

**POTENTIALITES DE BIOCONTROLE DE CINQ ESPECES
FONGIQUES ASSOCIEES AU SCOLYTE DU PISTACHIER
CHAETOPTELIUS VESTITUS (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)**

Karama Hadj Taieb¹, Houda Gharsallah¹, Ines Ksentini¹, Andreas Leclerque^{2,3}, Christina Schuster^{2,3}, Mohamed Ali Triki¹ & Mohieddine Ksantini¹

Résumé

Le présent travail a été mené afin d'identifier les champignons associés au scolyte du pistachier, *Chaetoptelius vestitus*, et d'explorer leurs potentialités biologiques. Pour ce faire, des isolements fongiques ont été entrepris à partir des adultes et des galeries de *Chaetoptelius vestitus*. L'analyse moléculaire de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ARNr de 41 isolats a permis d'identifier 28 espèces appartenant aux 13 genres suivants : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Nothophoma*, *Paecilomyces*, *Parengyodontium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichothecium* et *Meyerozyma*. L'évaluation de l'activité entomopathogène et phytopathogène des différentes espèces fongiques et le dépistage de leurs pouvoirs antifongique et antibactérien ont été effectués. Les potentialités de biocontrôle les plus importantes ont été enregistrées chez cinq isolats. Il s'agit de Tpi_io_1 (*T. pinophilus*), caractérisé par une forte activité entomopathogène, antifongique et antibactérienne, Pbi_io_2 (*P. bilaiae*) et Ata_io_1 (*A. tamaritii*), ayant montré des potentialités entomopathogènes et antifongiques importantes, Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) présentant une activité entomopathogène et antibactérienne élevées, et Pal_io_1 (*P. album*) montrant un pouvoir entomopathogène important. Tous ces isolats ont été caractérisés par une absence d'activité phytopathogène. Ils pourraient être considérés comme sources prometteuses pour la protection biologique du pistachier contre *C. vestitus* et les pathogènes microbiens.

Mots clés: pistachier, insectes, *Chaetoptelius vestitus*, champignons, activité phytopathogène, activité entomopathogène, activité antifongique, activité antibactérienne

Abstract

The present work was carried out in order to identify the fungi associated with the pistachio bark beetle, *Chaetoptelius vestitus*, and to explore their biological activities. Fungal isolation was made from adults and galleries of *Chaetoptelius vestitus*. Molecular analysis of the ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences of the

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

² Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Hochschule Geisenheim, Allemagne

³ Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt, Allemagne

ribosomal RNA operons of 41 fungal isolates allowed to identify 28 species belonging to the following 13 genera: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Nothophoma*, *Paecilomyces*, *Parengyodontium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichothecium* and *Meyerozyma*. The evaluation of entomopathogenic and phytopathogenic activities of the various fungal species as well as the screening of their antifungal and antibacterial potentialities were carried out. The most important biological potentialities were recorded in five isolates. These are Tpi_io_1 (*Talaromyces pinophilus*), representing high entomopathogenic, antifungal and antibacterial activities, Pbi_io_2 (*Penicillium bilaiae*) and Ata_io_1 (*Aspergillus tamaritii*), showing significant potential of entomopathogenic and antifungal activities, Pch_io_1 (*Penicillium chrysogenum*), showing high entomopathogenic and antifungal activities and Pal_io_1 (*Parengyodontium album*) representing a high entomopathogenic activity. All these isolates were characterized by the absence of phytopathogenic activity. They could be considered promising resources for biological protection of pistachio trees against *C. vestitus* and microbial phytopathogens.

Key words: pistachio tree, insects, *Chaetoptelius vestitus*, fungi, phytopathogenic activity, entomopathogenic activity, antifungal activity, antibacterial activity

Introduction

La production mondiale des pistaches est en augmentation continue (FAOSTAT, 2017). Elle est motivée d'une part par l'adaptation du pistachier aux conditions difficiles de culture (Yavuzet al., 2016) et d'autre part par sa valeur nutritionnelle très riche (Bulloet al., 2015). Cependant, le pistachier est soumis à l'attaque de plusieurs insectes ravageurs, tel que le scolyte du pistachier, *Chaetoptelius vestitus* (Coleoptera, Curculionidae), considéré comme l'un des principaux ravageurs du pistachier dans plusieurs pays producteurs de pistaches, y compris la Tunisie (Balachowsky, 1949 ; Abu Yaman, 1969 ; Mehrnejad, 2001 ; Fragoulis, 2004 ; Ghrissiet al., 2019).

Les dégâts de *C. vestitus* se manifestent surtout lors de la nutrition de l'adulte. En s'attaquant aux jeunes rameaux des arbres vigoureux, les adultes creusent des galeries profondes les vidant de leur contenu médullaire et provoquant ainsi leur dessèchement. Plusieurs rameaux peuvent être successivement minés par un même individu dont l'activité de nutrition peut s'étendre sur six mois, depuis son émergence jusqu'au début de sa phase de reproduction (Balachowsky, 1949). Si l'insecte attaque le bourgeon terminal, la croissance du rameau est arrêtée. En outre, les galeries forées favorisent le développement des agents pathogènes dans les rameaux du pistachier (Braham et Jardak, 2012). Pendant leur phase de reproduction, les adultes ont pour effet d'aggraver l'état des sujets déjà affaiblis (Chebouti-Meziouet al., 2013). En Tunisie, des études récentes ont signalé que *C. vestitus* cause des dégâts importants sur les cultures du pistachier, où de fortes infestations dépassant les 50% ont été enregistrées (Braham et Jardak, 2012 ; Ghrissi et al., 2019). Le contrôle de *C. vestitus* en Tunisie implique des insecticides de

contact organophosphatés contre les adultes (Ghrissi *et al.*, 2018). En raison de leur développement sous-cortical, la lutte chimique nécessite des applications répétées pour coïncider étroitement avec l'envol des adultes (Braham et Jardak, 2012). La complexité du contrôle chimique de *C. vestitus* et son impact environnemental négatif encourage la recherche de méthodes alternatives de lutte, y compris la lutte biologique. Cette dernière repose dans un premier temps sur le dépistage d'antagonistes naturels des nuisibles dans leur zone de répartition. C'est dans ce contexte que cette étude a été menée. Elle vise d'abord l'isolement et l'identification des champignons associés à *C. vestitus*, puis le criblage de leurs activités entomopathogène et phytopathogène. Enfin, les champignons caractérisés par une activité entomopathogène élevée accompagnée par une absence d'activité phytopathogène ont été criblés pour leurs potentialités antimicrobiennes.

Matériel Méthodes

1. Isolement des champignons associés à *Chaetoptelius vestitus*

Les adultes et les galeries de nutrition de *C. vestitus* ont été collectés à partir des deux sites d'étude, Taous (10°36'47''W, 34°55'17''N), situé à Sfax, et Ksar Ghris (9°55'14''W, 34°55'55''N), situé à Sidi Bouzid. Dans chaque site, des rameaux infestés par *C. vestitus* ont été collectés, placés individuellement dans des sacs en plastique stériles et transférés au laboratoire afin d'isoler les champignons à partir des adultes vivants et morts et des galeries de nutrition produites par les adultes.

L'écorce des rameaux collectés a été enlevée et les scolytes vivants et morts ont été prélevés à l'aide d'une pincette stérile. Les adultes morts ont été individuellement immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5%, rincés deux fois avec de l'eau distillée stérile, séchés sur papier filtre stérile et écrasés à l'aide d'un scalpel sur une lame de microscope. Le macérat a été réparti par la suite sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu PDA ("*Potato Dextrose Agar*") dont la composition est 4 g/l d'extrait de pomme de terre, 20 g/l de dextrose et 16 g/l d'agar.

Les adultes vivants ont été immédiatement écrasés en utilisant un scalpel stérile sur une lame de microscope, et le macérat a été étalé sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant du PDA.

