

TYPAGE MOLECULAIRE ET ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES CHAMPIGNONS ISOLES DES OLIVERAIES TUNISIENNES

Houda Gharsallah¹, Ines Ksentini¹, Karama Hadj Taieb¹, Sourour Naayma¹, Nour Abdelhedi¹, Christina Schuster^{2,3}, Mohamed Ali Triki¹, Andreas Leclerque^{2,3} et Mohieddine Ksantini¹

Résumé

Cette présente étude est une évaluation de l'activité entomopathogène des isolats fongiques dans le but de protéger l'olivier contre les insectes ravageurs et pour minimiser l'utilisation des produits de synthèse. Notre travail a consisté initialement à l'isolement des champignons à partir des vergers de l'olivier situés dans trois différents sites, suivis d'une identification moléculaire et d'une évaluation de leur activité entomopathogène.

L'analyse moléculaire de la région ITS (Internal transcribed spacer) de l'ARNr des isolats fongiques a montré la présence de 7 genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* et *Lecanicillium*. Les résultats du test de pathogénie des isolats fongiques sur les larves L2 d'*E. kuehniella* ont montré l'efficacité des isolats *Aspergillus pseudodeflectus*, *Cladosporium sphaerospermum* et *Lecanicillium aphanocladii* qui s'est traduite par une mortalité totale des larves, 7 jours après le traitement. *Lecanicillium aphanocladii* pourrait être plus profondément investiguée pour la lutte contre la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina*, considérés parmi les principaux insectes ravageurs de l'olivier.

Mots clés: Champignons, Activité entomopathogène, Olivier

Abstract:

In the present work, the entomopathogenic activity of our fungal isolates was explored in order to protect the olive tree against pest insects and to reduce the use of synthetic products. Our work initially consisted of isolating the fungi from olive orchards located at three different sites, followed by their molecular identification and exploration of their entomopathogenic activity.

Molecular analysis of the ITS region of rRNA from fungal isolates showed the presence of 7 genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* and *Lecanicillium*. The results of the pathogenesis test of fungal isolates on L2 larvae of *E. kuehniella* showed their efficacy with *Aspergillus pseudo deflectus*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Lecanicillium aphanocladii* isolates

¹Institut de l'Olivier, IRESA, Université de Sfax

²Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Hochschule Geisenheim, Allemagne

³Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt, Allemagne

causing total larval mortality 7 days after treatment. *Lecanicillium aphanocladii* could be further investigated for the control of the olive fly *Bactrocera oleae* and the olive psyllid *Euphyllura olivina*, the main insect pests of the olive tree.

Keywords: Fungi, Entomopathogenic activity, Olive tree

Introduction

En Tunisie, l'huile d'olive constitue un produit stratégique. Elle joue un rôle économique, social et environnemental important. Sur le plan national, l'huile d'olive contribue à la réalisation des objectifs nationaux de sécurité alimentaire, de création d'emplois, d'équilibre de la balance commerciale, de préservation des ressources naturelles et de limitation de l'exode rural. Sur le plan international, elle procure à la Tunisie le rang de quatrième producteur et de troisième exportateur mondial (FAOSTAT, 2018).

Cependant, la culture de l'olivier souffre de plusieurs problèmes qui diminuent la productivité de l'olivier et altèrent la qualité de l'huile d'olive. En effet, l'olivier est soumis à l'attaque de plusieurs bioagresseurs entomologiques telle que la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*, la teigne de l'olivier *Prays oleae* et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* (COI, 2007).

Pour lutter contre ces ravageurs, une stratégie d'utilisation des insecticides chimiques a été adoptée. Cependant, elle présente plusieurs effets néfastes aussi bien sur l'environnement, que sur la qualité de l'huile d'olive issue, et par conséquent des risques éventuels liés à sa consommation. A cet effet, la lutte biologique a été mise au point comme méthode alternative de lutte surtout qu'elle est très prometteuse pour une gestion durable des cultures contre les ravageurs (Warlop, 2006).

C'est dans ce contexte que le présent travail a été mené. Il a été dirigé dans un premier temps vers l'isolement et l'identification des champignons dans les vergers de l'olivier Tunisiens. Dans un second temps le criblage de l'activité entomopathogène des champignons identifiés a été effectué.

