droites ou rarement peu arquées, cylindriques avec un côté parfois légèrement plus large que l'autre et à extrémités arrondies. Les cellules sont séparées par une à sept cloisons (le plus souvent 4 à 5) (Fig. 5E). *Periconia* sp. a des conidies de couleur sombre, unicellulaires et globuleuses avec des conidiophores droits, de couleur marron, qui donnent naissance à des conidies terminales et apicales (Fig. 5F). Le conidiophore d'*Aspergillus* sp. se termine par un renflement pourvu de stérigmates portant des chaînettes de conidies unicellulaires et globoïdes (Fig. 5G). *Diplodia* sp. a été identifié par des conidies hyalines, ellipsoïdes à ovoïdes, monocellulaires et bicellulaires (Fig. 5H). *Fusarium* sp. présente des macroconidies pluricellulaires et légèrement arquées, et des microconidies unicellulaires, ovoïdes à oblongues (Fig. 5I). *Penicillium* sp. se caractérise par des conidiophores prolongés de phialides qui portent à leur apex, de longues chaînettes de conidies unicellulaires, globoïdes à ovoïdes (Fig. 5J). *Trichothecium* sp. se caractérise par des conidiophores longs terminés par des conidies ellipsoïdes, bicellulaires, disposées individuellement ou en groupes (Fig. 5K). La souche tunisienne de *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) se caractérise par des phialides de $1,5 \times 16 \pm 1,2 \mu\text{m}$ portées par des hyphes à ra-

mifications simples ou verticillées (Fig. 5L₁). Ses conidies unicellulaires d'une dimension de $(3,7 \pm 0,2) \times (4 \pm 0,3) \mu\text{m}$ sont individuellement portées à l'extrémité des phialides (Fig. 5L₁) et ses chlamydospores (Fig. 5L₂), sont pluricellulaires, de forme irrégulière (allongée à sphérique), avec des dimensions de $(21 \pm 1,3) \times (28,3 \pm 2,3) \mu\text{m}$. Les différentes souches isolées et purifiées n'ont pas présenté la même fréquence de chlamydospores sur le milieu CMA avec certaines produisant très peu de chlamydospores alors que d'autres en produisent en abondance. Le champignon 1 (genre indéterminé) stérile se caractérise par des chlamydospores en chaînettes et globoïdes (Fig. 5M).

Fréquence des champignons. *Pochonia chlamydosporia* et le champignon 1 non identifié sont les plus fréquemment associés aux femelles, voire aux kystes d'*H. avenae* récoltés dans les quatre régions prospectées et pourraient être responsables, à Kef, de la mortalité élevée des œufs et des larves (Fig. 6A). La diversité la plus élevée est observée à Zaghouan avec les genres *Alternaria*, *Fusarium*, *Drechslera*, *Trichothecium* et *Periconia* qui seraient spécifiques à cette région (Fig. 6A). *Pochonia chlamydosporia* parasite préférentiellement les œufs contenus dans les femelles et la diversité de la flore fongique diminue en fonction du stade de développement du nématode (Fig. 6 A et B) puisque les genres *Pithomyces*, *Pythium*, *Alternaria* et *Drechslera* n'ont été isolés

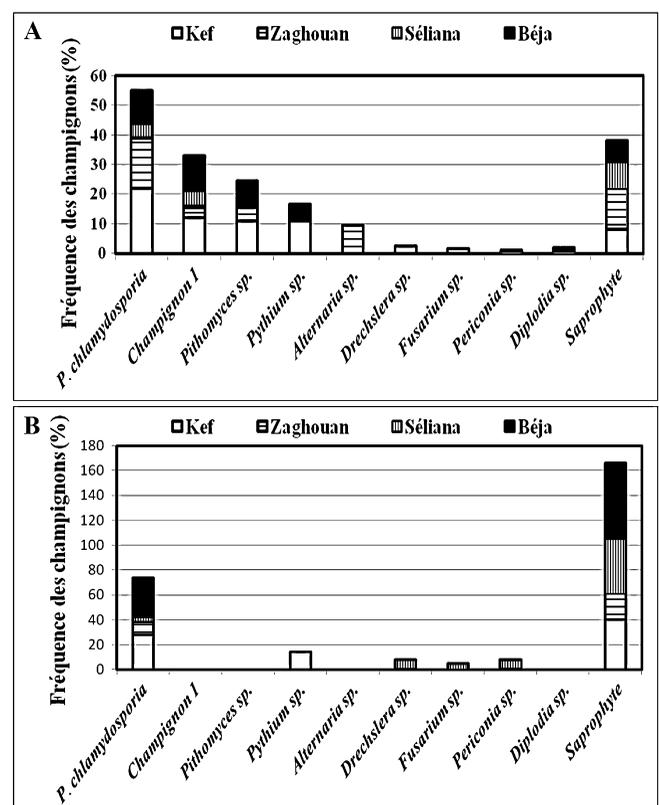


Fig. 6. Fréquence des champignons isolés à partir des femelles (A) et des kystes (B) d'*H. avenae* dans les quatre régions prospectées.

