

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MUSTAPHA Stambouli



جامعة مصطفى اسطمبولي

Mascara

معسكر

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

LABORATOIRE DE RECHERCHE SUR LES SYSTEMES BIOLOGIQUES ET LA

GEOMATIQUE

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Protection des végétaux

Intitulée

Essai de lutte biologique contre les principales maladies fongiques
de la lentille (*Lens culinaris*)

Présentée par :

Mr. KOUADRI Mohamed El Amine

Le 29/04/2023

Devant le jury :

Présidente	BOUNGAB Karima	Pr	Université de Mascara
Examineur	MOUTASSEM Dahou	MCA	Université d'El Bordj Bou Aréridj
Examinatrice	LAZREG Fatiha	MCA	Université de Mascara
Examinatrice	MERZOUG Aoumria	MCA	Université de Mascara
Encadreur	BEKKAR Ahmed Amine	MCA	Université de Mascara
Co-Encadreur	ZAIM Souad	MCA	Université de Mascara

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

A travers mes prières je remercie mon dieu Allah le Clément et miséricordieux pour m'avoir guidé et aidé de finaliser mon cursus jusqu'au Doctorat et pour m'avoir donné la volonté, la force et le courage et de mener à terme ce modeste travail de recherche.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Recherche sur les systèmes Biologiques et Géomatiques (LRSBG) de l'Université de Mascara, je tiens à exprimer ma gratitude au Pr. HAMIMED A. de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Dr BEKKAR Ahmed Amine pour son soutien et guidance tout au long de ces années. Son expertise, patience et engagement ont été inestimables pour moi. Je suis reconnaissant pour tous ses conseils et commentaires, pour les nombreuses heures qu'il a consacrées à mes questions et préoccupations. Je n'aurais pas pu réussir sans son aide. Son encadrement a été bien plus que professionnel, il a été humain, il s'est montré plus comme un grand frère qu'un encadreur. Il a su me guider tout en respectant mes choix, mes doutes et mes interrogations. Il a été un mentor exceptionnel pour moi et j'apprécie sincèrement son bienveillance. Son soutien m'a permis de réaliser un travail de qualité et de développer des compétences précieuses pour ma carrière future. Pour tout cela, je suis très heureux d'avoir eu la chance de travailler avec lui et je suis éternellement reconnaissant.

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Dr ZAIM Souad Co-promotrice de cette thèse, qui incarne la sagesse et la compétence envers son travail. Je la remercie pour ses encouragements, sa disponibilité, son attention, son aide précieuse durant mon travail, et la correction de ce manuscrit et des articles. Qu'elle trouve, à travers ce travail, l'expression de ma profonde gratitude.

Ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur MADANI Benyoucef, Directeur de laboratoire de Géomatique, Ecologie et Environnement de l'université de Mascara, pour l'accès au laboratoire, et qui a mis à ma disposition les matériels et produits nécessaires pour mener à bien cette recherche. Qu'il veuille bien agréer l'expression de mon profond dévouement.

Je remercie très vivement Madame la Professeur BOUNGAB karima de l'Université de Mascara, pour l'honneur d'être la présidente de jury de cette thèse ; qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury les Drs. MOUTASSEM Dahou, LAZREG Fatiha et MERZOUG Aoumria qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci à ma chère mère pour son soutien inappréciable et pour ses prières qui ont éclairé mon chemin.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin : DIAF W, Mr DJAFRI T, Mr BENARBA B, Mr MAKHLOUF M, Mr BOUHREM I, Mr ZAROURI B, Mr SITAYEB C, Mr BENAHMED W, Mr BENCHOHRA M,

Enfin, un merci particulier à DAHMOUN I, pour son encouragement, optimisme et soutien.

Je dédie ce modeste travail À l'âme de mon père.

À ma mère.

À ma famille.

Résumé

La lentille (*Lens culinaris* M.) est parmi les légumineuses les plus importantes dans le monde. Elle est cultivée pour son importance nutritionnelle et pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique qui améliore la fertilité et l'état nutritionnel du sol. Malheureusement, les maladies fongiques menacent gravement cette culture. Dans ce contexte, des champs de culture de la lentille ont été prospectés au cours des campagnes agricoles 2018-2019 et 2019-2020 dans 3 régions du nord-ouest Algérien (Mascara, Tiaret et Relizane). Les symptômes les plus fréquemment observés dans les champs visités étaient la rouille causée par *Uromyces viciae-fabae* avec des incidences de la maladie dépassant 83%. L'isolement des champignons associés à la lentille de différents échantillons prélevés des trois régions a permis d'obtenir 82 isolats appartenant à 17 genres. Le *Fusarium* était le genre le plus fréquemment isolé, avec un pourcentage d'abondance atteignant les 48,78% suivi par *Alternaria* et *Macrophomina*. Deux espèces fongiques, *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* responsables respectivement des maladies de la tache helminthosporienne et la pourriture charbonneuse, non signalés auparavant comme étant des agents phytopathogènes à la culture de la lentille en Algérie et dans le monde, ont été identifiées. Leur morphologie et phylogénie, leur pathogénicité et leur comportement vis-à-vis des facteurs abiotiques a été étudié. Pour assurer une protection phytosanitaire performante contre *Macrophomina pseudophaseolina*, la lutte biologique via l'utilisation des microorganismes antagonistes représente une méthode de lutte très prometteuse. Par ailleurs 7 isolats de *Trichoderma*, isolées à partir de la rhizosphère de lentille saine, ont été évalués pour leurs activités antagonistes. Tous les isolats de *Trichoderma* ont démontré une activité antagoniste avec des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène de 37,33% à 72,53% par confrontation directe et de 11,11% à 41,66 % à distance. L'effet inhibiteur a été observé également à l'échelle microscopique par une réduction importante du nombre et de la taille des microsclérotés de *M. pseudophaseolina* M1. L'isolat le plus performant a été identifié comme *Trichoderma longibrachiatum* T10. L'ensemble des isolats de *Trichoderma* ont la capacité de solubiliser le phosphate, de produire l'AIA et l'ammoniac ainsi que à synthétiser des enzymes lytiques tels que la cellulase, chitinase, pectinase, amylase et ligninase. Dans l'essai de lutte biologique en pot, le traitement des semences de la variété sensible Syrie 229 avec l'isolat le plus performant T10 a significativement réduit l'incidence de la pourriture charbonneuse de lentille avec 91,7% et même a amélioré les paramètres de croissance des plantes de lentille. Cette étude a permis de révéler que l'isolat *T. longibrachiatum* T10 peut être utilisé comme agent de lutte biologique.

Mots clés : *Uromyces viciae-fabae*, *Bipolaris*, *Macrophomina*, lutte biologique, *Trichoderma*, lentille, *Lens culinaris*

العدس (*Lens culinaris* M.) هو من أهم البقوليات في العالم. فهو يزرع لأهميته الغذائية وقدرته على تثبيت النيتروجين الموجود في الغلاف الجوي مما يحسن الخصوبة والحالة التغذوية للتربة. تهدد الأمراض الفطرية هذه المحاصيل بشكل خطير. في هذا السياق ، تمت عملية إستطلاع لحقول العدس خلال الموسمين الزراعيين 2018-2019 و 2019-2020 في 3 مناطق شمال غرب الجزائر (معسكر وتيارت و غليزان). كانت الأعراض الأكثر شيوعًا في الحقول التي تمت معاينتها هي الصداً الناجم عن *Uromyces viciae-fabae* مع تجاوز معدل الإصابة بالمرض 83%. أسفر عزل الفطريات المصاحبة للعدس من عينات مختلفة مأخوذة من المناطق الثلاث عن 82 عزلة تنتمي إلى 17 جنساً. كان *Fusarium* هو الجنس الأكثر عزلاً بنسبة 48.78% يليه *Alternaria* و *Macrophomina*. تم تحديد نوعين من الفطريات ، *Bipolaris* و *sorokiniana* و *Macrophomina pseudophaseolina* المسؤولين على التوالي عن أمراض تبقع الأوراق و العفن الفحمي ، والتي لم يتم الإبلاغ عنها سابقاً كعوامل ممرضة لنبات العدس في الجزائر والعالم. تمت دراسة مورفولوجية هذه الفطريات وتطورها ، ومدى إمراضها وسلوكها تجاه العوامل اللاأحيائية. لضمان الحماية الفعالة للصحة النباتية ضد *Macrophomina pseudophaseolina*، فإن مكافحة البيولوجية عن طريق استخدام الكائنات الدقيقة المضادة تمثل طريقة مكافحة واعدة للغاية. بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم 7 عزلات من *Trichoderma* ، معزولة من جذور نباتات عدس سليمة ، من حيث نشاطها المضاد. أظهرت جميع عزلات *Trichoderma* نشاطاً مضاداً في تثبيط نمو الفطر الممرض بنسب تتراوح من 37.33% إلى 72.53% بالمواجهة المباشرة ومن 11.11% إلى 41.66% عن بعد. كما لوحظ التأثير المثبط على المستوى المجهرى من خلال انخفاض كبير في عدد وحجم الأجسام الحجرية الصغيرة لـ *M. pseudophaseolina*. تم تحديد العزلة الأفضل أداءً T10 على أنها *Trichoderma longibrachiatum*. تتمتع جميع عزلات *Trichoderma* بالقدرة على إذابة الفوسفات وإنتاج AIA والأمونيا وكذلك تصنيع إنزيمات محللة مثل السليولاز والكتيناز والبكتيناز والأميلاز واللجنينيز. في تجربة المكافحة الحيوية على النبات، تبين أن معالجة بذور العدس (الصنف الحساس سوريا 229) بالعزلة T10 يحمي من مرض العفن الفحمي بنسبة 91.7% وحتى أنه ساهم في تحسين نمو نبات العدس. كشفت هذه الدراسة أن عزلة *T. longibrachiatum* T10 يمكن إستخدامها في المكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية : *Uromyces viciae-fabae*، *Macrophomina*، *Bipolaris*، *Trichoderma* ، المكافحة البيولوجية ، العدس ، *Lens culinaris*

Abstract

Lentil (*Lens culinaris* M.) is among the most important legumes in the world. It is grown for its nutritional importance and for its ability to fix atmospheric nitrogen, which improves the fertility and nutritional status of the soil. Unfortunately, fungal diseases are a serious threat to this crop. In this context, lentil crop fields were surveyed during the 2018-2019 and 2019-2020 cropping seasons in 3 regions of northwestern Algeria (Mascara, Tiaret and Relizane). The most frequently observed symptoms in the visited fields were rust caused by *Uromyces viciae-fabae* with disease incidences exceeding 83%. Isolation of lentil-associated fungi from different samples collected from the three regions yielded 82 isolates belonging to 17 genera. *Fusarium* was the most frequently isolated genus, with a percentage of abundance reaching 48.78% followed by *Alternaria* and *Macrophomina*. Two fungal species, *Bipolaris sorokiniana* and *Macrophomina pseudophaseolina* responsible respectively for spot blotch and charcoal rot, not previously reported as phytopathogenic agents to lentil in Algeria and worldwide, were identified. Their morphology and phylogeny, their pathogenicity and behavior towards abiotic factors were studied. To ensure an efficient phytosanitary protection against *Macrophomina pseudophaseolina*, the biological control using antagonistic microorganisms represents a very promising control method. In addition, 7 isolates of *Trichoderma*, isolated from the rhizosphere of healthy lentil plants, were evaluated for their antagonistic activities. All *Trichoderma* isolates showed antagonistic activity with an inhibition percentage of pathogen growth ranged from 37.33% to 72.53% by direct confrontation and from 11.11% to 41.66% at distance. The inhibitory effect was also observed in microscopic level with a significant reduction in the number and size of microsclerotia of *M. pseudophaseolina* M1. The best performing isolate was identified as *Trichoderma longibrachiatum* T10. All *Trichoderma* isolates have the ability to solubilize phosphate, to produce IAA and ammonia and to synthesize lytic enzymes such as cellulase, chitinase, pectinase, amylase and ligninase. In the pot biological control essay, seed treatment of the susceptible variety Syria 229 with the best performing isolate T10 significantly reduced the incidence of lentil charcoal rot with 91.7% and even improved the growth parameters of lentil plants. This study revealed that *T. longibrachiatum* T10 isolate can be used as a biological control agent.

Keywords: *Uromyces viciae-fabae*, *Bipolaris*, *Macrophomina*, biological control, *Trichoderma*, lentil, *Les culinaris*

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
I. Généralités sur la culture de la lentille (<i>Lens culinaris</i>)	3
I.1. Historique, origine et extension de la culture de la lentille	3
I.2. Description morphologique et botanique	4
I.3. Taxonomie de la plante	6
I.4. Importance et production de lentille dans le monde	7
I.5. Production de lentille en Algérie	11
I.6. Adaptation et culture	13
I.7. Principaux facteurs affectant la production de lentilles	14
I.7.1. Contraintes abiotiques	14
I.7.2. Contraintes biotiques	16
II. La rouille de la lentille causée par <i>Uromyces viciae-fabae</i>	18
II.1. Historique et importance de la maladie	18
II.2. Description de l'agent pathogène	18
II.3. Symptomatologie de la maladie	19
II.4. Cycle de vie et de développement de la maladie	21
II.5. Epidémiologie du pathogène	23
II.6. Mode d'action d' <i>U. viciae-fabae</i>	24
II.7. Méthodes de lutte contre la rouille	25
II.7.1. Pratique culturales	25
II.7.2. Variétés résistantes	26
II.7.3. Lutte biologique	27
II.7.4. Lutte chimique	27
III. La tâche helmintosporienne causée par <i>Bipolaris sorokiniana</i>	29
III.1. Classification et principaux hôtes de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	29
III.2. Description de l'agent pathogène	29
III.3. Symptomatologie de la maladie	30
III.4. Cycle de vie et de développement de la maladie	32
III.5. Épidémiologie et importance du pathogène	33
III.6. Composés phytotoxiques produits par <i>B. sorokiniana</i>	34

III.7. Méthodes de lutte contre les maladies causées par <i>B. sorokiniana</i>	35
III.7.1. Pratiques culturales	36
III.7.2. Variétés résistantes	37
III.7.3. Lutte biologique	37
III.7.4. Lutte chimique	38
IV. La pourriture charbonneuse causée par des espèces de <i>Macrophomina</i>	40
IV.1. Historique et taxonomie de <i>Macrophomina</i>	40
IV.2. Morphologie de <i>Macrophomina</i>	42
IV.3. Symptômes causés par <i>Macrophomina</i>	44
IV.4. Cycle de vie et de développement de la maladie	45
IV.5. La virulence de <i>M. phaseolina</i>	47
IV.6. Importance de la pourriture charbonneuse	48
IV.7. Méthodes de lutte contre les maladies causées par <i>Macrophomina</i>	49
IV.7.1. Pratiques culturales	49
IV.7.2. Résistance génétique	50
IV.7.3. Control chimique	51
IV.7.4. Lutte biologique	51
V. Généralités sur <i>Trichoderma</i>	55
V.1. Introduction	55
V.2. Morphologie, caractéristique et habitat de <i>Trichoderma</i>	55
V.3. Développement de <i>Trichoderma</i> en agriculture	57
V.4. Antagonisme phytopathogène de <i>Trichoderma</i>	58
V.5. Promotion de la croissance des plantes et la résistance induite	60
V.6. Résistance systémique induite (RSI)	61

Chapitre II

La rouille de lentille causée par *Uromyces viciae-fabae* dans le nord-ouest Algérien

1. Introduction	63
2. Matériel et méthodes	63
2.1. Prospections, échantillonnages et observation des symptômes au champ	63
2.2. Estimation de l'incidence et la gravité de la maladie	64
2.3. Identification microscopique	64
3. Résultats et discussion	64
3.1. Description des Symptômes	64
3.2. Importance de la maladie (incidence et gravité)	66
3.3. Observation microscopique et description de l'agent pathogène	67
4. Conclusion	69

Chapitre III

Isolement et identification de champignons à partir des plantes de la lentille

1. Introduction	71
2. Matériel et méthodes	71
2.1. Prospections et échantillonnages	71
2.2. Techniques d'isolement des champignons	71
2.2.1. Isolement à partir des feuilles	71
2.2.2. Isolement à partir des tiges et racines	72
2.2.3. Isolement à partir de la rhizosphère	73
2.3. Purification	73
2.4. Cultures monospores	74
2.5. Identification des champignons	74
2.5.1. Morphologie des isolats obtenus	74
2.5.2. Etude biométrique	75
2.6. Conservation des isolats	76
3. Résultats	76
3.1. Description des symptômes observés lors des prospections	76
3.2. Fréquence d'isolement des espèces fongiques	79
3.3. Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats fongiques	81
4. Discussion	86

Chapitre IV

***Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* : deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde**

1. Introduction	87
2. Matériels et méthodes	88
2.1. Matériel fongique	88
2.2. Identification macro et microscopique	88
2.3. Identification moléculaire	89
2.4. Test de pathogénicité	90
2.4.1. Test de pathogénicité de <i>Bipolaris</i>	91
2.4.2. Test de pathogénicité des isolats de <i>Macrophomina</i>	92
2.5. Comportement des isolats de <i>Bipolaris</i> Bs1 et <i>Macrophomina</i> M1 vis-à-vis des facteurs abiotiques	93
2.5.1. Effet des milieux de culture sur le développement de Bs1 et M1	93
2.5.2. Effet de la température et du pH sur le développement de Bs1 et M1	94
2.5.3. Traitement statistique	94
3. Résultats et discussion	95
3.1. Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de <i>Bipolaris</i> et <i>Macrophomina</i>	95
3.1.1. Caractérisation morphologique et biométrique de <i>Bipolaris</i> Bs1	95
3.1.2. Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de <i>Macrophomina</i>	95
3.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique	98
3.2.1. Identification moléculaire de <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Bs1)	98
3.2.2. Identification moléculaire de <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> (M1,M2)	98
3.3. Pathogénicité des isolats de <i>Bipolaris</i> et <i>Macrophomina</i>	101
3.3.1. Pathogénicité de <i>B. sorokiniana</i> (Bs1)	101
3.3.2. Pathogénicité des isolats de <i>Macrophomina</i>	103
3.4. Comportement des isolats de <i>Bipolaris</i> Bs1 et <i>Macrophomina</i> M1 vis-à-vis des facteurs abiotiques	108
3.4.1. Effet des milieux de culture sur le développement de <i>B. sorokiniana</i>	108
3.4.2. Effet de la température et du pH sur le développement de <i>B. sorokiniana</i>	116

3.4.3. Effet des milieux de culture sur le développement de <i>M. pseudophaseolina</i> M1	119
3.4.4. Effet de la température et du pH sur les paramètres de croissance de <i>M. pseudophaseolina</i> M1	127
3.4.5. Discussion des résultats obtenus de l'étude de l'effet des facteurs abiotiques sur le développement de Bs1 et M1	130
3.5. Conclusion	131

Chapitre V

Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*

1. Introduction	132
2. Matériels et méthodes	133
2.1. Obtention des isolats de <i>Trichoderma</i> à partir de la rhizosphère	133
2.1.1. Prélèvement des échantillons de sols rhizosphériques	133
2.1.2. Isolement des champignons du genre <i>Trichoderma</i>	133
2.1.3. Purification et obtention des cultures monospores	133
2.1.4. Identification morphologique	134
2.1.5. Conservation des isolats de <i>Trichoderma</i>	134
2.2. Activité antagoniste «in vitro» des isolats de <i>Trichoderma</i> vis-à-vis <i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	135
2.2.1. Confrontation directe	135
2.2.2. Confrontation indirecte	136
2.3. Identification moléculaire de l'isolat le plus antagoniste	136
2.4. Caractérisation des isolats de <i>Trichoderma</i>	137
2.4.1. Solubilisation du phosphate	137
2.4.2. Production des phytohormones (AIA)	137
2.4.3. Production d'ammoniac (NH ₃)	137
2.4.4. Activités enzymatiques	138
2.5. Efficacité in vivo de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> T10 sur M1 en pots	139
2.5.1. Préparation des graines de lentille	139
2.5.2. Préparation de l'inoculum de T10 et M1	139
2.5.4. Evaluation de l'efficacité de T10 sur M1	140
2.5.5. Effet de <i>T. longibrachiatum</i> T10 sur les paramètres de croissance des plantes de lentille	141

2.6. Analyses statistiques	141
3. Résultat	141
3.1. Isolement et caractérisation morphologique et biométrique des isolats de <i>Trichoderma</i>	141
3.2. Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i>	142
3.2.1. Confrontation directe entre M1 et les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	142
3.2.2. Confrontation indirecte entre M1 et les isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	148
3.3. Identification moléculaire de l'isolat T10 le plus antagoniste	148
3.4. Caractérisation des isolats de <i>Trichoderma</i>	150
3.4.1. Solubilisation de phosphate	150
3.4.2. Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)	150
3.4.3. La production d'ammoniac (NH ₃)	150
3.5. Production des enzymes	153
3.5.1. Amylases	153
3.5.2. Chitinases	153
3.5.3. Pectinases	153
3.5.4. Ligninases	153
3.5.5. Cellulases	154
3.6. Relations entre les différents paramètres étudiées	157
3.7. Efficacité <i>in vivo</i> de <i>T. longibrachiatum</i> T10 sur l'incidence de la maladie	160
3.8. Effet de <i>T. longibrachiatum</i> T10 sur la croissance et le développement de lentille	162
4. Discussion	163
4.1. Isolement et identification des champignons du genre <i>Trichoderma</i>	163
4.2. Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i>	164
4.3. Caractérisation des isolats de <i>Trichoderma</i>	165
4.3.2. Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)	167
4.3.3. La production d'ammoniac (NH ₃)	167
4.3.4. Production des enzymes	168
4.4. Efficacité <i>in vivo</i> de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> T10 sur M1 en pots	170
Conclusions générales et Perspectives	172
Références bibliographiques	174
Annexes	204

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
6-PP	6-pentyl-2H-pyran-2-one
ACP	Analyse en composantes principales
AIA	Acide Indole Acétique
AJ	Acide jasmonique
AS	Acide salicylique
CCLS	Coopérative des Céréales et Légumes Secs
CMC	Carboxy-Méthyl-Cellulose
COV	Composés organiques volatils
CPA	Croissance radiale du pathogène en présence de l'antagoniste
CT	Croissance radiale du témoin
DCc	Cylindre central détaché
GM	Gravité de la maladie
HPLC	High-performance liquid chromatography
I (%)	Pourcentage d'inhibition de la croissance du pathogène
IAM	Indole-acétamide
IM	Incidence de la maladie
IPyA	Acide indole pyruvique
ITS	Internal Transcribed Spacer
ml	Millilitre
My	Filaments mycéliens
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OGA	Oxytetracycline Glucose Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PGPF	Plant growth-promoting fungi
Pm	Parenchyme médullaire

PPO	Polyphénol Oxydase
PTC	Phosphate Tricalcique
PVK	Pikovskayas
r	Coefficient de corrélations
RI	Réponse de l'infection
RM	Réduction de la maladie
RSI	Résistance systémique induite
Sc	Microsclérotés
SDA	Sabouraud dextrose agar
SNA	Synthetic nutrient Agar
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TEF	Translation elongation factor
UV	Ultraviolet
Vc	Vaisseaux conducteurs

Liste des Figures

Figure 1: Morphologie d'une plante de lentille	5
Figure 2: La production mondiale de lentilles par région	8
Figure 3: Répartition des Zones de culture de la lentille en Algérie .	12
Figure 4: Evolution des productions de lentilles en Algérie (2000-2020)	12
Figure 5: Aspect microscopique de <i>Uromyces viciae-fabae</i> sur <i>Vicia sativa</i> ,	19
Figure 6: Les urédies d' <i>Uromyces viciae-fabae</i> sur la surface supérieure des feuilles de lentille, Éthiopie	20
Figure 7: Infection urédienne sévère des tiges et des feuilles de lentilles par <i>Uromyces viciae-fabae</i> , Ethiopie.	20
Figure 8: Cycle de vie d' <i>Uromyces viciae-fabae</i>	22
Figure 9: Structures sexuelles de <i>Cochliobolus sativus</i> sur la graine d'orge	31
Figure 10: Aspect microscopique de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	31
Figure 11: Symptômes de tache helminthosporienne sur les feuilles de l'orge	32
Figure 12: Cycle de vie de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	33
Figure 13: Les structures chimiques des cinq principales phytotoxines produites par <i>Bipolaris sorokiniana</i> .	35
Figure 14: arbre phylogénétique montrant les espèces de genre <i>Macrophomina</i>	42
Figure 15: caractéristiques morphologiques de <i>Macrophomina phaseolina</i>	43
Figure 16: <i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	44
Figure 17: les symptômes de pourriture charbonneuse sur haricot	45
Figure 18: cycle de vie de <i>Macrophomina phaseolina</i>	46
Figure 19: Morphologie du genre <i>Trichoderma</i> sp	57
Figure 20: Mycoparasitisme de <i>Trichoderma</i> vis-à-vis un champignon phytopathogène	59
Figure 21: Mécanismes de la résistance systémique induite	61
Figure 22: Plants de lentille en stade de la formation des gousses présentant des symptômes de la rouille (parcelle de Tiaret).	65
Figure 23: Importance (incidence et gravité) de la rouille de la lentille dans trois wilayas du Nord-Ouest Algérien	66
Figure 24: Vue microscopique d' <i>Uromyces viciae-fabae</i>	68
Figure 25 : Les différents sites de prospection : la région de Mascara, Tiaret et Relizane.	72
Figure 26: Fragments de racines de lentilles déposées sur une boîte pétri contenant PDA	73
Figure 27: Symptômes de flétrissement vasculaire (stade de la gousse) observé dans la parcelle 9 de la région de Tiaret	77
Figure 28 : Symptômes typiques de la rouille de la lentille (stade de la gousse) observé dans une parcelle de la région de Tiaret (Rahouia)	77
Figure 29: Champ de lentille infectée par la pourriture charbonneuse dans la région d'El Hamadna (Relizane)	78
Figure 30: Aspect macro et microscopique de <i>Bipolaris</i> (Bs1):	96
Figure 31: Aspect macro et microscopique de <i>Macrophomina</i> M1:	97
Figure 32: Arbre phylogénétique montrant la phylogénie de l'isolat Bs1 et d'autres espèces de <i>Bipolaris</i> .	99

Figure 33: Arbre phylogénétique montrant la phylogénie des isolats représentatifs M1 et M2 et d'autres espèces de <i>Macrophomina</i> sp.	100
Figure 34: Symptômes de la tache helminthosporienne causés par <i>B. sorokiniana</i> Bs1 sur la lentille :	102
Figure 35: Symptômes de la pourriture charbonneuse causés par <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> sur la lentille:	104
Figure 36: Coupes histologiques réalisées sur les tiges (A et B) et la racine (C) de lentille infectée par <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> .	107
Figure 37: Aspect des colonies de <i>Bipolaris sorokiniana</i> Bs1 sur différents milieux de culture:	110
Figure 38 : effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne (cm) de <i>B. sorokiniana</i> après 7 jours d'incubation.	111
Figure 39 : Le nombre des conidies (en cm ²) de <i>B. sorokiniana</i> produites sur les 11 milieux de culture après 7 jours d'incubation	111
Figure 40 : La longueur des conidies (µm) de <i>B. sorokiniana</i> produites sur les milieux de culture après 7 jours d'incubation	111
Figure 41 : Matrice de corrélation, entre les 11 milieux de culture testés, calculée suivant les différents paramètres de développement de <i>B. sorokiniana</i>	113
Figure 42 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 11 milieux suivant les 3 paramètres de développement de <i>B. sorokiniana</i>	113
Figure 43 : Répartition des 11 milieux de culture suivant les paramètres de développement de <i>B. sorokiniana</i> étudiés par une ACP	114
Figure 44 : Corrélation entre les valeurs de la croissance de <i>B. sorokiniana</i> sur les 11 milieux de culture et le nombre de conidies produites par cm ²	115
Figure 45 : Corrélation entre les valeurs de la croissance de <i>B. sorokiniana</i> sur les 11 milieux de culture et la longueur des conidies (µm)	115
Figure 46 : Corrélation entre les valeurs du nombre de conidies (/cm ²) de <i>B. sorokiniana</i> produites sur les 11 milieux et la longueur des conidies (µm)	115
Figure 47: Effet de la température (°C) sur la croissance mycélienne de <i>B. sorokiniana</i> Bs1	118
Figure 48 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de <i>B. sorokiniana</i> Bs1	118
Figure 49: Aspect des colonies de <i>M. pseudophaseolina</i> M1 sur différents milieux de culture:	121
Figure 50: Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne (cm) de <i>M. pseudophaseolina</i> après 7 jours d'incubation.	122
Figure 51: Le nombre des microsclérotés (/ cm ²) de <i>M. pseudophaseolina</i> produite sur les milieux de culture testés	122
Figure 52: La taille des microsclérotés de <i>M. pseudophaseolina</i> produite sur les milieux de culture testés	122
Figure 53: Graph de corrélation des 11 milieux calculée suivant les paramètres étudiés	124
Figure 54: Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 11 milieux de culture suivant les 3 paramètres étudiés	124
Figure 55: Répartition des 11 milieux de culture suivant les paramètres étudiés par une ACP	125

Figure 56: Corrélation entre les valeurs de la croissance de <i>M. pseudophaseolina</i> sur les 11 milieux de culture et le nombre des microsclérotés	126
Figure 57: Corrélation entre les valeurs de la croissance de <i>M. pseudophaseolina</i> sur les 11 milieux de culture et la taille des microsclérotés	126
Figure 58: Corrélation entre les valeurs des nombres des microsclérotés produites par <i>M. pseudophaseolina</i> sur les 11 milieux de culture et leurs tailles.	126
Figure 59: Effet de la température (°C) sur la croissance mycélienne (cm) de <i>M. pseudophaseolina</i>	129
Figure 60: Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm) de <i>M. pseudophaseolina</i>	129
Figure 61: Aspect macroscopique et microscopique des 3 espèces de <i>Trichoderma</i>	143
Figure 62: Confrontation directe entre <i>T. longibrachiatum</i> (T10) et <i>M. pseudophaseolina</i> (M1)	145
Figure 63: Observations microscopiques au niveau de la zone de confrontation directe entre les protagonistes :	146
Figure 64: effet des isolats de <i>Trichoderma</i> sur le nombre des microsclérotés produits par <i>M. pseudophaseolina</i> M1	147
Figure 65: effet des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la taille des microsclérotés de <i>M. pseudophaseolina</i> M1.	147
Figure 66: Arbre phylogénétique généré à partir de la région TEF montrant les relations phylogénétiques entre les espèces <i>Trichoderma</i>	149
Figure 67: Halo clair autour des colonies de <i>Trichoderma</i> caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK après 3 jours d'incubation..	152
Figure 68: Production d'AIA sur le milieu solide additionné de tryptophane	152
Figure 69: Production de NH ₃ sur le milieu liquide additionné de réactif Nessler	152
Figure 70: Activités enzymatiques des isolats de <i>Trichoderma</i>	156
Figure 71: Matrice de corrélation des 12 tests étudiés	158
Figure 72: Répartition des 12 tests étudiés par une ACP.	158
Figure 73: Analyse de cluster hiérarchique bidirectionnelle visualisée à l'aide d'un dendrogramme combiné à une carte thermique.	159
Figure 74: Essai de la lutte biologique en pots par l'utilisation de <i>T. longibrachiatum</i> T10 contre <i>M. pseudophaseolina</i> M1	161

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les caractéristiques distinctives des deux groupes macrosperma et microsperma la taille des graines de <i>Lens culinaris</i>	6
Tableau 2: Classement mondial des principaux pays en termes de superficie, de production et de rendement des lentilles	8
Tableau 3: Valeur nutritive des lentilles, brutes (Poids sec) pour 100 g	10
Tableau 4: Composition en acides aminés des lentilles	10
Tableau 5: Evolution des superficies cultivées et rendement des lentilles en Algérie (2000-2020)	13
Tableau 6 : les sites de prospections et échantillonnage	72
Tableau 7: Classification des genres fongiques recensés (Base de données de taxonomie NCBI)	79
Tableau 8: Résultats d'isolement des champignons dans les trois régions Mascara, Tiaret et Relizane.	80
Tableau 9: la fréquence (%) d'isolement des champignons isolés à partir de l'ensemble des échantillons prélevés.	81
Tableau 10: Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats fongiques	82
Tableau 11: Les isolats de <i>Bipolaris</i> et <i>Macrophomina</i> utilisés dans cette étude	89
Tableau 12: Effet des milieux de cultures sur les paramètres de croissance de <i>B. sorokiniana</i> Bs1	109
Tableau 13: Matrice de corrélation calculée sur les 3 paramètres évalués du développement de <i>B. sorokiniana</i> Bs1	116
Tableau 14: Croissance mycélienne de Bs1 sur les différentes températures et pH	117
Tableau 15: Effet des milieux de cultures sur les paramètres de croissance de <i>M. pseudophaseolina</i> M1	120
Tableau 16: Matrice de corrélation calculée sur les 3 paramètres évalués du développement de <i>M. pseudophaseolina</i> M1	127
Tableau 17: Effet de la température et pH sur la croissance mycélienne (cm) et la production des microsclérotés de M1	128
Tableau 18: Sept (07) isolats de <i>Trichoderma</i> obtenus à partir de sols rhizosphériques de la lentille	142
Tableau 19: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, réduction du nombre et de la taille des microsclérotés de M1 confronté aux 7 isolats de <i>Trichoderma</i>	144
Tableau 20: solubilisation du phosphate, production d'AIA et de NH ₃ par les isolats de <i>Trichoderma</i>	151
Tableau 21: Activités enzymatiques des isolats de <i>Trichoderma</i> (diamètres des halos formés autour des colonies (cm))	155
Tableau 22: La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots selon les traitements.	160
Tableau 23: Effet de <i>T. longibrachiatum</i> T10 sur les paramètres de croissance des plantes de lentille dans des conditions contrôlées	163

Introduction générale

Introduction générale

Les légumineuses représentent une place importante dans le système agricole et l'agroéconomie de plusieurs pays du monde. Elles sont des cultures vivrières cultivées en rotation avec les céréales en raison des caractéristiques biologiques des racines qui leur permet de fixer de l'azote atmosphérique via la relation symbiotique avec certaines bactéries du sol. Les légumineuses constituent également une source importante de protéines pour l'alimentation humaine et animale (Adarsh *et al.*, 2019).