Matériel et Méthodes

1. Milieux et conditions de culture

Pour les souches fongiques : Les cultures s'effectuent en milieu Potato Dextrose Agar (PDA) composé de 200 g/l Pomme de terre et 20 g/l Dextrose à pH $5,2 \pm 0,2$ ou le milieu Potato Glucose Agar (PGA) composé de 200 g/l Pomme de terre et 20 g/l Glucose à pH $5,6 \pm 0,2$. Les milieux sont solidifiés par 20 g/L d'agar et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

2. Méthodes

2.1. Collecte des échantillons et isolement des champignons

Un total de 60 échantillons a été recueilli, selon un protocole standardisé, à partir de trois parcelles situées dans deux zones géographiques du gouvernorat

de Sfax, à savoir la parcelle expérimentale de l'Institut de l'Olivier «Taoues», située à 26 km au nord-ouest de Sfax et conduite selon le mode conventionnel, et deux parcelles conduites selon le mode biologique, situées dans la localité de Torba (sud-ouest de Sfax). A partir de chaque parcelle, des feuilles portant des galeries des larves de *Prays oleae*, et des fruits portant des galeries vides de *Bactrocera oleae*, ont été collectés. Également, des échantillons de sol ont été prélevés avec une petite pelle préalablement désinfectée à l'alcool 70% avant chaque utilisation. Chaque échantillon a été emballé dans deux sacs en plastique stérile scellés avec un élastique en caoutchouc, puis ramené au laboratoire et conservé à 4°C.

L'isolement des champignons a été réalisé à partir du sol, des feuilles et des fruits et à partir des adultes et larves de la mouche de l'olive *B. oleae* et du psylle de l'olivier *E. olivina*. L'isolement a été effectué, par ensemencement en surface de 100 µl de chaque suspension dans des boîtes de Pétri (Ø =90 mm), contenant préalablement le milieu PDA ou le milieu PGA. Les milieux de cultures ont été conditionnés en duplicate et les boîtes ont été identifiées par des codes respectifs et ont été scellées avec du Parafilm. Après incubation à 25°C, pendant 3 jours, une lecture des résultats a été effectuée.

2.2. Identification moléculaire des champignons isolés

Une étude moléculaire à base de PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques ITS4/ITS5, ITS1/ITS6, ITS5/ITS6, ITS1/ITS4, NS5/NS8 (figure 1).

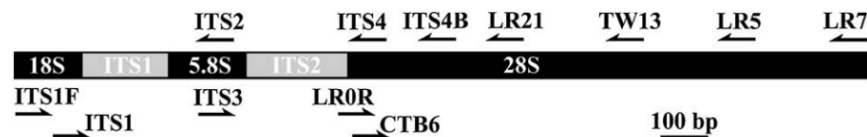


Figure 1: Représentation schématique de la région de l'ADN ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les organismes eucaryotes (d'après Tedersoo, 2006)

L'extraction de l'ADN fongique a été faite par le kit DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen®) selon un protocole optimisé. Pour ce faire, et pour chaque échantillon, 100 mg de la culture fongique ont été grattés et mis dans un tube Eppendorf puis plongés dans de l'azote liquide. Par la suite, chaque échantillon a été broyé avec un micro-pilon stérile dans du tampon AP1. Ce mélange a été ensuite mis dans un bain-marie pour la lyse des cellules. Par la suite, du tampon AP2 (tampon de déproteïnisation) a été ajouté au lysat préalablement obtenu. Le tout a été mélangé et incubé pendant 5 min dans de la glace afin de précipiter les détergents, les protéines et les polysaccharides. Le lysat a été ensuite centrifugé pour séparer le culot du surnageant. Ce dernier a été récupéré dans la colonne QIAshredder Mini spin column et a été centrifugé. La colonne a été soumise à des lavages avec deux tampons afin

d'obtenir une meilleure qualité d'ADN à l'élution. L'ADN extrait a été utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR de la région ITS de l'ARNr des champignons.