Concernant les galeries de l'insecte, elles ont été désinfectées à l'aide du coton imbibé d'alcool éthylique à 70% pendant environ 15 s, rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile, puis séchées sur papier filtre stérile. Des fragments de galeries ont été disséqués en utilisant un scalpel stérile et placés sur PDA.

Les cultures ont été incubées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, à l'obscurité pendant 10 à 20 jours. Les champignons ont été purifiés par des repiquages successifs sur PDA.

2. Identification moléculaire des isolats fongiques

2.1. Extraction de l'ADN et amplification par PCR

L'ADN de 41 isolats fongiques a été extrait à partir de mycélium développé sur PDA avec le kit DNeasy Plant Mini (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN extrait a été utilisé comme matrice pour l'amplification de la région ITS de L'ARNr, en utilisant les amorces ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') et ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990).

La PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl, contenant 42,25 µl de H₂O, 5 µl de tampon Taq PCR (10X), 1 µl de dNTPs (200 µmol/l), 0,25 µl de chaque amorce (0,4 µmol/l), 0,25 µl de Taq polymérase (1,25 U pour 50 µl de PCR) (New England Biolabs, Frankfurt, Allemagne) et 1 µl d'ADN extrait. Un témoin négatif ne contenant pas d'ADN et un contrôle positif utilisant un ADN fongique ont été préparés pour chaque série de réaction.

L'amplification de PCR a été réalisée en utilisant un thermocycleur (Eppendorf, Hamburg, Allemagne) selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 45 s, hybridation à 52°C pendant 45 s et polymérisation à 68°C pendant 2 min, avec une élongation finale à 68°C pendant 5 min. Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du Kit de purification des produits PCR Qiaquick (Qiagen GmbH) suivant les instructions du fabricant.

2.2. Séquençage et analyses moléculaires

Les Produits obtenus ont été séquencés dans les deux sens en utilisant les amorces ITS4 et ITS5 par la société StarSEQ GmbH (Mayence, Allemagne).

Les séquences obtenues ont été analysés par le logiciel MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) Version 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Les séquences consensus résultantes ont été alignées et comparées avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank via le serveur BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997 ; Zhang et Madden, 1997) disponibles sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Les séquences obtenues ont été déposées dans la base de données GenBank.

3. Activité entomopathogène

3.1. Préparation des suspensions fongiques

Les suspensions fongiques ont été obtenues en grattant la surface des cultures fongiques développées sur le milieu PDA et âgées de 15 jours dans une solution aqueuse de Tween 80 (2‰). Les suspensions obtenues ont été par la suite filtrées à travers une mousseline pour éliminer le mycélium. La

concentration a été ajustée à 10^8 conidies/ml à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope (Leitz Dialu×40 EB).

3.2. Piégeage et élevage de *C. vestitus*

Des branches pièges ont été coupées et laissés sous les pistachiers au niveau de la parcelle expérimentale de l'Institut de l'Olivier "Taous", située à Sfax (34°55'17''N, 10°36'47''W). Ces pièges ont été laissés sous les arbres pendant 6 semaines afin d'attirer les adultes en vue de se reproduire. Ces rameaux, siège de reproduction de l'insecte, ont été ramenés au laboratoire et mis en élevage dans des cages en plastique, à la température ambiante, afin d'obtenir une population homogène et suffisante d'adultes de *C. vestitus* pour effectuer les tests biologiques.

3.3. Tests biologiques

Les adultes de *C. vestitus*, issus de l'élevage, âgés de 1 à 3 jours, ont fait l'objet des tests biologiques. Ces adultes ont été trempés dans 10 ml de la suspension fongique de concentration 10^8 conidies/ml pendant 20 s. Des adultes trempés dans du Tween aqueux à 2‰ ont servi de témoin négatif et des adultes traités avec la souche commercialisée *Beauveria bassiana* GHA (nom commercial Botanigard® 22WP, BioWorks®) ont servi de témoin positif. Chaque traitement a été répété trois fois, soit 10 adultes par répétition. Les scolytes traités ont été placés individuellement dans des tubes en polypropylène contenant un rameau de pistachier frais lui servant de nourriture. Ce dernier a été remplacé tous les 5 jours. Les tubes ont été recouverts par du papier filtre humidifié et ont été maintenus à une température située entre 25 et 28°C, une humidité relative comprise entre 60 et 70% et sous un éclairage naturel. La mortalité des adultes a été enregistrée 5, 10 et 15 jours après traitement. Les adultes morts ont été désinfectés en surface avec de l'hypochlorite de sodium 5%, rincés deux fois à l'aide d'eau distillée stérile, séchés sur papier filtre et placés dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre humidifié. Ces cadavres ont été par la suite incubés à 25°C, à humidité saturée, pendant 7 jours afin de permettre le développement des champignons testés à la surface du cadavre de l'insecte. Pour satisfaire les postulats de Koch, des petits morceaux de mycélium ont été transférés sur un milieu PDA et incubés à 25°C. Les champignons obtenus ont été déterminés par microscopie (LeitzDialu x40 EB).

4. Activité phytopathogène

Afin d'évaluer l'activité phytopathogène des champignons identifiés, des tests de pathogénie ont été effectués sur jeunes rameaux de pistachier de la variété Mateur (Jeffers *et al.*, 1981). Pour ce faire, des jeunes rameaux de pistachier de la variété Mateur, de 10 à 15 mm de diamètre et de 20 cm de longueur, ont été prélevés à partir des pistachiers vigoureux et sains de la parcelle expérimentale Taous. Après défoliation, les rameaux ont été stérilisés en surface à l'hypochlorite de sodium 10% pendant 10 min, rincés avec de

l'eau distillée stérile deux fois et séchés sur papier filtre stérile. Cinq pousses ont été inoculées pour chaque isolat. En effet, après avoir retiré un fragment de l'écorce (5 x 8 mm) au milieu de la pousse, un fragment gélosé de la culture fongique, âgée de 10 à 15 jours, y a été placé puis recouvert par du Parafilm. Les témoins ont été inoculés par des fragments de PDA stérile. Les rameaux inoculés ont été déposés dans des bacs en plastique dont le fond est tapissé par un papier filtre humidifié, puis maintenus à 25°C, et à une humidité relative de 70%. Vingt-huit jours après inoculation, les pousses ont été grattées pour révéler et mesurer la zone de nécrose superficielle. Ces pousses ont été par la suite longitudinalement coupées sur toute leur longueur pour repérer la nécrose interne. Conformément aux postulats de Koch, des sections de tissus brunis ont été mises en culture sur PDA et incubées à 25°C.

5. Activité antimicrobienne

Les cinq isolats suivants, *P. biliae*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *A. tamarii* et *T. pinophilus*, ayant montré une forte activité entomopathogène accompagnée par une absence d'activité phytopathogène, ont été testés pour leur potentialités antimicrobiennes.

5.1. Activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée contre 11 isolats phytopathogènes, à savoir : Aal_io_1 (*A. alternata*), Fbr_io_1 (*F. brachygibbosum*), Feq_io_1 (*F. equiseti*), Fgra_io_1 (*F. graminearum*), Fso_io_2 (*F. solani*), Fve_io_1 (*F. verticilloides*), Geo_io_2 (*Geosmithia* sp. 20), Nqu_io_1 (*N. quercina*), Pva_io_1 (*P. variotii*), Psu_io_1 (*P. sumatraense*) et Tro_io_1 (*T. roseum*).

Pour ce faire, la méthode de double culture a été utilisée. Le protocole consiste à préparer des suspensions fongiques et de les ajuster à 10⁶ conidies/ml. 50 µl de chaque suspension fongique ont été étalés sur la surface des boîtes de Pétri de 60 mm. Un disque du mycélium fongique à tester a été coupé et placé au centre de la boîte inoculée. Un disque de PDA stérile a été placé au centre des boîtes témoins. Sept jours après incubation à 25°C, l'activité antagoniste a été déterminée par la présence d'une zone d'inhibition.