La lentille (*Lens culinaris* M.) est considérée parmi les légumineuses les plus importantes dans le monde. Elle tire son importance du fait qu'elle est une riche source de protéines et de micronutriments pour l'alimentation humaine et animale (Laskar *et al.*, 2019). En Algérie, les rendements de cette culture sont très faibles ; cela est dû à plusieurs paramètres tels que la pluviométrie déficitaire et irrégulièrement, l'absence d'irrigation, des travaux du sol mal réalisés, l'absence de fertilisation et des traitements phytosanitaires qui engendrent des dégradations de la santé des plantes, un mauvais état des semences et la prolifération des adventices. Toutefois, les maladies causées par les agents pathogènes fongiques constituent un des facteurs les plus limitants le développement et le rendement des lentilles (Bayaa et Erskine, 1998).

Les plants de lentille sont couramment l'hôte de champignons phytopathogènes comme le *Fusarium oxysporum* responsable de la fusariose (Belabid *et al.*, 2004), l'*Ascochyta lentis* responsable de la maladie de l'ascochytose et l'*Uromyces viciae-fabae*, l'agent causal de la rouille (Kouadri *et al.*, 2020). Ces dernières années, plusieurs nouvelles maladies fongiques ont été identifiées sur la culture de lentille. C'est le cas notamment de la tache helminthosporienne causée par *Bipolaris sorokiniana* et la pourriture charbonneuse causée par *Macrophomina phaseolina* et *M. pseudophaseolina* (Ullah *et al.*, 2018 ; Kouadri *et al.*, 2021 a et b).

L'apparition de maladies émergentes est devenue une menace sérieuse pour les plantes cultivées dans le monde, car elles peuvent se transformer en épidémies imprévues et dévastatrices qui peuvent influencer la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays (Fones *et al.*, 2020). Le manque des informations sur l'origine, l'évolution et l'adaptation écologique de ces nouvelles maladies ainsi que leurs façons dont sont transmises, changent d'hôtes et provoquent des infections, compromettent grandement la mise en place de stratégies de lutte (Karunarathna *et al.*, 2021).

Le contrôle des maladies fongiques est principalement géré par des fongicides chimiques qui offrent une protection rapide et efficace contre les agents causals des maladies (Iqbal, 2020a). Cependant, leurs applications excessives constituent une menace sérieuse pour la santé humaine, le bétail, l'environnement, les organismes bénéfiques du sol et l'agriculture durable (Aktar, 2009). De plus, l'utilisation des mêmes matières actives pour le même pathogène conduit éventuellement au développement de souches résistantes des pathogènes. Par conséquent, les efforts des chercheurs se sont concentrés sur le développement de stratégies alternatives, respectueuses de l'environnement pour lutter contre ces maladies, y compris l'utilisation d'agents de lutte biologique qui a été adoptée pour l'intégrer dans le cadre d'une lutte intégrée. Plusieurs recherches sur les micro-organismes bénéfiques ont été effectuées durant le siècle dernier afin d'isoler, d'étudier et d'utiliser les agents de lutte sur les pathogènes et les plantes elles-mêmes (Sharma, 2023).

Dans ce contexte, cette thèse a comme objectif d'effectuer en premier lieu un inventaire des maladies fongiques de la lentille cultivée dans différentes régions du nord-ouest de l'Algérie. En second lieu, nous nous intéressons à étudier deux nouvelles maladies fongiques causées par des agents phytopathogènes, non signalés auparavant sur la culture de la lentille en Algérie, sous un triple aspect : leur morphologie et phylogénie, leur pathogénicité et leur comportement vis-à-vis des facteurs abiotiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous mettons en évidence un modèle de lutte biologique contre la pourriture charbonneuse de la lentille causée par *Macrophomina pseudophaseolina*, en utilisant des isolats indigènes de *Trichoderma*. Pour ces derniers, leur activité antagoniste vis-à-vis *M. pseudophaseolina* sera étudiée et leur capacité de produire des enzymes lytiques, à solubiliser le phosphate et à synthétiser l'hormone de croissance AIA sera testée. Nous présentons aussi leur effet bénéfique sur l'incidence de la pourriture charbonneuse de la lentille et sur la croissance des plantes.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la culture de la lentille

I. Généralités sur la culture de la lentille (*Lens culinaris*)

I.1. Historique, origine et extension de la culture de la lentille

La lentille (*Lens culinaris*) est une légumineuse qui fut parmi les premières plantes cultivées depuis le néolithique ; des résidus de lentilles ont été trouvés dans des villages agricoles néolithiques et acéramiques qui étaient occupés au 7^{ième} millénaire avant J.C (Helbaek 1959). L'histoire de cette plante est aussi ancienne que l'agriculture (Helbaek 1963).

Les vestiges carbonisés de lentilles datées de 11000 avant J.C de la grotte de Franchthi en Grèce sont les plus anciens vestiges connus. En Syrie, de petites graines (2–3 mm) ont été trouvées à Tell Mureybet et datées de 8500–7500 avant J.C (Van Zeist 1971).

En Grèce, des lentilles datantes de 6000 à 5000 avant J.C ont été trouvées dans des colonies néolithiques telles que Argissa-MagulaThessaly (Hopf 1962) et NeaNikomedeia, Macédoine (Renfrew 1969) et au cours de la même période, des résidus de lentilles ont été également détectés en Egypte (Matmur, El Omari fin 4^{ème} millénaire) (Helbaek 1963).

Lens culinaris est native du Proche-Orient et de l'Asie centrale. Le progéniteur présumé des espèces cultivées (*Lens culinaris* subsp. *orientalis*) a été trouvé en Syrie, Turquie, Palestine, Liban, Irak, Jordanie, Afghanistan, Iran, Ouzbékistan et Grèce (Ladizinsky 1979a, Cubero 1981, Zohary 1972).

Khazaei *et al.* (2016) ont rapporté que le matériel génétique mondial des lentilles cultivées était regroupé, principalement en fonction de son origine éco-géographique, en trois groupes de base : savane subtropicale, méditerranéenne et tempérée du nord. Les cultivars de lentilles sont souvent divisés en deux groupes. L'Europe, l'Afrique du Nord et l'Amérique sont connues pour cultiver le groupe de macrospermes à grandes graines pour la plupart, tandis que le groupe de microspermes à petites graines est cultivé principalement en Asie, en Égypte et en Éthiopie.

La plupart des lentilles d'Asie occidentale ont une apparence de lentille aplatie tandis que les lentilles d'Asie du Sud ont une forme convexe des deux côtés.

Les lentilles sont des plantes autogames, ce qui a grandement contribué à maintenir l'identité des lignées au fil du processus de domestication. La région regroupant la Turquie, la Syrie et l'Irak, a joué un rôle important dans la domestication des lentilles avant d'être propagées au Nil, en Grèce, en Europe centrale et vers l'est jusqu'en Asie du Sud (Nene 2006). Au même temps, les lentilles se sont également propagées en Éthiopie, en Afghanistan, en Inde, au Pakistan, en Chine et plus tard au Nouveau Monde, y compris en Amérique latine (Cubero 1981, Duke 1981, Ladizinsky 1979).

Bahl *et al.* (1993) ont suggéré que la domestication des lentilles était probablement la plus ancienne parmi les légumineuses à grains.

Les lentilles ont donc joué un rôle important dès le début de la révolution agricole dans l'Ancien Monde aux côtés de la domestication du blé, de l'orge, des pois, du lin et du blé tendre (Zohary 1976).

I.2. Description morphologique et botanique

La lentille est une plante dicotylédone, herbacée, annuelle, à port érigé, très ramifiée avec une **tige** mince, dressée, anguleuse, de couleur vert clair d'environ 15 à 75 cm de hauteur (Duke 1981 ; Muehlbauer *et al.* 1985) (Figure 1).

Les racines de la lentille sont minces pivotantes avec une masse de racines latérales fibreuses, qui portent de nombreux petits nodules ronds ou allongés qui sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique en symbiose avec des rhizobiums. **Les nodules** sains ont un aspect blanc rosé et, une fois coupés, présentent une décoloration rose de la léghémoglobine (Saxena et Hawtin, 1981).

Les graines sont biconvexes, rondes, petites, en forme de lentille et, la couleur du testa varie du bronze au brun noir, violet et noir. Les marbrures et les mouchetures des graines sont une caractéristique commune à certaines lignées. Les cotylédons sont rouges, orange, jaunes ou verts, blanchissant au jaune (Kay 1979, Duke 1981, Muehlbauer *et al.* 1985).

La germination des graines est épigée ; elle permet au développement de semis de pousser sous le niveau du sol, ce qui facilite l'évitement des conditions environnementales difficiles à un stade de croissance précoce.

Le rachis mesure 4 à 5 cm de long et porte 10 à 15 folioles en 5-8 paires. **Les feuilles** sont alternes, composées, pennées, avec différentes couleurs (vert jaunâtre, vert jaune clair, vert terne, vert foncé ou vert bleuâtre foncé) qui se terminent généralement par une vrille ou hérissée.

Les stipules sont petites ou absentes. Les grappes axillaires portent généralement 1 à 4 fleurs sur des pédoncules courts de 2,5 à 5 cm de long. **Les fleurs** sont petites et de couleurs variables qui peuvent être blanches, roses, violettes, violettes pâle, bleues pâle groupées par petites grappes de deux à quatre (Muehlbauer *et al.* 1985). L'autofécondation est un phénomène courant chez les lentilles. La floraison est acropète (vers le haut). La fleur développe un fruit ou **gousse** oblongue, aplatie ou compressée, lisse avec 1 à 2 cm de long contenant 1 à 2 graines (Kay 1979, Duke 1981, Muehlbauer *et al.* 1985).



Figure 1: Morphologie d'une plante de lentille

(1) Plante, (2) Feuilles, (3) Fleurs (4) Gousse (5) Graine (Otto Wilhelm, 1885)

Cubero (1981) a divisé *Lens culinaris* sur la base de la taille des graines en deux groupes : macrosperma et microsperma. Les caractéristiques distinctives des deux groupes sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Les caractéristiques distinctives des deux groupes macrosperma et microsperma la taille des graines de *Lens culinaris* (Cubero *et al.* 2009)

Caractéristiques	Macrosperma	Microsperma
<i>Hauteur</i>	25–75 cm	15–35 cm
<i>Gousses, graines et cotylédons</i>	—Grandes gousses (15–20 × 7,5–10,5 mm) généralement plates, renfermant de grosses graines aplaties ; avec un poids de 25–50 g (1000 graines). —Cotylédons jaunes ou orange.	—Gousses petites ou moyennes (6-15 × 3,5-7 mm), convexes renfermant des graines plates, subglobuleuses, petite ou moyenne (3–6 mm de diamètre) avec 1000 graines pesant jusqu'à 25 g. —Cotylédons rouges, orange ou jaunes.
<i>Fleurs</i>	— Fleurs grandes (7–8 mm de long), blanches avec des nervures, rarement bleu clair avec 2 à 3 pédoncules.	— Fleurs blanches à violettes, petites (5–7 mm de long) et 1–4 pédoncules.
<i>Folioles</i>	— Folioles de forme ovale de 15–27 × 4–10 mm.	— Petites folioles de forme allongée, linéaires ou lancéolées, de dimension de 8–15 × 2–5 mm.

I.3. Taxonomie de la plante

En 1787, le botaniste Allemand Medikus a attribué à la lentille cultivée le nom scientifique « *Lens culinaris* » (Alihan et Munqez, 2013). Cette espèce est une légumineuse appartenant à la classe « Magnoliopsida » et à l'ordre des Fabales. Le genre « *Lens* » comprend sept taxons répartis sur quatre espèces (Ferguson et Erskine 2001 ; Ferguson *et al.*, 2000) :

- *Lens culinaris* Medik. (divisée en quatre sous espèces) :
 - subsp. culinaris* Medik.
 - subsp. orientalis* (Boiss.) Ponert
 - subsp. tomentosus* (Ladiz.) M.E. Ferguson & al.
 - subsp. odemensis* (Ladiz.) M.E. Ferguson & al.
- *Lens ervoides* (Brign.) Grande
- *Lens nigricans* (M. Bieb.) Godron
- *Lens lamottei* Czefr.

La lentille est classée comme suit (sur la base de l'USDA, Plants Database 2020) :

Règne :	Plante
Sous-règne :	Tracheobionta – Plantes vasculaires
Superdivision :	Spermatophyta – Plantes à graines
Division :	Magnoliophyta – Plantes à fleurs
Classe :	Magnoliopsida – Dicotylédones
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae/Légumineuse
Genre :	<i>Lens</i> – Lentille
Espèce :	<i>Lens culinaris</i> Medik.

I.4. Importance et production de lentille dans le monde

La lentille est l'une des légumineuses les plus importantes dans le monde, en témoigne la production et les multiples usages de cette plante. Elle se classe au cinquième rang après le Haricot, le Pois chiche, le Pois et le Niébé. En effet, elle est cultivée sur environ 5 millions d'hectares par an dans le monde (FAO, 2022). La production annuelle mondiale est estimée à 6.537.581 tonnes de graines sèches dont l'Asie réalise à elle seule 48,5 % de la production mondiale au cours de la dernière décennie suivie de 40,7 % par l'Amérique (Figure 2).

Aujourd'hui, le Canada est le plus grand producteur mondial de lentille avec une production de 2,8 millions de tonnes par an suivi par l'Inde avec 1,1 millions de tonnes (Tableau 2).

L'Inde, le Bangladesh, la Syrie, la Turquie, l'Iran, la Chine et le Népal dans la région de l'Asie du Sud sont les principaux contributeurs. Le Canada et l'Inde sont les chefs de file dans leurs régions respectives ; cependant, le Canada augmente sa part de production sur le marché mondial à un rythme plus élevé que l'Inde. Le Canada est nettement en avance sur l'Inde dans la superficie récoltée et la production totale avec un rendement élevé. Cette évolution reflète les efforts continus de la culture des lentilles au Canada conduisant à une augmentation significative de leur superficie cultivée au fil des ans, et complétée par des cultivars à haut rendement et des pratiques de gestion modernes ; le Canada est loin devant tous les autres pays, dont l'Inde en production. Un des inconvénients dans le Sud de l'Asie est le faible rendement des variétés de lentilles cultivées. Le rendement le plus élevé par hectare est enregistré en Jordanie (3138,9 kg/ha),

suivi de la Chine (2511,7 kg/ha). Apparemment, les pratiques agricoles inefficaces et les cultivars à faible rendement sont le facteur contraignant dans les régions les moins productives, dont l'Inde.

Tableau 2: Classement mondial des principaux pays en termes de superficie, de production et de rendement des lentilles (FAOSTAT, 2022)

Pays	Superficie récoltée (ha)	Pays	Rendement (kg/ha)	Pays	Production (Qx)
Canada	1.704.800	Jordanie	3138,9	Canada	28.678.000
Inde	1.353.912	Chine	2511,7	Inde	11.800.000
Australie	412.381	Nouvelle-Zélande	2456,4	Australie	5.258.480
Turquie	247.642	Egypte	2167,9	Turquie	3.708.150
Népal	212.876	Tadjikistan	1904,2	Etats unis	3.361.600
Etats unis	208.010	Syrie	1777,2	Népal	2.628.350
Bangladesh	141.282	Palestine	1768,8	Syrie	2.002.180
Iran	130.582	Canada	1682,2	Bangladesh	1.773.540
Russie	128.583	Etats unis	1616,1	Chine	1.643.810
Syrie	112.657	Turquie	1497,4	Russie	1.155.560

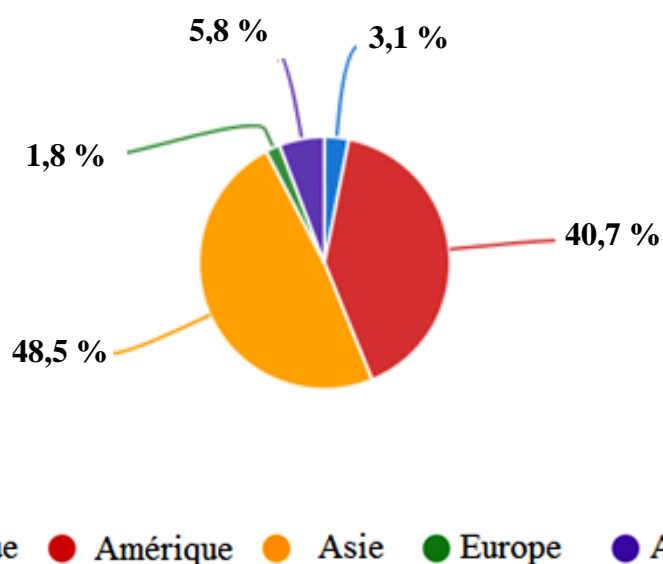


Figure 2: La production mondiale de lentilles par région (FAOSTAT 2022)

La culture de lentille présente également des retombées nutritionnelles, agronomiques considérables.

- **Sur le plan nutritionnel**

La lentille est un aliment de base apprécié dans de nombreux pays du monde, elle est considérée comme l'un des premiers aliments cultivés depuis l'Antiquité (Sarker et Erskine 2006). Les lentilles sont connues sous de nombreux noms dans différents pays et langues, ce qui indique l'étendue de leur culture et leur intérêt. L'importance alimentaire des lentilles en tant que sources essentielles de macro et micronutriments a été reconnue depuis longtemps pour le bien-être humain.

Les lentilles sont très nutritives et sont des légumineuses faciles à digérer, les graines de lentilles sont riches en protéines, en glucides et en calories (Muehlbauer *et al.*, 1985). Ses graines sont également une bonne source de plusieurs minéraux essentiels pour la nutrition humaine, tels que K, P, Fe, Zn et les vitamines B (Bhatty, 1988). Le niveau insignifiant de cholestérol, de graisses et d'anti-nutriments que l'on trouve dans les lentilles est attribué au fait qu'il s'agit de la source de protéines la plus recherchée pour la consommation humaine (Sultana et Ghafoor 2008).

La valeur nutritive des lentilles est présentée dans les tableaux 3 et 4. Le profil en acides aminés de la protéine de lentille est déficient en acides aminés soufrés méthionine et cystine, et en tryptophane. Elle sert également une bonne source de fibres. Les lentilles cuisent rapidement, ce qui réduit la perte de nutriments.

Des études sur la nutrition humaine ont montré que la consommation de lentilles est saine. Elle atténue le stress oxydatif, améliore la capacité antioxydante sérique et réduit les concentrations de lipoprotéines-cholestérol totales et de faible densité, triglycérides, molécules d'adhésion et biomarqueurs inflammatoires qui limitent la progression des maladies cardiovasculaires (Azadbakht *et al.*, 2007 ; Crujeiras *et al.*, 2007 ; Esmailzadeh et Azadbakht 2012 ; Taku *et al.*, 2007).

Tableau 3: Valeur nutritive des lentilles, brutes (Poids sec) pour 100 g (les valeurs nutritives et les poids sont pour la portion comestible) (USDA, National Nutrient Database for Standard Reference 2018)

Nutriments	Valeur	Les minéraux	Valeur
Eau	10,40 g	Calcium, Ca	56 mg
Énergie	343 kcal	Fer, Fe	7,54 mg
Protéine	25,80 g	Magnésium, Mg	122 mg
Lipides	1,06 g	Phosphore, P	451 mg
Glucides	60,08 g	Potassium, K	955 mg
Fibres alimentaires	30,50 g	Sodium, Na	6,00 mg
Sucres	2,03 g	Zinc, Zn	4,78 mg
Vitamines		Lipides	
Vitamine C, acide ascorbique	4,40 mg	Acides gras, saturés totaux	0,156 g
Thiamine	0,873 mg	Acides gras, mono insaturés	0,189 g
Riboflavine	0,211 mg	Acides gras, polyinsaturés	0,516 g
Niacine	2,605 mg		
Vitamine B-6	0,540 mg		
Folate, DFE	479 µg		
Vitamine A, RAE	2,00 µg		
Vitamine A, UI	39 UI		
Vitamine E (alpha-tocophérol)	0,49 mg		
Vitamine K (phyllo quinone)	5,0 µg		

Tableau 4: Composition en acides aminés des lentilles

(Source : https://www.nutritionvalue.org/Lentils%2C_raw_nutritional_value.html)

Valeur en acides aminés g pour 100 g	Valeur	Valeur en acides aminés g pour 100 g	Valeur
Protéine	24,63	Leucine	1.786
Alanine	1.029	Lysine	1.720
Arginine	1.903	Méthionine	0,210
Acide aspartique	2,725	Phénylalanine	1.215
Cystine	0,322	Proline	1.029
Acide glutamique	3.819	Serine	1.136
Glycine	1.002	Thréonine	0,882
Histidine	0,693	Tryptophane	0,221
Isoleucine	1.065	Tyrosine	0,658

Les graines de lentilles sont utilisées souvent comme plats principaux, accompagnements ou comme grains germés dans les salades avec du riz ou des rôtis (Sandhu et Singh, 2007). Sa farine peut être mélangée à des céréales pour faire des pains et des gâteaux (Williams et Singh, 1988). Dans certaines régions d'Europe, du Moyen-Orient et d'Inde, les graines de lentilles sont utilisées depuis longtemps comme alternatives de viande en raison de la teneur élevée en protéines et de la qualité. En outre, il est rapporté par Williams *et al* (1994) que les lentilles ont les moindres concentrations de facteurs anti-nutritionnels, tels que les inhibiteurs de la protéase et les lectines qui peuvent provoquer des flatulences. Les résidus de plantes de lentilles tels que les feuilles, les tiges et la paroi des gousses laissés après le battage sont également une bonne source d'aliments pour le bétail.

- **Sur le plan agronomique**

La lentille n'est pas seulement une plante d'intérêt nutritionnel. Elle possède aussi des vertus agronomiques. C'est une plante améliorante, très utile dans la rotation avec les céréales et les assolements.

En raison de sa croissance rapide, la lentille assure une couverture du sol et une protection contre l'érosion et l'envahissement des adventices. Les résidus de récoltes abandonnées au champ constituent une source importante en matières organiques et en éléments minéraux pour sol. La lentille améliore la teneur en azote du sol grâce aux relations symbiotiques de ses racines avec des bactéries du genre *Rhizobium* capables de fixer l'azote atmosphérique ce qui améliore la fertilité du sol (Quinn, 2009). Ainsi, la couverture du sol par cette culture permet de maintenir une humidité constante au niveau du sol et le protège contre l'érosion hydrique et les érosions causées par le vent et le soleil. Enfin, la lentille facilite l'intégration entre l'agriculture et l'élevage car les résidus de cette culture constituent une source de nourriture pour les animaux. Ces multiples atouts nutritionnels et agronomiques montrent donc l'importance cette culture.

I.5. Production de lentille en Algérie

En Algérie, la production de lentille a été chiffrée à 12.112 tonnes sur une superficie totale de 14.705 hectares (FAO 2020). Cette superficie occupe 14,26 % du total des terres réservées aux légumineuses alimentaires et est répartie sur de grandes surfaces dans l'ouest algérien dans les régions de Tiaret, Relizane, Chlef, Ain Témouchent et Sidi-Bel-Abbès ainsi qu'à Sétif, Mila et Constantine à l'est du pays (Figure 3).

Par ailleurs, les rendements de lentilles ont progressivement évolué entre 2008 et 2020 avec un rendement maximal de 29.663 tonnes en 2018 (Figure 4 et Tableau 5). Cette évolution est liée à l'extension de la superficie de la culture et au nombre d'agriculteurs qui s'y intéressent.

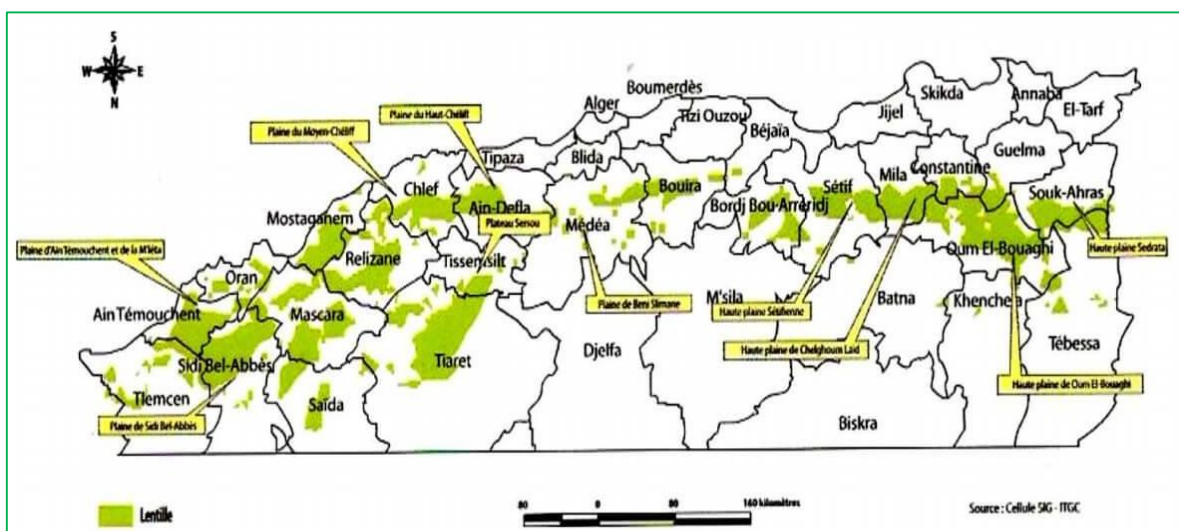


Figure 3: Répartition des Zones de culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013).

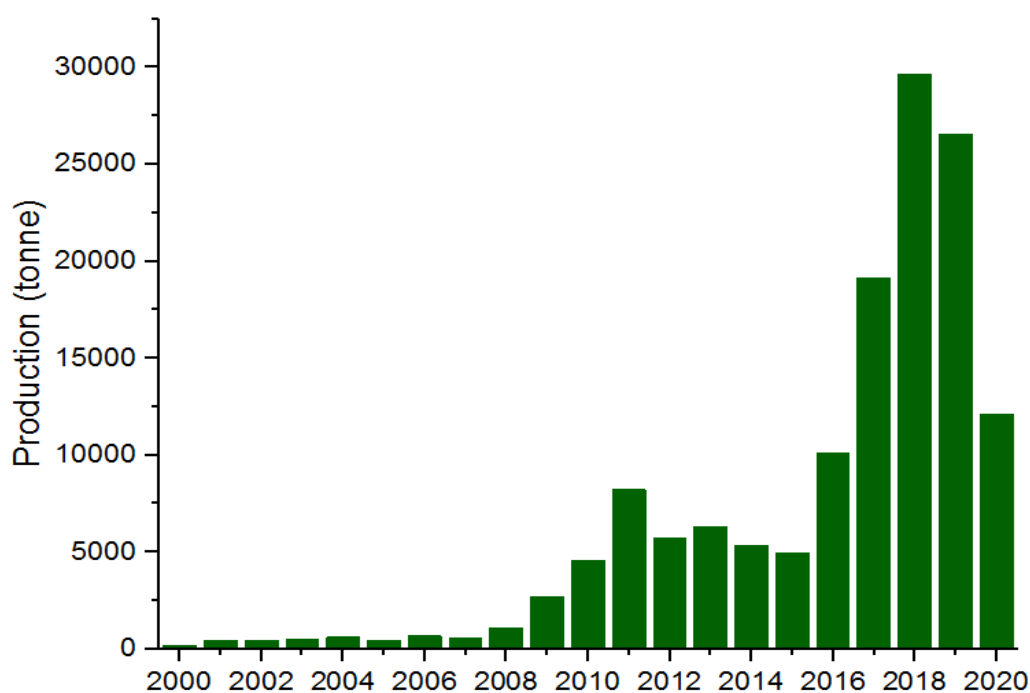


Figure 4: Evolution des productions de lentilles en Algérie (2000-2020) (FAOSTAT, 2022)

Tableau 5: Evolution des superficies cultivées et rendement des lentilles en Algérie (2000-2020) (FAOSTAT, 2022).

Année	Superficie (ha)	Rendement (Kg/ha)
2000	690	281.2
2001	920	497.8
2002	920	472.8
2003	840	583.3
2004	862	711.1
2005	1090	388.1
2006	1218	540.2
2007	873	642.6
2008	1369	789.6
2009	2588	1040.6
2010	4233	1084.3
2011	11090	740.8
2012	6244	919
2013	5543	1139.8
2014	6458	827
2015	6330	781.2
2016	8762	1149.4
2017	19033	1005.6
2018	25956	1142.8
2019	29516	898.6
2020	14705	823.7

I.6. Adaptation et culture

La lentille est une espèce qui se présente bien aux écosystèmes des régions tropicales chaudes tempérées, subtropicales et de haute altitude du monde (Muehlbauer *et al.* 1995). Elle est principalement cultivée seule ou en rotation avec d'autres cultures

comme le blé, le riz, l'orge, la moutarde, la canne à sucre, le ricin et les graines de lin (Andrews et McKenzie 2007).

Le Centre international de recherches agricoles dans les zones sèches (ICARDA), en Syrie, possède la plus grande collection au monde de génotypes de lentilles (> 10 000) (Sarker *et al.* 2002).

Les conditions agro-climatiques et les systèmes de culture dans lesquels les lentilles sont cultivées varient d'une région à l'autre. Les lentilles sont cultivées comme culture d'hiver dans les régions subtropicales (Pakistan, Inde, Népal et Bangladesh). Par contre, dans les régions où les hivers sont trop froids, le semis est retardé jusqu'au printemps (Materne et Siddique, 2009).

Les lentilles se portent bien avec des précipitations annuelles d'environ 750 mm avec une période sèche marquée avant la récolte. Cependant, grâce aux variétés améliorées, certains cultivars peuvent supporter des périodes de sécheresse. En matière de sol, la lentille n'est pas très exigeante mais croît de préférence sur des sols bien drainés, sols sablo-limoneux à haute teneur en phosphore, à pH= 6 ou 7 (Dugje *et al.*, 2009).

Le désherbage doit être effectué entre les semis et également pendant la saison de croissance ; il peut être effectué par des moyens mécaniques ou chimiques, ainsi que par un désherbage manuel traditionnel dans de petits champs. Le désherbage mécanique s'effectue soit par binage rotatif, soit par hersage. La récolte se fait généralement lorsque les plantes commencent à jaunir et que les gousses inférieures deviennent brunes à brun jaune. Les lentilles peuvent sécher sur le terrain ou dans des séchoirs à air à une température de 43°C.

I.7. Principaux facteurs affectant la production de lentilles

L'accroissement de la production de lentille se heurte à plusieurs contraintes qui réduisent ou même anéantissent la récolte. Ces contraintes sont d'ordres abiotiques et biotiques.