L'amplification a été programmée en un cycle initial de dénaturation à 95°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles à 95°C pendant 1 min, 1 min à 52°C (hybridation) et 68°C pendant 2 min (polymérisation), et se terminant avec un cycle d'élongation à 72°C pendant 5 min. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermo cycleur PCR. (my Cyciler TM – Hochschule Geisenheim University, Geisenheim, Allemagne). Dans cette étude, l'amplification par PCR a été réalisée dans un volume total de 50 µl pour 1 échantillon contenant 5 µl du tampon de réaction, 43,2 µl d'eau, 1 µl dNTP, 0,25 µl de chaque amorce (100 µM), 0,25 µl de la Taq polymérase (New England Biolabs®) et 1 µl d'ADN. Précisons toutefois, qu'afin d'augmenter les chances d'obtention de signaux, 5 réactions de PCR ont été préparées en même temps, dont chacune a été lancée avec l'un des couples d'amorces suivants : ITS4/5, ITS1/6, ITS1/4, ITS5/6 et NS5/NS8. Le séquençage a été effectué par la société StarSEQ Gmbh (Mayence, Allemagne).

Au terme des analyses, la société contractée a procédé à l'envoi des séquences nucléotidiques des isolats. Ces dernières ont été assimilées, par la suite, à leur indice de similarité par l'outil de recherche de base d'alignement en ligne BLAST (Basic Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) qui permet de comparer les séquences des gènes inconnues à des sources connues dans la base de données de la banque des gènes (NCBI). Cette dernière détient des séquences provenant de milliers de champignons, et peut constituer un outil puissant susceptible d'identifier les organismes inconnus.

2.3. Evaluation du pouvoir entomopathogène des différents champignons isolés

Avant d'envisager une application au terrain des champignons isolés à partir des oliveraies, ces isolats ont fait l'objet d'une série d'expérimentation au laboratoire, en conditions contrôlées. Après avoir obtenu des cultures pures de champignons, les colonies développées ont été grattées par des lames désinfectées et mises en suspension dans 5ml d'eau distillée stérile à laquelle 0,1% de Tween 80 (monooléate de polyoxyéthylène sorbitane 0,1 ml/l) ont été ajoutés. Après filtration de la suspension, la concentration a été ajustée à 10⁸ spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez.

Tous les tests de pathogénie ont été conduits au laboratoire sur un insecte, la teigne de la semoule *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera ; Pyralidae), activement utilisé dans plusieurs laboratoires de recherche. De ce fait, un élevage est conduit depuis plusieurs années à l'Institut de l'Olivier.

Ainsi, pour mener à bien ces expériences, les œufs fraîchement pondus ont étéensemencés dans des boîtes contenant de la semoule et placées dans les conditions ambiantes (15-25°C), jusqu'à leur éclosion. Ces boîtes ont été

vérifiées 3 fois par semaine pour s'assurer de la survie des nouvelles larves écloses et de l'absence de tout prédateur ou parasitoïde.

Une fois qu'elles ont atteint le stade L2, les larves d'*E. kuehniella* sont devenues susceptibles d'être utilisées dans les bio-essais afin de déceler l'activité entomopathogène des champignons isolés. Chaque traitement a été répété trois fois. Ainsi, dix larves pour chaque répétition, soient 30 larves par traitement, ont été utilisées pour tester l'effet de chaque suspension. L'activité entomopathogène a été mesurée en termes de mortalité larvaire, et a été contrôlée quotidiennement sur une durée de 15 jours.

2.4. Les postulats de Koch

Les postulats de Koch ont été appliqués afin de vérifier le développement des champignons testés à la surface des cadavres des insectes issus des tests d'entomopathogénicité. Pour ce faire, les cadavres ont été trempés dans 5% d'eau de javel, lavés une ou plusieurs fois avec de l'eau stérile puis séchés sur papier filtre stérile. Les insectes ainsi préparés ont été maintenus à 25°C en présence d'humidité. Les champignons qui se sont développés ont été examinés et vérifiés par microscopie (LeitzDialu x40 EB).

2.5. Méthodes analytiques

Pour des fins statistiques, l'activité entomopathogène des différents isolats a été estimée par l'analyse du taux de mortalité des insectes traités. Pour élucider les effets des traitements, une analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour détecter les différences selon le Test de Tukey ($p < 0,05$). Les analyses ont été faites en utilisant le logiciel statistique SPSS 17 version 2008.