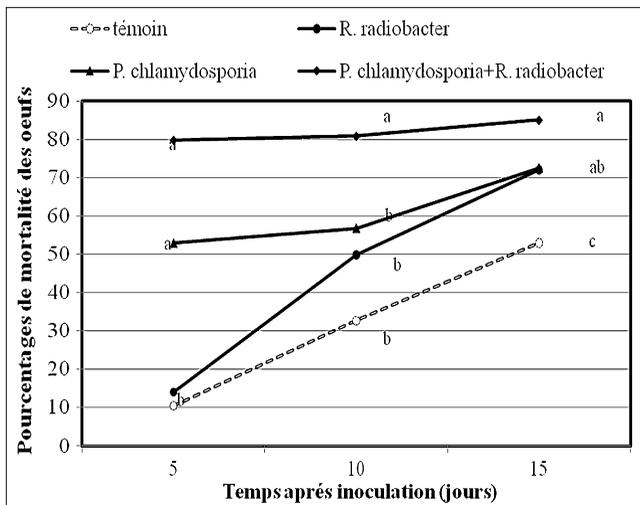


Fig. 7. Evolution de l'effet des quatre traitements sur la mortalité des œufs d'*H. avenae*. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P = 0,05$.

qu'à partir des femelles. Les kystes sont essentiellement colonisés par *P. chlamydosporia* et les saprophytes (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*). A part *P. chlamydosporia*, tous les autres champignons ont été isolés avec une fréquence inférieure à 10% et sont considérés comme des parasites secondaires.

Toxicité de *P. chlamydosporia*. Cinq jours après l'inoculation, les traitements des femelles avec *P. chlamydosporia*, seul ou en combinaison avec *R. radiobacter*, ont donné des pourcentages de mortalité significativement supérieurs par rapport au témoin et au traitement par *R. radiobacter* seul avec des taux de mortalité, respectivement de 52 et de 79%. Après quinze jours, cet effet toxique se maintient puisque la mortalité la plus élevée des larves (85%) est obtenue avec la combinaison des deux agents biologiques. Les traitements seuls par *P. chlamydosporia* ou par *R. radiobacter* ont donné des taux de mortalité intermédiaires d'environ 70%. Néanmoins, dans les femelles non traitées, la mortalité naturelle des œufs s'élève à 52% (Fig. 7). A l'intérieur des femelles traitées, les œufs sont envahis par les hyphes du champignon et sont complètement détruits 10 à 15 jours après l'inoculation.

DISCUSSION

La séparation par la coloration au bleu de Meldola d'œufs et de larves enchorionnées, viables ou non viables, a permis d'estimer les taux de mortalité d'*H. avenae* dans les quatre régions prospectées. Ces taux de mortalité sont plus importants dans les femelles que dans les kystes et pourraient résulter d'une plus grande vulnérabilité du nématode au cours de l'embryogenèse (Kerry, 1988a; Siddiqui et Irshad, 1996). Ils sont les plus élevés dans les régions de Kef et Séliana comme l'avait

indiqué Namouchi-Kachouri (2008) qui y avait décelé un important parasitisme par les champignons qui affectait aussi bien la formation des femelles que leur fécondité. Les taux de mortalité élevés chez les larves enchorionnées à Kef pourraient être liés au sol limoneux plus favorable à l'expression du parasitisme que le sol sableux (Kerry *et al.*, 1982a).

Douze champignons appartenant à des genres différents ont été identifiés à partir des femelles et des kystes d'*H. avenae* provenant des quatre régions céréalières. La plupart des champignons isolés appartiennent à la classe des Deutéromycètes et à l'ordre des Hyphales. Ces champignons ont été classés en deux groupes: les parasites d'*H. avenae* et les opportunistes (Ownley Gintis *et al.*, 1983; Dackman et Nordbring-Hertz, 1985). *Pochonia chlamydosporia* est le seul champignon parasite des œufs et des femelles d'*H. avenae* isolé lors de cette étude. Il est considéré comme l'un des plus importants champignons responsables de la régulation naturelle d'*H. avenae* dans plusieurs pays (Dackman et Nordbring-Hertz, 1985; López-Llorca et Boag, 1993; Kerry et Crump, 1998; Olivares-Bernabeu et López-Llorca, 2001). En effet, dans des systèmes de monocultures céréalières, ce champignon provoque la destruction de 95 à 97% des femelles et des œufs d'*H. avenae* (Kerry *et al.*, 1982a). Les champignons opportunistes sont des Oomycètes (*Pythium* sp.), Zygomycètes (*Rhizopus* sp.) et plusieurs Deutéromycètes tels que *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Diplodia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Pithomyces* sp. et *Trichothecium* sp.