I.7.1. Contraintes abiotiques

Les contraintes abiotiques constituent l'un des principaux facteurs limitants la production de lentille. Elles sont principalement des facteurs de types pédoclimatiques.

I.7.1.1. Les contraintes pédologiques

Les contraintes pédologiques sont liées essentiellement à une faible fertilité des sols en éléments nécessaires au développement de la plante de la culture ou à une toxicité nutritive ainsi que l'envahissement des mauvaises herbes.

Une pauvre teneur en azote dans les sols affecte le développement et le rendement de la lentille. De ce fait, la relation symbiotique avec les rhizobiums est importante pour assurer une bonne fixation de l'azote, une bonne assimilation de phosphore et par conséquent, un rendement élevé (Materne et Siddique, 2009). Les carences en fer sont très communes chez la lentille, particulièrement dans les sols alcalins où le fer devient moins disponible. Les pertes en rendement sont estimées à 47 % en Syrie et à 18-25% en Inde chez les cultivars susceptibles au déficit en fer. Par contre, aucune perte rendement n'a été constaté chez les cultivars modérément tolérants à la carence en fer (Erskine *et al.*, 1993), (Ali et Johnson, 2000).

Les lentilles sont généralement cultivées et adaptées aux sols neutres à alcalins, mais les rendements sont compromis lorsque les sols sont acides, sodiques, salins ou contiennent des niveaux élevés de bore.

Les légumineuses sont relativement sensibles au sel ; les lentilles sont comparativement plus sensibles que les pois et les féveroles et sont similaires aux pois chiches (Saxena *et al.*, 1993).

Chez les lentilles, l'augmentation de la sodicité du sol (pourcentage de sodium échangeable, ESP) réduit la hauteur des plantes, la surface foliaire, le poids sec des feuilles, la production totale de biomasse et le rendement en graines des lentilles, et réduit à la fois l'activité de la nitrate réductase dans la feuille et la concentration totale d'azote (Singh *et al.*, 1993).

Ainsi, les mauvaises herbes sont considérées comme l'un des facteurs affectant le rendement en lentilles. Une étude de Halila (1995) a montré que la perte de rendement moyenne des lentilles semées en hiver causée par les mauvaises herbes pourrait atteindre 100%. Les lentilles sont généralement moins compétitives par rapport aux mauvaises herbes, en raison de leur petit couvert fragile (Chaudhary *et al.*, 2011) et de leur croissance ralentie durant l'hiver (Carr *et al.*, 1995).

I.7.1.2. Les contraintes climatiques

Les contraintes climatiques sont liées aux températures très élevées ou très basses et à la mauvaise répartition des pluies.

Les variations des températures influencent largement le développement et la croissance de la lentille ainsi que son adaptation à l'environnement. En effet, la température peut limiter la production de la lentille, particulièrement pendant les stades de floraison et de formation des graines (Erskine *et al.*, 1989). A ces stades de développement, le temps chaud ou sec peut gravement limiter sa productivité dans de nombreuses régions du monde (Erskine, 1985 ; Muehlbauer *et al.*, 2006).

Les lentilles préfèrent être cultivées par temps frais ou comme culture d'hiver dans la zone tropicale semi-aride. Comparées à d'autres légumineuses à grains tempérés, les lentilles étaient considérées comme plus tolérantes aux basses températures, par exemple, elles avaient une meilleure résistance à l'hiver que les pois ou les pois chiches (Murray *et al.*, 1988).

Le déficit en eau est aussi une contrainte majeure qui limite le rendement des lentilles dans de nombreuses régions du monde (McWilliam, 1986 ; Muehlbauer *et al.*, 1995 ; Andrews et McKenzie, 2007). Bien que cette culture soit généralement adaptée pour pousser dans des zones sèche et zone semi-aride en raison de ses besoins inférieurs en eau comparée aux autres légumineuses (Carr *et al.*, 1995). Il a été signalé que 80% de la variation du rendement en grains de lentilles dans l'environnement méditerranéen était dû aux différences de précipitations saisonnières (Erskine et EI Ashkar, 1993).

Certains auteurs (Yusuf *et al.*, 1979 ; McKenzie et Hill, 2004) ont montré que plusieurs légumineuses à grains, dont les lentilles, avaient une période critique de sensibilité au stress hydrique au stade de la floraison.

Le système racinaire et la partie végétative de la lentille sont sévèrement affectées par l'excès en eau et l'inondation après la levée. En effet, un excès en eau à toute période pendant la saison de la culture peut réduire le rendement de la lentille, spécialement dans les sols à drainage bloqué ou à structure pauvre (Jayasundara *et al.*, 1998).

I.7.2. Contraintes biotiques

Au champ, la lentille subit durant tout son cycle végétatif l'action de plusieurs ennemis, en particulier, les champignons, les bactéries, les virus, les nématodes et les parasites des plantes (Garkoti *et al.*, 2013). Les maladies de la lentille réduisent non seulement le rendement, mais diminuent également la qualité des semences.

L'ascochytose (*Ascochyta lentis*) et la fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*) sont les principales maladies fongiques qui peuvent causer des pertes graves dans la plupart des régions productrices de lentilles dans le monde. Ainsi, les maladies fongiques

telles que la pourriture grise (*Botrytis fabae* et *B. cinerea*), la rouille (*Uromyces viciae-fabae*), la stemphyliose (*Stemphylium botryosum*) et l'anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) sont également importantes dans certains pays lorsque les conditions environnementales sont favorables à l'infection (Taylor *et al.*, 2007).

Les plants de lentilles peuvent également être infectés par les virus, mais généralement l'effet sur le rendement n'est pas aussi important que celui causé par les champignons. La maladie de la jaunisse des lentilles causée par le virus de l'enroulement du haricot (BLRV), le virus de la jaunisse occidentale de la betterave (BWYV) ou le virus de la feuille rouge du trèfle souterrain (SCRLV) sont répandues dans le monde entier. Il existe aussi d'autres maladies virales importantes de la lentille tel que la mosaïque jaune du haricot (BYMV), la mosaïque transmise par les graines de pois (PSbMV), la mosaïque du concombre (CMV), la mosaïque de la luzerne (AMV) et la tache de la fève (BBSV).

Selon Bayaa et Eriskine (1998), la lentille cultivée peut être attaquée par la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* et 5 espèces de nématodes.

Le puceron, le criquet, le vers-gris et la tordeuse sont les principaux insectes ravageurs de la culture de la lentille (Nasraoui, 2008 ; Belaid, 2017 ; Amri *et al.*, 2019).

II. La rouille de la lentille causée par *Uromyces viciae-fabae*

II. La rouille de la lentille causée par *Uromyces viciae-fabae*

II.1. Historique et importance de la maladie

La rouille de la lentille causée par *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Schröt est considérée comme la maladie foliaire la plus importante de la lentille et l'une des contraintes biotiques majeures de cette culture (Erskine *et al.*, 1994a). La maladie a été signalée pour la première fois en Inde par Butler en 1918 sur lentille, pois, pois de senteur et fève dans la plaine indo-gangétique. Plus tard, la maladie a été signalée dans plusieurs pays, à savoir Chypre, Maroc, Sicile, Palestine, Portugal, Bulgarie, Turquie, Iran, Chili, Hongrie, Syrie, Bangladesh et Népal. Bejiga *et al.* (2000) ont souligné l'importance de la rouille en Afrique.

La perte de rendement en graines de lentilles attribuable à la rouille a été estimée à 25 % en Éthiopie (DZARC, 1993). Cependant, en 1997, une épidémie de rouille en Éthiopie a causé des pertes de rendement atteignant 100 %, près de 2500 ha de lentilles sont complètement détruites par cette maladie dans le district de Gimbichu en Éthiopie. Cela a entraîné une perte financière d'un million de dollars américains (Negussie *et al.*, 1998). Également, Khare (1981) a enregistré en Inde une perte de récolte de 100 %.

U. vicia-fabae est une espèce fongique cosmopolite et largement répandue parasitant un grand nombre de plantes cultivées à travers le monde. Elle comprend principalement toutes les cultures légumineuses comme le pois, le pois de senteur et la fève (Bilgrami *et al.*, 1979). Les mauvaises herbes dans les champs de lentilles (*Fumari parviflora*, *Lathyrus sp.*, *Melilotota alba*, *Circicum arvense*, etc.) ont également été trouvées infectées par ce champignon.

II.2. Description de l'agent pathogène

L'agent pathogène *U. vicia-fabae* responsable de la rouille de la lentille est un champignon autoïque qui termine son cycle de vie sur une seule plante hôte. Ils possèdent 5 types de fructifications (spermogonies, écidies, urédies, téliosores et basides) et 5 types de spores (spermaties, écidiospores, urédospores, téléutospores et basidiospores). Les spermogonies sont petites, en forme de flacon, formées principalement sur la surface inférieure des feuilles en petits groupes portant des spermaties. Les écidies de sont généralement en groupes entourant les spermogonies ou parfois dispersées, cupulées, de 0,3 à 0,4 mm de diamètre. Les écidiospores sont sphéroïdales, de 18 à 26 µm de diamètre, à paroi hyaline, verruqueuse, de 1 µm d'épaisseur. Les urédies sont formés sur les pétioles et les tiges, dispersées, de 0,5 à 1 mm de diamètre. Les urédospores sont brunes claires,

épineuses, unicellulaires, ellipsoïdales ou ovoïde de $22-28 \times 19-22 \mu\text{m}$ à paroi finement échinulée, de $1-2,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur et des pores de $3-4 \mu\text{m}$ (Figure 5 A). Les téliosores sont comme les urédies mais noires et plus grosses de 1 à 2 mm de diamètre. Les téléutospores sont subglobuleuses brunes claires, ovales ou elliptiques, unicellulaires, à paroi épaisse avec un sommet aplati et $25-38 \times 18-27 \mu\text{m}$ de diamètre. Elles possèdent un long pédicelle qui mesure jusqu'à $100 \mu\text{m}$ (Figure 5 B) (Negussie and Pretorius, 2012).

II.3. Symptomatologie de la maladie

L'agent pathogène de la rouille attaque toutes les parties aériennes de la plante de lentille. Les symptômes de la maladie commencent par l'apparition de taches blanches jaunâtres sur les deux faces de la feuille et les gousses (Agrawal *et al.*, 1993). Ces taches s'allongent, et finissent par virer au brun clair. Par la suite, des pustules à aspect poudreux contenant les urédospores se développent sur tous les organes infectés (Khare, 1981). A maturité, les pustules produisent de nombreuses urédospores de couleur marron (Figure 6). Ces urédospores se disséminent sur d'autres feuilles et germent pour coloniser les tissus.

Plus tard dans la saison, les téliosores de couleur brune foncée à noire se forment à partir du même mycélium, principalement sur les tiges et les branches de la plante (Agrawal et Prasad, 1997).

La plante infectée sèche sans former de graines dans les gousses ou avec de petites graines ratatinées. Les plantes à un aspect brun foncé à noirâtre sont clairement visible dans les parcelles affectées (Beniwal *et al.*, 1993). En cas d'infection grave (Figure 7), les pustules coalescent et forment de grandes surfaces nécrotiques sur les feuilles et les tiges provoquant la chute des feuilles et la mort prématurée des plantes (Chen *et al.*, 2009).

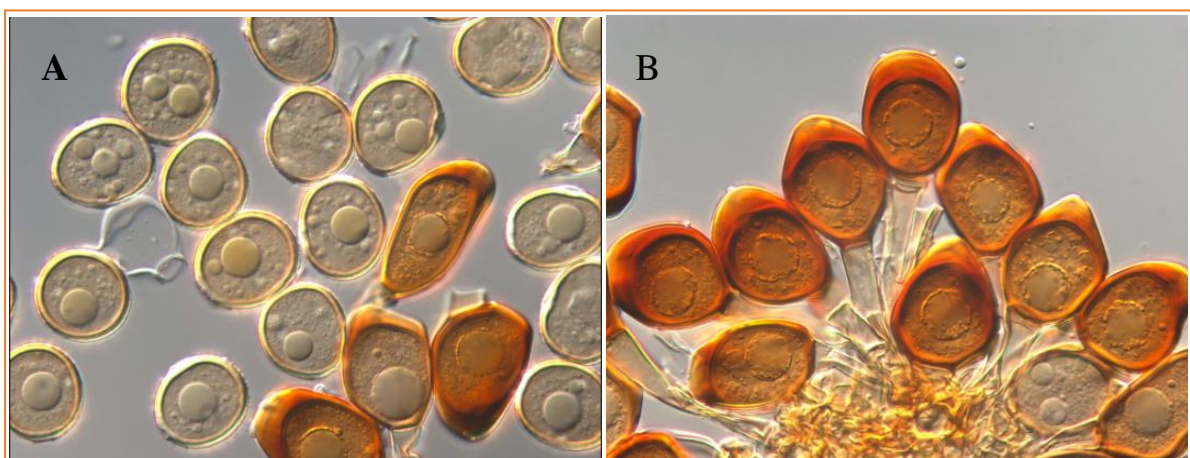


Figure 5: Aspect microscopique de *Uromyces viciae-fabae* sur *Vicia sativa*,
A : Urediniospores ; B : Téléutospores (Negussie *et al.*, 2015)



Figure 6: Les urédies d'*Uromyces viciae-fabae* sur la surface supérieure des feuilles de lentille, Éthiopie. (Negussie *et al.*, 2015)



Figure 7: Infection urédienne sévère des tiges et des feuilles de lentilles par *Uromyces viciae-fabae*, Éthiopie. (Negussie *et al.*, 2015)

II.4. Cycle de vie et de développement de la maladie

Le cycle biologique d'*U. viciae-fabae* est caractéristique d'une rouille autoïque ; ce qui signifie que 'une seule plante hôte est nécessaire à l'accomplissement de son cycle biologique, et macrocyclique, ce qui signifie que les cinq stades de spores se produisent au cours du cycle. Toutefois, *U. viciae-fabae* ne possèdent pas d'hôtes alternatifs, mais des hôtes collatéraux.

Les spores sexuées (basidiospores et spermaties) qui sont des spores monocaryotes donnent naissance à des spores asexuées dicaryotes (N + N ou contenant deux noyaux sexuellement compatibles), appelées écidiospores. Ces derniers, lors de la germination, produisent des mycéliums dicaryotes, qui à leurs tours produisent des urédies.

La phase primordiale dans le cycle biologique d'*U. viciae-fabae* est le stade urédien qui correspond à la phase épidémique (Figure 8). Les urédies produisent des urédospores qui se déposent sur les feuilles, germent et pénètrent les tissus. Après l'infection, on observe la formation de télisores contenant des téléospores (spores productrices de basides) (Cummins et Hiratsuka, 1983). Lorsque les conditions sont défavorables, les téléospores entrent en dormance et constituent ainsi une forme de résistance sous laquelle *U. viciae-fabae* passe l'hiver. De plus, ces téléospores peuvent germer dès leur pleine formation sans entrer en dormance (Prasada et Verma, 1948). Lors de la germination, les téléospores produisent des basides et des basidiospores capables d'infecter les lentilles et de démarrer le cycle d'infection. Cette caractéristique des téléospores joue un rôle important dans l'épidémiologie de la rouille de la lentille.

Le contact entre les surfaces cellulaires d'un agent pathogène et son hôte est une condition préalable à l'établissement réussi d'une relation hôte-pathogène. L'adhérence des deux surfaces, un phénomène de pré-pénétration, est d'une importance fondamentale pour la séquence ultérieure d'événements dans le développement de la maladie (Beckett *et al.*, 1990).

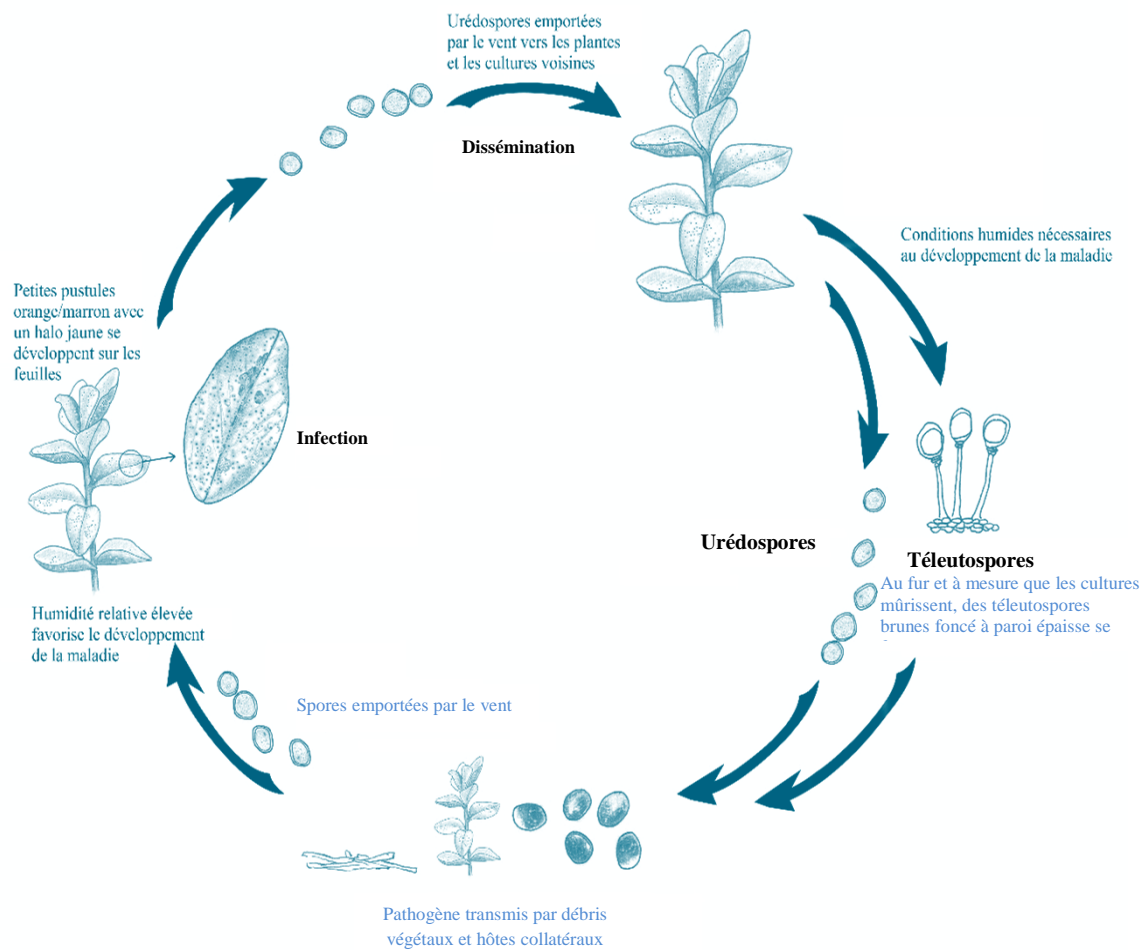


Figure 8: Cycle de vie d'*Uromyces viciae-fabae* (Anonyme)

Les substances produites par de nombreux champignons pathogènes (Hamer *et al.*, 1988), y compris *U. viciae-fabae* (Beckett et Porter, 1988), facilitent l'adhésion ou la fixation des germes et des spores non germées. Les urédospores d'*U. viciae-fabae* produisent des sérine-estérases, qui contribuent à l'adhésion des spores à la surface de l'hôte (Deising et Mendgen, 1992). De plus, les caractéristiques morphologiques des urédospores en germination sont connues pour faciliter la fixation des spores à la surface de l'hôte en augmentant la zone de contact avec le substrat (Clement *et al.*, 1997).

Chez la rouille de la lentille, les débris végétaux infectés et mélangés aux graines de lentilles ou aux résidus de culture constituent la principale source d'inoculum (Khare, 1981). Cependant, les hôtes collatéraux d'*U. viciae-fabae* peuvent également servir de sources d'inoculum. Selon Khare (1981), les cultivars de lentilles sensibles sont plus vulnérables aux attaques de rouille au stade de la floraison qu'au stade végétatif. Cependant, Kramm et Tay (1984) ont signalé que les plantes au stade de semis sont également très sensibles.

II.5. Epidémiologie du pathogène

Les épidémies de la rouille sont dommageables du fait de leur endémicité dans la quasi-totalité des régions légumières dans le monde et de leur impact sur la production de la lentille, notamment dans les pays tempérés, où les conditions climatiques sont propices au développement de la maladie. Des épidémies de rouille de la lentille surviennent presque chaque année dans certains pays producteurs de lentilles appelés « les points chauds » et comprennent Akaki en Ethiopie, Ishurdi au Bangladesh et Pantnagar en Inde (Erskine *et al.*, 1994a, b).

La gravité des épidémies annuelles de la rouille dépend des variations agro-climatiques (Eversmeyer et Kramer, 2000). En 1997, une grave épidémie à l'échelle nationale de l'Éthiopie s'est produite suite à des conditions météorologiques plus humides ainsi que de l'utilisation des variétés locales sensibles qui ont également contribué à l'épidémie. Des réductions de rendement allant jusqu'à 100 % ont été mesurées (Negussie *et al.*, 1998).

La rouille de la lentille dépend fortement de la température, l'humidité, les précipitations ou la rosée qui influencent directement sur la gravité et la distribution de la maladie. L'inoculum le plus important dans le cycle infectieux d'*U. viciae-fabae* sur la lentille est celui des écidiospores qui germent à des températures de 17 à 22°C (Prasada et Verma, 1948). La germination des urédospores est affectée par la durée d'humidité, la température et la qualité de la lumière (Chen *et al.*, 2011). Les urédospores peuvent germer

dans des températures de 5 à 26°C, avec une germination optimale à 20°C. L'infection des feuilles par les urédospores augmente progressivement à mesure que la période d'humidité des feuilles augmente, par contre, plus la température est basse, plus le processus d'infection est lent (Joseph et Hering, 1997). Les téléospores associées aux débris infectés qui peuvent fournir un moyen d'infection important permettant à la rouille de la lentille de commencer son cycle de développement, germent facilement à des températures allant de 17 à 22°C (Chen *et al.*, 2011).

II.6. Mode d'action d'*U. viciae-fabae*

Les champignons de la rouille pénètrent généralement dans leur hôte par des ouvertures naturelles telles que les stomates (Deising et Mendgen, 1992). Les urédospores attachées aux feuilles donnent naissance à une série de structures d'infection telles que des tubes germinatifs, des appressoriums, des vésicules sous-stomatiques, des hyphes d'infection et des haustoriums (Mendgen *et al.*, 1988). Ces derniers se forment au sein de la cellule hôte après avoir pénétré dans la cellule sans causer de blessure létale (Deising et Mendgen, 1992). Cependant, l'haustorium, qui est généralement un organe par lequel un champignon absorbe les nutriments des cellules hôtes, agit chez *U. viciae-fabae* comme une structure essentielle pour la biosynthèse des métabolites tels que la thiamine en plus de l'absorption des nutriments (Sohn *et al.*, 2000).

Le comportement de pré-pénétration des champignons de la rouille dans les stomates est caractérisé par des réponses à des stimuli chimiques (chimiotropismes) et/ou à des stimuli de surface (thigmotropismes ou tropismes de contact) tels que des crêtes stomatiques (caractéristiques morphologiques des cellules de garde stomatiques) (Deising et Mendgen, 1992).

La croissance directionnelle est l'un des tropismes spécifiques des champignons dont dépendent les tubes germinatifs des urédospores pénétrant dans les stomates pour les diriger au point de l'infection (Wynn, 1981). Par exemple, les gradients de pH à la surface des feuilles influent sur la direction de la croissance du tube germinatif d'*U. viciae-fabae* (Edwards et Bowling, 1986). Une fois que le champignon est installé dans l'hôte, il doit produire des enzymes lytiques pour surmonter la paroi cellulaire qui fonctionne comme une barrière physique à l'établissement des pathogènes.

Heiler *et al.* (1993) ont confirmé la présence d'une activité cellulase chez *U. viciae-fabae*, de plus, Frittrang *et al.* (1992) ont reporté la présence de la pectinestérase, une enzyme qui modifie la composition chimique des substances pectiques au site d'infection (Frittrang *et al.*, 1992).

Les résultats d'une étude menée par Rauscher *et al.* (1995) suggèrent également qu'*U. viciae-fabae* peut produire des protéinases extracellulaires capables de percer la paroi cellulaire de l'hôte en dégradant les protéines fibreuses. Ces derniers sont importants chez les plantes pour la stabilité de la paroi cellulaire et jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes fongiques (Rauscher *et al.*, 1995). Avec la cellulase, la protéinase affaiblit les parois cellulaires et facilite l'infection et l'invasion intracellulaire des tissus hôtes par *U. viciae-fabae*. Richmond (1983) a montré qu'*U. viciae-fabae* est capable de se propager dans une cellule végétale d'une manière intracellulaire et intercellulaire.

II.7. Méthodes de lutte contre la rouille

La rouille de lentille réduit considérablement le rendement à la fois qualitativement et quantitativement. Les stratégies de lutte utilisées contre cette maladie comprennent les pratiques culturales, l'utilisation de cultivars résistants, la lutte biologique et l'application de fongicides.

II.7.1. Pratique culturales

Les pratiques culturales à savoir la date du semis, la densité des plantes, l'espacement de culture, la fertilisation, la préparation du lit de semence, le désherbage, etc. affectent la santé et le rendement des cultures et peuvent également limiter les dégâts causés par la rouille.

En Éthiopie, un semis précoce a réduit la gravité de la rouille de la lentille (Mengistu et Negussie, 1994). Cependant, malgré la forte infection par la rouille, les lentilles semées précocement ont donné un rendement en graines significativement plus élevé que les cultures semées tardivement. Encourager le caractère de maturation précoce des cultivars de lentilles leur permettrait d'échapper à l'épidémie sans sacrifier le rendement, ce qui pourrait être bénéfique pour les producteurs de lentilles (Bejiga *et al.*, 1996).

Un espacement des rangs supérieur à 15 cm affecte également la sévérité de la rouille (Lal *et al.*, 2006). Ainsi, l'élimination des débris végétaux de lentilles infectés est primordiale pour réduire l'inoculum potentiel et minimiser l'apparition de la rouille la saison suivante (Prasada et Verma, 1948).

Dans le cadre de la gestion intégrée, Lal (2006) a signalé que le semis retardé (15 jours plus tard que le semis normal) combiné avec un traitement des semis avec du propiconazole (à raison de 1,0 ml/kg de semences) en raison de deux pulvérisations par saison a donné le meilleur contrôle de la maladie (83,0 %) et le meilleur rendement (1 233 kg/ha).

II.7.2. Variétés résistantes

De nombreuses recherches d'intérêt agronomique menées dans le but de contrôler le développement des pathogènes, visent à intégrer des gènes de résistance dans les variétés cultivées sensibles. La présence de ces gènes peut protéger intégralement et efficacement la plante contre plusieurs maladies. Cette approche est économique, durable, efficace, facile à manipuler et respectueuse de l'environnement.

Chez la lentille, plusieurs programmes d'amélioration et de sélection variétale ont déjà été réalisés, ouvrant une voie prometteuse à la commercialisation de variétés résistantes. La culture de variétés de lentilles à haut rendement et résistantes à la rouille devient courante dans les systèmes agricoles de la plupart des pays producteurs de lentilles, en particulier dans les pays en développement, où la rouille est un problème majeur pour la production.

Le taux de réussite pour développer des cultivars de lentilles résistants à la rouille est relativement élevé en raison de la transmission simple du gène dominant (Sinha et Yadav, 1989 ; Mishra *et al.*, 2008). De plus, il y a des indications que la résistance pourrait également être contrôlée par des gènes dominants dupliqués dans les lentilles macrosperma, (par exemple la variété Precoz) (Kumar *et al.*, 1997).

De nombreuses variétés résistantes sont maintenant disponibles dans les pays d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud (Bayaa et Erskine, 1998). Au Bangladesh, « Barimasur -4 », dérivé d'un croisement ILL 5888/FLIP 84-112L, a été lancé en 1995 (Sarker *et al.*, 1999). De même, « Pant Lentil 4 » a été autorisé pour la culture commerciale dans les plaines du nord-ouest de l'Inde (Singh *et al.*, 1994) et Alemaya (FLIP-89-63L) a été approuvé pour être commercialisé en Éthiopie (Bejiga et al., 1998). Au Maroc, une variété sous le nom de Hamria, dérivé d'un croisement entre ILL4354 et ILL 922, a été publiée (ICARDA, 2010 ; Sakr *et al.*, 2004), tandis que ILL 1233/ILL 4536 et FLIP 96-46L, ont été enregistrés respectivement sous les noms d'Assano et de Teshale en Éthiopie (Fikru *et al.*, 2007 ; Fikre *et al.*, 2007). Plus récemment, Chen *et al.* (2011) ont répertorié les lignées ILL 358, ILL 2704 du Centre international de recherche agricole dans les zones arides (ICARDA) et Pusa 10, comme résistantes à la rouille de la lentille.

L'ICARDA contribue de manière significative au développement de variétés résistantes en coordonnant et en distribuant des pépinières de criblage aux programmes nationaux de lentilles dans des pays où la rouille est un problème phytosanitaire comme l'Éthiopie, le Maroc et le Pakistan (Erskine *et al.*, 1994a).

Des études sur les facteurs influençant le mécanisme de résistance à la rouille chez la lentille (Reddy et Khare 1984) ont rapporté que les cultivars résistants contenaient plus de cire de surface foliaire, d'éléments minéraux (P, K, Zn, S, Fe, Cu), et de phénols que les cultivars sensibles qui avaient des niveaux plus élevés d'azote (N), Mn, acides aminés et sucres. Structurellement, aucune différence significative n'a été observée entre les cultivars résistants et sensibles.

II.7.3. Lutte biologique

Le microorganisme antagoniste *Trichoderma* a été utilisé comme un agent de lutte biologique contre *U. viciae-fabae* (Parker et Blakeman, 1984b). Un contrôle maximal de 43 à 45% de la maladie de la rouille de la lentille a été enregistré suite à des pulvérisations foliaires par *Trichoderma viride* ou de *Gliocladium virens* (Lai, 2006). *Trichoderma harzianum* et *Verticillium lecanii* ont démontré un potentiel de contrôle biologique de la rouille du haricot causée par *Uromyces appendiculatus* (Carrion, 1999 ; Burmeister et Hau, 2009).

Des espèces bactériennes ont prouvé leur efficacité en réduisant la croissance des tubes germinatifs ou en empêchant la germination des urédospores d'*U. viciae-fabae* (Parker and Blakeman, 1984b). *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* et *Stenotrophomonas maltophilia* ont été signalé comme des agents de lutte biologique efficaces contre la rouille du haricot causée par *U. appendiculatus* (Baker *et al.*, 1985 ; Yuen *et al.*, 2001 ; Abo-Elyousr *et al.*, 2021).

II.7.4. Lutte chimique

Il existe plusieurs fongicides qui sont efficaces contre la rouille de la lentille lorsqu'ils sont utilisés comme pulvérisations foliaires et enrobages de semences (Chen *et al.*, 2011).

Les fongicides couramment utilisés pour contrôler la rouille sont le mancozèbe (Dithane), le carbendazime, le triadiméfon et le propinèbe (Singh 1985 ; Sepulveda et Alvarez, 1989 ; Mohyud-Din *et al.*, 1999). En Égypte, l'efficacité de d'autre fongicide, notamment le bénomyl, la carboxine, le métalaxyl, l'oxycarboxine, le thirame, a été prouvée contre la rouille de la fève (Khaled *et al.*, 1995).

L'efficacité des fongicides dépend du moment et de la fréquence d'application. Certains fongicides sont efficaces aux stades précoces de l'infection par la rouille et d'autres à un stade ultérieur car il existe des différences de sensibilité entre les écidiospores et les urédospores à des fongicides spécifiques (Sugha *et al.*, 1994). Par exemple, les écidiospores sont plus sensibles au thiabendazole, le bénomyl, le carbendazime, et moins

sensibles au bitertanol, tandis que les urédospores sont plus sensibles au triadiméfon, au dinobuton et au myclobutanil et moins sensibles au bitertanol (Sugha *et al.*, 1994).

Appliquer un fongicide deux fois après l'apparition de la rouille est plus efficace qu'une seule application avant l'apparition de la maladie (Mohyud-Din *et al.*, 1999). Aussi, l'application répétée de mancozèbe s'est avérée efficace contre la rouille de la fève lorsque les symptômes apparaissent tôt dans la saison (Yeoman *et al.*, 1987).