Résultats et discussion

1. Identification moléculaire

Nos échantillons recueillis ont été collectés à partir de chacune des trois parcelles sur des feuilles portant des galeries des larves de *Prays oleae*, et des fruits portant des galeries vides de *Bactrocera oleae*. Suite à la diversité très large des différents isolats, des amorces universelles ont été utilisées pour l'amplification de l'ADN extrait par PCR et l'identification des champignons isolés.

1.1. La PCR et l'analyse des produits de PCR

Les résultats du gel d'électrophorèse sont le reflet de la bonne amplification des produits de PCR. En voulant tester la sensibilité de la PCR, 5 différents couples d'amorces (ITS4/ITS5 ; ITS1/ITS6 ; ITS5/6 ; ITS1/4 et NS5/NS8) ont été testés. On a constaté que pour un même produit d'extraction, l'amplification était effective dans des conditions différentes impliquant certains couples d'amorces. En effet, parmi les gels d'électrophorèse, un total de 43/57 ont montré la présence de produit de PCR suite à l'utilisation des couples d'amorces ITS4/ITS5 (37/57), ITS1/6 (2/57), ITS5/ITS6 (2/57), ITS1/4 (1/57) et NS5/NS8 (1/57).

1.2. Le séquençage

Parmi les 43 produits de PCR séquencés, seulement 33 séquences ont été retenues. Les chromatogrammes bruts ont été analysés par le logiciel Chromas. Par le biais de ce dernier, on a pu constater que seulement 8 séquences obtenues sont hautement interprétables puisqu'elles présentent un seul signal, alors que les séquences restantes (25/33) sont très peu interprétables puisqu'elles présentent deux signaux ou plus témoignant sans doute d'une contamination.

1.3. Analyse des séquences

La comparaison des séquences ITS et de la région qui code l'ADNr 5.8S des souches fongiques avec celles disponibles au niveau de la banque de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) en utilisant le serveur BLAST, permet la détermination de la position taxonomique exacte de chaque champignon. L'interprétation des séquences a montré que les 33 champignons sont repartis en 7 genres différents à savoir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* et *Lecanicillium*.

1.4. Arbre phylogénétique

L'analyse informatique des séquences ITS et de la région qui code l'ARNr 5.8S des 7 genres dont les espèces présentent un pourcentage de similitude supérieur à 99% en comparaison avec les espèces de référence publiées dans la banque de données NCBI, nous a permis de construire un arbre phylogénétique non enraciné par la méthode de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et Nei, 1987), à l'aide du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7 (Tamura *et al.*, 2011).

Sur le plan phylogénétique, l'analyse bio-informatique des séquences ITS et du gène codant pour l'ARNr 5.8S est devenue un outil important dans l'identification fongique puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement phylogénétique des espèces. Cette présente étude a permis d'assigner les souches codées par F1', F58, F46 et F60 au genre *Aspergillus* et plus exactement aux espèces *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus tamarii*, respectivement.

Également, la comparaison des pourcentages de similitude des souches fongiques obtenues avec des souches de référence, a permis d'assigner la souche codée par F16 au genre *Fusarium* et plus précisément à l'espèce *Fusarium solani*. Cependant, nous notons l'existence d'une certaine distance phylogénétique entre la souche nommée F16 et les deux souches de référence KT224788.1 et KX359614.1. L'alignement des séquences des souches fongiques avec celui des souches de référence, nous a permis d'assigner la souche codée par F49 au genre *Penicillium* et plus précisément à l'espèce *Penicillium commune* qui montre une certaine distance phylogénétique avec la souche de référence (*Penicillium commune* KY921952.1). Au terme de cette

analyse, un arbre phylogénétique global obtenu selon la méthode des distances (Neighbor-joining) a été dressé (Figure2).