5.2. Activité antibactérienne

5.2.1. Bactéries

Neuf souches de bactéries ont été utilisées pour dépister l'activité antibactérienne. Parmi lesquelles, 4 espèces sont à gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 25912), *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*. Les 5 autres espèces sont à gram négatif. Il s'agit d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Agrobacterium fabrum* (C58), *Agrobacterium tumifaciens* (B6) et *Agrobacterium vitis* (CPFB 2355). Les souches d'*Agrobacterium* sont phytopathogènes et ont été fournies par l'Institut de l'Olivier. Les autres souches ont été fournies gracieusement par le laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Universitaire Habib Bourguiba de Sfax.

5.2.2. Préparation des cultures fongiques en milieu liquide

Les isolats fongiques ont été cultivés sur un milieu PDA pendant 7 jours à 25 °C. Ensuite, trois fragments de chaque culture ont été transférés dans des flacons de 500 ml contenant 150 ml de milieu PDB ("*Potato Dextrose Broth*") de composition 4g/l d'extrait de pomme de terre et 20 g/l de dextrose.

Les cultures liquides ont été incubées à 25°C, sous agitation à 150 rpm, pendant 21 jours jusqu'à atteindre une phase stationnaire. Le surnageant a été obtenu par une centrifugation suivie d'une filtration à l'aide d'un filtre à membrane de 0,22 µm.

5.2.3. Tests de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée en utilisant la technique de diffusion sur puits (Ameri *et al.*, 2017). En effet, 100 µl de culture bactérienne fraîchement préparée (10^7 CFU/ml) ont été ensemencés, à l'aide d'un coton-tige stérile, sur la surface des boîtes de pétri gélosée. Le milieu YPG ("*Yeastextract Peptone Glucose Agar*") dont la composition est de 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l de peptone, 15 g/l de glucose et 15 g/l d'agar, a été utilisé pour les espèces d'*Agrobacterium*. Le milieu TSA ("*Trypticase Soy Agar*") de composition 15 g/l de tryptone, 20 g/l de peptone papainique de soja, 5 g/l de chlorure de sodium et 15 g/l d'agar, a été utilisé pour les autres bactéries. Par la suite, des puits de 5 mm de diamètre ont été creusés au milieu de chaque boîte, et 100 µl du filtrat fongique à tester y a été placé. Les boîtes inoculées ont été maintenues pendant 2 à 4 h à 4°C pour permettre la diffusion du filtrat de culture fongique, puis, les espèces d'*Agrobacterium* ont été incubées à 28°C pendant 48 à 72 h et les autres bactéries ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des puits.

6. Analyses statistiques

Dans le but d'évaluer et de comparer l'activité phytopathogène des isolats fongiques, une étude statistique a été réalisée. Les données ont été évaluées au moyen d'une analyse de variance (ANOVA). Les différences significatives ont été relevées par le Test de Tukey au seuil de 5%. Les analyses ont été faites en utilisant le logiciel statistique SPSS 17 ("*Statistical Package for Social Sciences in personal computers*" ver. 17).

Résultats et Discussion

1. Diversité fongique

Une centaine d'isolats fongiques associés aux adultes et aux galeries de nutrition de *C. vestitus*, collectés à partir des deux sites d'étude Taous et Ksar Gris, ont été purifiés et conservés. L'analyse moléculaire des 41 isolats a été effectuée en se basant sur l'amplification de la région ITS de l'ARNr (tableau 1). Cette région est considérée comme "meilleur" marqueur moléculaire pour l'identification des champignons du fait qu'elle est caractérisée par un degré de variation très élevé au niveau des espèces (Ahmed, 2016 ; Tekpinar et Kalmer, 2019).

Tableau 1: Champignons associés à *Chaetoptelius vestitus* (adultes et galeries) en se basant sur le séquençage de la région ITS

Famille	Code de l'isolat	Espèce la plus proche (Numéro d'accèsion GenBank)	Similarité (%)	*Taille	Numéro d'accèsion GenBank
Chaetomiaceae	Tmi_io_1	<i>Thielaviamicrospora</i> (MG780389.1)	100	520	MK397279
	Tmi_io_2	<i>Thielaviamicrospora</i> (MG780389.1)	100	480	MK397280
Cordycipitaceae	Pal_io_1	<i>Parengyodontium album</i> (LC317572.1)	100	300	MK397281
Didymellaceae	Nqu_io_1	<i>Nothophomaquercina</i> (LT592929.1)	100	460	MK397282
	Nqu_io_2	<i>Nothophomaquercina</i> (LT592929.1)	100	360	MK397283
Hypocreaceae	Fbr_io_1	<i>Fusarium brachygibbosum</i> (MG267121.1)	100	330	MK397284
	Feq_io_1	<i>Fusarium equiseti</i> (KM979505.1)	100	480	MK397285
	Fgra_io_1	<i>Fusarium graminearum</i> (HG970335.2)	100	460	MK397784
	Fso_io_1	<i>Fusarium solani</i> (HG938368.1)	99	540	MK397286
	Fso_io_2	<i>Fusarium solani</i> (KX014709.1)	100	500	MK397287
	Fve_io_1	<i>Fusarium verticillioides</i> (MF411134.1)	100	230	MK397288
Pleosporaceae	Aal_io_1	<i>Alternaria alternata</i> (KY996469.1)	100	450	MK397289
	Aal_io_2	<i>Alternaria alternata</i> (KY996469.1)	100	480	MK397290
	Aal_io_3	<i>Alternaria alternata</i> (MF370945.1)	100	460	MK397291
	Cs_io_1	<i>Curvulariaspicifera</i> (MH010905.1)	100	400	MK397292
Saccharomycetaceae	Mgu_io_1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH223591.1)	100	360	MK397293
	Mgu_io_2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH223591.1)	100	220	MK397294
Trichocomaceae	Apr_io_1	<i>Aspergillus protuberus</i> (MH137674.1)	100	490	MK397295
	Asc_io_1	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> (MG204869.1)	100	320	MK397296
	Ata_io_1	<i>Aspergillus tamaritii</i> (KY828882.1)	100	509	MK397297
	Ave_io_1	<i>Aspergillus versicolor</i> (HQ637363.1)	100	520	MK397298
	Gla_io_1	<i>Geosmithialavendula</i> (KF808299.1)	99	530	MK397299
	Gla_io_2	<i>Geosmithialavendula</i> (KF808300.1)	100	320	MK397300
	Gom_io_1	<i>Geosmithia omnica</i> (KR229925.1)	100	460	MK397301
	Gpa_io_1	<i>Geosmithia pallida</i> (KF914637.1)	100	200	MK397302

Gpa_io_2	<i>Geosmithia pallida</i> (KF914637.1)	100	500	MK397303
Geo_io_1	<i>Geosmithia</i> sp. 20 ^b (AM421073.1)	100	520	MK397304
Geo_io_2	<i>Geosmithia</i> sp. 20 ^b (AM421073.1)	100	480	MK397305
Geo_io_3	<i>Geosmithia</i> sp. 20 ^b (AM421073.1)	99	480	MK397306
Geo_io_4	<i>Geosmithia</i> sp. 20 ^b (AM421073.1)	100	470	MK397307
Pva_io_1	<i>Paecilomyces variotii</i> (FJ011547.1)	100	550	MK397308
Pbi_io_1	<i>Penicillium bilaiae</i> (KY379676.1)	100	360	MK397309
Pbi_io_2	<i>Penicillium bilaiae</i> (MF681615.1)	100	380	MK397310
Pch_io_1	<i>Penicillium chrysogenum</i> (MH171487.1)	100	340	MK397311
Pci_io_1	<i>Penicillium citrinum</i> (MH137670.1)	100	490	MK397312
Pci_io_2	<i>Penicillium citrinum</i> (MH137689.1)	100	400	MK397313
Psu_io_1	<i>Penicillium sumatraense</i> (MH171490.1)	100	440	MK397314
Pul_io_1	<i>Penicillium ulaiense</i> (MH236134.1)	100	330	MK397315
Tat_io_1	<i>Talaromyces atroroseus</i> (LT558942.1)	100	513	MK397316
Tpi_io_1	<i>Talaromyces pinophilus</i> (KY965441.1)	100	500	MK397317
Tro_io_1	<i>Trichothecium roseum</i> (KY610499.1)	100	550	MK397318

^aTaille: nombre de paires de bases alignées

^bNuméro de *Geosmithia* sp. selon Kolarik *et al.*, 2007

Les travaux ont permis d'identifier 28 espèces fongiques appartenant aux 13 genres suivants: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Nothophoma*, *Paecilomyces*, *Parengyodontium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichothecium* et *Meyerozyma* (Tableau 1).