L'intervalle de temps entre les pulvérisations successives a également un impact sur l'efficacité d'un fongicide. Yeoman *et al.* (1987) ont appliqué des fongicides deux fois à un intervalle de 42 jours et ont réussi à contrôler efficacement la rouille causée par *U. viciae-fabae*. En effet, s'il y avait eu une progression rapide de l'épidémie de rouille, ils auraient utilisé des intervalles plus courts et plus de deux pulvérisations.

Dans les pays en développement comme l'Éthiopie, les fongicides ne sont pas utilisés pour lutter contre la rouille de la lentille, car de nombreux composés sont coûteux et indisponibles pour les producteurs de lentilles. Dans ces pays, les agriculteurs manquent souvent de l'expertise technique requise pour la lutte chimique et dépendent de la disponibilité de variétés résistantes.

**III. La tâche helmintosporienne causée par
*Bipolaris sorokiniana***

III. La tâche helmintosporienne causée par *Bipolaris sorokiniana*

III.1. Classification et principaux hôtes de *Bipolaris sorokiniana*

Bipolaris sorokiniana est un champignon de la classe des ascomycètes, l'ordre des Pleosporales et la famille des Pleosporaceae. Il a été officiellement nommé avec plusieurs synonymes tels que : *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. 1891, *Helminthosporium sativum* Pammel, C.M. King & Bakke 1910 et *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. & B.L. Jain 1966 (Maraite *et al.*, 1998).

B. sorokiniana possède une forme sexuée (Téléomorphe : *Cochliobolus sativus*), rarement observée dans la nature, mais qui peut être obtenue *in vitro* (formation d'ascospores). C'est la forme asexuée (Anamorphe : *Bipolaris sorokiniana*) qui est prédominante et associée à la maladie.

Les espèces de *Bipolaris* étaient autrefois attribuées au genre *Helminthosporium*. Cependant, les genres d'*Helminthosporium* ont été redéfinis, et sont actuellement séparés en trois genres anamorphiques : *Bipolaris*, *Drechslera* et *Exserohilum*; chacun d'eux possède un stade téléomorphique (forme sexuée) nommé respectivement *Cochliobolus*, *Pyrenophora* et *Setosphaeria* (Shoemaker, 1959).

B. sorokiniana est signalé depuis plusieurs décennies comme pathogène des céréales en provoquant plusieurs types de maladies tels que la tâche helmintosporienne, la brûlure des épis, la brûlure des semis, la pourriture commune des racines du blé, de l'orge et d'autres céréales et graminées (Zillinsky, 1983 ; Wiese, 1998).

Parmi toutes ces maladies causées par ce pathogène, la tâche helmintosporienne du blé et l'orge est la plus importante, surtout dans les régions caractérisées par une température élevée et une humidité élevée (van Ginkel et Rajaram 1993). Ainsi, on dénombre plus de 1000 espèces végétales qui sont décrites comme des hôtes possibles pour *B. sorokiniana* (Farr et Rossman 2022), y compris les céréales comme le blé tendre et le blé dur, l'orge, le seigle, le maïs, le riz, le millet perlé et le mil (Acharya *et al.*, 2011 ; Gupta *et al.*, 2018 ; Kumar *et al.*, 2002). En 2021, *B. sorokiniana* a été identifié pour la 1^{ière} fois sur la lentille en Algérie et dans le monde (Kouadri *et al.*, 2021 ; Farr et Rossman, 2022).

III.2. Description de l'agent pathogène

Le genre *Cochliobolus* produit des ascocarpes globuleux à col court et des asques cylindriques obclavés contenant des ascospores filiformes (Figure 9).

Le mycélium de *B. sorokiniana* est brun olive. Il produit des colonies grises claires au début de la croissance sur le milieu PDA, puis dérivent vers le noir à noir olivâtre. Les conidiophores sont bruns, dressés, non ramifiés, simples ou groupés, cloisonnés et mesurent $6-10 \times 52-310 \mu\text{m}$ (Figure 10). Les conidies sont droites à légèrement incurvées, oblongues, fusiformes à largement ellipsoïdes, brun olive à brun foncé mesurent $10-28 \times 31-120 \mu\text{m}$, effilées vers l'extrémité ayant 3 à 12 parois transversales épaisses appelées distosepta (Manamgoda *et al.*, 2014).

Dans le tissu de l'hôte, il produit un mycélium cloisonné, qui se ramifie à la fois en inter et intracellulaire. Les conidiophores se forment à travers les stomates, les épidermes rompus ou les blessures et produisent successivement des conidies sur de nouveaux points de croissance (Manamgoda *et al.*, 2014).

III.3. Symptomatologie de la maladie

Les symptômes causés par *B. sorokiniana* se manifestent presque sur la plante entière (les racines, le collet et les feuilles de base, les arêtes des épillets, les glumes et les graines). La tâche helminthosporienne des feuilles est le nom commun de la maladie qui caractérise le principal symptôme sur les feuilles où ils apparaissent des taches allongées à ovales de couleur brun foncé (Figure 11). La taille de ces taches dépend du cultivar et de l'environnement de la culture (Duveiller *et al.*, 2005).

Aux premiers stades de l'infection, il n'y a aucun signe de marge chlorotique. Suite à la colonisation progressive des tissus végétaux, des petites lésions s'étendent très rapidement et atteignent finalement plusieurs centimètres (Figure 11). Lorsque l'infection se produit dans l'épillet, les grains deviennent ratatinés et l'extrémité embryonnaire de la graine devient de couleur foncée. Les jeunes plantules infectées développent des lésions brunes foncées sur les coléoptiles, les couronnes, les tiges et les racines. La mort prématurée des plantules peut survenir avant ou peu après la levée (Chand *et al.*, 2003). Une pourriture commune des racines se traduit alors par des lésions nécrotiques brunes foncées à noires sur les racines, la sous-couronne, les entre-nœuds et la partie basale de la tige. En cas d'infection sévère, les lésions fusionnent souvent pour former des nécroses larges (Jones et Clifford 1983 ; Mathre, 1987). Les plantes affectées par la pourriture commune des racines produisent moins de talles et moins de grains par épi.

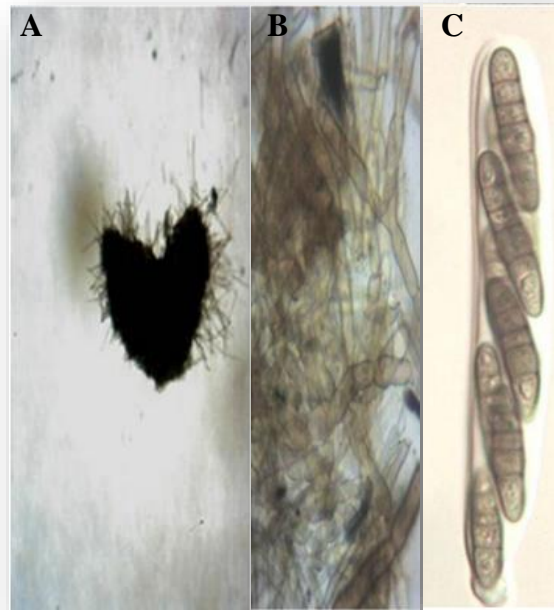


Figure 9: Structures sexuelles de *Cochliobolus sativus* (anamorphe *Bipolaris sorokiniana*) sur la graine d'orge (Sultana *et al.*, 2018) : **A.** Pseudothécie ; **B.** paraphyses ; **C.** asque avec ascospores



Figure 10: Aspect microscopique de *Bipolaris sorokiniana* (Manamgoda *et al.*, 2014) :

A. Conidies sur l'hôte. **B.** Conidiophore sur l'hôte ; **F–K.** Conidiophores produites sur PDA. **C–E, L–Q.** Conidies. Échelle = 5 µm

Figure 11: Symptômes de tache helmintosporienne sur les feuilles de l'orge (Elizabeth, 2010)



III.4. Cycle de vie et de développement de la maladie

L'agent pathogène hiverne dans les graines, les résidus de culture infectés, les repousses, les hôtes alternatifs et dans le sol sous forme de mycélium, de conidies et rarement de pseudothèces ce qui assure l'infection primaire (Reis, 1991 ; Nasraoui, 2008). Les conidies s'adhèrent aux tissus végétaux par l'excrétion d'un substrat mucilagineux. Au bout de 4 à 6 heures, les conidies germent sous des conditions environnementales favorables (humidités élevées et des températures supérieures à 20°C) (Nasraoui, 2008 ; Han *et al.*, 2010). Le champignon pénètre soit par l'intermédiaire de l'appressorium ou directement à travers les stomates. L'hyphe de pénétration continue de se développer et il perce les cellules de la cuticule, de l'épiderme et du parenchyme du tissu foliaire ainsi que la couche externe et interne du cortex du tissu racinaire (Carlson *et al.*, 1991 ; Han *et al.*, 2010). Au cours de son développement sur le tissu végétal, la virulence des souches de *Bipolaris sorokiniana* est accentuée par la production d'un certain nombre de toxines notamment le préhelmintosporol qui est la phytotoxine la plus active et la plus abondante produite par ce champignon (Apoga *et al.*, 2002).

Une fois l'infection soit établie, le champignon produit successivement des conidies (inoculum secondaire), qui sont transmises par le vent par la pluie, permettant à l'agent pathogène de se produire en plusieurs cycles d'infections au cours de la même saison (Figure 11). Par conséquent, ce phénomène augmente le potentiel d'une épidémie (Acharya *et al.*, 2011).

Les graines infectées peuvent être la principale source d'inoculum de *B. sorokiniana*, en particulier dans les zones nouvellement cultivées. La survie des conidies dans le sol pendant plus d'un an et la monoculture constituent une autre source d'infection, et les hôtes

alternatifs tels que les graminées qui peuvent également être un abri pour l'agent pathogène (Pandey *et al.*, 2005). Dans ce même contexte, Neupane *et al.* (2010) ont démontré que les mauvaises herbes n'étaient pas la source initiale d'inoculum de *B. sorokiniana* causant la tâche helmintosporienne du blé mais pouvaient être des hôtes alternatifs de l'agent pathogène pendant la saison où le blé n'est pas cultivé.

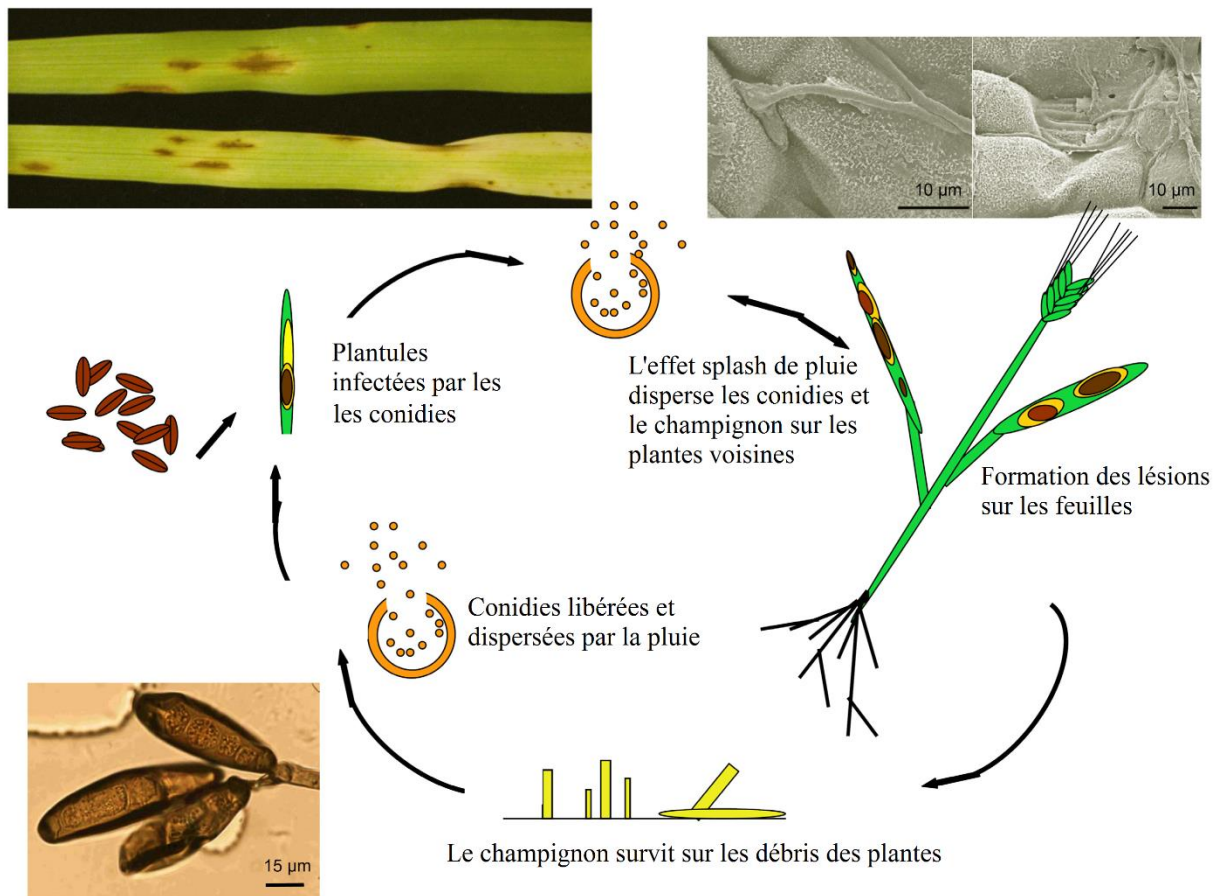


Figure 12: Cycle de vie de *Bipolaris sorokiniana* (Persson, 2008)

III.5. Épidémiologie et importance du pathogène

Le développement de *Bipolaris* et la gravité de la maladie sont directement liés à plusieurs paramètres tels que le travail du sol, l'irrigation, la fertilité du sol, la densité de semis, le stade phénologique des plantes, la pluie, la température élevée et l'humidité relative (Nema et Joshi 1973 ; da Luz et Bergstrom, 1986 ; Saunders, 1988 ; Reis, 1991; Sentelhas *et al.*, 1993; Sharma et Duveiller, 2003 ; Duveiller, 2004 ; Duveiller *et al.*, 2005).

L'infection commence lorsque les conditions favorables deviennent disponibles. La maladie se développe favorablement dans des températures modérées à chaudes allant de

18°C à 32°C et l'infection maximale se produit lorsque la température est d'environ 28°C. Aussi, la maladie est grave lorsque les plantes sont exposées à de longues heures humides ou brumeuses (Nasraoui, 2008 ; Acharya *et al.*, 2011 ; Chowdhury *et al.*, 2013 ; Duveiller *et al.*, 2005 ; Nema et Joshi, 1973 ; Neupane *et al.*, 2010 ; Rosyara *et al.*, 2008, 2010 ; Sharma *et al.*, 2007b ; Sharma et Duveiller, 2004).

Les attaques précoces des racines et du collet tuent généralement la plante. L'infection peut toucher le premier entre-noeud et provoquer une réduction de la circulation de la sève (Nasraoui, 2008). La tâche helminthosporienne endommage plus gravement les feuilles inférieures et progresse des parties inférieures vers les parties supérieures des plantes.

Les pertes dues à la tâche helminthosporienne sont importantes, en particulier dans les régions les plus chaudes du monde. Ils peuvent atteindre 16 à 43 % (Sharma et Dubin, 1996 ; Duveiller et Sharma, 2009 ; Ayana *et al.*, 2018 ; Devi *et al.*, 2018). De plus, les régions de l'Asie du Sud sont les plus affectées par cette maladie (Van Ginkel et Rajaram, 1998 ; Joshi *et al.*, 2007 ; Sharma *et al.*, 2018 ; Sultana *et al.*, 2018).

Au Népal, la perte a été signalée jusqu'à 23,8% (Shrestha *et al.*, 1997). Néanmoins, Duveiller et Gilchrist (1994) et Mehta (1998) ont déclaré que la tâche helminthosporienne a entraîné une perte de rendement substantielle atteignant 100%. De même, des pertes de rendement allant jusqu'à 2 à 22 % au Bangladesh ont été signalées par Siddique *et al.* (2006).

III.6. Composés phytotoxiques produits par *B. sorokiniana*

La virulence de *B. sorokiniana* s'est avérée positivement corrélée avec le niveau de mélanine et d'enzymes lytiques extracellulaires telles que la cellulase et la pectinase dans les souches isolées de l'orge (Chand *et al.*, 2014). Différentes espèces de *Bipolaris* produisent également une gamme de composés phytotoxiques, notamment le préhelminthosporol, l'helminthosporol, l'acide helminthosporique et le sorokinianine (Figure 13). Le préhelminthosporol (C₁₅H₂₂O₂), que l'on pense être le plus abondant et le plus active de ces toxines, est un sesquiterpène hydrophobe de faible stabilité thermique et de faible solubilité dans l'eau (Carlson *et al.*, 1991). Il interfère avec les protéines de la membrane plasmique impliquées dans l'absorption des nutriments et les ions (Olbe *et al.*, 1995).

Le préhelminthosporol est utilisé pour la synthèse de l'helminthosporol, qui à son tour donne de l'acide helminthosporique. Ces deux composés sont des régulateurs de croissance des plantes et sont connus pour inhiber la germination des graines et la croissance des hypocotyles/radicelles (Qader *et al.*, 2017). Le sorokinianine est également un sesquiterpène et il a été démontré qu'il a un effet inhibiteur sur la germination des graines (Nakajima *et al.*,

1994). Jahani *et al.* (2006, 2014) ont identifié le composé bipolaroxine, qui entraîne des lésions jaunes ou nécrotiques lorsqu'il est déposé sur une feuille de blé.

Une étude portant sur 12 isolats de *B. sorokiniana*, a montré que la virulence de l'agent pathogène est corrélée avec le niveau de toxine produite ; la souche la plus virulente (B25) a montré le niveau de toxine le plus élevé tandis que la souche la moins virulente (B7) s'est avérée avoir une concentration relativement beaucoup plus faible de la toxine, ce qui suggère que la virulence dépend également du niveau de la toxine (Jahani *et al.*, 2006).

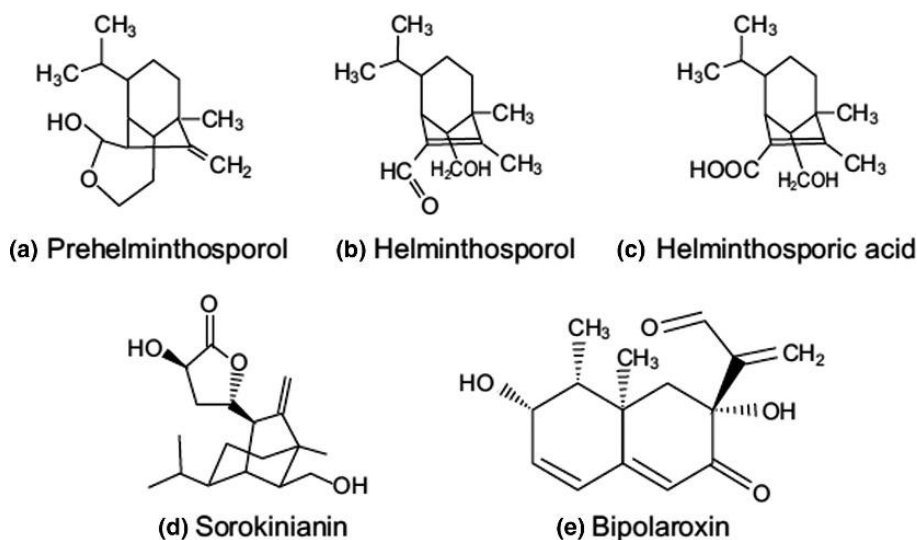


Figure 13: Les structures chimiques des cinq principales phytotoxines produites par *Bipolaris sorokiniana* : (a) prehelminthosporol, (b) helminthosporol, (c) acide helminthosporique, (d) sorokinianine, et (e) bipolaroxine (Kumar *et al.*, 2002).

III.7. Méthodes de lutte contre les maladies causées par *B. sorokiniana*

Les maladies causées par *B. sorokiniana* peuvent être contrôlées de plusieurs manières. La lutte intégrée est de loin la meilleure méthode de contrôle du pathogène (Mehta, 1993 ; Dubin et Duveiller, 2000). En générale, la lutte intégrée contre les champignons phytopathogènes est l'une des stratégies les plus importantes à suivre pour réduire l'effet des maladies fongique sur les cultures. Une approche prometteuse pour atteindre cet objectif tout en minimisant l'utilisation de pesticides et en combinant des différentes pratiques agricoles qui contribuent à augmenter le rendement des cultures en diminuant directement ou indirectement les maladies des plantes. Un tel programme intègre l'utilisation de pratiques culturales, les variétés résistantes, la lutte biologique et l'application du fongicide foliaire ainsi que le traitement des semences.

III.7.1. Pratiques culturales

Les pratiques culturales consistent essentiellement à instaurer les conditions défavorables au développement et à la dissémination de l'agent pathogène. Ces pratiques visent à éliminer les sources d'inoculum et à prévenir la propagation des agents pathogènes. Des préconisations consistent à éliminer les résidus des cultures et les tissus infectés, les graminées adventices et les céréales spontanées (Diehl *et al.*, 1982).

La sélection de semences exemptes de maladies et la fertilisation appropriée permet également à contrôler efficacement la gravité de la tâche helminthosporienne. Au Brésil, il est recommandé de ne pas planter un lot de semences avec plus de 30% de semences infectées afin de limiter l'incidence de cette maladie (Reis, 1991).

Les macro et micronutriments sont depuis longtemps reconnus comme étant associés à l'amélioration de la taille, la qualité des grains et le rendement des cultures. En outre, l'objectif de l'apport de nutriments est aussi de protéger les cultures contre les agents pathogènes. À cet égard, des études ont été menées pour indiquer le rôle de la potasse dans la réduction de la gravité de la tâche helminthosporienne (Krupinsky et Tanaka, 2000 ; Regmi *et al.*, 2002 ; Duveiller, 2004). Au cours des années 2001 et 2002, une étude sur le terrain a été réalisée à Rampur, au Népal, en utilisant deux variétés de blé (Bhrikuti et Sonalika) pour déterminer l'effet de la fertilisation à l'azote, au phosphore et au potassium sur la réduction de la sévérité des tâches. Les résultats ont montré que l'application équilibrée de ces éléments a réduit la gravité de la maladie de 15 et 22 % sur les 2 variétés respectivement (Sharma *et al.*, 2006).

Le potassium aide à prévenir le développement de la maladie en empêchant la multiplication, le développement et la survie de l'agent pathogène, ainsi qu'en empêchant l'établissement du champignon et sa propagation dans la plante (Perrenoud, 1990). Contrairement, l'application d'azote seul sans phosphore et potassium entraîne une augmentation de la sévérité de la tâche helminthosporienne (Singh *et al.*, 2012).

La rotation des cultures avec des cultures non hôtes en combinaison avec les traitements fongicides peuvent contrôler la tâche helminthosporienne (Reis *et al.*, 1998). Cependant, la nature polyphage de *B.sorokiniana* et son comportement héli-biotrophe sembleraient limiter l'intérêt de cette technique.

Le lin (*Linum usitatissimum*) et la moutarde d'Abyssinie (*Brassica carinata*) cultivés en alternance avec le blé ont été prouvés à réduire l'inoculum de *B.sorokiniana* (Malaker *et al.*, 2008 ; Campanella *et al.*, 2020).

La rotation des cultures peut également être combinée à la fertilisation. S̆varta et Bims̆teine (2019) ont indiqué que la fertilisation équilibrée et la rotation de culture devraient faire partie des stratégies de lutte intégrée contre la tâche helminthosporienne chez le blé.

III.7.2. Variétés résistantes

Aucune résistance complète à la tâche helminthosporienne n'a été signalée chez le blé, mais il a été signalé que les cultivars du blé se différencient en terme de résistances à la maladie (Al-Sadi, 2021). Par conséquent, la sélection de cultivars résistants est la meilleure option pour gérer la tâche helminthosporienne à long terme (Gupta *et al.*, 2018a). Elle devrait permettre de réduire l'utilisation des fongicides et les pertes de rendement. Selon Tembo *et al.* (2018), sur 150 génotypes de blé criblés en Zambie, les génotypes 19HRWSN6, 19HRWSN7 et 19HRWSN15 ont exprimés une résistance à la maladie. De plus, une étude sur 60 génotypes de blé au Népal a indiqué que le génotype NL750 avait un niveau élevé de résistance à la tâche helminthosporienne, tandis que le génotype tolérant BL1473 est capable de produire de bons rendements malgré les niveaux élevés de maladie (Sharma *et al.*, 2004 ; Rosyara *et al.*, 2007).

III.7.3. Lutte biologique

La lutte biologique vise à contrôler les agents phytopathogènes aux moyens de microorganismes antagonistes.

La résistance naturelle du blé à l'égard de *B. sorokiniana* s'avère faible (Agarwal *et al.*, 2004). Cependant, il existe une possibilité de contrôle biologique de cette maladie (Mandal *et al.*, 1999).

Plusieurs microorganismes antagonistes se sont révélés capables de lutter contre le *B. sorokiniana* lors de travaux réalisés sur divers hôtes. Des études menées ont souligné le rôle du champignon *Chaetomium globosum* dans le contrôle de la tâche helminthosporienne du blé (Biswas *et al.*, 2000). Ainsi, une étude réalisée par Singh *et al.* (2018) a mis en évidence l'effet antagoniste des isolats fongique de *Trichoderma spp.* vis-à-vis *Bipolaris sorokiniana* à la fois dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. Le traitement des semences et du sol par *Trichoderma spp.* a montré que le dernier à diminuer la gravité des tâches helminthosporienne sur le blé et l'orge.

Dans une étude sur l'efficacité de 195 souches bactériennes pour contrôler *B. sorokiniana*, la souche *Bacillus subtilis* TE3 s'est avérée la plus efficace pour contrôler la maladie (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). Les mécanismes d'action de la souche bactérienne

antagoniste se faisaient par la colonisation de la phyllosphère du blé et la sécrétion des composés antimicrobiens produits par la bactérie. Cependant, l'efficacité des agents de lutte biologique est généralement limitée par les facteurs environnementaux et les conditions de croissance.

La résistance des plantes contre cette maladie peut être induite à l'aide de certains micro-organismes et composés. Il a été constaté que l'application combinée de *Trichoderma harzianum* et de jasmonate de méthyle améliore les activités des enzymes liées à la défense, notamment la catalase, l'ascorbate peroxydase, la phénylalanine lyase et la peroxydase (Singh *et al.*, 2019). De plus, le jasmonate de méthyle est connu pour inhiber la germination des spores de *B. sorokiniana*.

En outre, Sharma *et al.* (2018) ont montré que l'acide salicylique et l'acide syringique étaient négativement corrélés à la sévérité de la tâche helmintosporienne, indiquant leur rôle dans la défense contre la maladie.

III.7.4. Lutte chimique

La lutte contre la tâche helmintosporienne par les fongicides de synthèse se fait principalement par des traitements des feuilles et de la semence. Il ressort des différents tests d'efficacité de traitement foliaire que le carbendazime, difénoconazole, propiconazole, Azoxystrobine, époxiconazole, flusilazole, prochloraze, pyraclostrobine et tébuconazole sont les plus efficace contre cette maladie (Singh et Singh, 2007 ; Nasraoui, 2008 ; Ishikawa *et al.*, 2012 ; Yadav *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2017 ; Castro *et al.*, 2018 ; Navathe *et al.*, 2019). L'utilisation du fongicide Opus (Epoxyconazole) a réduit la gravité de la maladie à moins de 10 %, ce qui suggère sa valeur dans le contrôle des cultivars de blé résistants à la tâche helmintosporienne (Duveiller *et al.*, 2005 ; Sharma-Poudyal *et al.*, 2005). L'application de fongicides a permis de réduire la sévérité de la maladie et entraîné une augmentation des rendements en grains de plus de 10 à 30% en Suède et en Argentine comparativement aux parcelles non traitées (Castro *et al.*, 2018 ; Djurle *et al.*, 2018).

Les semences constituent l'une des principales sources d'infection pour *Bipolaris*. Par conséquent, le traitement des semences avec un fongicide approprié réduit le potentiel de transfert de l'inoculum, mais à moins que l'inoculum du sol ne soient réduits, les traitements des semences n'offrent aucun avantage.

Bien que plusieurs types de fongicides systémiques sont disponibles pour le traitement des semences, la décision de traiter les semences doit être réfléchi. Le traitement des semences est recommandé sur la base de l'état sanitaire des semences, du sol et de la rotation

des cultures (Reis, 1991). Toutefois, le traitement des semences avec des fongicides tels que captane, mancozèbe, manèbe, thirame, fludioxonil, prochloraze, thiabendazole et triticonazole sont utiles pour protéger les graines en germination et les jeunes plantules contre les brûlures des semis (Stack et McMullen, 1988 ; Mehta, 1993 ; Nasraoui, 2008).

Cependant, bien que plusieurs fongicides chimiques soient efficace contre la tache helminthosporienne, leurs applications doivent être raisonnées compte tenu les conséquences néfastes sur l'homme et l'environnement, ainsi que la possibilité d'apparition de souches résistantes (Vinale *et al.*, 2008a).

IV. La pourriture charbonneuse causée par des espèces de *Macrophomina*

IV. La pourriture charbonneuse causée par des espèces de *Macrophomina*

IV.1. Historique et taxonomie de *Macrophomina*

Macrophomina est un champignon tellurique qui provoque la pourriture des racines, des tiges, des feuilles, des fruits et des graines de plusieurs cultures importantes. L'examen du tissu épidermique des plantes infectées révèle généralement la présence de nombreux petits organes de fructifications noires appelées microsclérotés, intégrés dans la tige inférieure et les racines. Ces sclérotés assombrissent les tissus pourris. Ce phénomène de pourriture dû à *Macrophomina* est appelé maladie de la pourriture charbonneuse, également connue sous le nom de pourriture sèche (Islam *et al.*, 2012)

Le genre *Macrophomina* (téléomorphe : *Rhizoctonia*) appartient au phylum des Ascomycètes, classe des Dothideomycètes, Ordre des Botryosphaerales et la famille des Botryosphaeriaceae. Le terme « *Macrophomina* » a été utilisé pour la première fois par Goidanich en 1947 (Dhingra et Sinclair, 1978).

Le genre *Macrophomina* a fait l'objet d'une série de révisions au cours de ces 100 dernières années. Il a été initialement nommé *Rhizoctonia bataticola* par Halsted en 1890 après avoir observé les sclérotés sur les racines de la patate douce (*Ipomoea batatas*). En 1901, Tassi a décrit les spores produites sur le haricot et le champignon fut nommé *Macrophoma phaseolina*. Puis, il a été renommé par Maublanc en 1905 comme étant *Macrophoma phaseoli* (Dhingra et Sinclair, 1978 ; Ashby, 1927).

En 1916, Sydow et Butler ont décrit un champignon similaire avec des sclérotés noirs et l'ont nommé *Macrophoma cajani* (Dhingra et Sinclair, 1978 ; Nene et Sheila, 1996 ; Babu *et al.*, 2010). Le même champignon a été appelé par Swada *M. corchori* et *M. sesame* isolé à partir du jute et le sésame respectivement (Muriel et Thirtjmalachar, 1977 ; Kaur *et al.*, 2012).

En 1923, Petrak a confondu l'espèce *M. phaseolina* avec *M. philippinensis* ayant un stroma et posant des spores hyalines, à parois minces, longues, étroites et aseptées (Muriel et Thirtjmalachar, 1977). Cependant, les découvertes de Petrak ont déjà été décrites par Tassi comme des pycnides immatures et un tel champignon a été inclus dans le genre *Macrophoma*, qui a été défini comme un groupe hautement hétérogène par Petrak.

Le chercheur Ashby a examiné les espèces *M. cajani*, *M. corchori*, *M. sesame* et *M. philippinensis*, et a conclu que ces espèces sont identiques (Ashby, 1927 ; Kulkarni et Patil, 1966).

Finalement, le chercheur Goidanich a comparé *Macrophoma phaseoli* avec toutes les espèces trouvées par les chercheurs ultérieurs, ainsi que *M. phaseolina* de Tassi et a trouvé qu'elles étaient toutes identiques. Il a donc confirmé l'authenticité de *Macrophoma phaseolina* et a proposé le nouveau *Macrophomina phaseolina*, puisque *phaseolina* était la première espèce décrite par Tassi. Sa proposition de nommer *M. phaseolina* comme stade pycnidien de *R. bataticola* a été acceptée comme nom valide par « Code international de nomenclature botanique » en 1947 (Dhingra et Sinclair, 1978).