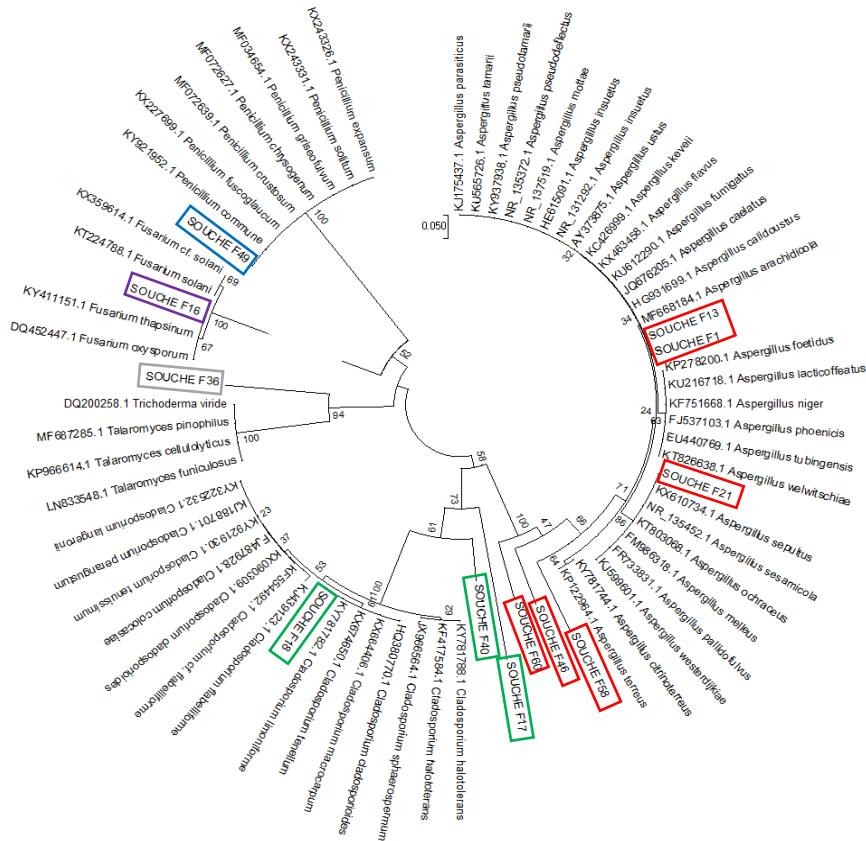


Figure 2: Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-joining) construit d'après l'analyse de séquences du gène qui code pour l'ADNr 5.8S en utilisant le logiciel Mega Version 7 montrant la position phylogénétique des souches fongiques.

2. Evaluation du pouvoir entomopathogène des différents champignons isolés

Afin de mettre en évidence le pouvoir entomopathogène de nos différents isolats fongiques sur la teigne de la farine *E.kuehniella*, dont l'élevage est effectué au sein de l'Institut de l'olivier, une suspension fongique de 10^8 spores de chaque champignon a été mélangée avec 1g de semoule afin de tester le pouvoir entomopathogène de 17 isolats sur les larves d'*E.kuehniella* au 2^{ème} stade de leur développement par alimentation et aussi par contact.

Après 15 jours de traitement, le contrôle des taux de mortalité des larves a été effectué. La comparaison des mortalités suite au traitement par les différents champignons est représentée dans la figure 3.

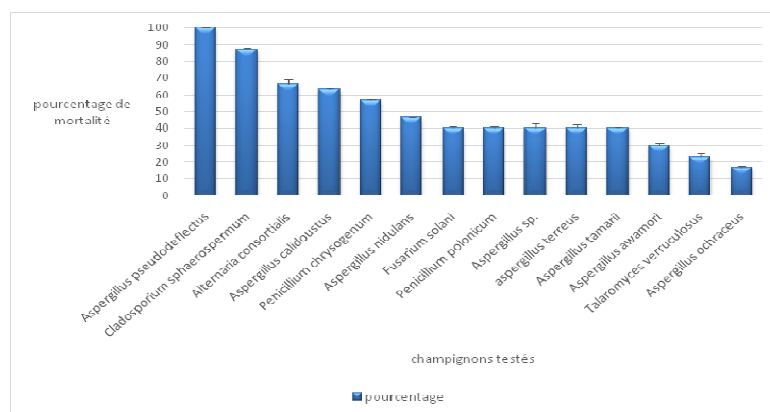


Figure 3: Pourcentage de mortalité des larves d'*E. kuehniella*, 15 jours après le traitement par les différents champignons (\pm SEM)

L'analyse statistique des taux de mortalité montre que l'effet des champignons est hautement significatif, ce qui permet de classer ces derniers selon leur degré de pathogénie.