La présence de 28 espèces fongiques associées aux adultes de *C. vestitus* et ses galeries confirme que l'association fongique avec divers champignons est l'une des caractéristiques frappantes des scolytes (Kirisits, 2003 ; Klepzig et Six, 2004). *Geosmithia* a été le genre le plus fréquemment isolé représentant 21,95% du total des isolats fongiques, suivis de *Penicillium* (17,03%), *Fusarium* (14,63%) et *Aspergillus* (9,75%). Les espèces fongiques isolées sont connues par différentes relations biologiques avec les insectes et les plantes (Tableau 2).

Tableau 2: Relations rapportées entre les espèces fongiques associées à *Chaetoptelius vestitus* (adultes et galeries) avec les insectes et les plantes

Espèces fongiques	Relations avec les plantes	Références	Relations avec les insectes	Références
<i>Alternaria alternata</i>	Endophyte	Musettiet <i>al.</i> (2007)	Entomopathogène	Sharma <i>et al.</i> (2012)
	Phytopathogène : cause l'alternariose du pistachier	Kridet <i>al.</i> (2011)		
<i>Aspergillus protuberus</i>	N/A		N/A	
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	N/A		Non pathogène	deMoraes <i>et al.</i> (2001)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Endophyte	Zhanget <i>al.</i> (2012)	Entomopathogène	Yang <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus versicolor</i>	N/A		N/A	
<i>Curvularias picifera</i>	Phytopathogène	Ismail <i>et al.</i> (2016)	N/A/	
<i>Fusarium brachybibosum</i>	Phytopathogène	Mirhosseini <i>et al.</i> (2014)	N/A	
<i>Fusarium equiseti</i>	Endophyte	Macia-Vicente <i>et al.</i> (2009)	Entomopathogène	Sharma et Marques (2018)
	Phytopathogène: agent de pourriture des racines et du collet du pistachier	Eskalenet <i>al.</i> (2001)		
<i>Fusarium graminearum</i>	Phytopathogène	Voigt <i>et al.</i> (2005)	N/A	
<i>Fusarium solani</i>	Phytopathogène: agent de Pourriture des racines de pistachier	Triki <i>et al.</i> (2011)	Symbiote de scolytes	Morales <i>et al.</i> (2000)
			Entomopathogène	Peciulyteet <i>al.</i> (2010)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Phytopathogène	Venturini <i>et al.</i> (2011)	Entomopathogène	Pelizzaet <i>al.</i> (2011)
<i>Geosmithia lavendula</i>	N/A		Symbiotes de scolytes	Kolariket <i>al.</i> (2005)
<i>Geosmithia omnicola</i>	N/A			
<i>Geosmithia pallida</i>	Phytopathogène	Lynch <i>et al.</i> (2014)		
<i>Geosmithias</i> p. 20	N/A			

Tableau 2 (Suite)

Espèces fongiques	Relations avec les plantes	Références	Relations avec les insectes	Références
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Endophyte : stimulateur de croissance	Sripontanet <i>et al.</i> (2014)	Symbiote des scolytes	Yun <i>et al.</i> (2015)
	Activité de décomposition du bois	Yun <i>et al.</i> (2015)		
<i>Nothophoma quercina</i>	Phytopathogène : cause la maladie du chancre de la tige de pistachier	Yun et Oh (2016)	N/A	
<i>Paecilomyces variotii</i>	Phytopathogène : agent de dépérissement de pistachier	Sabbagh et Moghaddam (2016)	Entomopathogène	Moorthiet <i>et al.</i> (2015)
<i>Parengyodontium album</i>	N/A		N/A	
<i>Penicillium bilaiae</i>	Endophyte : stimulateur de croissance	Ignatova <i>et al.</i> (2013)	N/A	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Endophyte	Menget <i>et al.</i> (2011)	Entomopathogène	Francis <i>et al.</i> (2011)
<i>Penicillium citrinum</i>	Endophyte	Waqaset <i>et al.</i> (2015)	Entomopathogène	Maketon <i>et al.</i> (2014)
<i>Penicillium sumatrense</i>	Endophyte	Mahdian et Zafari (2017)	N/A	
	Phytopathogène	Vega <i>et al.</i> (2010)		
<i>Penicillium ulaiense</i>	N/A		N/A	
<i>Talaromyces atroroseus</i>	N/A		N/A	
<i>Talaromyces pinophilus</i>	Endophyte	Vinaleet <i>et al.</i> (2017)	Entomopathogène	Vinaleet <i>et al.</i> (2017)
<i>Thielaviami crospera</i>	Endophyte	Soltani et Hosseini Moghaddam (2015)	N/A	
<i>Trichothecium roseum</i>	Endophyte	Zhang <i>et al.</i> (2010)	Entomopathogène	Mohiuddin <i>et al.</i> (2006)
	Phytopathogène	Hamid <i>et al.</i> (2014)		

N/A : données manquantes ("Not available")

2. Potentialités de biocontrôle

2.1. Activité entomopathogène

L'activité pathogène des 21 isolats fongiques appartenant à différentes espèces a été évaluée sur les adultes de *C. vestitus*. Puisque la levure *M. guilliermondii* et les espèces de *Geosmithia* sont bien connues comme symbiotes communs des scolytes (Kolariket *et al.*, 2007 ; Yun *et al.*, 2015), elles n'ont pas été utilisées dans les tests de l'activité entomopathogène.

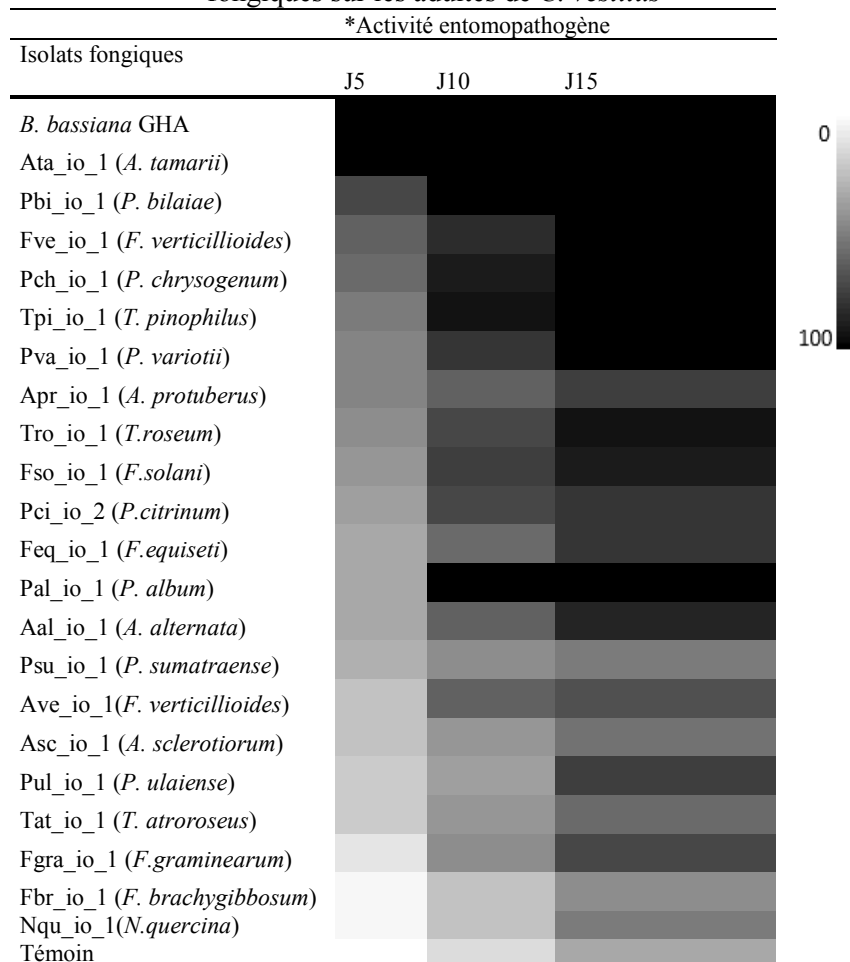
Le placement des cadavres traités dans les conditions saturées d'humidité, après désinfection en surface, a entraîné la croissance des champignons testés, ce qui a confirmé que la mortalité de l'insecte a été causée par son infection fongique.