Les champignons isolés dans notre étude sont trouvés souvent et partout dans le monde en association avec plusieurs nématodes à kystes (Heteroderidae), ce qui suggère que cette microflore leur est spécifique (Willcox et Tribe, 1974; Kerry et Crump, 1977; Kerry, 1980; Nigh *et al.*, 1980; Ownley Gintis *et al.*, 1983; Crump et Kerry, 1987; Crump, 1991; Crump et Flynn, 1995; Chen *et al.*, 1996). Selon Kerry *et al.* (1982b), les opportunistes ou parasites secondaires comme *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Alternaria* sp. n'infectent qu'un nombre faible d'œufs et ne colonisent que les femelles mortes. Par contre, *Nematophthora gynophila* et *P. chlamydosporia* infectent la plupart des œufs à l'intérieur des femelles et sont considérés comme de vrais parasites (Kerry *et al.*, 1982b). Il est à noter que certains des champignons isolés sont associés aux céréales.

A part *P. chlamydosporia*, tous les autres champignons isolés des quatre régions tunisiennes prospectées ont une fréquence inférieure à 10% et sont considérés comme des parasites secondaires (Dackman et Nordbring-Hertz, 1985; Kerry, 1988b). L'association régulière de *P. chlamydosporia* avec *H. avenae* suggère que ce champignon a vraisemblablement un rôle dans la régulation naturelle des populations de ce nématode en Tunisie. Sa fréquence la plus élevée dans la région du Kef pourrait résulter de conditions bioclimatiques favorables à son

développement et surtout de la monoculture des céréales (blé ou orge) qui y est pratiquée (Ben Hassine *et al.*, 2005). Kerry (1982) a montré que la régulation naturelle d'*H. avenae* (essentiellement due au parasitisme par *Nematophthora gynophila* et *P. chlamydosporia*) s'observe souvent dans les monocultures de céréales.

La diversité de la microflore fongique diminue en fonction du développement du nématode. Les femelles sont infestées par au moins quatre champignons *Pithomyces* sp., *Pythium* sp., *Alternaria* sp. et *Drechslera* sp., alors que les kystes sont colonisés par une microflore plus restreinte à savoir *P. chlamydosporia* et les champignons saprophytes (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. et *Rhizopus* sp.). Lopez-Llorca et Boag (1993) suggèrent que *P. chlamydosporia* produit des substances antagonistes du développement des autres champignons et devient par conséquent le seul parasite d'*H. avenae*.

En conditions de laboratoire, on a démontré la toxicité à l'égard d'*H. avenae* de *P. chlamydosporia* qui provoque une mortalité élevée et rapide des œufs du nématode. La mortalité induite par la bactérie *R. radiobacter* est plus lente à s'installer. La combinaison de ces deux microorganismes constitue donc une potentialité majeure de lutte biologique qui a été précédemment démontrée par plusieurs auteurs aussi bien à l'encontre des nématodes à kystes (*Heterodera*) que des nématodes à galles (*Meloidogyne*). L'efficacité de l'association *P. chlamydosporia*-*R. radiobacter* pourrait résulter d'un effet synergique entre les deux microorganismes et confirme les résultats d'autres travaux qui ont montré que la combinaison de plusieurs agents antagonistes est plus efficace dans la lutte contre les nématodes phytoparasites (Siddiqui et Mahmood, 1996).