En effet, *Cladosporium phaeospermum* et *Aspergillus pseudo deflectus* sont significativement les plus virulents avec des pourcentages de mortalité respectifs de 86,66% et 100%. D'autres champignons tels que *Alternaria consortialis*, *Aspergillus calidoustus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Penicillium polonicum*, *Aspergillus sp.* et *Aspergillus tamarii* ont engendré des pourcentages de mortalité moyens qui varient entre 40 et 66,66%. Ces champignons pourraient être des pathogènes facultatifs de l'insecte.

Par contre, les autres champignons *Aspergillus ochraceus*, *Talaromyces verrucosus* et *Aspergillus awamori* ont montré un pouvoir pathogène extrêmement faible se situant aux alentours de 16,66%, 22% et 29%, respectivement (Figure 3).

Conformément aux postulats de Koch, des cadavres d'insectes ont été mis en culture et incubés à 25°C.

Ainsi, toutes les larves mortes traitées ont développé le champignon testé, en surface, dans les conditions humides. Ceci confirme que l'infection fongique est à l'origine de leur mortalité. Plusieurs aspects de mortalité ont été observés (figure 4).

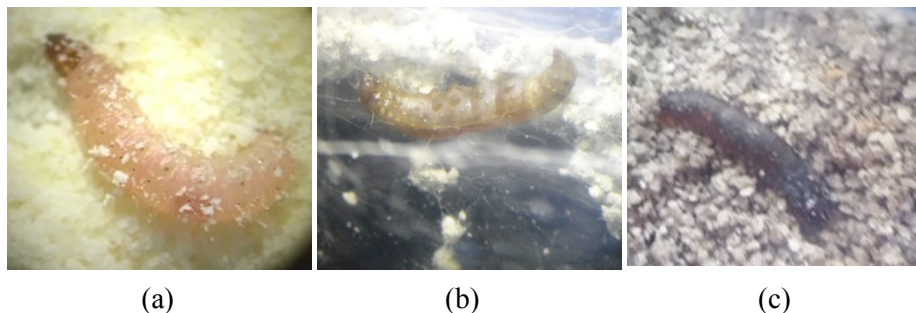


Figure 4: Observation sous loupe binoculaire des larves mortes d'*E. kuehniella* suite au traitement par des champignons entomopathogènes. (b) et (c) les photos montrent l'effet des différents champignons sur les larves d'*E. kuehniella*. (a): témoin : la photo d'une larve non infectée.

L'activité entomopathogène des espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Talaromyces* contre les insectes a été notée par plusieurs auteurs. En effet, les travaux de Nurariaty (2006) ont montré que plusieurs espèces d'*Aspergillus* agissent comme entomopathogènes et provoquent la mort du doryphore de la pomme de terre.

Dans notre étude, l'effet entomopathogène d'*Aspergillus* sur *E. kuehniella* diffère en fonction de l'espèce. Ainsi, *A. pseudo deflexus* s'est avéré très virulent puisqu'il a causé la mortalité totale des insectes traités, alors que *A. ochraceus* s'est montré très peu virulent avec un pourcentage de mortalité très bas de l'ordre de 16,16%. Parallèlement aux *Aspergillus* (Scully et Bidochka, 2009), quelques espèces du genre *Cladosporium* sont connues pour leur pouvoir pathogène (Bahar et al., 2011) à l'instar de celui de *Cladosporium sphaerospermum* qui a engendré une mortalité de l'ordre de 86,66% sur les larves d'*E. kuehniella* au cours de cette présente étude. Ceci est en concordance avec les travaux d'Abdel Baky (2000) qui a montré le pouvoir entomopathogène de *Cladosporium* sur deux espèces d'aleurodes et de Pucerons.