L'analyse statistique des résultats de la mortalité des insectes (test de Tukey, $P < 0,05$) a montré des différences significatives au niveau de l'activité entomopathogène des champignons testés (Tableau 3). La mortalité des adultes a augmenté en fonction du temps. Après 15 jours, la mortalité des témoins a aussi augmenté ($36,66 \pm 4,44\%$). Ceci nous a permis de mettre fin à l'essai biologique.

Les isolats Ata_io_1 (*A. tamarii*), Pbi_io_1 (*P. bilaiae*), Pal_io_1 (*P. album*), Fso_io_1 (*F. solani*), Fve_io_1 (*F. verticillioides*), Pch_io_1 (*P. chrysogenum*), Pva_io_1 (*P. variotii*), Tpi_io_1 (*T. pinophilus*), Tro_io_1 (*T. roseum*) et Aal_io_1 (*A. alternata*) ont été significativement les plus pathogènes ($P < 0,05$) sur les adultes de *C. vestitus*. Parmi lesquels, l'isolat Ata_io_1 (*A. tamarii*) a été comparable au témoin positif (*B. bassiana*) et a provoqué une mortalité totale des adultes, 5 jours après le traitement. Les isolats Pbi_io_1 (*P. bilaiae*) et Pal_io_1 (*P. album*) ont provoqué une mortalité totale des adultes 10 jours après le traitement, et les isolats Fve_io_1 (*F. verticillioides*), Pch_io_1 (*P. chrysogenum*), Pva_io_1 (*P. variotii*) et Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) ont provoqué la mortalité totale des adultes 15 jours après le traitement.

L'activité entomopathogène de la plupart des espèces citées (*A. tamarii*, *F. verticillioides*, *P. chrysogenum*, *P. variotii*, *T. pinophilus*, *T. roseum* et *A. alternata*) a été notée dans plusieurs études antérieures (Mohieddine *et al.*, 2006 ; Francis *et al.*, 2011 ; Pelizza *et al.*, 2011 ; Sharma *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2015 ; Moorthi *et al.*, 2015 ; Vinale *et al.*, 2017). Cependant, à notre connaissance, *P. album* n'a pas été notée pour son potentiel entomopathogène, sachant que *Parengyodontium* a été classé dans le genre *Beauveria* (Kepler *et al.*, 2017).

Tableau 3 : “Heatmap” de l’activité entomopathogène de 21 isolats fongiques sur les adultes de *C. vestitus*



*L’activité entomopathogène des isolats fongiques (à 10^8 conidies/ml) sur les adultes de *Chaetoptelius vestitus* a été basée sur la mortalité moyenne 5, 10 et 15 jours après traitement. L’intensité de la couleur des cellules augmente avec la mortalité moyenne. La cellule blanche indique l’absence de mortalité.

2.2. Activité phytopathogène

Compte tenu que les champignons associés à *C. vestitus* pourraient être transmis aux rameaux du pistachier puisque l’insecte s’y développe, l’activité pathogène des différentes espèces fongiques a été testée sur les jeunes rameaux de pistachier. Elle a été déterminée en se basant sur la longueur de la nécrose qui s’est manifestée au niveau du cortex, 28 jours après inoculation.

Le placement des fragments de la zone nécrosée sur PDA et leur incubation à 25°C a permis de ré-isoler les champignons inoculés.

Les résultats ont montré que 71% (20/28) des isolats testés ont produit une nécrose corticale (Figure 1) dont la longueur a été comprise entre 3 et 107 mm. Ces résultats indiquent différents degrés de phytopathogénie des champignons associés à *C. vestitus*.

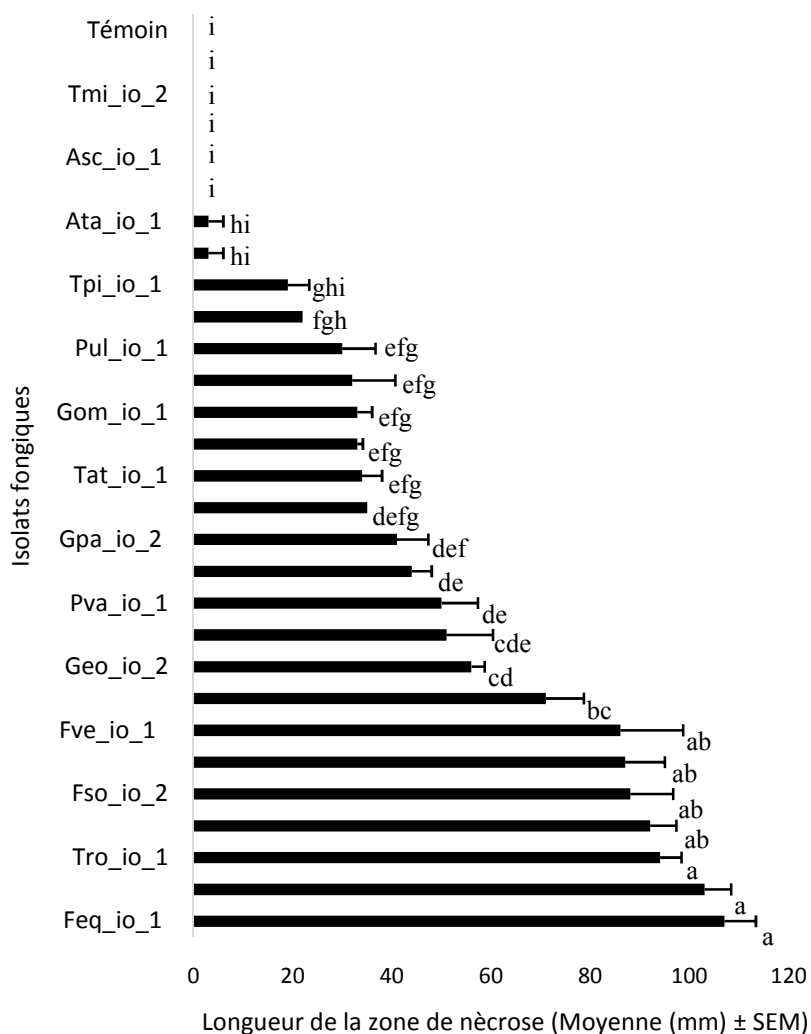


Figure 1: Pathogénie de 28 isolats fongiques sur les rameaux de pistachier basée sur la longueur moyenne de la zone de nécrose corticale (\pm SEM), 28 jours après inoculation. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (analyse de la variance à un facteur, $P < 0,05$; Test de Tukey).