Actuellement, *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. 1947 est officiellement reconnu comme le nom taxonomique correct (description CMI des champignons et bactéries pathogènes n° 275) avec la phase sclérotique connue sous le nom de *Rhizoctonia bataticola* (Holliday et Punithalingam, 1970).

M. phaseolina a été la seule espèce décrite du genre *Macrophomina* jusqu'au 2014. Après cela, quatre nouvelles espèces similaires ont été identifiées : *M. pseudophaseolina* (Sarr *et al.*, 2014), *M. euphorbicola* (Machado *et al.*, 2019), *M. vaccinii* (Zhao, 2019) et *M. tecta* (Figure 14) (Poudel *et al.*, 2021).

M. pseudophaseolina est la 2^{ème} espèce décrite du genre *Macrophomina* et qui a moins de gamme d'hôtes que *M. phaseolina*. Cependant, il a été démontré qu'il est aussi dommageable ou plus agressif que *M. phaseolina* en termes de gravité (Mbaye *et al.*, 2015). *M. pseudophaseolina* a été identifié pour la première fois au Sénégal associé à l'arachide (*Arachis hypogaea*), le niébé (*Vigna unguiculata*) et le gombo (*Abelmoschus esculentus*) (Sarr *et al.*, 2014). Au Brésil, il a été signalé sur le cotonnier (*Gossypium hirsutum*), l'arachide (*A. hypogaea*), le manioc (*Manihot esculenta*), le ricin commun (*Ricinus communis*) et le jatropha (*Jatropha curcas*) (Machado *et al.*, 2019). En outre, il a été trouvé associé à deux autres espèces végétales : *Boerhavia diffusa* et *Trianthema portulacastrum* (Negreiros *et al.*, 2019). Plus tard, *M. pseudophaseolina* a été signalé en Inde sur *Coleus forskohlii* (Mastan *et al.*, 2019). En 2021, *Macrophomina pseudophaseolina* a été signalé pour la 1^{ère} fois en Algérie en tant que nouveau pathogène des plants de lentilles provoquant la pourriture charbonneuse (Kouadri *et al.*, 2021).

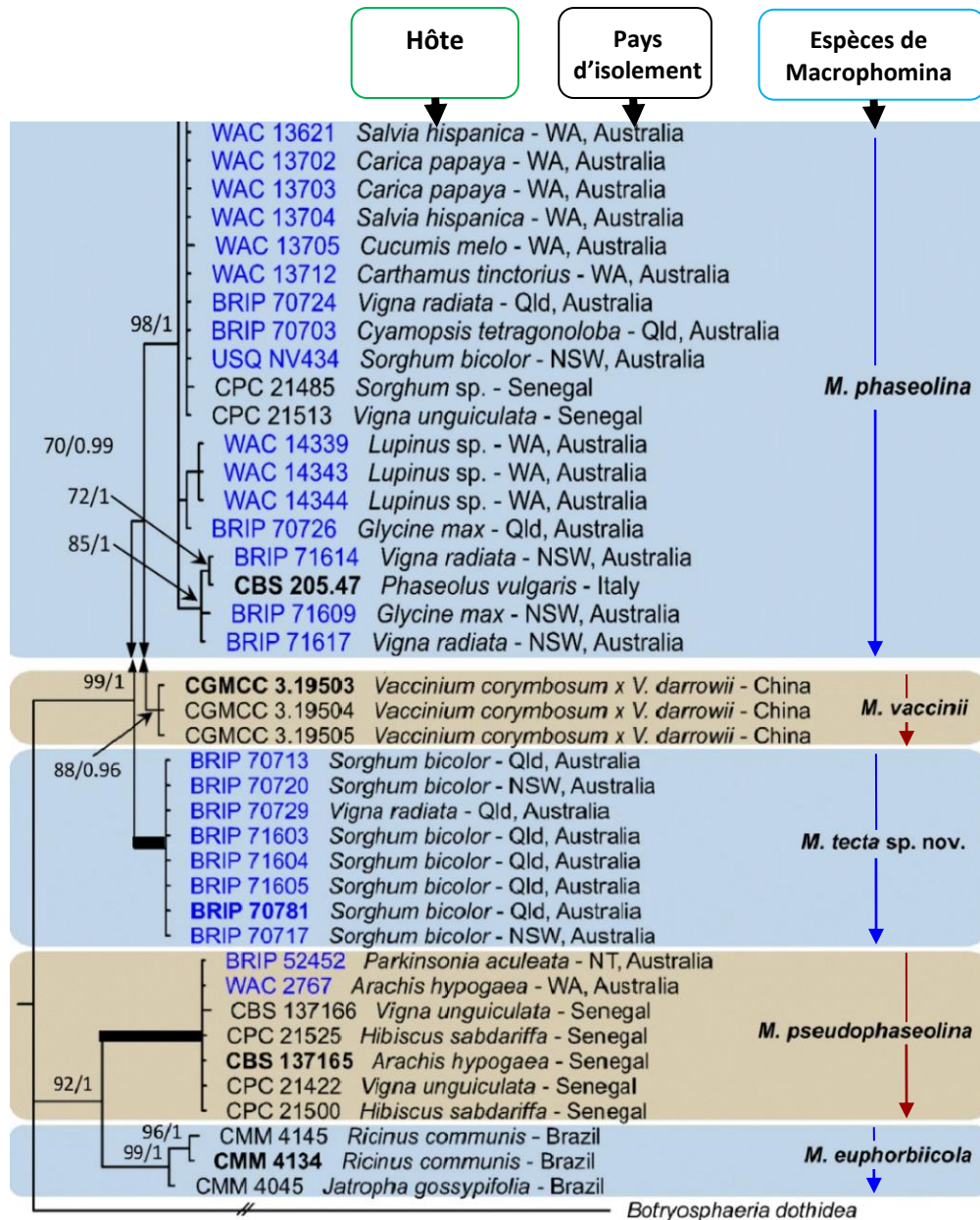


Figure 14: arbre phylogénétique montrant les espèces de genre *Macrophomina*, les pays et les hôtes d'isolement (Poudel *et al.*, 2021).

IV.2. Morphologie de *Macrophomina*

Sur le milieu de culture gélosé, la couleur des colonies de *Macrophomina* varie du noir au brun ou au gris et devient de couleur foncée sur des cultures âgées (Figure 15). Il se caractérise par un mycélium duveteux très ramifié, d'abord hyalin puis noir ou gris avec une paroi mince (Kaur *et al.*, 2012). Très rapidement, ce mycélium forme des microsclérotés denses, noirs sphériques, ovales ou oblongues, brun clair à foncé, leurs diamètres varient de 50 à 450 μm selon l'hôte et le milieu de culture utilisé. Les sclérotés possèdent un pigment mélanine qui leur confère une protection contre les conditions environnementales défavorables.

Les pycnides, rarement observés dans des conditions naturelles sont noirs et globuleuses de 100 à 300 μm avec des ostioles par lesquels sont libérés des conidies unicellulaires typiquement hyalines, de forme ovale ou elliptique avec une base tronquée qui finit par s'arrondir et mesure environ de 5–10 \times 14–30 μm (Lakhran *et al.*, 2018).

Au niveau morphologique, les deux espèces *M. phaseolina* et *pseudophaseolina*, sont très similaires sauf que les conidies de ce dernier semblent un peu plus courtes (2,5–3 \times 5–8 μm) (Figure 16) (Sarr *et al.*, 2014).

M. phaseolina ne possède pas de stade téléomorphe. Cependant, il possède une forme asexuée où l'espèce est considérée comme *Rhizoctonia bataticola* (Ashby, 1927).

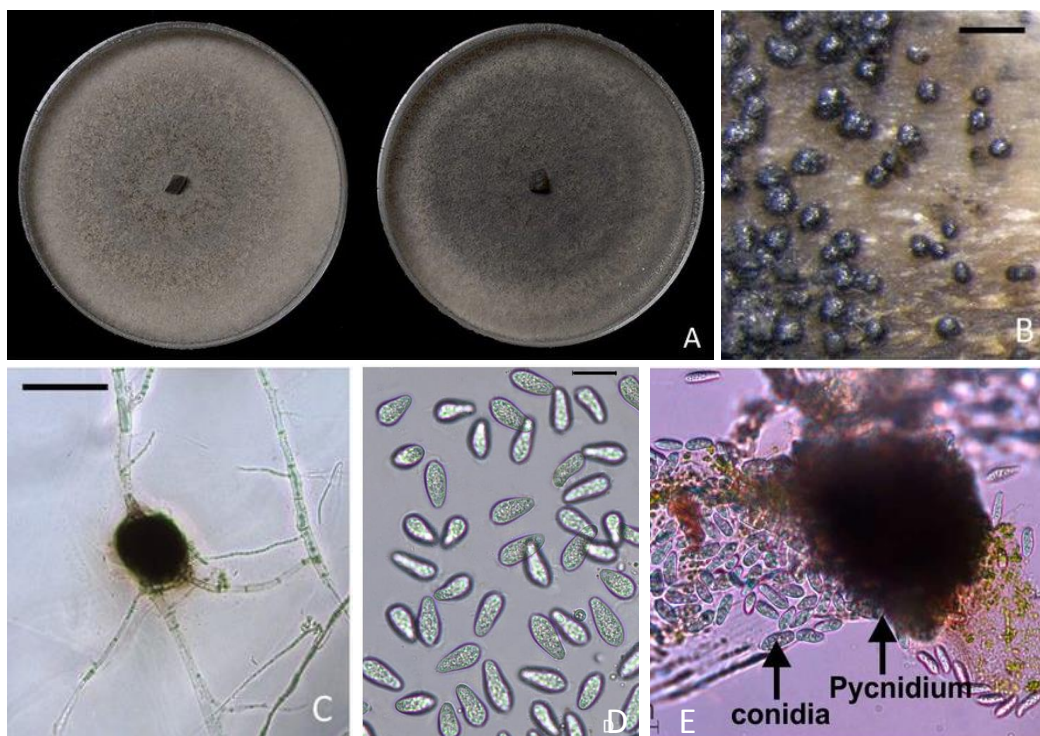


Figure 15: Caractéristiques morphologiques de *Macrophomina phaseolina*

(A) colonies sur milieu PDA après 10 jours d'incubation à 25 ± 1 °C dans l'obscurité ; (B,C) microsclérotés sur bois de pistachier et un agrandissement sur un microsclérote sur eau gélosée ; (D) conidies produites à partir de pycnides matures se formant sur un milieu gélosé à la feuille de pistache ; (E) pycnide et pycniospores
Barre d'échelle en B = 300 μm ; en C = 60 μm ; et en D = 20 μm .

(Nouri *et al.*, 2020, Sarkar *et al.*, 2014)

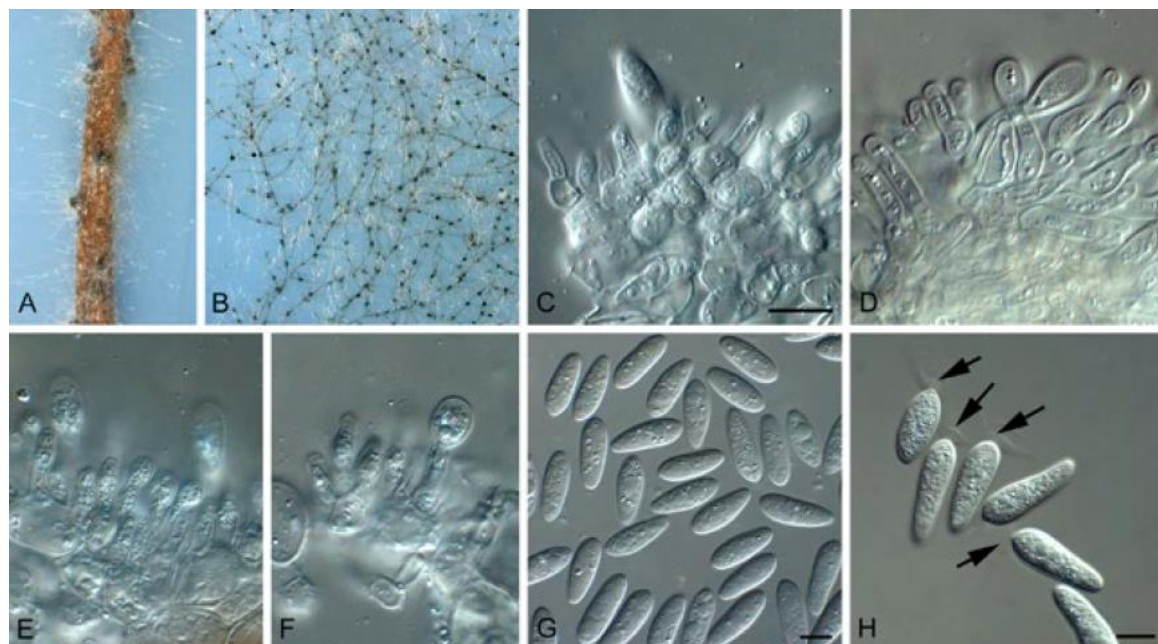


Figure 16: *Macrophomina pseudophaseolina*:

A : Formation de pycnides sur gélose aux aiguilles de pin. **B** : Sclérotés sur gélose à l'eau.

C–F : Cellules conidiogènes. **G, H** : Macroconidies avec appendices apicaux (flèches).

Barres d'échelle = 10 μ m (Sarr *et al.*, 2014).

IV.3. Symptômes causés par *Macrophomina*

Les plantes infectées par la pourriture charbonneuse montrent une perte de vigueur, un jaunissement et une sénescence des feuilles qui restent attachées aux tiges par les pétioles (Figure 17), la desquamation des tissus corticaux de la tige inférieure et de la racine pivotante, l'aspect gris ou argenté des tissus épidermiques et sous-épidermiques ainsi que l'abondance et la formation de microsclérotés jusqu'à ce que les tissus soient secs (Khamari *et al.*, 2016).

M. phaseolina peut infecter plus de 500 espèces de plantes cultivées et sauvages affectant presque toutes les parties de la plante (Cohen et coll, 2016).

L'agent pathogène développe différents symptômes en fonction de l'espèce végétale et du stade de la culture attaquée. Ces symptômes peuvent généralement inclure la fonte des semis ou la brûlure des semis (jute, sorgho, betterave à sucre, gombo, arachide), la pourriture sèche des racines (chez les membres de la famille des Fabacées), la pourriture charbonneuse (sorgho, maïs, soja, arachide, coton, pomme de terre, lentille), pourriture de la tige (ricin, Aubergine, piment) et pourriture des graines (pois cajan, pois chiche, arachide, niébé, tournesol, coton et cucurbitacées) (Das *et al.*, 2015).

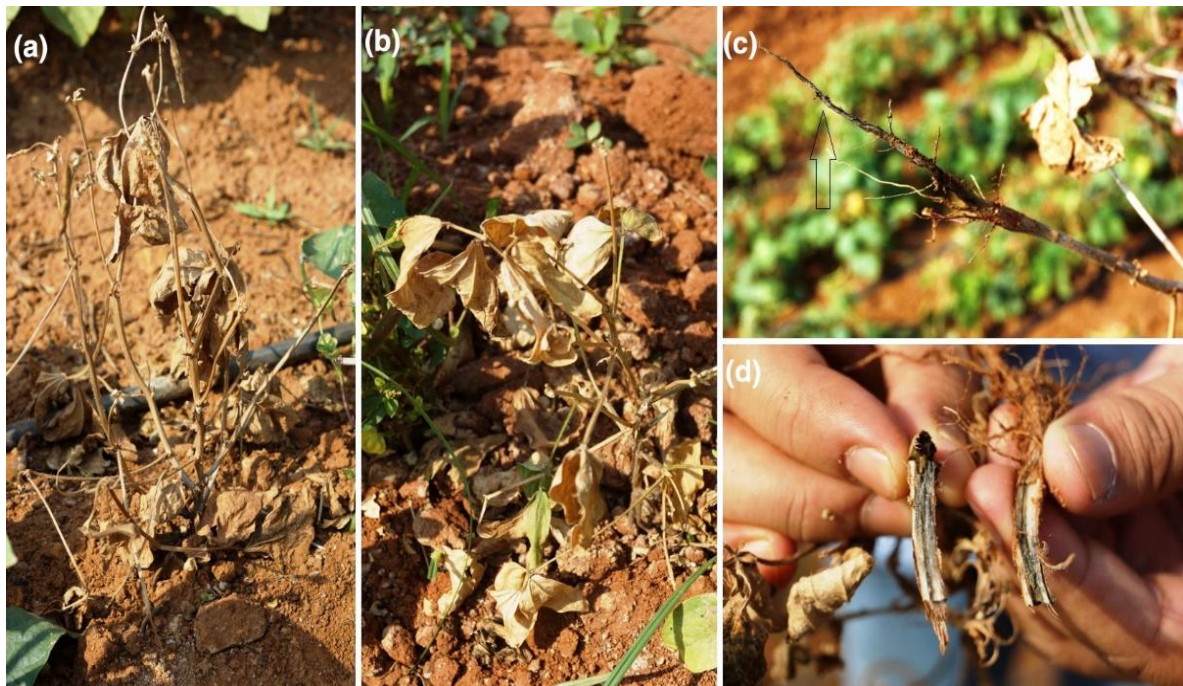


Figure 17: les symptômes de pourriture charbonneuse sur haricot (Basandrai *et al.*, 2021)

IV.4. Cycle de vie et de développement de la maladie

L'infection des plantes se fait principalement au moyen des microsclérotés qui sont des structures de résistance capable de survivre jusqu'à 15 ans dans le sol, sur les résidus de culture et même dans les graines (Gahlot, 2018). Ces microsclérotés restent dormantes jusqu'à la stimulation de leur germination par les exsudats racinaires. Ces microsclérotés stimulés produisent de nombreux hyphes qui pénètrent et colonisent les tissus racinaires de la plante hôte (Figure 18). Son cycle de vie comprend quatre phases : la phase de germination, la phase de pénétration, la phase parasitaire et la phase saprophyte (Dhingra et Sinclair, 1978).

Au fur et à mesure que la maladie progresse, l'agent pathogène entre dans une phase saprophyte au cours de laquelle la dégradation des cellules hôtes commence et qui entraîne une décoloration noire typique des racines de l'hôte (Gupta *et al.*, 2012a).

La nécrose des tissus de l'hôte provoque également la fragilité des tissus racinaires et l'absorption inadéquate de l'eau et de nutriments par l'hôte qui entraînant un arrêt de la croissance des plantes et une réduction du rendement (Lodha et Mawar, 2020). Les plantes gravement infectées meurent précocement suite à l'action des toxines produites par le champignon, comme Phaséolinone, soit à l'envahissement des hyphes fongique qui

provoque l'obstruction des vaisseaux de l'hôte, soit de ces causes combinées (Basandrai *et al.*, 2021).

La phase saprophyte du champignon dans le tissu hôte se présente sous forme de mycélium, des pycnides et des microsclérotos. Les microsclérotos germent et produisent des hyphes. Après la décomposition des débris végétaux dans le champ, les microsclérotos sont libérés dans le sol. Les températures de 28 à 35 °C et une humidité relativement faible (40 %) sont favorables à l'infection des plantes hôtes.

L'étude de pouvoir pathogène de *Macrophomina phaseolina* et *M. pseudophaseolina* établie par Ndiaye sur trois variétés de niébé à deux régimes de température, à révéler de faibles différences de pathogénicité entre les deux champignons. Cependant, *M. pseudophaseolina* semblait être un peu plus agressif sur la variété sensible à la température élevée testée (36°C) avec plus de microsclérotos par tissu et moins de production de biomasse dans la variété (Ndiaye *et al.*, 2015).

M. phaseolina présente une variabilité génétique, pathogénique et physiologique importante. La distribution de ce champignon montre une corrélation significative avec l'humidité relative, la température du sol et l'humidité du sol, qui contribuent ensemble à l'infection et à la propagation de *M. phaseolina* (Pandey et Basandrai, 2021).

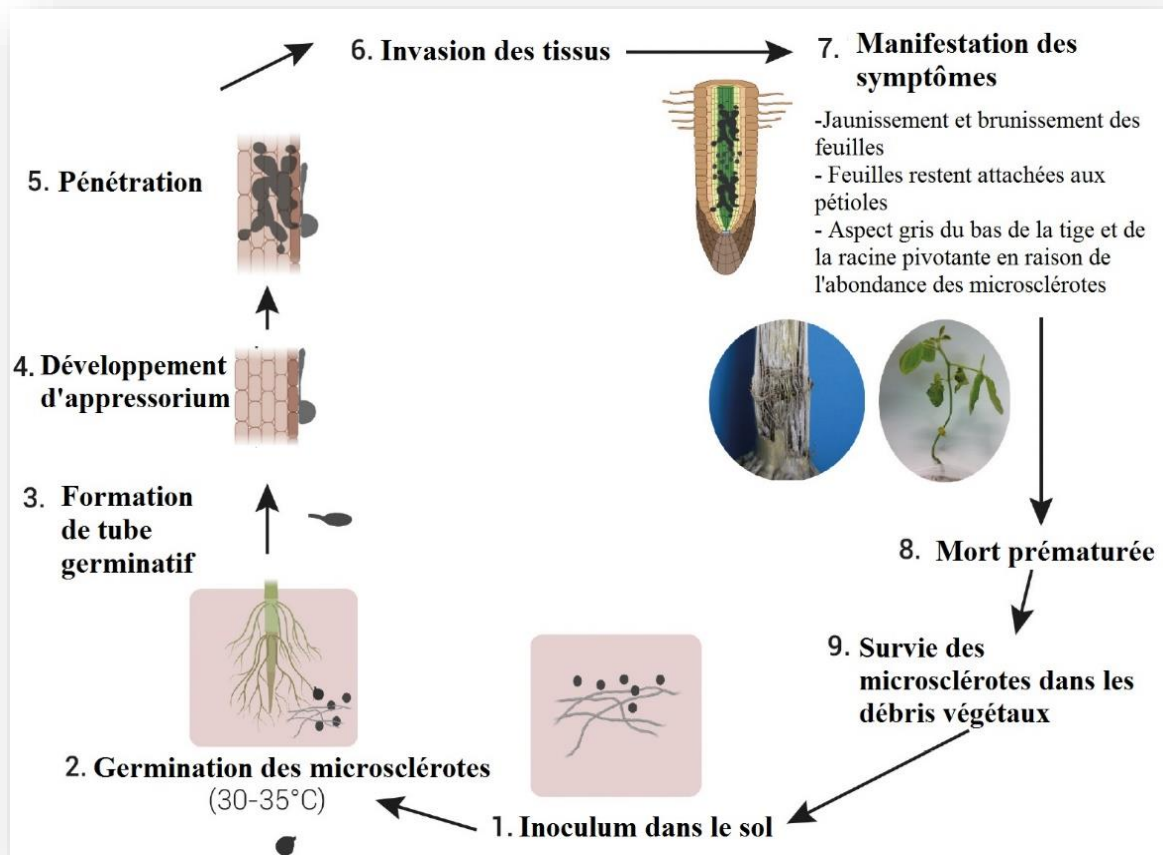


Figure 18: cycle de vie de *Macrophomina phaseolina* (Marquez *et al.*, 2021)

IV.5. La virulence de *M. phaseolina*

Le génome de *M. phaseolina* code pour un large répertoire de gènes associés à la pathogénicité qui peuvent être impliqués dans la pathogenèse du champignon. Ces différents gènes permettent à *M. phaseolina* d'adhérer au tissu de l'hôte, de neutraliser la défense initiale de l'hôte, de pénétrer et d'envahir l'épiderme des plantes. Une fois dans l'hôte, l'agent pathogène libère une gamme de différentes phytotoxines et enzymes dégradant la paroi cellulaire et finalement perturbe la défense de l'hôte, entraînant la mort de la cellule hôte et l'établissement de la maladie (Islam *et al.*, 2012).

La caractéristique majeure de *M. phaseolina* est sa grande capacité de produire des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polysaccharides de la paroi cellulaire et les lignocelluloses pour pénétrer dans le tissu hôte. Cela comprend : les endoglucanases, les exocellobiohydrolases et les β -glucosidases pour l'hydrolyse de la cellulose ; et laccases, lignine peroxydases, galactose oxydases, haloperoxydases, chloroperoxydases, et peroxydases hémique pour la dégradation de la lignine. Ainsi, *M. phaseolina* possède le plus grand nombre de laccases et d'enzymes cellulolytiques par rapport aux d'autres espèces fongiques et levures (par exemple, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans* et *Saccharomyces cerevisiae*) (Islam *et al.*, 2012 ; Bandara *et al.*, 2018). La production et l'activité de ces enzymes dégradant les parois cellulaires végétales ont été confirmées dans des conditions de culture in vitro (Ramos *et al.*, 2016).

De plus, des métabolites phytotoxiques produits par *M. phaseolina* ont été décrits, notamment le phaséolinone, la botryodiplodine et la patuline, qui joueraient un rôle dans les premiers stades de l'infection, provoquant le flétrissement des plantules et la formation de lésions nécrotiques sur les feuilles et les racines (Abbas *et al.*, 2020 ; Salvatore *et al.*, 2020). Cela augmente la virulence de *M. phaseolina* qui contribue comme un mécanisme d'action très efficace sur différents hôtes et tissus. La grande adaptabilité du champignon aux différentes conditions environnementales contribue également à sa distribution ubiquiste et à son infectiosité des plantes (Islam *et al.*, 2012 ; Salvatore *et al.*, 2020). Cette adaptation consiste en l'expression de gènes de détoxification (tels que le cytochrome P450, Cof, la superoxyde dismutase) pour contrer la réponse de défense des plantes (Ghosh *et al.*, 2018).

L'analyse du génome de *M. phaseolina* a révélé une séquence de type synthase d'oxyde nitrique avec des séquences d'acides aminés conservées. L'oxyde nitrique (NO) a

été détecté in vitro à l'intérieur du mycélium et dans le milieu environnant, ainsi qu'une concentration élevée dans les tissus de jute infectés. Cela suggère que le NO peut avoir une importance physiologique dans l'interaction nécrotrophe hôte-pathogène (Sarkar *et al.*, 2014).

IV.6. Importance de la pourriture charbonneuse

La maladie de la pourriture charbonneuse est une menace sérieuse pour plusieurs cultures importantes dans le monde, entraînant des pertes de rendement élevées en fonction des conditions environnementales favorables, de la sensibilité du cultivar, du stade de la culture et de la gravité de la maladie (Vyas, 1981).

Des pertes de rendement de 100% ont été enregistrées chez les cultivars d'arachide lorsque la maladie est apparue au stade de pré-émergence (Sharma et Bhowmik, 1986).

Dans la région centrale du Midwest des États-Unis, la pourriture charbonneuse est devenue de plus en plus répandue au cours des 20 dernières années. La réduction de la production de cultures économiquement importantes chaque année en raison de cette maladie mortelle est devenue un problème majeur. Par exemple, le soja, une espèce de légumineuse et l'un des principaux aliments de base dans le monde, est dévasté par cette maladie. La pourriture charbonneuse s'est classée au deuxième rang des maladies les plus courantes après l'infection du soja par le nématode à kyste du soja (NCS) en 2003 et 2012 (Young, 1949 ; Bhandari, 2017).

En 2006, les États-Unis à eux seuls ont perdu environ 6,9 millions de tonnes de soja en raison de la pourriture charbonneuse, soit 1,15 % de la perte mondiale totale par la maladie et 7,58 % de la perte totale due aux 4 principales maladies du soja aux États-Unis. Dans le contexte des 8 principaux pays producteurs de soja, la perte de soja est passée de 2,3 à 2,75 millions de tonnes de 1998 à 2006 (Wrather *et al.*, 2006 ; 2009).

En 2017, la pourriture charbonneuse, qui était considérée comme la deuxième maladie la plus dangereuse du soja en 2003 et 2012, a causé une perte estimée à environ 1,9 million et 2 millions de tonnes de soja respectivement (Romero *et al.*, 2017). Comme la pourriture charbonneuse est si répandue dans de nombreuses cultures à travers le monde, il est devenu un problème important à comprendre et à traiter.

Chez le haricot urd, la pourriture sèche des racines a causé environ 40 % d'incidence de la maladie dans les conditions climatiques indiennes et 29 % de perte de rendement (Indira et Gayatri, 2003 ; Kulkarni *et al.*, 2019).

IV.7. Méthodes de lutte contre les maladies causées par *Macrophomina*

En face d'un champignon redoutable et polyphage qui se conserve et se dissémine par le sol et les semences, il est difficile de développer des méthodes de lutte assez efficaces. Par conséquent, la gestion des maladies causées par ce type de champignons nécessite une gestion intégrée comprenant plusieurs moyens de lutte préventive et curative.

IV.7.1. Pratiques culturales

Pour les agents pathogènes du sol à longue durée de vie tel que *Macrophomina*, les pratiques de gestion reposent sur deux approches principales : éviter l'introduction de l'agent pathogène dans les champs et réduire la gravité de la maladie (Lodha et Mawar, 2020).

L'introduction de l'agent pathogène peut être réduite par l'utilisation de semences propres et maintenir l'hygiène de la ferme pour réduire la dissémination des microsclérotés hivernants. Les microsclérotés de *Macrophomina* peuvent adhérer aux particules de sol et se propager via les machines ou un sol érodé (Rennie *et al.*, 2015).

La bio-solarisation qui combine la biofumigation et la solarisation, s'est avérée efficace pour réduire ou stabiliser la population de microsclérotés de *M. phaseolina* dans le sol, réduisant ainsi l'incidence de la pourriture charbonneuse du fraisier (Chamorro *et al.*, 2015b). Également, une humidité élevée du sol (supérieure à 60 %) a réduit la gravité de la maladie. Cependant, l'irrigation a maintenu des densités de microsclérotés relativement constantes et n'a pas empêché l'infection par *M. phaseolina* (Kendig *et al.*, 2000 ; Jordaan *et al.*, 2019).

La capacité de *Macrophomina* à infecter une large gamme d'hôtes et la forte persistance des microsclérotés font que les stratégies de rotation des cultures et de cultures intercalaires sont moins prises en compte. Pour le cas particulier du sésame, cultivé en association avec le Haricot mungo, une faible incidence de la pourriture de *Macrophomina* ont été rapporté avec un rendement en graines plus élevé par rapport au sésame cultivé seul (Rajpurohit, 2002).

Des approches visant à modifier l'environnement du sol, favorisant les organismes antagonistes interférant avec le pathogène, ont également été tentées. Par exemple, l'adoption de stratégies telles que le semis direct a montré une suppression de *M. phaseolina* favorisée par l'abondance et l'activité microbiennes plus élevées, et le développement des plantes avec des systèmes racinaires plus sains (Perez-Brandán *et al.*,

2012). Egalement, la combinaison de l'irrigation et de l'amendement du sol a augmenté la population de bactéries antagoniste contre *M. phaseolina* (Lodha *et al.*, 1997).

La fertilisation a montré des effets variables sur la sévérité de *M. phaseolina*. La fertilisation phosphatée a montré une réduction, tandis que l'azote a augmenté la gravité de la maladie (Spagnoletti *et al.*, 2018, 2020). L'application de sulfate de zinc a réduit l'incidence de la pourriture sèche des racines et la survie de *M. phaseolina* chez le haricot mungo et le haricot urd (Ansari, 2010 ; Siddiqui *et al.*, 2011). Cependant, ces investigations étaient spécifiques pour les régions étudiées et doivent être validées dans différentes régions bioclimatiques.

IV.7.2. Résistance génétique

Le déploiement de la résistance génétique est une méthode durable, respectueuse de l'environnement, pratiquement faisable et économique pour gérer les maladies des plantes. Cependant, pour *M. phaseolina*, il n'existe pas de résistance verticale connue (basée sur le gène R) inhibant ou limitant l'infection, mais plutôt une résistance partielle qui ne limite pas l'infection mais réduit ou compense les dégâts. Des cultivars de soja, fraise, haricot mungo et haricot vert présentant un certains degrés de résistance à *M. phaseolina* ont été identifiés (Khan *et al.*, 2016, Reznikov *et al.*, 2018 ; Dambal *et al.*, 2019, Gomez *et al.*, 2020).