LITTÉRATURE CITÉE

- Barnett H.L. et Hunter B.B., 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. MacMillan Publishing company, New York, USA, 219 pp.
- Ben Hassine H., Nahdi H., Bonin G. et Ben Salem M., 2005. Évaluation des potentialités de production des sols céréaliers du Nord-Ouest tunisien. *Science et Changements Planétaires/Sécheresse*, 16: 287-303.
- Chen S.Y., Dickson D.W. et Mitchell D.J., 1996. Pathogenicity of fungi to eggs of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 28: 148-158.
- Collingwood C.A., 1962. Continuous corn growing and cereal root eelworm in the South West. *National Agricultural Advisory Services Quarterly Review*, 58: 70-73.
- Crump D.H., 1991. Fungal species isolated from beet, cereal, and potato cyst nematodes. *Bulletin IOBC/WPRS*, 14: 58-64.
- Crump D.H. et Kerry B.R., 1987. Studies on the population dynamics and fungal parasitism of *Heterodera schachtii* in soil from sugar-beet monoculture. *Crop Protection*, 6: 49-55.
- Crump D.H. et Flynn C.A., 1995. Isolation and screening of fungi for biological control of potato cyst nematodes. *Nematologica*, 41: 628-638.
- Dackman C. et Nordbring-Hertz B., 1985. Fungal parasites of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in Southern Sweden. *Journal of Nematology*, 17: 50-55.
- Fenwick D.W., 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155-172.
- Irving F. et Kerry B.R., 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*, 32: 474-485.
- Jaffee B.A., Muldoon A.E. et Tedford E.C., 1992a. Trap production by nematophagous fungi growing from parasitized nematodes. *Phytopathology*, 82: 615-620.
- Jaffee B.A., Phillips R., Muldoon A.E. et Mangel M., 1992b. Density dependent host pathogen dynamics in soil microcosms. *Ecology*, 73: 495-506.
- Jaffee B.A., Tedford E.C. et Muldoon A.E., 1993. Tests for density dependent parasitism of nematodes by trapping and endoparasitic fungi. *Biological Control*, 3: 329-336.
- Kerry B.R., 1980. Biocontrol: fungal parasites of female cyst nematodes. *Journal of Nematology*, 12: 253-259.
- Kerry B.R., 1982. The decline of *Heterodera avenae* populations. *EPPO Bulletin*, 12: 491-496.
- Kerry B.R., 1988a. Fungal parasites of cyst nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 24: 293-305.
- Kerry B.R., 1988b. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. Pp. 153-177. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (Whipps J.M. et Lumsden R.D., eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kerry B.R. et Crump D.H., 1977. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica*, 23: 193-201.
- Kerry B.R. et Crump D.H., 1998. The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. *Fundamental and Applied Nematology*, 21: 617-625.
- Kerry B.R., Crump D.H. et Mullen L.A., 1982a. Natural control of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* Woll., by soil fungi at three sites. *Crop Protection*, 1: 99-109.
- Kerry B.R., Crump D.H. et Mullen L.A., 1982b. Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. *Annals of Applied Biology*, 100: 489-499.
- Lopez-Lorca L.V. et Boag B., 1993. A contribution to the ecology of fungi associated with females and cysts of *Heterodera avenae* in Eastern Scotland. *Nematologia Mediterranea*, 21: 187-197.
- Namouchi-Kachouri N., 2008. Contribution à l'étude des principaux nématodes associés aux céréales en Tunisie: Attention particulière au nématode à kyste *Heterodera avenae* Woll. Thèse de doctorat d'état en sciences agronomiques, Institut National Agronomique de Tunisie, Tunisie, pp. 188.
- Namouchi-Kachouri N., Kallel S. et B'Chir M.M., 2009. Incidence économique d'*Heterodera avenae* sur blé, *Triticum durum*, sous les conditions naturelles tunisiennes. *Nematologia Mediterranea*, 37: 3-10.
- Nigh E.A., Thomason I.J. et Van Gundy S.D., 1980. Identification and distribution of fungal parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California. *Phytopathology*, 70: 884-889.

- Ogica I.R. et Estey R.H., 1974. The use of Meldola blue and Nile blue A, for distinguishing dead from living nematodes. *Nematologica*, 20: 271-276.
- Olivares-Bernabeu C.M. et López-Llorca L.V., 2001. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19: 104-110.
- Ownley Gintis B., Morgan Jones G., Rodriguez-Kabana R., 1983. Fungi associated with several development stages of *Heterodera glycines* from Alabama soybean field soil. *Nematologica*, 13: 182-201.
- Seinhorst J.W., 1965. The relationship between nematode density and damage to plants. *Nematologica*, 11: 137-154.
- Seinhorst J.W., 1986. Effects of nematode attack on the growth and yield of crop plants. Pp. 191-209. *In*: Cysts Nematodes (Lamberti F. and Taylor C.E., eds). Academic Press, London, UK.
- Seinhorst J.W., 1998. The common relation between population density and plant weight in pot and microplot experiments with various nematode plant combinations. *Fundamental and Applied Nematology*, 21: 459-468.
- Siddiqui Z.A. et Irshad M., 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology*, 58: 229-239.
- Stirling G.R., 1991. *Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects*. CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- Willcox J. et Tribe H.T., 1974. Fungal parasitism of cysts of *Heterodera*. I. Preliminary investigations. *Transactions of the British Mycological Society*, 62: 585-594.

Accepté pour publication le 28 septembre 2011.