L'analyse statistique de la longueur de la zone de nécrose a montré des différences significatives de l'activité pathogène des isolats testés. En effet, les isolats de Feq_io_1 (*F. equiseti*), Fgra_io_1 (*F. graminearum*), Tro_io_1 (*T. roseum*), Nqu_io_1 (*N. quercina*), Fso_io_2 (*F. solani*), Aal_io_1 (*A. alternata*) et Fve_io_1 (*F. verticilloides*) ont montré le niveau de pathogénie le plus élevé ($P < 0.05$) sur le cortex des rameaux du pistachier.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont cohérents avec des études antérieures présentant les espèces de *F. equiseti*, *F. graminearum*, *T. roseum*, *N. quercina*, *F. solani*, *A. alternata* et *F. verticilloides*, *F. brachygibbosum*, *Geosmithias* p. 20, *P. sumatrense* et *P. variotii* comme phytopathogènes (McMullen *et al.*, 1997 ; Cizkova *et al.*, 2005 ; Venturini *et al.*, 2011 ; Hamid *et al.*, 2014 ; Mirhosseini *et al.*, 2014 ; Mahdian et Zafari, 2017). Parmi ces champignons, *P. variotii*, *N. quercina*, *A. alternata*, *F. solani* et *F. equiseti* sont impliqués dans le développement des maladies sur pistachier (Eskalen *et al.*, 2001 ; Krid *et al.*, 2011 ; Triki *et al.*, 2011 ; Sabbagh et Moghaddam, 2016 ; Yun et Oh, 2016). Dans ce même contexte, Triki *et al.* (2019) ont rapporté que *N. quercina* cause le dépérissement des arbres fruitiers en Tunisie. Ceci suggère que *C. vestitus* pourrait agir comme vecteur de maladies sur le pistachier.

La phytopathogénie fongique associée aux scolytes pourrait être liée à la nécessité des agents phytopathogènes de se développer et survivre dans une plante hôte défensive qui essaie de les tuer ou limiter leur développement. Ces champignons doivent survivre dans de telles conditions, jusqu'à ce que leurs scolytes vecteurs terminent leur développement et les vectorisent vers un nouvel hôte. Si ces champignons ne présentent pas un degré relativement élevé de phytopathogénie, ils seraient probablement tués ou leur croissance serait arrêtée après la pénétration dans l'arbre (Six et Wingfield, 2011).

Les différences de l'activité phytopathogène des champignons associés à *C. vestitus* pourrait être déterminantes dans leur dynamique au niveau de l'arbre hôte. En effet, la communauté fongique associée à un scolyte occupe la même niche biologique, puisque toutes les espèces sont présentes en même temps, au même endroit et utilisent les mêmes ressources. Cela pourrait résulter en une forte concurrence et par la suite une sélection des espèces les plus compétitives. Ainsi, de légères différences dans les propriétés fongiques intrinsèques, telles que la pathogénie, peuvent réduire cette concurrence et permettre la coexistence des différentes espèces. En effet, les différences de pathogénie pourraient agir dans la séparation de niche permettant aux champignons de coloniser l'arbre hôte à des moments différents en fonction de leur activité pathogène. Dans ce cas, les plus phytopathogènes colonisent les premiers la plante hôte (Six et Wingfield, 2011).

Dans la présente étude, plusieurs isolats d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Talaromyces* n'ont pas présenté d'activité pathogène sur les rameaux de pistachier. Parmi ces espèces, *P. biliae*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*,

A. tamaritii et *T. pinophilus* ont été rapportés comme endophytes des plantes, qui sont définis pour se produire à l'intérieur des tissus végétaux sans causer de symptômes apparents à l'hôte (Wilson, 1995 ; Meng *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Ignatova *et al.*, 2013 ; Waqas *et al.*, 2015 ; Vinale *et al.*, 2017). Parmi ces espèces, *P. bilaiae*, a été notée comme stimulateur de croissance des plantes, et de ce fait elle a été formulée comme un biofertilisant (Burton et Knight, 2005).

2.3. Activité antimicrobienne

Les isolats Ata_io_1 (*A. tamaritii*), Pal_io_1 (*P. album*), Pbi_io_1 (*P. bilaiae*), Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) et Tpi_io_1 (*T. pinophilus*), caractérisés par une activité entomopathogène élevée et par une absence d'activité phytopathogène, ont fait l'objet de l'exploration de l'activité antifongique et antibactérienne.

2.3.1. Activité antifongique

L'activité antifongique a été testée contre 11 isolats phytopathogènes. L'activité antifongique a été révélée par la présence de zones d'inhibition autour des colonies fongiques. Nos résultats ont montré que l'isolat de Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) a montré une activité antagoniste contre tous les phytopathogènes fongiques testés, suivis par Pbi_io_2 (*P. bilaiae*) antagonisant 7 isolats phytopathogènes, puis Ata_io_1 (*A. tamaritii*) et Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) antagonisant 3 parmi 11 isolats phytopathogènes. Cependant, Pal_io_1 (*P. album*) n'a montré aucune activité antifongique (Tableau 4). Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs travaux antérieurs qui ont démontré les potentialités anti-phytopathogènes de *T. pinophilus*, *P. bilaiae*, *A. tamaritii* et *P. chrysogenum* (Khokhar *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012 ; Abdel-Rahim et Abo-Elyousr, 2018; Meng *et al.*, 2011).

L'antagonisme entre les champignons associés à *C. vestitus* pourrait agir sur les populations de l'insecte. En effet, l'antagonisme des champignons symbiotes de l'insecte pourrait être considéré comme un antagonisme de l'insecte puisque la relation mutualiste entre le scolyte et les champignons pourraient résulter en une interdépendance. Ainsi, la survie des scolytes et de leurs progénitures pourrait dépendre de la croissance de leurs champignons symbiotiques (Klepzig et Six, 2004). Dans ce contexte, l'antagonisme de l'isolat de *Geosmithiasp.* 20 (Geo_io_2), symbiote de *C. vestitus*, par Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) et Pbi_io_2 (*P. bilaiae*) pourrait réduire les populations de l'insecte.

Les résultats présentant Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) et Pbi_io_2 (*P. bilaiae*) comme ayant une forte activité entomopathogène et anti-phytopathogène, avec une absence d'activité phytopathogène, suggèrent que ces isolats devraient être plus profondément explorés pour la protection du pistachier aussi bien contre *C. vestitus* que contre les pathogènes fongiques qu'il est susceptible de transmettre.

2.3.2. Activité antibactérienne

Les isolats Ata_io_1 (*A. tamaritii*), Pal_io_1 (*P. album*), Pbi_io_1 (*P. bilaliae*), Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) et Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) ont été testés pour leur activité antibactérienne contre 9 bactéries de référence. Cette activité a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. L'activité antibactérienne la plus élevée a été enregistrée par l'isolat Tro_io_1 (*T. pinophilus*) ayant inhibé 5 bactéries, suivi par Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) inhibant la croissance de 4 bactéries (tableau 5). En se basant sur le diamètre de la zone d'inhibition, les isolats Tpi_io_1 (*T. pinophilus*) et Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) ont engendré l'activité antibactérienne la plus élevée sur *A. vitiset S. aureus*, respectivement. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures indiquant que *P. chrysogenum* et *T. pinophilus* ont un potentiel antibactérien élevé (Devi *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2016).

Ces isolats ont été caractérisés par une absence d'activité phytopathogène. Ils peuvent être considérés comme sources prometteuses de protection biologique du pistachier contre *C. vestitus* et les pathogènes microbiens.