Lors de l'infection des racines de sésame par *Macrophomina*, des différences de comportement ont été observées chez les variétés de sésame résistantes et sensibles (Chowdhury *et al.*, 2014). La rhizosphère autour de la variété résistante présentait une croissance réduite de *M. phaseolina* par rapport à la variété sensible. De même, Hemmati *et al.* (2018) ont signalé l'incapacité de l'agent pathogène à terminer son cycle de vie chez les cultivars du soja résistants, tandis que les étapes de pré-pénétration dans les racines n'étaient pas liées à la résistance, car ils n'ont pas observé de différences dans la germination des microsclérotés et le développement des hyphes.

La résistance des lignées de haricot mungo et de haricot rouge semble résulter de l'inhibition de la colonisation des agents pathogènes en raison de la forte concentration de phytoalexine et de glycéolline dans les cellules végétales (Lygin *et al.*, 2010). Sharma *et al.* (2014) ont rapporté que des enzymes défensives telles que la chitinase et la stilbène synthase amélioreraient la résistance vis-à-vis *M. phaseolina*, car le niveau d'expression des deux enzymes était significativement plus élevé dans un cultivar résistant de sorgho.

Notamment, l'identification et la cartographie des QTL (Quantitative trait loci) associés à la résistance à *M. phaseolina* ont révélé des gènes candidats ayant un potentiel pour une analyse génomique fonctionnelle plus poussée et pourraient faciliter les progrès de la sélection et de l'ingénierie moléculaire contre ce pathogène (Mahmoud *et al.*, 2018 ; da Silva *et al.*, 2019).

IV.7.3. Control chimique

Le contrôle chimique de *M. phaseolina* est difficile, car il n'existe pas de fongicides systémiques qui se déplacent vers la racine (Marquez *et al.*, 2021). Cependant, une gestion à l'aide de fongicides peut s'avérer nécessaire lorsque les facteurs environnementaux sont propices au développement de la maladie.

Des fongicides systémiques et non systémiques (carbendazime, difénoconazole, bénomyl, azoxystrobine, dazome) à différentes concentrations ont été évalués *in vitro* et *in vivo* contre *M. phaseolina* (Chamorro *et al.*, 2015a ; Parmar *et al.*, 2017 ; Lokesh *et al.*, 2020). Les résultats indiquent que la croissance mycélienne et la formation de sclérotas sont très sensibles au carbendazime (50 ppm) avec un impact qui augmente avec l'augmentation de la concentration de ce fongicide systémique (Lokesh *et al.*, 2020).

Le traitement des semences avec du carbendazime à raison de 2 g m.a./kg de semences réduit la pourriture sèche des racines du haricot mungo et du haricot urd (Athira, 2017).

Aussi, Le thiophanate-méthyl à 1 g m.a./kg de graines s'est montré efficace contre la pourriture sèche des racines car il entrave la croissance de *M. phaseolina* (Athira, 2017).

Bien que l'efficacité de certains fumigants chimiques a été démontrée, les politiques agro-environnementales et la perception négative croissante du public sur les produits agrochimiques ont conduit à l'évaluation et à la comparaison des agents chimiques avec des alternatives plus durables pour contrôler les maladies des plantes causées par *M. phaseolina* (Reznikov *et al.*, 2016 ; Adhikary *et al.*, 2019).

IV.7.4. Lutte biologique

Les agents de lutte biologique et les éliciteurs des défenses des plantes ont fait l'objet d'une attention croissante au cours des dernières décennies. Certains agents de lutte biologique ont un impact direct sur les agents pathogènes, inhibant leur croissance, tandis

que d'autres affectent indirectement l'agent pathogène en suscitant des voies de défense dans la plante hôte.

- **Champignons antagoniste**

Trichoderma spp. sont un champignon antagoniste efficace pour plusieurs champignons phytopathogènes telluriques y compris *M. phaseolina* (Bastakoti *et al.*, 2017). Ces champignons possèdent de multiples mécanismes antagonistes tels que la compétition des nutriments, la production d'antibiotiques et le mycoparasitisme. De plus, certaines espèces sont connues pour leurs effets promoteur de la croissance des plantes et contribuent à renforcer la résistance systémique et cela améliore la santé des plantes (Martinez-Medina *et al.*, 2016).

Les inhibitions de croissance de *M. phaseolina* pendant l'antagonisme étaient positivement corrélées avec la capacité de *Trichoderma* spp. à proliférer et à dégrader le mycélium pathogène. L'induction de la chitinase, de la β -1, 3 glucanase et l'augmentation de la teneur en phénol total ont également été observées, suggérant leur rôle dans l'inhibition de la croissance du pathogène lors de l'antagonisme (Gajera *et al.*, 2012).

En plus d'inhiber la croissance de l'agent pathogène lors de l'interaction directe, la sécrétion des composés organiques volatils microbiens a été observée chez *Trichoderma longibrachiatum* (Sridharan *et al.*, 2020). Ces composés ont réduit la croissance mycélienne de *M. phaseolina* en modifiant la structure mycélienne. Les interactions ont augmenté le niveau de terpénoïdes et entraîné un composé nouvellement exprimé, qui n'a été produit par aucun des organismes avant l'interaction, comme le limonène, l'azulène, le 3-méthyl-1-butanol, le styrène, salicylaldéhyde, undécane et 3-méthylphénol. Ces composés pourraient agir comme molécules de signalisation dans les interactions microbe-microbe et sont de puissants antimicrobiens.

De même, la levure antagoniste *Brettanomyces naardensis*, est un agent de lutte biologique puissant contre *M. phaseolina*, qui colonise les hyphes fongiques provoquant des malformations et des dommages sur le pathogène (Nafady *et al.*, 2019).

Les champignons mycorhiziens arbusculaires sont probablement la symbiose la plus ancienne et la plus répandue sur terre (Smith et Carvil, 1997) formant des associations mutualistes avec une estimation de 72 % des plantes terrestres (Brundrett et Tedersoo, 2018). Ils produisent des changements significatifs dans la plante hôte et son environnement et ont été signalés à plusieurs reprises comme réduisant l'incidence ou la gravité de plusieurs ravageurs et maladies (Zhang *et al.*, 2018 ; Jain et Pundir, 2019). Les

mécanismes décrits vont de la compétition avec les agents pathogènes du sol pour l'espace et les nutriments à la reprogrammation de l'expression des gènes des plantes, en particulier ceux impliqués dans les mécanismes de défense et le métabolisme (Marquez *et al.*, 2018, 2019).

La symbiose mycorhizienne a provoqué une réduction de l'infection des racines par *M. phaseolina* et de la gravité des symptômes de la maladie (Spagnoletti *et al.*, 2017, 2020). Ces observations ont été associées à une diminution des dégâts et au renforcement des mécanismes de réponse de défense, notamment une augmentation significative des teneurs totales en phénol, en proline et de l'activité de la superoxydase (Spagnoletti *et al.*, 2017).

- **Bactéries antagoniste**

Plusieurs bactéries rhizosphériques et associées aux racines ont été isolées et testées pour leurs effets antagonistes contre *M. phaseolina*. Plusieurs isolats se sont avérés assez efficaces pour réduire l'incidence de la maladie et favoriser la croissance de la plante hôte. Parmi celles-ci des espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Serratia* (Kumar *et al.*, 2007 ; Vasebi *et al.*, 2013 ; Mmbaga *et al.*, 2018 ; Hussain et Khan, 2020).

Les isolats de *Bacillus* ont montré une inhibition de croissance importante de *Macrophomina* sp. in vitro, soit en confrontation direct, soit par l'utilisation de filtrats de culture. *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. siamensis* ont montré des activités antifongiques via l'excrétion de composés de la classe des lipopeptides-surfactine. Aussi, des dommages létaux sur les microsclérotos du champignon ont été observés (Torres *et al.*, 2016 ; Hussain et Khan, 2020).

De plus, deux isolats de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), identifiés comme *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*, ont montré des capacités inhibitrices importante contre *M. phaseolina* dans des conditions de culture in vitro (sur graines de soja) et in vivo (test en serre) (Simonetti *et al.*, 2015).

- **Éliciteurs de défense des plantes**

Les éliciteurs sont des composés naturels ou synthétiques qui induisent une résistance systémique acquise (SAR) et dissuadent l'infection par des agents pathogènes bactériens, fongiques et viraux. Les éliciteurs benzothiadiazole, chitosane, phénylalanine et acide salicylique ont été appliqués sur le feuillage du soja afin de contrôler *M. phaseolina*

et deux autres agents pathogènes du soja (*Phytophthora sojae* et *Sclerotinia sclerotiorum*). Les résultats ont montré que l'efficacité de l'éliciteur variait en fonction des génotypes de soja, des agents pathogènes et des conditions environnementales (Pawlowski *et al.*, 2016). Le chitosane hydrosoluble (s-chitosane) a montré un double rôle potentiel en induisant une réponse de défense chez les semis de jute et en inhibant directement *M. phaseolina* durant l'infection.

De plus, après traitement par le s-chitosane, l'activité des enzymes liées à la défense des plantes comme la peroxydase et la chitosanase était améliorée chez les semis de jutes infectés par *M. phaseolina* (Chatterjee *et al.*, 2014).

V. Généralités sur Trichoderma

V. Généralités sur *Trichoderma*

V.1. Introduction

Les maladies des plantes causées par les agents pathogènes fongiques et bactériens sont connues à endommager les cultures agricoles dans le monde entier. Actuellement, la lutte chimique largement utilisée en agriculture, constitue généralement la méthode la plus efficace contre ces maladies à court terme. Cependant, l'utilisation continue de produits chimiques suscite des inquiétudes en raison de leurs effets néfastes sur l'environnement et la sécurité alimentaire. Les pesticides qui sont toxiques pour les agents pathogènes des plantes peuvent également diminuer ou éliminer les microorganismes bénéfiques. Ainsi, des effets chroniques sur la santé humaine et animale peuvent survenir après une exposition aux pesticides (Toxic Action Center, 2017).

Une méthode de lutte prometteuse et alternative à l'utilisation de produits chimiques est l'utilisation d'agents de lutte biologique (BCA). Les BCAs peuvent se développer rapidement et envahissent un nouvel environnement plus rapidement que l'agent pathogène ; ils libèrent des produits de biosynthèse pour tuer les agents pathogènes spécifiques à l'hôte et peuvent se nourrir directement d'un agent pathogène. Ainsi, les BCAs peuvent induire une résistance des plantes contre les attaques d'agents pathogènes et favoriser la croissance des plantes (Schuster et Schmoll, 2010 ; Stiling et Cornelissen, 2005).

Les espèces de *Trichoderma* sont maintenant connues comme des agents de lutte biologique (BCA) efficace contre les agents phytopathogènes et bénéfiques pour les plantes. *Trichoderma* spp. sont des champignons du sol que l'on trouve couramment dans la matière organique ou inorganique du sol (Harman, 2011). Il existe aussi des produits de lutte biologique à base de *Trichoderma* sous différentes formes.

Contrairement à l'action de la plupart des produits chimiques pesticides, *Trichoderma* protège la plante contre plusieurs maladies et améliore la croissance, la qualité et le rendement des cultures. De plus, l'utilisation de *Trichoderma* ne cause pas d'effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement.

V.2. Morphologie, caractéristique et habitat de *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* est un champignon anamorphe qui appartient à classe des Ascomycètes. L'identification de nouvelles espèces de *Trichoderma* ne cesse d'augmenter, rendant la taxonomie de ce genre très complexe. Cette classification, initialement basée sur

les critères morphologiques est continuellement bouleversée via la biologie moléculaire (Bisset, 1991 ; Chaverri *et al.*, 2015). Les espèces de *Trichoderma* sont identifiables par leurs aspects morphologiques, notamment grâce à leurs pigments verts clairs ou blancs et à la forme des conidiophores branchés (Figure 19). La morphologie de *Trichoderma* est distinctive et différente selon l'espèce (Druzhinina *et al.*, 2006). Les différences d'apparence physique des colonies comprennent généralement la couleur, la croissance radiale et l'aspect microscopique (la morphologie des conidies, les conidiophores, les phialides et les chlamydospores). La couleur des conidies de *Trichoderma* est généralement jaunâtre terne, blanche, pâle ou verdâtre foncée (Shah *et al.*, 2012).

Les *Trichoderma* sont des champignons ubiquistes et très répandus dans la nature, ils sont retrouvés dans des milieux écologiques très différents, tant terrestres qu'aquatiques. Ils possèdent une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques (Gams et Bissett 1998).

La plupart des espèces se multiplie exclusivement par reproduction asexuée, la sporulation abondante leur assure un développement très rapide. Ce mode de vie permet aux organes de dissémination de rester à l'état quiescent. Le développement mycélien du champignon est stimulé plus tard lorsqu'une source d'énergie appropriée est disponible. Les espèces de *Trichoderma* sont caractérisées par une croissance très rapide et une capacité à utiliser une large gamme de substrats naturels ou chimiques bien que leurs besoins nutritionnels semblent très faibles (Gams et Bissett 1998).

En relation avec les plantes, les *Trichoderma* sont généralement saprophytes et très rarement parasites. Ils vivent associés aux racines et/ou sur les débris végétaux (la litière des forêts en particulier) (Howell, 2003). Cependant, certaines espèces sont endophytes des parties aériennes, les feuilles notamment. Le développement de plusieurs espèces de *Trichoderma* au sein de la rhizosphère est favorisé sur les sols tempérés et tropicaux par la présence des racines qu'elles colonisent aisément.

A ce titre, ils sont considérés comme des organismes majeurs dans l'équilibre de la microflore où ils habitent, et leur présence prédominante associée à leur forte activité en fait un maillon important de la chaîne biologique.

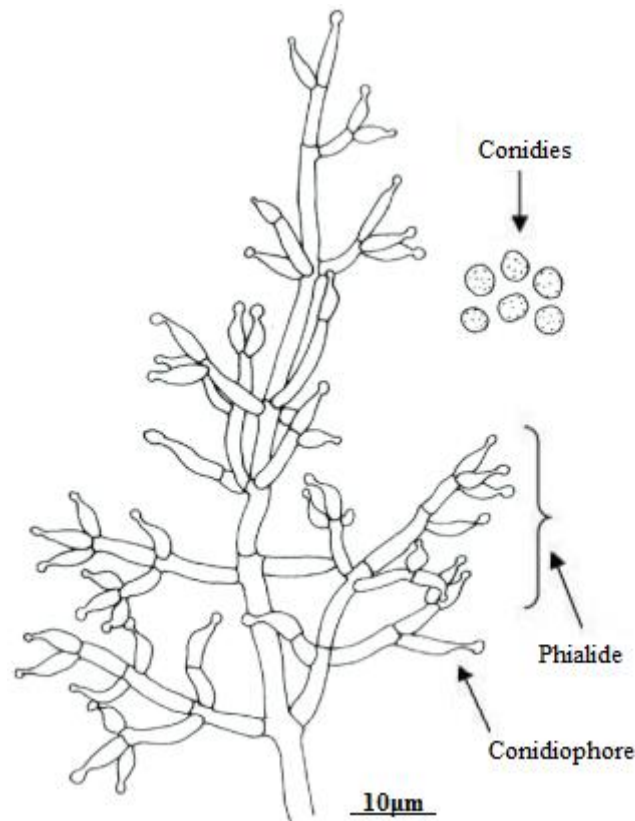


Figure 19: Morphologie du genre *Trichoderma* sp (Samuels *et al.*, 1999)

V.3. Développement de *Trichoderma* en agriculture

Trichoderma a été signalé pour la première fois comme agent antagoniste par Weindling en 1932 et a été utilisé avec succès pour lutter contre le phytopathogène *Rhizoctonia solani* sur les semis d'agrumes quelques années plus tard (Weindling et Fawcett, 1936). Néanmoins, le potentiel agricole de *Trichoderma* est resté inexploité jusqu'à la fin des années 70, lorsque d'autres souches de *Trichoderma* se sont révélées antagonistes de plusieurs champignons phytopathogènes (Elad *et al.*, 1980 ; Hadar *et al.*, 1979).

L'application de spores de *Trichoderma* sur les semences des cultures pour contrôler les maladies transmises par le sol en remplacement des pesticides nocifs est devenue une alternative agricole importante. Cela a créé une demande de produits à base de *Trichoderma* dans le marché agricole. La souche *Trichoderma harzianum* T22 a été prouvée à induire une augmentation significative des rendements de plusieurs cultures comme le coton, le concombre, le pois, le haricot, le maïs sucré et le blé (Harman *et al.*, 1989 ; Stasz *et al.*, 1988). Il a été affirmé avec le temps que T22 appartenait à un taxon

d'espèces différent au sein du même clade de *T. harzianum* et qu'il s'appelait *Trichoderma afroharzianum* T22 (Chaverri *et al.*, 2015).

Trichoderma peut contribuer aux améliorations agricoles en favorisant la croissance des plantes, en induisant une résistance systémique et en agissant directement sur les phytopathogènes par leur effet antagoniste (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). L'antagonisme est l'un des aspects les plus étudiés de *Trichoderma* en raison de son potentiel en agriculture et de sa facilité à l'étudier de manière isolée.

V.4. Antagonisme phytopathogène de *Trichoderma*

Plusieurs espèces de *Trichoderma* ont la capacité de s'opposer aux micro-organismes nuisibles et aux nématodes par des actions directes tels que la compétition des nutriments, le mycoparasitisme et l'antibiose (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Ces propriétés antagonistes ont été mentionnées pour la première fois par Vuillemin en 1887 (Lamy Krafft et Roquebert, 1981).

De plus, certaines souches se colonisent d'une manière vigoureuse et durable la surface des racines en pénétrant l'épiderme des plantes parasitées. Ce contact avec la plante établit une relation très particulière qui permet à cette dernière d'en tirer un profit positif très significatif.

L'activité antagoniste de *Trichoderma*, quel que soit le mode d'action déployé, apparaît d'être comme un processus complexe. Les différents mécanismes d'action de *Trichoderma* ont été élucidé *in vitro* pour la première fois par Dennis et Websteren en 1971 où ils révélaient la présence du mycoparasitisme (Figure 20), l'antibiose, la compétition pour les nutriments et l'espace, puis la stimulation des défenses de la plante (Tseng *et al.*, 2008).

La capacité d'antagonisme des espèces de *Trichoderma* dépend de la sécrétion des enzymes extracellulaires et un ensemble très diversifié de métabolites secondaires (Druzhinina *et al.*, 2011). Les *Trichoderma* sont aptes à sécréter près de 200 métabolites secondaires appartenant à différentes classes chimiques (Andrabi *et al.*, 2011). Parmi ces classes, nous retrouvons des peptaïboles, c'est polypeptides qui contiennent généralement des acides aminés, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériens et antiviraux (Kubicek *et al.*, 2007). Les enzymes extracellulaires comme les protéases, les chitinases, les β -glucanases sont généralement sécrétées pour la dégradation de la paroi cellulaire du pathogène (ex. acide harzianique, trichodermine, gliotoxine, peptaïbols etc.) (Kubicek *et al.*, 2011 ; Lorito *et al.*, 1993).

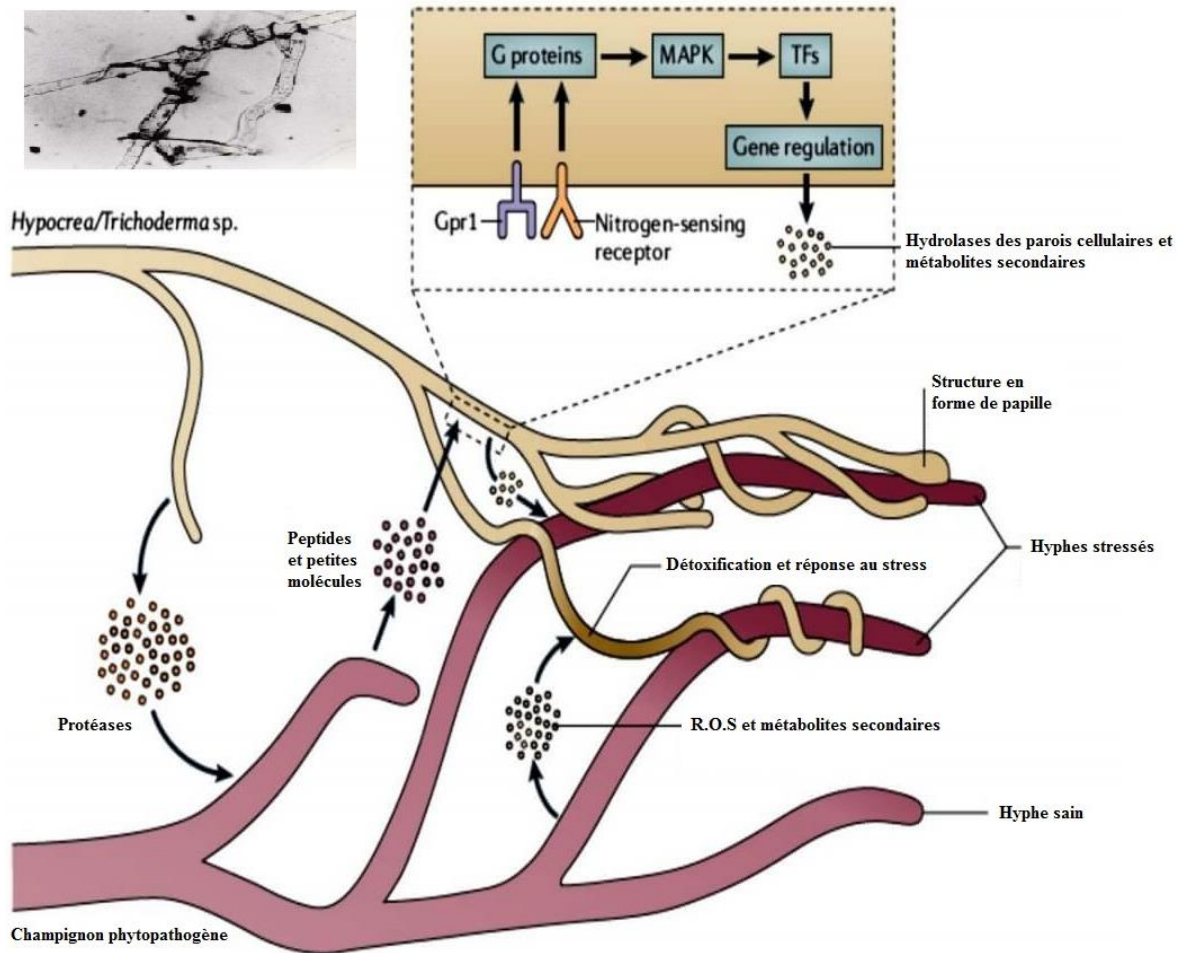


Figure 20: Mycoparasitisme de *Trichoderma* vis-à-vis un champignon phytopathogène (Druzhinina *et al.*, 2011)

En effet, les métabolites secondaires produits par *Trichoderma* constituent l'arsenal chimique d'attaque lors de l'antibiose. Certains de ces métabolites sont indispensables pour assurer les phénomènes de modifications chimiques de l'environnement (pH, ionisation etc).

Par conséquent, plusieurs souches de *Trichoderma* ont été valorisées en tant qu'agents biologiques efficaces pour contrôler des maladies d'origine fongiques et bactériennes chez les plantes. En s'opposant aux micro-organismes indésirables, *Trichoderma* contribue à la lutte antiparasitaire dans les champs infestés par des agents pathogènes, permettant ainsi une croissance saine de différentes cultures (Harman, 2011). Par exemple, *T. harzianum* peut limiter le développement de *Fusarium graminearum* jusqu'à 96 % lors de tests *in vitro* et éliminer complètement les symptômes de la Fusariose de l'épi lors d'essais sur pots (Saravanakumar *et al.*, 2017).

V.5. Promotion de la croissance des plantes et la résistance induite

En synergie avec les actions directes précédemment décrites, *Trichoderma* établit des actions indirectes telles que la promotion de la croissance des plantes en augmentant la disponibilité en éléments nutritifs pour la plante et la stimulation de du système défense chez la plante (Vos *et al.*, 2015). Plusieurs études ont prouvé l'aptitude de *Trichoderma* à moduler les résistances localisées et systémiques vis-à-vis plusieurs agents pathogènes.

Une multitude d'espèces de plantes cultivées ont montré une croissance accrue lorsque leurs semences sont traitées avec *Trichoderma* dans les champs agricoles (Yedidia *et al.*, 2001, Ortuño *et al.*, 2016). L'une des souches de *Trichoderma* les plus étudiées qui stimulent significativement la croissance des plantes de plusieurs cultures est *T. harzianum* T22 (plus tard renommé *T. afroharzianum*) (Chaverri *et al.*, 2015 ; Harman, 2011).

Plusieurs mécanismes favorisant la croissance des plantes par *Trichoderma* ont été proposés. Le premier est que le champignon améliore la solubilisation des nutriments dans le sol pour les rendre plus assimilable pour la nutrition des plantes (Altomare *et al.*, 1999). Cependant, les souches qui peuvent solubiliser le phosphate et produire des sidérophores n'améliorent pas toujours la croissance (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Le deuxième et le plus récent mécanisme d'action décrit est la promotion de la croissance des plantes par les composés organiques volatils (COV) synthétisés par *Trichoderma*. Il a été démontré que même les COV simples (par exemple le 1-octène-3-ol) produits par *Trichoderma* favorisent la croissance des plantes (Hung *et al.*, 2013).

Parmi les effets étudiés de *Trichoderma*, la translocation de nombreux minéraux comme le fer, le cuivre, le fer, le zinc et le manganèse qui peuvent être non disponibles ou bien existent sous des formes non assimilables pour les plantes, et la modulation des équilibres des hormones végétales et la stimulation des défenses végétales. *Trichoderma* est apte à synthétiser des molécules mimant les phytohormones comme l'auxine et cytokinine ou des enzymes participant à leur biosynthèse comme l'ACC Désaminase à l'égard de l'éthylène (Chanclud and Morel, 2016).

D'autres effets positifs de *Trichoderma* peuvent être mis en exergue, comme la résistance aux stress abiotiques chez les plantes, l'amélioration de l'efficacité photosynthétique et la meilleure utilisation de certains minéraux du sol tel que l'azote. Ces effets sont à l'origine de l'augmentation de la croissance des plantes.

V.6. Résistance systémique induite (RSI)

La résistance systémique induite est l'une des résultats les plus récemment décrits lors de l'interaction plantes-Trichoderma (Figure 21). De Meyer *et al.* (1998) ont montré que l'application des spores de *T. harzianum* T39 sur les racines de tomate, de haricot, de laitue, de poivron et de tabac conférait une protection contre le pathogène *Botrytis cinerea* dans les feuilles. Plus tard, il a été observé que l'induction de l'RSI chez *Arabidopsis thaliana* par *T. atroviride* était stimulée par les voies de signalisation de défense médiées par l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonique (AJ) en même temps (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011). L'expression des gènes marqueurs des voies AS et AJ a culminé après 96 h et a conféré une protection contre le champignon *B. cinerea* et la bactérie *Pseudomonas syringae* pendant au moins deux semaines (Salas-Marina *et al.*, 2011).

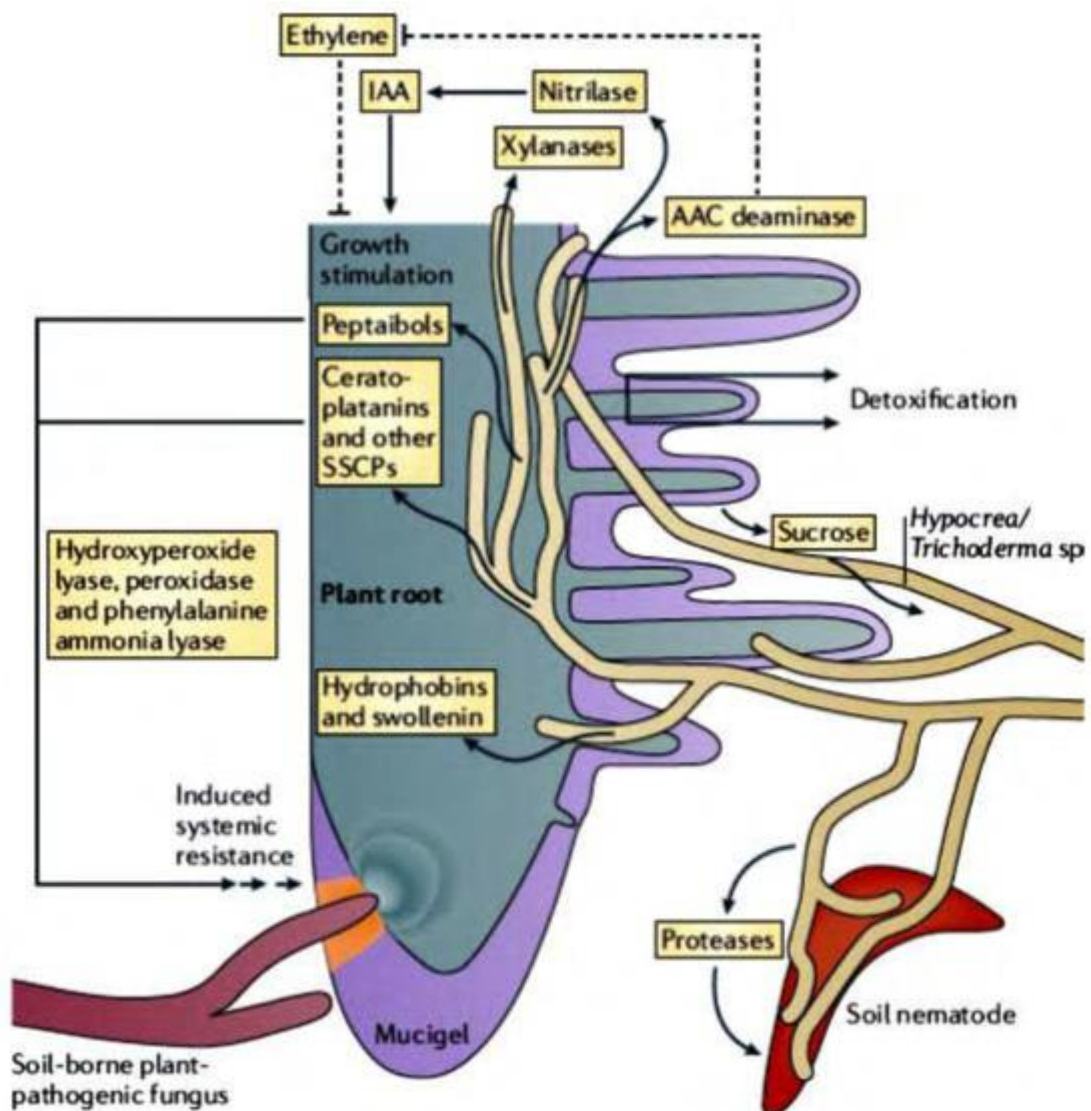


Figure 21: Mécanismes de la résistance systémique induite (Druzhinina *et al.*, 2011)

La RSI est un processus complexe avec plusieurs composés qui agissent simultanément. Par exemple, les mutants de *Trichoderma* dépourvus de cellulases ou les mutants dépourvus de l'éliciteur protéique SM2 ont chacun partiellement perdu la capacité d'induire une résistance systémique chez le maïs, ce qui montre que plusieurs composants fongiques pourraient être impliqués dans l'induction d'ISR dans les champs (Crutcher *et al.*, 2015 ; Saravanakumar *et al.*, 2016).

Des composés isolés des sécrétions de *Trichoderma* tels que la petite protéine Sm1 de *T. virens* ont induit une résistance systémique chez le coton et le maïs (Djonović *et al.*, 2006 ; Djonović *et al.*, 2007). Des études sur les Sm1 et Epl1 de *T. atroviride* ont donné un aperçu de la forte abondance de cérato-platanines chez *Trichoderma*, qui sont des éliciteurs sécrétés trouvés uniquement sur les champignons, bénéfiques et pathogènes (Baccelli, 2014 ; Lamdan *et al.*, 2015 ; Seidl *et al.*, 2006).

L'induction d'une résistance systémique peut être déclenchée par des composés isolés du sécrétome de *Trichoderma*. Par exemple, il a été démontré que la cellulase de *Trichoderma viride*, conférait une résistance aux plantes contre le peptaibolalaméthicine autrement nocif (Aidemark *et al.*, 2010). Cependant, les études de l'expression globale des gènes sur l'induction de RS chez les plantes par le complexe sécrété par *Trichoderma* ne sont pas encore disponibles.