L'activité entomopathogène des espèces d'*Aspergillus*, *Cladosporium*, hautement pathogènes aux larves d'*E. kuehniella*, devrait être confirmée sur les principaux ravageurs de l'olivier en vue de leur utilisation possible pour la protection biologique de ce dernier. Cependant, il est important de préciser qu'après les applications d'*Aspergillus pseudo deflexus* sur les larves d'*E. kuehniella*, les mouvements de ces derniers sont devenus de plus en plus lents avant de cesser complètement. Des changements dans la couleur des cadavres ont été visibles au niveau des thorax et correspondent à la présence du mycélium. Toutefois, selon Charnley (1989), ce changement de couleur est dû au dépôt de mélanine. Par contre, en ce qui concerne le champignon *Fusarium solani*, les observations ont montré qu'en présence d'humidité, le

mycélium se développe à l'extérieur du cadavre de l'insecte et commence à sporuler. Par la suite, le cadavre se couvre d'une couche poudreuse blanchâtre. En plus de ces symptômes une déshydratation de la larve est généralement observée, empêchant l'insecte de passer au stade supérieur. Milat-Bissaad (2011) a observé des symptômes similaires chez des larves de cinquième stade du criquet pèlerin traitées avec *Beauveria bassiana*.

Conclusion

Dans cette présente étude, un isolement des champignons a été fait à partir du sol, des feuilles et des fruits d'olivier de deux biotopes (Taoues et Torba), situés à Sfax, et à partir de deux insectes ravageurs de l'olivier, à savoir : la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* dans le but de les utiliser dans la lutte biologique, comme alternative au modèle conventionnel.

L'identification moléculaire des isolats a mis en évidence l'existence de plusieurs espèces fongiques réparties en 7 genres différents à savoir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* et *Lecanicillium* avec lesquels un test d'activité entomopathogène a été réalisé. Les résultats du test d'entomopathogénie sur les larves L2 d'*E. kuehniella* ont montré que *Cladosporium sphaerospermum* est l'isolat le plus virulent avec un pourcentage de mortalité de 100%. D'autres champignons ayant engendré des pourcentages de mortalité moyens variant entre 40 et 66,66% pourraient être pathogènes facultatifs de l'insecte. Bien que les champignons ayant montré un pouvoir pathogène extrêmement faible pourraient être pathogènes facultatifs de l'insecte, ils peuvent être testés directement contre les ravageurs cités dans le but de les utiliser dans les programmes de lutte biologique. Parmi ces champignons, *Lecanicillium* est inclus dans la formulation de plusieurs myco insecticides. De ce fait, il pourrait être plus profondément investigué pour la lutte contre la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina*, deux des principaux insectes ravageurs de l'olivier.

Références bibliographiques:

Abdel-Baky NF., 2000: *Cladosporium* spp. an entomopathogenic fungus for controlling whiteflies and aphids in Egypt Pakistan Journal of Biological Sciences 3 (10), 1662-1667

Bahar MD., Backhous D., Peter C. Gregg & Robert Mensah, 2011: Efficacy of a *Cladosporium* sp. fungus against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), other insect pests and beneficial insects of cotton. Biocontrol Science and Technology. Volume 21- Issue 12, Pages 1387-1397.

Charnley., 1989: Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus, *Metarhiziumanisopliae*.

COI., 2007. Conseil oléicole international, 2007: Saavedra M.S. (Espagne), Tombesi A., Tombesi S. (Italie), Andria R., Lavini A. (Italie), Fernández-Escobar R. (Espagne) et Jardak T. (Tunisie): Techniques de production en oléiculture, 346 p. Coordination : Mohammed OuhmadSbitri et Francesco Serafini.

FAOSTAT, 2018. <http://www.fao.org/home/fr> (Consulté le 15.10.2020).

Karray B., Msallam M., Ksantini M., Mahjoub Boujnah D. et Grati Kammoun N., 2009 : Programmes et acquis de recherches pour la rénovation de la filière huile d'olive et l'amélioration de ses performances. Institut de l'Olivier, 10-2009.

Milat-Bissaad F., 2011: Effect of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhiziumanisopliae* var. *acidum* on the Haemolymph of the Desert Locust *Schistocerca gregaria*.

Saitou N. et M. Nei., 1987: Neighbor-joining Method Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

Scully LR., et Bidochka MJ., 2009: An alternative insect pathogenic strategy in an *Aspergillus flavus* auxotroph. 10.1016/j.mycres.2008.10.007.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Tedersoo L., Suvia R., Larssonb E., Ijalga U., 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. Mycological research 110 : 734–748.

Warlop, 2006. Limitation des populations de ravageurs de l'olivier par le recours à la lutte biologique par conservation. Cahiers Agricultures 15 (5, 449-455).