Tableau 4: Activité antifongique de 5 isolats fongiques entomopathogènes contre 11 isolats phytopathogènes

Isolats fongiques antagonistes	Isolats phytopathogènes										
	Aal_io_1	Fbr_io_1	Feq_io_1	Fgra_io_1	Fso_io_2	Fve_io_1	Geo_io_2	Nqu_io_1	Pva_io_1	Psu_io_1	Tro_io_1
Ata_io_1	Présence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité
Pal_io_1	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité
Pbi_io_2	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité
Pch_io_1	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité
Tpi_io_1	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité

Présence d'activité
 Absence d'activité

Tableau 5: Activité antibactérienne de 5 isolats fongiques entomopathogènes. Les chiffres indiquent les diamètres moyens des zones d'inhibition (mm)

Code de l'isolat	Bactéries de référence									
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>A. fabrum</i>	<i>A. tumifaciens</i>	<i>A.vitis</i>	
Pal_io_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ata_io_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pbi_io_2	-	-	-	-	-	-	22	-	-	
Pch_io_1	-	42	18	-	24	24	-	-	-	
Tpi_io_1	-	-	-	-	11	16	32	28	40	

Conclusion

La présente étude a permis de détecter des champignons présents naturellement dans les vergers de pistachier Tunisiens et ayant des activités biologiques importantes qui pourraient être exploités dans le biocontrôle. Il s'agit de Tpi_io_1 (*T. pinophilus*), caractérisé par une forte activité entomopathogène, antifongique et antibatérienne, Ata_io_1 (*A. tamaritii*) et Pbi_io_2 (*P. bilaiae*) ayant montré des potentialités entomopathogènes et antifongiques importantes, Pch_io_1 (*P. chrysogenum*) montrant un pouvoir entomopathogène et antibactérien élevés, et Pal_io_1 (*P. album*) présentant un pouvoir entomopathogène important. Ces isolats ont été caractérisés par une absence d'activité phytopathogène.

Les potentialités entomopathogènes et antimicrobiennes de ces champignons devraient être plus profondément étudiées en vue de leur utilisation possible dans les programmes de protection biologique des cultures du pistachier en Tunisie, contre *C. vestitus* et les pathogènes microbiens.

Références Bibliographiques

- Abdel-Rahim I.R. et Abo-Elyousr K.A.M., 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiol Res* 212-213, 1-9.
- Abu Yaman I.K., 1969. Biology and control studies of the pistachio beetle, *Hylesinus vestitus* Muls., in Iraq. *J. Appl. Entomol.* 64, 426-436.
- Ahmed A., 2016. Analysis of Metagenomics Next Generation Sequence Data for Fungal ITS Barcoding: Do You Need Advance Bioinformatics Experience? *Front. Microbiol.* 7, 1061.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *NucleicAcidsRes* 25, 3389-3402.
- Ameri A., Shushizadeh M.A., Bagher S.M., Nabavi E.F. and Zarei Ahmady A., 2017. Antibacterial Evaluation and Biochemical Characterization of *Thais savignyi* Gastropod Extracts from the Persian Gulf. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 12, 13942. doi: 10.5812/jjnpp.13942.
- Balachowsky A.S., 1949. Faune de France. Coléoptères Scolytides. Ed. P. Lechevalier, Paris, France.
- Braham M. et Jardak T., 2012. Contribution à l'étude de la bio-écologie du Scolyte du pistachier *Chaetoptelius vestitus* Muls & Rey (Coleoptera, Scolytidae) dans les régions du Centre et du Sud tunisiens. *Ezzaitouna* 13, 1-17.
- Burton E.M. et Knight S.D., 2005. Survival of *Penicillium bilaiae* inoculated on canola seed treated with Vitavax RS and Extender. *Biol Fertil Soils.* 42, 54-59.

Chebouti-Meziou N., Merabet A., Chebouti Y., Bissaad F.Z. et Behidj N., 2013. Cycle of *Chaetoptelius vestitus* on pistachio fruit (*Pistacia vera* L.) and counting galleries at four cardinal exposure in Algeria. In *International Conference on Sustainable Environment and Agri-culture, IPCBEE*. pp. 119-123.

Cizkova D., Šrůtka P., Kolařík M., Kubátová A. et Pažoutová S., 2005. Assessing the Pathogenic Effect of *Fusarium*, *Geosmithia* and *Ophiostoma* Fungi from Broad-Leaved Trees. *Folia Microbiol* 50, 59–62.

Devi P., Rodrigues C., Naik C.G. et D'Souza L., 2012. Isolation and characterization of antibacterial compound from a mangrove-endophytic fungus, *Penicillium chrysogenum* MTCC 5108. *Indian J Microbiol.* 52, 617-623.

DeMoraes, A.M., da Costa G.L., Barcellos M.Z., de Oliveira R.L. et de Oliveira P.C., 2001. The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. *J. Basic Microbiol.* 41, 45-49.

Eskalen A., Küsek M., Danisti L. et Karadag S., 2001. Fungal diseases in pistachio trees in East Mediterranean and Southeast Anatolian regions. In *11 GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds*. ed. Ak B.E. pp. 261-264. Cahiers Options Méditerranéennes : 56.

FAOSTAT., 2017. Agricultural Production Database:<http://faostat.fao.org/>.

Fragoulis A.P., 2006. Biological cycle of *Chaetoptelius vestitus* (Mulsant & Rey, 1860) (Coleoptera, Scolytidae) in Thessaloniki (Greece). *Thèse de Doctorat*. Laboratory of Zoology, Department of Zoology, School of Biology, Faculty of Sciences, University of Thessaloniki, Grèce.

Francis F., Jaber K., Colinet F., Portetelle D. et Haubruge E., 2011. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties. *Fungal Biol.* 115, 1093-1109.

Ghrissi I., Braham M., Said I., LaBonte J.R. et Shahan T., 2018. Morphological characteristics for sexing living adults of *Chaetoptelius vestitus* (Coleoptera, Curculionidae). *Anim Biol*, DOI 10.1163/15707563-17000100.

Ghrissi I., Braham M., Said I. et Ayberk H. 2019. Ecological study of pistachio bark beetle, *Chaetoptelius vestitus* (muls&rey, 1861) (Coleoptera: curculionidae). *Fresen Environ Bull* 28, 1971-1977.

Hamid M.I., Hussain M., Ghazanfar M.U., Raza M. et Liu X.Z., 2014. *Trichothecium roseum* Causes Fruit Rot of Tomato, Orange, and Apple in Pakistan, *Plant Dis* 98, 1271.

Ignatova L.V., Brazhnikova Y.V., Mukasheva T.D., Omirbekova A. A., Berzhanova R.Z., Sydykbekova R.K., Karpenyuk T.A. et Goncharova A.V., 2013. Biodiversity of Micromycetes Isolated from Soils of Different

Agricultures in Kazakhstan and Their Plant Growth Promoting Potential. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* 7, 690-695.

Ismail A.M., Essa T.A., Kamel S.M. et Perrone G., 2016. First report of *Curvularias pificera* causing leaf spot on tomato (*solanum lycopersicum* l.) in Egypt. *Plant Pathol. J.* 98, 677-697.

Jeffers S.N., Aldwinckle H.S., Burr T.J. et Arneson, P.A., 1981. Excised twig assay for the study of apple tree crown rot pathogens *in vitro*. *Plant Dis* 65, 823-825.

Jia M., Chen L., Xin H. L., Zheng C. J., Rahman K., Han T. et Qin L., 2016. A friendly relation ship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Front. Microbiol.* 7 :906.

Khokhar I., Haider M.S., Mukhtar I. et Mushtaq S., 2012. Biological control of *Aspergillus niger*, the cause of Black-rot disease of *Allium cepa* L. (onion), by *Penicillium* species. *J Agrobiol.* 29, 23-28.

Kirisits T., 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. ed. Lieutier F., Day K.R., Battisti A., Grégoire J-C. et Evans, H.F. pp. 181-235. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Klepzig K.D. et Six D.L., 2004. Bark beetle-fungal symbiosis: context dependency in complex associations. *Symbiosis* 37, 189-205.