Il a également été démontré que les COV de *Trichoderma* sont des inducteurs de la résistance systémique des plantes contre différents agents pathogènes. Par exemple, la 6-pentyl- α -pyrone (6PP) peut induire une résistance systémique contre *Alternaria brassicicola* et *B. cinerea* à de faibles concentrations, mais à des concentrations plus élevées, elle inhibe plutôt la croissance des plantes (Kottb *et al.*, 2015).

Chapitre II

La rouille de lentille causée par *Uromyces viciae-fabae* dans le nord-ouest Algérien

CHAPITRE II

La rouille de lentille causée par *Uromyces viciae-fabae* dans le nord-ouest Algérien

1. Introduction

La rouille de lentille, causée par *Uromyces viciae-fabae*, est une maladie fongique largement répandue dans le monde (Negussie *et al.*, 2008). Cette maladie est considérée comme un facteur limitant de la production de culture de la lentille, car elle occasionne des pertes considérables pouvant atteindre les 100 % dans certains pays où le développement du champignon est favorisé par des températures modérées et des conditions humides (Bejiga *et al.*, 2000).

Lors d'attaques sévères sur la lentille, le champignon *U. viciae-fabae* peut survenir sur toutes les parties aériennes des plantes ; elles présentent une apparence brûlée et deviennent rabougries et sèches. Les plantes finissent par mourir avant la formation des graines (Chen *et al.*, 2009). Les premiers symptômes sont observables sous forme de pustules en février suite à un développement d'écidies sur les folioles. Les écidies se présentent sous forme des taches rondes ou allongées de couleur jaune qui vire progressivement au brun (Negussie, 2004). Ensuite, des urédies bruns se développent sur les deux côtés des feuilles, du pétiole, des tiges et des gousses et se présentent sous une forme circulaire ou ovale (Khare, 1981). Des téliosores brun foncé à noir apparaissent plus tard sur la plante, principalement sur les tiges (Agrawal et Prasad, 1997).

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant de présenter l'état actuel de la culture de la lentille aux attaques de la rouille dans le nord-ouest Algérien. Dans le cadre de cette thèse, une étude sur cette maladie a été réalisée où l'incidence et la sévérité des attaques ont été évaluées.

2. Matériel et méthodes

2.1. Prospections, échantillonnages et observation des symptômes au champ

Au cours de deux campagnes agricoles (2018/2019 et 2019/2020), quinze (15) parcelles ont été prospectées dans trois wilayas du nord-ouest Algérien favorables à la culture de la lentille (Mascara, Tiaret et Relizane). Ces prospections ont été effectuées au stade de maturité physiologique de la lentille, en période de formation des graines pour la culture de printemps. Elles avaient pour objectif de localiser les foyers de la rouille de la

lentille et d'évaluer l'importance de cette maladie ainsi que d'identifier l'espèce responsable.

Au niveau de chaque site prospecté, un diagnostic visuel de la lentille a été effectué et les différents symptômes sont décrits. Le diagnostic de la rouille est donc basé sur l'observation des plantes malades présentant des symptômes décelables à l'œil. Les plantes malades sont prélevées entièrement pour être analysées au laboratoire.

2.2. Estimation de l'incidence et la gravité de la maladie

Lors de chaque prospection, l'incidence et la gravité de la maladie ont été évaluées. Au niveau de chaque parcelle, 50 plantes, choisies arbitrairement et en diagonale, ont été examinées et le nombre de plantes présentant des symptômes de la rouille a été relevé.

L'incidence de la maladie (IM) a été exprimée par le pourcentage de plantes affectées par rapport au nombre total de plantes.

La gravité de la maladie (GM) a été estimée en se basant sur l'évaluation visuelle de la proportion des parties de la plante atteinte par la rouille. Un indice de gravité a été attribué aux plantes affectées en fonction de l'importance des symptômes en se basant sur une échelle de 1 à 9 où 1 = aucune pustule visible et 9 = pustules étendues sur les feuilles, les pétioles et les tiges (mort de la plante) (Khare *et al.*, 1993).

2.3. Identification microscopique

À partir des fragments d'organes infectés par la rouille, des pustules ont été frottées directement sur une goutte d'eau montée sur une lame et lamelle. Des observations microscopiques sont ensuite réalisées pour déterminer les différentes formes de spores. Les mensurations (longueur et largeur) des spores produites par le champignon ont été évaluées à l'aide d'un micromètre. En général, les observations microscopiques ont porté sur 40 spores. Toutes les observations sont effectuées au grossissement 40x10 (Rapilly, 1968).

3. Résultats et discussion

3.1. Description des Symptômes

Les plantes de lentille présentant des symptômes de la rouille ont été retrouvées dans toutes les parcelles prospectées au cours des campagnes de 2018 à 2020.

L'identification de la rouille aux champs de la lentille est facile du fait qu'elle forme des pustules caractéristiques. Ces dernières correspondent à une déchirure de l'épiderme et l'apparition d'une poudre composée uniquement de spores facilement transportées par le vent. Les symptômes comprenaient des pustules brunes foncées à noires sur les feuilles (Fig. 22A et B) et des tiges brûlées (Fig. 22C et D).

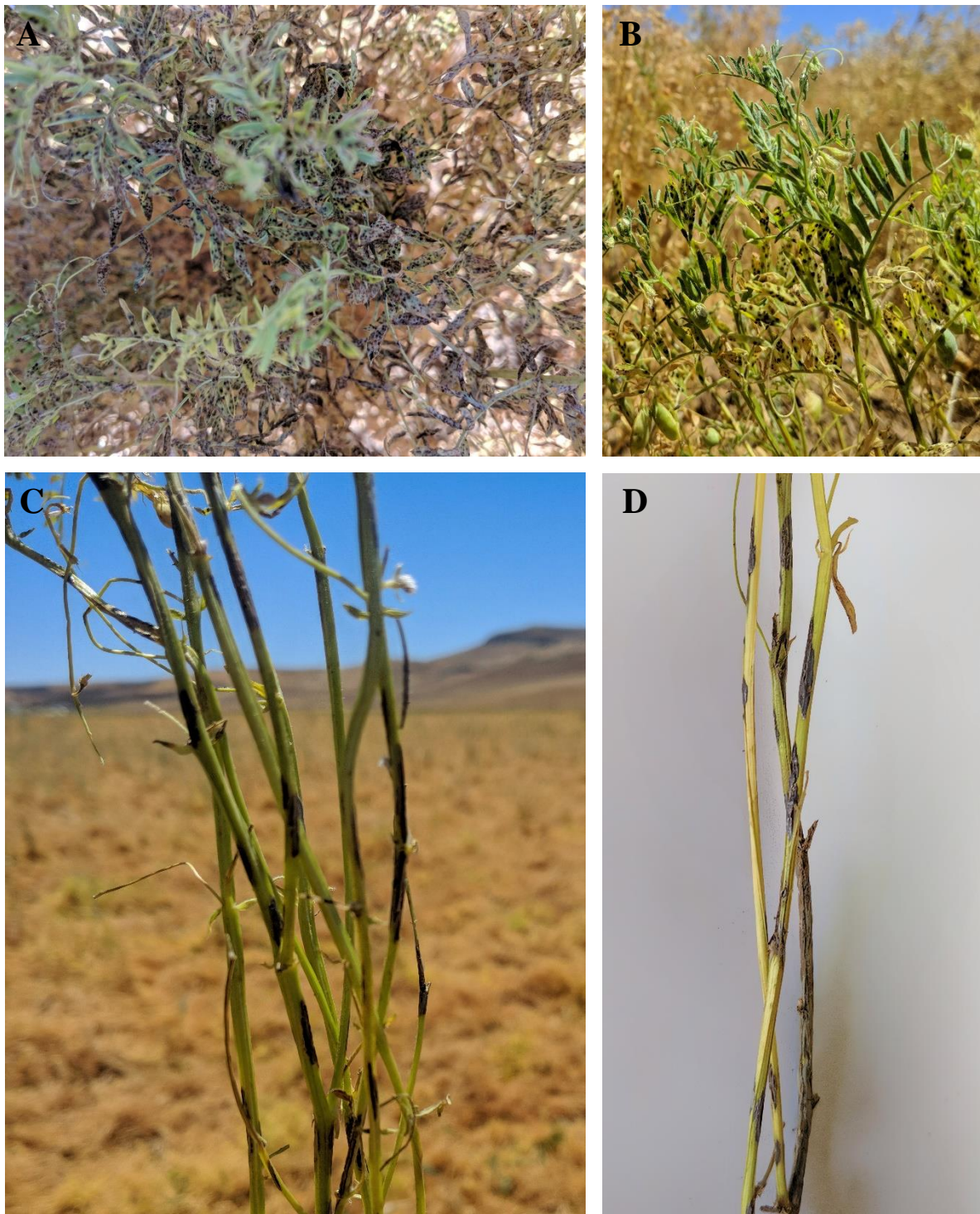


Figure 22: Plants de lentille en stade de la formation des gousses présentant des symptômes de la rouille (parcelle de Tiaret).

- A, B** : Feuilles et tiges de lentille couvertes de pustules de rouille.
C, D : Eclatement des pustules sur les tiges et libération des urédospores

Les symptômes de la rouille manifestés au champ sont similaires à ceux rapportés dans d'autres pays (Khare, 1981 ; Negussie *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2009, 2011). Almi (2016) a signalé la présence d'une forte attaque de la rouille sur les champs de lentilles cultivées lors des prospections menées en 2016 dans le Nord-Est de l'Algérie.

3.2. Importance de la maladie (incidence et gravité)

Le pourcentage de plantes infectées varie d'un site à l'autre, dépassant 83,7% (Fig. 23), avec un pourcentage presque identique enregistré pour chaque campagne agricole.

Le développement de la rouille de la lentille a été relativement élevé au cours des deux campagnes agricoles dans les 3 régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Relizane et Tiaret. L'évaluation moyenne de la maladie est présentée sur la figure 23.

L'incidence la plus élevée de la maladie a été enregistrée dans la région de Tiaret avec 96,3%, suivie de celles évaluées dans les régions de Relizane et Mascara (90,1% et 83,7%, respectivement). Cependant, la gravité de la rouille varie de 7,6 à 9 pour toutes les parcelles prospectées.

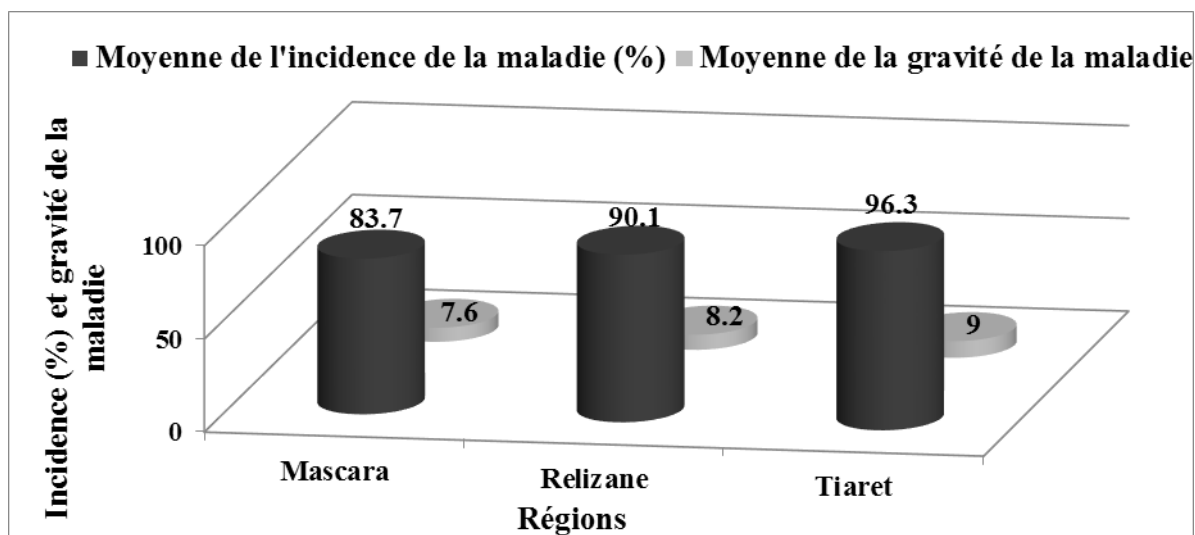


Figure 23: Importance (incidence et gravité) de la rouille de la lentille dans trois wilayas du Nord-Ouest Algérien

La rouille causée par *Uromyces viciae-fabae* est l'un des facteurs limitant le rendement de la lentille (*Lens culinaris* M.) en Algérie, au Maroc, au Pakistan, au Bangladesh, en Ethiopie, en Inde, au Canada, en Italie, au Népal, en Syrie, en Turquie et en Amérique du Sud (Bascur, 1993 ; Erskine *et al.*, 1994, Beniwal *et al.*, 1993). Cette maladie

a le potentiel de causer des pertes de rendement de plus de 60 % et jusqu'à 100 % signalées en Éthiopie et en Inde (Singh *et al.*, 1986 ; Khare, 1981).

La variété cultivée dans toutes les parcelles prospectées était la variété Syrie 229. Les pourcentages enregistrés des plantes atteintes par la rouille ont indiqué que cette variété est sensible à cette maladie.

D'après Fatiha *et al.*, (2019), la variété Syrie 229 est cultivée dans les champs du nord-ouest algérien pour ces caractères agronomiques (microsperma, précoce, graine ronde, couleur jaune vert, rendement élevé). Elle est modérément tolérante à la sécheresse. Elle est aussi cultivée surtout en raison de la hauteur élevée de ces gousses les plus basses (14,9 cm) en comparaison avec d'autres variétés cultivées en Algérie (Gaad *et al.*, 2018). La hauteur des gousses les plus basses au-dessus du sol est un caractère important pour la mécanisation de la lentille.

3.3. Observation microscopique et description de l'agent pathogène

Deux formes de spores d'*Uromyces* (Urédospores et Teliospores) ont été observées au microscope sur des lames préparées à partir des échantillons infectés.

Les urédospores libérées des pustules sont des spores unicellulaires, bien groupées, de couleur marron clair et de forme globulaire. Elles sont entourées d'une paroi visible et pigmentée de $20-30 \times 18-26 \mu\text{m}$ (Fig. 24A). Les urédiospores sont aéroportées et peuvent induire de nouveaux cycles d'infections au cours de la saison.

Les téléutospores produites à partir des pustules sont unicellulaires, globuleuses, ovales ou ellipsoïdales, brune claire avec une paroi épaisse et un apex papillaire de $25-38 \times 18-27 \mu\text{m}$ (Fig. 24B). Les téléutospores représentent le stade dormant de la maladie de la rouille.

U. vicia-fabae, est un champignon autoïque macrocyclique qui produit 5 types de spores (spermaties, écidiospores, urédospores, téliospores et basidiospores) sur une seule culture sans un hôte alternatif (Cummins *et al.*, 1983).

Les téléutospores jouent un rôle essentiel dans l'épidémiologie de la rouille de lentille. Elles permettent à *U. viciae-fabae* de survivre à des conditions défavorables et de produire des basides et des basidiospores, qui peuvent infecter également les plants de lentille et initier le cycle d'infection de la maladie de la rouille.

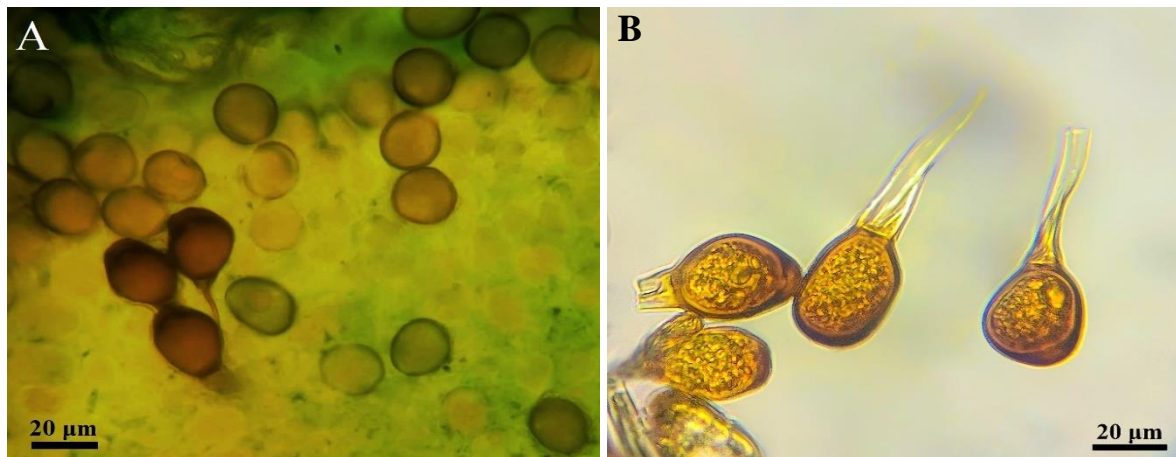


Figure 24: Vue microscopique d'*Uromyces viciae-fabae*

A. Urédospores ; **B.** Télisporangia

La rouille de la lentille peut être maîtrisée par l'application de fongicides sous forme de pulvérisations foliaires et d'enrobages de semences. Leur efficacité dépend du moment et du nombre de traitements appliqués, ainsi que du stade de l'infection (Sugha *et al.*, 1994). Parmi les fongicides efficaces contre la rouille de la lentille : Mancozèbe, bénomyl, thirame, sulfate de zinc, carbendazime et triadiméfon (Singh, 1985; Mohyud-Din *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2011; Emeran *et al.*, 2011).

En revanche, l'utilisation de fongicides n'est pas totalement efficace et peut entraîner la sélection de nouvelles souches résistantes d'agents pathogènes, en plus d'être coûteuse et dommageable pour l'environnement. Dans de nombreux pays, l'utilisation de pulvérisations chimiques potentiellement nocives est considérée avec mécontentement (Harman *et al.*, 2004). Cependant, la méthode de contrôle la plus économiquement viable et écologiquement durable est le développement de variétés résistantes à la rouille (Rubiales *et al.*, 2011). Les géotypes de lentilles présentant une certaine résistance à la rouille sont désormais utilisés dans les programmes de sélection où la rouille est un problème sérieux (Nleya *et al.*, 2016).

Plusieurs variétés résistantes à la rouille de la lentille ont été rapportées par Chen *et al.* (2011) et Negussie *et al.* (2012) et qui sont disponibles au Bangladesh, en Inde, en Éthiopie, au Maroc, en Éthiopie, au Pakistan et au Chili. La collection algérienne

d'accession de lentille fournie par Gaad *et al.* (2018) ne cite aucune des variétés résistantes à la rouille de la lentille répertoriée par Chen *et al.* (2011) et Negussie *et al.* (2012).

Plusieurs études ont été réalisées pour explorer la génétique de la résistance de la lentille à *U. viciae-fabae* (Erskine *et al.*, 1994 ; Negussie *et al.*, 2005, 2012 ; Rubiales *et al.*, 2011, 2013). Une résistance partielle et une hypersensibilité à la rouille chez la lentille ont été signalées sur la base de la réduction et du retard de l'accumulation épidémique et résultant d'une période de latence prolongée et d'une densité et d'une taille réduites des pustules.

Les ravageurs et les maladies, y compris la rouille, sont affectés par les différentes mesures culturales telles que la préparation du sol, la date de plantation, la densité de plantation, la fertilisation, le désherbage, l'élimination des débris infectés, etc. De telles pratiques peuvent également influencer la santé des plantes et donc le développement et le rendement de la culture. Par exemple, Mittal (1997) a prouvé que le report de la date de semis réduisait considérablement l'incidence de la rouille. De plus, une réduction maximale de la sévérité de la rouille sur la lentille a été rapportée en utilisant un espacement plus large des rangs (15 cm) (Lal *et al.*, 2006).

La lutte biologique est une alternative prometteuse à l'application de fongicides chimiques. Parmi les microorganismes antagonistes, les levures *Cryptococcus* et *Sporobolomyces* et le champignon antagoniste *Trichoderma* spp. ont été utilisées pour la lutte biologique contre *U. viciae-fabae* (Parker et Blakeman, 1984b). Les isolats de *Trichoderma* ont plusieurs mécanismes pour supprimer l'activité pathogène des parasites fongiques, y compris la production d'une large gamme de métabolites antifongiques à large spectre, le mycoparasitisme et la compétition avec les agents pathogènes des nutriments et de l'espace (Harman *et al.*, 2004).

4. Conclusion

Cette étude a permis dans un premier temps à mettre en évidence l'importance de la rouille de la lentille causée par *U. viciae-fabae* dans les 3 régions prospectées Mascara, Tiaret et Relizane. Les incidences et les gravités enregistrées dans ces régions ont été remarquablement élevées pendant les deux campagnes agricoles 2018-2019 et 2019-2020.

Il ressort de cette étude que la variété de lentille cultivée dans le nord-ouest de l'Algérie (Syrie 229) est très sensible aux attaques de rouille. D'autres travaux sont nécessaires sur la résistance de la lentille à la rouille grâce aux criblages de germoplasme

CHAPITRE II : La rouille de lentille causée par *Uromyces viciae-fabae* dans le nord-ouest Algérien

local, y compris les variétés cultivées, fourniront des informations importantes pour la gestion de la maladie.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Mycopath » en 2020 (Annexe 8).

Les données sur l'agent pathogène doivent aider à l'élaboration d'un programme d'amélioration génétique, dont les caractères recherchés seraient la résistance multiple. Une connaissance plus approfondie des populations de cet agent pathogène et leur répartition en Algérie serait néanmoins souhaitable.

Chapitre III

**Isolement et identification de champignons à partir des
plantes de la lentille**

CHAPITRE III**Isolement et identification de champignons à partir des plantes de la lentille****1. Introduction**

Parmi les problèmes phytosanitaires, les champignons constituent un des principaux facteurs limitant le développement de la lentille, en provoquant plusieurs maladies. Parmi les champignons qui constituent une menace permanente pour la culture de la lentille : *Uromyces viciae-fabae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* et *Ascochyta lentis* responsables des maladies de la rouille, la fusariose et l'ascochytose, respectivement.

L'étape initiale de cette étude consiste à regrouper, par le biais d'un inventaire effectué dans les régions de Mascara, de Tiaret et de Relizane, une collection d'isolats fongiques. Nous chercherons ici à préciser quels champignons sont les plus fréquents. Cet inventaire nous permettra d'obtenir des résultats intéressants dans le point de vue agronomique.

2. Matériel et méthodes**2.1. Prospections et échantillonnages**

Trois (03) régions, Mascara, Tiaret et Relizane, ont été choisies pour cette étude en raison de l'importance capitale des superficies cultivées de la lentille.

Les prospections des maladies fongiques et l'isolement des champignons associés à la lentille (*lens culinaris*), cultivée dans la région de Mascara, Tiaret et Relizane ont été effectuées durant les campagnes agricoles 2018-2019 et 2019-2020 (Fig. 25, Tableau 6). Lors des prospections, les échantillons de la plante entière (feuilles, tiges, racines et semences) et du sol rhizosphérique ont été prélevés et introduits séparément dans des sachets en papier portant des renseignements sur l'organe, le stade du végétal, le lieu et la date de prélèvement. Les échantillons prélevés ont été conservés au réfrigérateur à 4°C en vue de leurs analyses.



Figure 25 : Les différents sites de prospection : la région de Mascara, Tiaret et Relizane. (Google Earth, 2023)

Tableau 6 : les sites de prospections et échantillonnage

Wilaya	Nombre de parcelles prospectées	Sites prospectés
Mascara	3	Parcelle P1 El Keurt
		Parcelle P2 Maoussa
		Parcelle P3 Maoussa
Tiaret	9	Parcelle P1-P2 Djilali Ben Amar
		De la parcelle P3 à P9 Rahouia
Relizane	3	Parcelle 1
		Parcelle 2 El Hamadna
		Parcelle 3

2.2 Techniques d'isolement des champignons

2.2.1. Isolement à partir des feuilles

La technique utilisée consiste à désinfecter les feuilles avec des lésions avec de l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 3 minutes puis à les rincer soigneusement trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant 3 minutes. Les feuilles sont ensuite séchées entre deux feuilles de papier filtre stérile et déposées à raison de 5 ou 6 feuilles par boîte de pétri

contenant un milieu de culture à base de pomme de terre (PDA) (Annexe 1). Les boîtes sont ensuite incubées à 25 °C pendant 2-3 jours (Rapilly, 1968).

2.2.2. Isolement à partir des tiges et racines

La technique d'isolement utilisée consiste à préparer des petits fragments de tiges et de racines d'environ 1 cm. Les racines ont préalablement été rincées à l'eau du robinet afin de les débarrasser de leurs terres. Les fragments de tiges et de racines sont par la suite désinfectés à l'aide d'hypochlorite de sodium à 2%, pendant 03 minutes puis rincés trois fois dans trois bains d'eau distillée stérile (Rapilly, 1968).

Après séchage entre deux feuilles de papier filtre stériles, les fragments de tiges et de racines sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA à raison de 5-6 fragments par boîte (Fig. 26). Les boîtes sont ensuite incubées à 25 °C pendant 5 à 6 jours.



Figure 26: des fragments de racines de lentilles déposées sur une boîte pétri contenant PDA

2.2.3. Isolement à partir de la rhizosphère

L'isolement des champignons a été conduit selon la technique des suspensions-dilutions telle qu'elle est décrite par Rapilly (1968). La préparation des dilutions consiste en premier lieu à ajouter dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile, 1 g du sol rhizosphérique. Ce mélange est agité pendant quelques minutes afin de mettre en suspension les particules du sol ainsi que les spores et mycélium qui y sont attachés. La suspension obtenue constitue la dilution 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 1 ml sont réalisés à partir de la solution mère et ajoutés chaque fois à 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration variable de propagules et faciliter le dénombrement des colonies. Ces solutions vont constituer les dilutions de 10^{-2} jusqu'à 10^{-9} . Les solutions (10^{-3} , 10^{-5} et

10⁻⁷) ont été choisies afin de les ensemer sur des boîtes Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes ont été agitées doucement et incubées à 25°C pendant 72h.

2.3. Purification

Après incubation, les colonies fongiques ont été purifiées. La purification des colonies est effectuée par le prélèvement aseptique d'un fragment d'agar sur lequel le champignon est développé et puis déposé au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1). Un repiquage successif a été effectué par fragments des cultures qui ne présentent aucune contamination. Les boîtes ainsi préparées sont incubées dans des conditions décrites précédemment.

Cette purification va nous permettre d'obtenir des cultures pures des champignons isolés.

2.4. Cultures monospores

La culture monospore consiste à obtenir une culture pure à partir d'une spore (des isolements monoconidiens) (Rappilly, 1968). Une suspension de spores diluée a été préparée où un disque de 1 cm de diamètre d'une culture pure âgée de 5 à 10 jours est introduit dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Le tube est agité pendant 2 à 3 min à l'aide d'un vortex.

Un dixième (0,1 ml) de chaque suspension diluée a été prélevé et étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu PDA puis incubé à 25°C pendant 24 à 48h. Les spores germées sont repérées puis repiquées individuellement sur boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Belabid, 2003).

2.5. Identification des champignons

2.5.1. Morphologie des isolats obtenus

L'identification des champignons repose, dans un premier temps, sur une étude macroscopique des caractères culturels sur milieu solide en observant l'aspect du mycélium (aérien, dense, poudreux...), la couleur des colonies, la sporulation, la diffusion ou non d'un pigment dans la gélose ... etc. Elle a été réalisée sur un milieu PDA qui est communément utilisé pour caractériser les champignons (Liddell et Burgess, 1983), et sur le milieu Czapek pour identifier les espèces de *Fusarium* (Abildgren, 1987). Pour chaque isolat, l'ensemencement a été effectué au moyen d'un disque (0,5 cm) prélevé

aseptiquement dans une culture et déposé sur le milieu. Les cultures ont été soumises à une température de 25°C pendant 10 jours (Bekkar, 2007).

Dans une seconde étape, une étude microscopique est réalisée par l'examen direct au microscope optique d'un petit fragment de culture de champignon âgé de 5 à 7 jours. Cette étude permet d'observer les caractères du mycélium, type des spores et leurs formes et tailles, la présence ou l'absence des formes de résistance (microsclérotes, chlamydospores).

L'identification des espèces fongiques isolée est effectuée en utilisant des clés d'identification :

- Clés d'identification des champignons phytopathogènes (Champion, 1997 ; Campbell *et al.*, 2013) ;
- Clé de classification du genre *Fusarium* (Leslie et Summerell, 2006).
- Clé d'identification et de classification du genre *Bipolaris* (Manamgoda *et al.*, 2014)
- Clé d'identification et de classification du genre *Macrophomina* (Sarr *et al.*, 2014).

Une vérification du nom scientifique de chaque champignon isolé ainsi que sa classification ont été effectuée en se basant sur des bases de données en ligne comme :

- Taxonomie au **NCBI** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>) qui inclut une taxonomie hiérarchique pour les champignons et autres organismes pour lesquels des données moléculaires existent.
- **USDA Fungal Database** ; Bases de données des collections nationales de champignons des États-Unis (<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>) qui fournissent les noms scientifiques des champignons associés aux plantes ainsi que des rapports sur leurs hôtes et leur distribution. Elles permettent la recherche par hôte et par répartition géographique.
- **MycoBank** (<https://www.mycobank.org/>) qui comprend tous les noms scientifiques des champignons, avec des données associées, telles que des descriptions, des illustrations, des liens vers des référentiels de données de séquence, ainsi que des noms mis à jour et une classification supérieure.
- **Index Fungorum** (www.indexfungorum.org/Names/Names.asp) qui comprend tous les noms scientifiques des champignons avec des citations et des liens vers le nom accepté et des liens vers des protologues (publication originale) pour certaines espèces.

2.5.2. Etude biométrique

La caractérisation des isolats, a été effectuée sur des cultures âgées de 6 à 10 jours. L'examen direct au microscope optique permet d'effectuer les mensurations (longueur et largeur) des conidies produites par les isolats fongiques. Les mensurations ont été évaluées à l'aide d'un micromètre oculaire. En général, les observations microscopiques ont porté sur 40 conidies par isolat. Toutes les observations sont effectuées au grossissement 40x10 (Rapilly, 1968).

2.6. Conservation des isolats

Deux méthodes de conservation ont été utilisées :

- ***Conservation sur gélose inclinée***

La méthode consiste à repiquer le champignon purifié sur le milieu PDA incliné sur des tubes à essai stérile. Les cultures sont incubées pendant 3 jours à la température de 25°C puis conservées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

- ***Conservation sur papier filtre***

La méthode consiste à ensemercer le champignon dans des boîtes de Pétri contenant un disque de papier filtre imbibé d'une solution nutritive pauvre en source carbonée puis incubé à 25°C pendant 10 jours.

Après le développement du champignon, les boîtes sont disposées dans une étuve réglée à 30°C pendant une semaine pour le séchage du papier filtre ; celui-ci est ensuite aseptiquement découpé en petits morceaux que l'on introduit dans des petits tubes stériles. Les tubes hermétiquement fermés sont conservés à la température ambiante. Cette méthode de conservation du champignon sous formes de spores assure à l'espèce une longévité de plusieurs années.

3. Résultats

3.1. Description des symptômes observés lors des prospections

Les prospections effectuées dans les trois régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Tiaret et Relizane, comprenant 15 champs de la lentille nous ont permis de détecter la présence des symptômes de la fusariose vasculaire, de la rouille et la pourriture charbonneuse (Figure 27, 28 et 29).

Les symptômes des plantes infectées par la fusariose vasculaire comprennent un jaunissement partiel ou total du feuillage accompagné de flétrissement de la plante (Fig. 27). Le système racinaire des plantes malades présente une réduction des ramifications

secondaires. Cette maladie fongique est présente uniquement dans la parcelle 9 à Tiaret. L'indice de gravité présent sur cette parcelle témoigne d'une gravité élevée de la maladie, les deux tiers sinon la totalité de la plante étant atteinte par le flétrissement.



Figure 27: Symptômes de flétrissement vasculaire (stade de la gousse) observé dans la parcelle 9 de la région de Tiaret



Figure 28 : Symptômes typiques de la rouille de la lentille (stade de la gousse) observé dans une parcelle de la région de Tiaret (Rahouia)



Figure 29: Champ de lentille infectée par la pourriture charbonneuse dans la région d'El Hamadna (Relizane)

D'autres symptômes ont été observés dans la parcelle d'El Keurt (Mascara) et D'El Hamadna (Relizane) où les plantes présentent un développement végétatif moins important avec système racinaire moins développé (Fig. 29).