Kolarik M., Kubatova A., Cepicka I., Pazoutova S. et Srutka P., 2005. A complex of three new white-spored, sympatric, and host range limited *Geosmithia* species. *Mycol Res* 109, 1323-1336.

Kolarik M., Kostovcik M. et Pazoutova S., 2007. Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *MycolRes* 111, 1298-1310.

Krid S., Triki M.A., Ghrab M., Gdoura R. et Rhouma A., 2011. Occurrence of *Alternaria* species involved in fruit blight of pistachio in Tunisia. *Plant Pathol. J.* 93, 63-89.

Lynch S.C., Wang D.H., Mayorquin J.S., Rugman-Jones P.F, Stouthamer R. et Eskalen A., 2014. First Report of *Geosmithia pallida* Causing Foamy Bark Canker, a New Disease on Coast Live Oak (*Quercus agrifolia*), in Association with *Pseudopityophthorus pubipennis* in California. *Plant Dis.* 98, 1276-1276.

Macia-Vicente J.G., Rosso L.C., Ciancio A., Jansson H.B. et Lopez-Llorca, L.V., 2009. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochoniachlamy dosporia*: Effects on plant growth and disease. *Ann Appl Biol* 155, 391-401.

Mahdian S. et Zafari D., 2017. First Report of Table Grape Blue Mold Caused by *Penicillium sumatrense* in Iran. *Plant Dis* 101, 244.

Maketon M., Amnuaykanjanasin A. et Kaysorngup A., 2014. A rapid knockdown effect of *Penicillium citrinum* for control of the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 727-736.

McMullen M., Jones R. et Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis* 81, 1340-1348.

Mehrnejad M.R., 2001. The current status of pistachio pests in Iran. In *Seminars on Pistachio and Almonds. Zaragoza. CIHEAM. eds. A.K., XI GREMPA. pp. 315-322. Options Méditerranéennes n. 56.*

Meng L., Sun P., Tang H., Li L., Draeger S., Schulz B., Krohn K., Hussain H., Zhang W. et Yi Y., 2011. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochem Syst Ecol* 39, pp .163-165.

Mirhosseini H.A., Babaeizad V. et Hashemi L., 2014. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. *J. Plant Pathol.* 96, 431-439.

Mohiuddin S., Zaki F.A., Munshi N.A., Jan A. et Sultan P., 2006. Evaluation of some entomopathogenic fungal isolates from Kashmir for the biocontrol of white grubs infesting turf grass in golf course. *J Biol Control.* 20, 45-50.

Moorthi P.V, Balasubramanian C., Ramar M. et Murugan K., 2015. Biocontrol potential of entomopathogenic fungi against *Spodoptera Litura*. *Sci Agri.* 12, 23-27.

Morales R.J.A., Rojas M.G., Sitterz B.H. et Saldana G., 2000. Symbiotic relationship between *Hypothenemushampeii* (coleoptera: scolytidae) and *Fusarium solani* (moniliales :tuberculariaceae). *Ann Entomol Soc Am* 93, 541-547.

Musetti R., Polizzotto R., Vecchione A., Borselli S., Zulini L., D'Ambrosio M., di Toppi L.S. et Pertot I., 2007. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: an ultrastructural study. *Micron.*38, 643-50.

Peciulyte D., Nedveckyte I., Volodkiene V.D. et Buda V., 2010. Pine defoliator *Bupaluspiniaria* L. (Lepidoptera: Geometridae) and its entomopathogenic fungi. *Ekologija* 56, 34-40.

Pelizza S.A, Stenglein S.A, Cabello M.N, Dinolfo M.I. et Lange CE., 2011. First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. *Insect Sci.* 11, 1-8.

Sabbagh S.K. et Moghaddam F.K., 2016. Genetic variability of *Paecilomyces variotii* isolates, the causal agent of die- back disease in pistachio, using ITS-RFLP analysis. *Mycol Iran* 3, 111-120.

Sharma A., Thakur A., Kaur S. et Pati P.K., 2012. Effect of *Alternaria alternata* on the coccinellid pest *Hemiptera septentrionalis punctata* and its implications for biological pest management. *J Pest Sci.* 85, 513-518.

Sharma L. et Marques G. 2018. *Fusarium*, an Entomopathogen-A Myth or Reality? *Pathogens* 93, doi:10.3390/pathogens7040093.

Six D.L et Wingfield M.J., 2011. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annu Rev Entomol* 56, 255-272.

Soltani J., Hosseini Moghaddam M.S., 2015. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Mediterranean Cypress *Cupressus sempervirens*. *Curr Microbiol* 70, 580-600.

Sripontan Y., Tan C.W., Hung M.H., Young C.C. et Hwang S.Y., 2014. Effects of plant-growth-promoting microorganisms and fertilizers on growth of cabbage and tomato and *Spodoptera litura* performance. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 587-593.

Tekpinar A.D. et Kalmer A., 2019. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia* 109, 187-224.

Triki M.A., Rhouma A., Chaabouni A. et Cloos R., 2011. Emergence of *Fusarium solani* causing root rot of pistachio trees in Tunisia. *Acta Horti* 912, 717-721.

Triki M.A., Gharbi Y., Bouazizi E., Cheffi M., Krid S., Ayadi Feki F. et Bouhamed J., 2019. First report of branch blight of almond trees caused by *Nothophoma quercina* in Tunisia. *Plant Pathol. J.* 101, 1277.

Vega E.F., Simpkins A., Aime M.C., Posada F., Peterson S.W., Rehner S.A., Infante F., Castillo A. et Arnold A.E., 2010. Fungal Endophyte Diversity In Coffee Plants From Colombia, Hawaii, Mexico And Puerto Rico. *Fungal Ecol.* 3, 122-138.

Venturini G., Assante G. et Vercesi A., 2011. *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. *PhytopatholMediterr* 50, 110-120.

Vinale F., Nicoletti R., Lacatena F., Marra R., Sacco A., Lombardi N., d'Errico G., Digilio M.C., Lorito M. et Woo S.L., 2017. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Nat Prod Res* 31, 1778-1785.

Voigt C.A., Schafer W. et Salomon S.A., 2005. Secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J* 42, 364-375.

Waqas M.A., Khan A.L., Hamayun M., Shahzad R., Kang S.M., Kim J.G. et Lee L.J., 2015. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the

adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *J Plant Interact* 10, 280-287.

White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J. et White T.J. pp. 315–322. New York: Academic Press.

Wilson D., 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274-276.

Yang Y., Zhang Y., Wang M., Li S.S., Ma X.Y., et Xu Z.H., 2015. Bioefficacy of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Appl Entomol Zool.* 50, 443-49.

Yavuz M.A., Yildirim K. et Onay A., 2016. Evaluating the last ten years of world pistachio production. *J Life Sci* 6, 22–31.

Yun Y.H., Suh D.Y., Yoo H.D., Oh M.H. et Kim S.H., 2015. Yeast associated with the ambrosia beetle, *Platypus koryoensis*, the pest of oak trees in Korea. *Mycobiology* 43, 458-466.

Yun Y.H. et Oh. Y.H., 2016. First report of *Nothophoma quercina* causing shoot canker on *Chaenomeles sinensis* in Korea. *Plant Dis* 100, 2533.

Zhai M.M., Li J., Jiang C.X., Shi Y.P., Di D.L., Crews P. et Wu Q.X., 2016. The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. *Nat Prod Bioprospect.* 6, 1-24.

Zhang J. et Madden T.L., 1997. Power BLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 7, 649-56.

Zhang X., Li G., Ma J., Zeng Y., Ma W. et Zhao P., 2010. Endophytic Fungus *Trichothecium roseum* LZ93 Antagonizing Pathogenic Fungi *In Vitro* and Its Secondary Metabolites. *J Microbiol* 48, 784-790.

Zhang H.C., Ma Y.M., Liu R. and Zhou F., 2012. Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines, *Biochem Syst Ecol* 45, 31–33.