Mises à part les quelques manifestations précitées, quelques champs prospectés ne présentent aucun symptôme et la culture était restée dans son ensemble saine et indemne de d'autres maladies.

3.2. Fréquence d'isolement des espèces fongiques

Les isollements ont été effectués à partir des échantillons récoltés à chaque prospection de parcelles de culture de lentille.

L'isolement effectué à partir de différents organes des plantes de lentille ainsi que leurs rhizosphères a permis d'obtenir une collection fongique de 82 isolats appartenant à 17 genres différents. Ces genres sont répertoriés dans le tableau 07. Certains de ces champignons isolés sont connus comme étant des agents phytopathogènes pouvant causer

des dégâts considérables à la culture de la lentille et d'autres champignons sont des saprophytes.

Plus de 64% de la collection fongique a été obtenue à partir des échantillons prélevés de la région de Tiaret suivi par Mascara et Relizane avec un pourcentage de 20,73 % et 14,63, respectivement (Tableau 08).

Tableau 7: Classification des genres fongiques recensés (Base de données de taxonomie NCBI)

N°	Genre	Phylum	Ordre	Famille
1.	<i>Fusarium</i>	Ascomycota	Hypocréales	Nectriaceae
2.	<i>Verticilium</i>	Ascomycota	Glomerellales	Plectosphaerellaceae
3.	<i>Alternaria</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
4.	<i>Macrophomina</i>	Ascomycota	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae
5.	<i>Botrytis</i>	Ascomycota	Helotiales	Sclerotiniaceae
6.	<i>Ascochyta</i>	Ascomycota	Pleosporales	Didymellaceae
7.	<i>Bipolaris</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
8.	<i>Stemphylium</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
9.	<i>Rhizoctonia</i>	Basidiomycota	Cantharellales	Ceratobasidiaceae
10.	<i>Chaetomium</i>	Ascomycota	Sordariales	Chaetomiaceae
11.	<i>Phoma</i>	Ascomycota	Pleosporales	Didymellaceae
12.	<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	Cladosporiales	Cladosporiaceae
13.	<i>Absidia</i>	Zygomycota	Mucorales	Cunninghamellaceae
14.	<i>Penicillium</i>	Ascomycota	Eurotiales	Aspergillaceae
15.	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	Eurotiales	Aspergillaceae
16.	<i>Rhizopus</i>	Zygomycota	Mucorales	Rhizopodaceae
17.	<i>Ulocladium</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae

Tableau 8: Résultats d'isolement des champignons dans les trois régions Mascara, Tiaret et Relizane.

Isolats	Nombre des isolats par région			Total
	Mascara	Tiaret	Relizane	
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	27	3	32
<i>Fusarium solani</i>	2	6	-	8
<i>Verticillium sp</i>	-	3	1	4
<i>Alternaria sp</i>	1	6	-	7
<i>Macrophomina sp</i>	1	3	2	6
<i>Botrytis sp</i>	-	1	1	2
<i>Ascochyta sp</i>	1	-	1	2
<i>Bipolaris sp</i>	-	-	1	1
<i>Stemphylium sp</i>	-	1	1	2
<i>Rhizoctonia sp</i>	1	-	-	1
<i>Chateomium sp</i>	1	1	-	2
<i>Phoma sp</i>	1	-	-	1
<i>Cladosporium sp</i>	1	1	-	2
<i>Absidia sp</i>	1	-	-	1
<i>Penicillium sp</i>	1	1	1	3
<i>Aspergillus sp</i>	1	1	1	3
<i>Rhizopus sp</i>	2	2	-	4
<i>Ulocladium sp</i>	1	-	-	1
Total	17	53	12	82
Fréquence %	20,73	64,63	14,63	100

La répartition, par partie d'isolement, de la collection des isolats obtenus à partir des feuilles, des tiges, des sols rhizosphériques et des semences, est représentée dans le tableau 9.

Au cours des isolements, le *Fusarium* était le genre le plus fréquemment isolé, avec un pourcentage d'abondance atteignant les 48,78% suivi par *Alternaria* et *Macrophomina* avec des pourcentages de 8,53 et 7,31 % respectivement.

Tableau 9: la fréquence (%) d'isolement des champignons isolés à partir de l'ensemble des échantillons prélevés.

Isolats	Nombre d'isolat par organe					Total	%
	Feuille	Tige	Racine	Semence	Sol		
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	4	16	-	12	32	39,02
<i>Fusarium solani</i>	-	2	6	-	-	8	9,75
<i>Verticillium sp</i>	-	3	1	-	-	4	4,88
<i>Alternaria sp</i>	7	-	-	-	-	7	8,53
<i>Macrophomina sp</i>	-	-	6	-	-	6	7,31
<i>Botrytis sp</i>	2	-	-	-	-	2	2,44
<i>Ascochyta sp</i>	1	-	-	1	-	2	2,44
<i>Bipolaris sp</i>	1	-	-	-	-	1	1,22
<i>Stemphylium sp</i>	2	-	-	-	-	2	2,44
<i>Rhizoctonia sp</i>	-	-	1	-	-	1	1,22
<i>Chateomium sp</i>	-	-	-	-	2	2	2,44
<i>Phoma sp</i>	-	-	-	-	1	1	1,22
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-	-	2	2	2,44
<i>Absidia sp</i>	-	-	-	-	1	1	1,22
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	-	3	3	3,65
<i>Aspergillus sp</i>	-	-	-	-	3	3	3,65
<i>Rhizopus sp</i>	-	-	-	-	4	4	4,88
<i>Ulocladium sp</i>	-	-	-	-	1	1	1,22
Total	13	9	30	1	29	82	100
Fréquence %	15,85	10,97	36,58	1,22	35,36	100	

3.3.Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats fongiques

L'observation macro et microscopique des champignons isolés nous a permis de déterminer les caractéristiques culturales : pigmentation de la colonie sur milieu de culture PDA, les caractères microscopiques ainsi que les mensurations des spores (Tableau 10). L'observation microscopique des isolats est présentée dans les planches 1 et 2.

Tableau 10: Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats fongiques

Champignon	Pigmentation	Caractères microscopiques	Mensuration des spores (µm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	blanche, jaune clair	-Mycélium cloisonné, ramifié -Conidiophores : simples ou ramifiés -Macroconidies pluricellulaire légèrement courbées aux extrémités microconidies unicellulaires d'une forme ovoïde	5-12 × 2-3,5
<i>Fusarium solani</i>	Orange, Rouge	Macroconidies droites faiblement arqués possèdent 3 à 5 cloisons	25-34 × 3,5-54
<i>Verticilium sp</i>	Blanche	-Conidiophores dressés qui comprennent des verticilles -Les verticilles sont constitués phialides, portent de nombreuses conidies unicellulaires ovoïdes à ellipsoïdes	4.8 - 6.6 × 2.6 - 3.4
<i>Alternaria sp</i>	Verte foncé	Conidies ovales ou obclavées, de couleur brune jaunâtre à brune foncé, libre ou en chaîne	6,5-59,8 × 4,2-16,5
<i>Macrophomina sp</i>	Noire	Mycélium cloisonné présence des microsclérotés	50-74
<i>Botrytis sp</i>	Gris Noire	-Mycélium cylindrique de couleur marron clair à olivâtre -Conidies unicellulaires, ovoïdes, hyalines à légèrement brunâtres -Présence de sclérotés	5-11,25 × 7,5-15
<i>Ascochyta sp</i>	Marron Orangé	-Présence de pycnides -Pycnidiospores hyalines, cylindrique avec les deux extrémités arrondies et pluricellulaire	8,2-10 × 4,2 -4,5
<i>Bipolaris sp</i>	Verte foncé	Mycélium cloisonné, brun olive foncé Conidies produites à l'extrémité des conidiophores, brun olive, ellipsoïdes avec des extrémités effilées	55-82 × 20-27
<i>Stemphylium sp</i>	Grise noirâtre	Mycélium cloisonné Conidiophores solitaires, droits à flexueux, parfois ramifiés, Conidies solitaires, brun olive, verruqueuses, large, ellipsoïdes à ovoïdes, avec des septa transversaux et longitudinaux	18-28 × 11-18,5
<i>Rhizoctonia sp</i>	Jaune	mycélium stérile, ramifié	Pas de spores
<i>Chaetomium sp</i>	Grise	Ascocarpe superficiels, ostiolés noirs subglobuleux ou ovales, Spores olivâtres brunes fusiformes ou piriformes allongées	8-11 × 4,5-6

<i>Phoma sp</i>	Jaune à orange	Des pycnides de couleurs marron	Pas de spores
<i>Cladosporium sp</i>	Verte olivâtre	Mycélium cloisonné Conidiophores longs, sombres, droits, groupés ou solitaires. Conidies : solitaires ou en chaînes, ramifiées ; uni ou pluricellulaires, De couleurs sombres ovoïdes à cylindriques et irrégulières.	2.51-4.29 × 1.63-2.14
<i>Absidia sp</i>	blanchâtre	Mycélium non cloisonné très abondant. Sporangiophores hyalins à faiblement pigmentés, simples ou parfois ramifiés Sporanges petits pyriforme avec une columelle de forme conique. Spores globuleuses de couleur brun gris clair	4,2–6,8 × 3,3–5,5
<i>Penicillium sp</i>	blanche à bleu-vert	Mycélium cloisonné Phialides formés à l'extrémité des ramifications Conidies rondes ou ovoïdes, hyalines ou colorées, en chaînes	3 à 3.5
<i>Aspergillus sp</i>	noir	Mycélium cloisonné Phialides formés sur la vésicule portant des conidies Conidies nombreuses en chaînettes, dressés et non ramifiés,	3,5 à 4,5
<i>Rhizopus sp</i>	Noir	Mycélium non sépté Présence de stolons Spores ovoïdes, lisses ou rugueuse	8-14 × 6-10
<i>Ulocladium sp</i>	Noir	Conidiophores foncés, portant des conidies brun foncé, plus ou moins ovoïdes à cylindriques qui possèdent des cloisons transversales et longitudinales	20.1 × 10.2

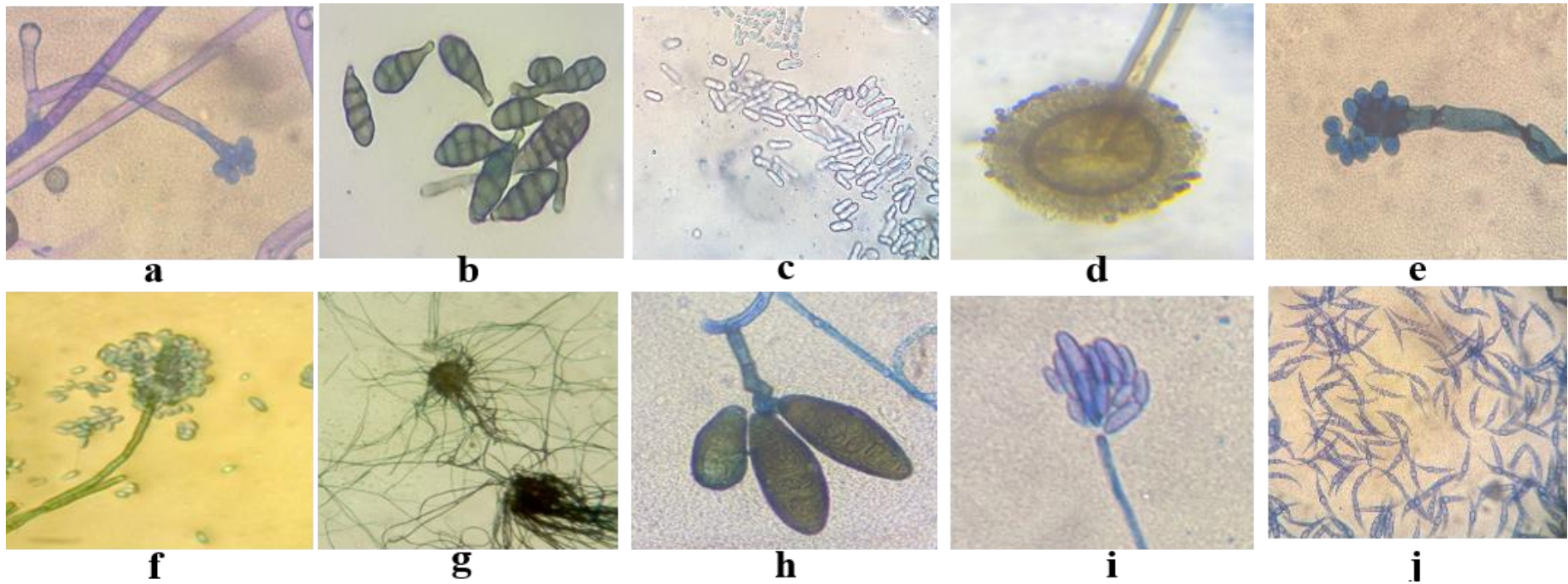


Planche 1 : Observation microscopique des isolats obtenues lors de l'isolement :

a-*Absidia sp*, **b-***Alternaria sp*, **c-***Ascochyta sp*, **d-***Aspergillus sp*, **e** *Botrytis sp* - **f-** *Cladosporium sp*, **g-** *Chaetomium sp*, **h-** *Bipolaris sp*, , **i-** *Fusarium oxysporum*, **j-** *Fusarium solani*,

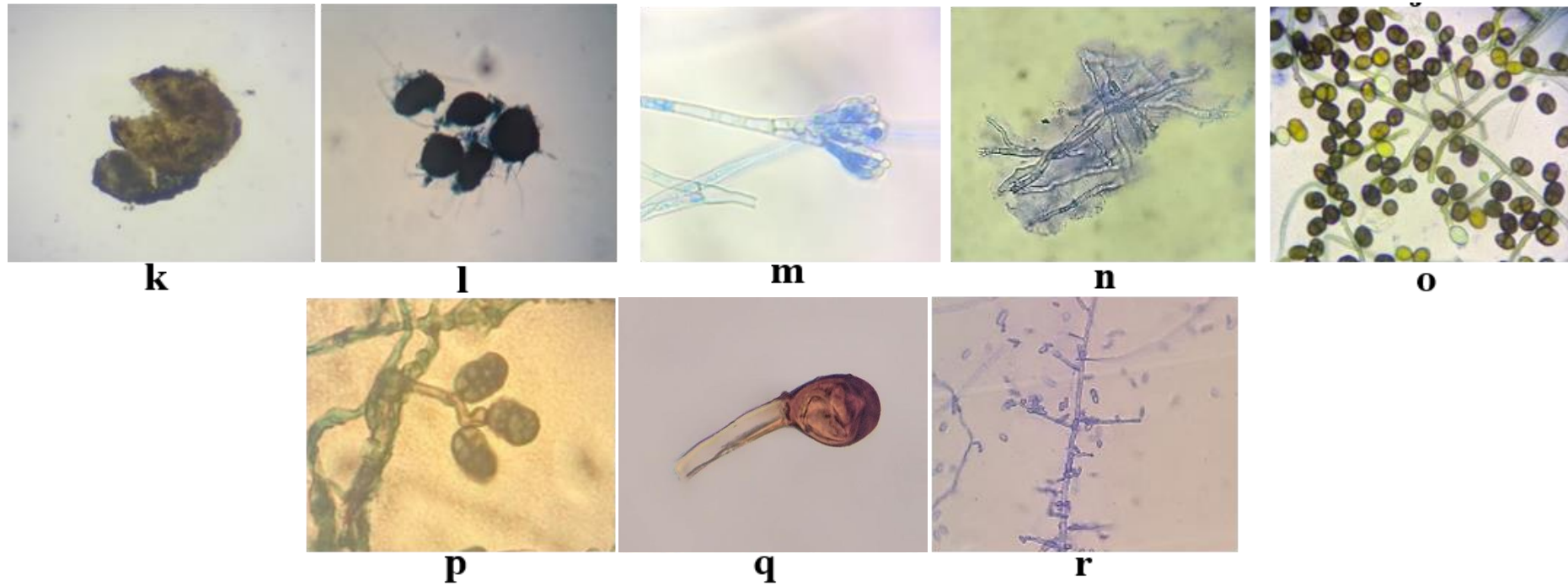


Planche 2 : Observation microscopique des isolats obtenues lors de l'isolement :

k-Phoma sp, l-Macrophomina sp, m-Penicillium sp, n-Rhizoctonia sp, o-Stemphylium sp, p-Ulocladium sp, q-Uromyces sp, r-Verticilium sp

4. Discussion

Plusieurs maladies fongiques ont été signalées en Algérie sur la culture de la lentille ; la fusariose, la rouille et le rhizoctone sont parmi les maladies les plus importantes (Belabid *et al.*, 2003).

Les symptômes de flétrissement vasculaire observés dans les parcelles prospectées sont similaires à ceux rapportés en Algérie (Belabid, 2004). Le flétrissement pourrait résulter de l'obstruction du système vasculaire des racines qui constituent la voie de pénétration du *Fusarium oxysporum* dans la plante (Zaim, 2016).

Les symptômes les plus fréquemment observés dans les champs visités étaient la rouille induit par *Uromyces viciae-fabae* qui correspond à des pustules sur les feuilles et les tiges décrit par Shivas *et al.*, (2014). Les niveaux d'attaque étaient beaucoup plus élevés (incidence > 90%) dans les parcelles prospectées. On a préjugé à ces niveaux d'attaque, que les rendements seront considérablement réduits par cette maladie.

Les prospections des cultures de la lentille faites dans d'autres pays, montrent la présence d'autres maladies fongiques que nous n'avons pas pu détecter sur nos champs au cours de cette étude. C'est le cas principalement du rhizoctone et l'antracnose (Duarte *et al.*, 2018 ; Buchwaldt *et al.*, 2018).

Cette étude a montré que le *Fusarium* est l'un des champignons les plus importants associés à la lentille dans le nord-ouest Algérien. Hussain *et al.*, 2007, ont mené une étude similaire et ont rapporté que le *Fusarium* ainsi que l'*Alternaria* étaient les pathogènes les plus isolés à partir des semences de lentilles au Pakistan. Cinq autres pathogènes, dont *Alternaria*, *Verticillium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* et *Stemphylium* ont également été isolés de différentes parties des plantes malades. Cependant, les champignons saprophytes tels qu'*Absidia*, *Aspergillus*, *Penicilium* et *Rhizopus* n'ont été isolés que de la rhizosphère. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Almi *et al.* (2015) dans une recherche menée dans le nord-est de l'Algérie.

La grande diversité des isolats obtenus après identifications est principalement due aux conditions environnementales favorables notamment la pluviométrie, l'humidité et la température favorisant le développement des saprophytes. La majorité des isolats identifiés appartiennent au phylum des Ascomycota et Zygomycota. Quelques isolats obtenus sont indigènes et généralement isolés à partir du sol (Vankudoth *et al.*, 2016).

Chapitre IV

Bipolaris sorokiniana et *Macrophomina pseudophaseolina*

Deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

CHAPITRE IV

Bipolaris sorokiniana et *Macrophomina pseudophaseolina* :
deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille
en Algérie et dans le monde

1. Introduction

Une liste de 157 interactions lentille-champignon pathogène est répertoriée sur le site des bases de données des collections nationales de champignons (Farr et Rossman, 2020). Ces champignons phytopathogènes (157 espèces) associés à la culture de la lentille représentent 55 genres fongiques différents.

Nos résultats obtenus, présentés dans le chapitre précédent, concernant l'isolement des champignons à partir de lentille ont été comparés aux différentes interactions possibles recensées sur les bases de données de Farr et Rossman (2020). Notre attention a été attiré vers les deux champignons *Bipolaris* et *Macrophomonia* qui n'ont jamais été signalés auparavant comme étant des agents phytopathogènes à la culture de la lentille en Algérie. L'hypothèse d'avoir de nouvelles interactions entre ces champignons et la lentille a été lancée.

Les études menées en pathologie végétale sur les interactions plante-pathogène se sont historiquement concentrées sur des modèles simples d'infection impliquant des systèmes de maladie à hôte unique. Cependant, les plantes dans la nature interagissent avec de multiples espèces/génotypes pathogènes (Abdullah *et al.*, 2017).

L'apparition de nouvelles formes d'infections fongiques de plantes (un agent pathogène nouvellement décrit sur un nouvel hôte) et la signalisation d'importants changements dans la localisation géographique des maladies fongiques, de nouveaux hôtes ou de nouvelles races physiologiques d'agents pathogènes sont en augmentation. Cette augmentation alarmante des agents pathogènes nouveaux et émergents peut être attribuée à la mondialisation des échanges et du commerce international, au potentiel d'adaptation, aux changements climatiques et écologiques ainsi que les pratiques agricoles modernes qui ont modifié les milieux naturels et créé de nouvelles opportunités d'évolution (Fisher *et al.*, 2012 ; Karunarathna *et al.*, 2021). Les nouvelles maladies et races de champignons évoluent souvent en conséquence de différents facteurs biotiques et abiotiques et

interagissent avec le pathogène pour provoquer une maladie végétale particulière et sa progression ultérieure.

Aussi, le nombre d'espèces nouvellement décrites a augmenté de façon considérable suite aux progrès récents des techniques génomiques et moléculaires d'identification qui deviennent de plus en plus des outils précieux dans tous les aspects du diagnostic fongique.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés, en premier lieu, aux deux champignons *Bipolaris* sp. et *Macrophomina* sp., sous un double aspect : leur morphologie et phylogénie et leur pathogénicité. En second, leur comportement vis-à-vis des facteurs abiotiques a été étudié.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel fongique

Sept isolats fongiques appartenant au genre *Bipolaris* et *Macrophomina*, listés dans le tableau 11, sont utilisées aux cours cette étude à savoir : un isolat de *Bipolaris* (Bs1) et six isolats de *Macrophomina* (de M1 à M6). Tous les isolats ont été initialement isolés à partir de plantes de lentilles infectées collectées dans le nord-ouest de l'Algérie. L'origine et la date d'isolement de chaque isolat sont indiquées dans le tableau 11.

2.2. Identification macro et microscopique

Les méthodes de base utilisées pour identifier les champignons reposent principalement sur des approches microscopiques, culturelles et morphologiques.

Les caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques des champignons ont été examinées à partir de cultures de PDA incubées à 25°C pendant 7 jours. Les hyphes et les structures conidiogènes ont été montés dans une goutte de bleu de méthylène et observés au microscope optique.

Pour décrire la macro-morphologie des microsclérotés de *Macrophomina*, les microsclérotés ont été produits sur une aiguille en bois imbibée dans un milieu solide SNA (Synthetic Nutrient Agar ; annexe 1) (Zhao *et al.*, 2019), et sur eau gélosée (Sarr *et al.*, 2014).

La production des pycnidiospores chez les isolats de *Macrophomina* sp. a été stimulé *in vitro* en cultivant le champignon sur un milieu gélosé à base d'avoine et en exposant les boîtes de Pétri à la lumière UV pendant 72h (Zhao *et al.*, 2019). La taille de 50 microsclérotés sélectionnés au hasard a été mesurée grâce à un oculaire micrométrique.

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

L'identification des espèces fongiques a été réalisée en se basant sur des connaissances taxonomiques classiques et en utilisant des clés d'identification (Manamgoda *et al.*, 2014 ; Sarr *et al.*, 2014 ; Nouri *et al.*, 2020).

Tableau 11: Les isolats de *Bipolaris* et *Macrophomina* utilisés dans cette étude

Isolats		Organe d'isolement	Origine	Année d'isolement
<i>Bipolaris</i> sp.	Bs1	Feuille	Relizane	2020
<i>Macrophomina</i> sp.	M1	Racine	Relizane	2020
	M2		Tiaret	2019
	M3		Tiaret	2019
	M4		Relizane	2020
	M5		Tiaret	2019
	M6		Mascara	2019

2.3. Identification moléculaire

Trois isolats représentatifs (un isolat de *Bipolaris* (Bs1) et 2 isolats de *Macrophomina* (M1 et M2)), ont fait l'objet d'une identification génotypique par une analyse phylogénétique utilisant la région de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADNr et les séquences génétiques du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF1- α).

Pour l'extraction de l'ADN, les isolats fongiques ont été cultivés sur le milieu PDA à 25°C pendant 7 jours. Ensuite, une extraction de l'ADN fongique a été réalisée en utilisant le kit commercial NucleoSpin® Food de Macherey Nagel (Allemagne).

Les amplifications PCR ont été réalisées en thermocycleur de type Icyler Bio rad de la région ITS par les amorces universelles ITS1/ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ; ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) et la paire d'amorces EF1-728F/tef1-rev (EF1-728F: 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' ; tef1-rev : 5'-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3') qui codent pour les facteurs d'élongation (Carbone et Kohn, 1999).

Les conditions d'amplification et les paramètres du cycle de la PCR étaient une dénaturation initiale de 1 cycle à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, un anelage à 55°C pendant 30 sec et une extension à 72°C pendant 45 sec et une étape d'extension finale à 72°C pendant 7 min.

Les produits de la PCR ont été révélés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% et ensuite purifiés avec le kit « Wizard® SV Gel » et le « PCR Clean-Up System de Promega ». Les amplificateurs sont séquencés par le kit Applied Biosystems Big Dye v3.1.

Les séquences obtenues ont été comparées à des séquences analogues sur la base de données du logiciel Blast (basic local alignment search tool), du site NCBI (National Centre Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>). Toutes les séquences ainsi obtenues, ont été déposées sur les bases de données nucléotidiques internationales NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) où un numéro d'accèsion a été attribué à chaque séquence.

De plus, des arbres phylogénétiques basés sur la concaténation des séquences d'ITS et TEF ont été construits à l'aide du logiciel MEGA X avec la méthode Neighbor-joining. Les valeurs de bootstraps ont été déterminées à partir de 1000 répliques (Kumar *et al.* 2018).

2.4. Test de pathogénicité

L'isolement d'un agent pathogène à partir d'une plante infectée ne suffit pas toujours pour confirmer son rôle ; l'identification doit être complétée par un test de pathogénicité sur son hôte.

L'étude de la pathogénicité des isolats de *Bipolaris* et *Macrophomina* est réalisée dans l'absence de toutes informations concernant la variété à utiliser dans ce test, la concentration de l'inoculum, la technique d'inoculation et la notation des symptômes vue que les isolats à tester sont des champignons nouvellement identifiés sur la culture de la lentille.

La pathogénicité des isolats de *Bipolaris* et *Macrophomina* a été testée sur la variété de la lentille Syrie 229 qui est choisie en raison qu'elle était la variété cultivée dans toutes les parcelles prospectées. Les graines de cette variété ont été fournies par la CCLS (Coopérative des Céréales et Légumes Secs) de Mascara. Elles ont été désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes puis rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile et séchées sur du papier filtre stérile (Belabid *et al.*, 2004). Elles ont ensuite été semées dans des pots contenant un mélange stérilisé de terre végétale-tourbe (1v :1v) à raison de 3 graines par pots. Les pots ainsi préparés sont ensuite placés sous serre de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mascara.

Le choix de la technique d'inoculations artificielles de la variété Syrie 229 ainsi que la concentration de l'inoculum pour chaque champignon est fait en se basant sur les modèles d'interactions de plante-*Bipolaris* et plante-*Macrophomina* les plus étudiés.

2.4.1. Test de pathogénicité de *Bipolaris*

L'inoculum de l'isolat de *Bipolaris* (Bs1) a été préparé à partir de cultures de champignon développées sur le milieu PDA après incubation à 25°C pendant 10 jours. Les conidies ont été récoltées en grattant la surface de la culture préalablement inondée avec 20 ml d'eau distillée stérile et la suspension a été filtrée à travers une couche de compresse stérile. La concentration de la suspension en conidies du Bs1 a été ajustée à l'aide de la cellule de Malassez à 10⁵ conidies/ml (Neves *et al.*, 2021).

La technique d'inoculation de *Bipolaris* a été inspirée de Neves *et al.* (2021) qui consiste à pulvériser les feuilles de plantules de lentille âgées de 15 jours avec la suspension de conidies (3 pots pour chaque inoculation). Les plantules témoins sont pulvérisées avec de l'eau distillée stérile.

Après inoculation, les pots ont été recouverts de sacs en plastique pendant 3 jours pour maintenir une humidité élevée. En retirant les sacs en plastique, les plantes ont été placées sous serre et arrosées à intervalle de 2 jours (si nécessaire) pendant 30 jours. L'humidité a été maintenue en pulvérisant quotidiennement les feuilles avec de l'eau distillée stérile (Perelló *et al.*, 2003).

Les symptômes de la maladie se traduisent par lésions nécrotiques sur les feuilles liées à la présence des conidies à la surface des feuilles au cours de l'infection. Les plantes inoculées ont été examinées au bout de 30 jours et la taille des lésions nécrotiques a été notée pour chaque feuille.

L'évaluation de la maladie a été effectuée en fonction de la gravité des symptômes en utilisant une échelle de notation proposée par Fetch et Steffenson (1999) allant de 1 à 9. Ce classement est basé sur la réponse de l'infection (RI) (présence de nécrose et de chlorose). Les RI ont été classés en trois catégories selon la compatibilité hôte-pathogène :

- les RI faibles (de 1 à 3) consistaient en de minimes à petites lésions nécrotiques sans ou avec une très légère chlorose marginale diffuse;
- les RI intermédiaires (4 et 5) consistaient en des lésions nécrotiques de taille moyenne avec une marge chlorotique distincte mais restreinte;
- les RI élevées (de 6 à 9) consistaient en de grandes lésions nécrotiques avec des marges chlorotiques distinctes et divers degrés de chlorose diffuse en expansion.

Pour vérifier l'implication de *Bipolaris* dans l'infection des plantules inoculées, des réisolements du champignon à partir des feuilles ont été effectués (vérification du postulat du Koch). Les cultures fongiques obtenues sur PDA sont comparées à leurs cultures mères.

2.4.2. Test de pathogénicité des isolats de *Macrophomina*

La méthode d'infestation des semences de la lentille par les microsclérotés des isolats de *Macrophomina* a été inspirée de Khanzada *et al.* (2012) avec des modifications. Les graines de lentille (variété Syrie 229) ont été inoculées en les trempant pendant une (01) heure dans une suspension d'inoculum pour chaque isolat de *Macrophomina* ajustée à une concentration de 10^4 microsclérotés/ml (Khanzada *et al.*, 2012). La suspension d'inoculum a été préparée de la même façon décrite précédemment. Les graines témoins ont été immergées dans de l'eau distillée stérilisée.

Par la suite, les graines ont été semées dans des pots en plastique de 7 cm de diamètre contenant le mélange stérilisé de terre végétale-tourbe (1v:1v). Le semis a été réalisé à raison de trois graines par pot et 3 pots pour chaque inoculation. Les pots ainsi préparés sont ensuite placés sous serre durant une période de 40 jours et arrosés 2 à 3 fois par semaine.

L'incidence de la maladie a été évaluée 40 jours après le semis en utilisant la formule suivante (Pandey *et al.*, 2021) :

$$\text{Incidence de la maladie (\%)} = \frac{\text{Nombre de plantes infectées}}{\text{Nombre total des plantes}} \times 100$$

La gravité de la maladie a été aussi évaluée par la gravité de la colonisation des racines, comme décrit par Reznikov *et al.* (2019) avec quelques modifications. Une échelle de 1 à 5 a été attribuée à chaque racine en fonction du niveau de colonisation observé dans les tissus racinaires, où 1 indique aucun signe de pourriture charbonneuse, 2 : aucune décoloration, avec très peu de microsclérotés visibles sur les racines, 3 : racine partiellement décolorée et séchée, avec peu des microsclérotés sur la base des tiges, 4 : racine décolorée et séchée, avec décoloration de la base des tiges et présence de nombreux microsclérotés visibles sur les tige et racines, et 5 indiquant une infection grave, avec un dessèchement total des racines et la base des tiges, un envahissement des microsclérotés avec la mort de la plante.

Pour vérifier et confirmer l'identité de l'agent causal de la maladie, les plantes inoculées ont été récupérées en vue de réisoler l'agent pathogène (vérification du postulat de Koch). Les cultures fongiques obtenues sur PDA sont comparées à leurs cultures mères.

La colonisation des tissus de la plante par *Macrophomina* a été mise en évidence par la réalisation des observations histologiques sur les racines et les tiges de lentille préalablement contaminée artificiellement par les microsclérotés de *Macrophomina*. Ces

observations ont aussi pour but de confirmer la sensibilité de la variété de la lentille utilisée (Syrie 229) vis-à-vis les isolats de *Macrophomina* testés.

Des coupes fines ont été préparées à partir des échantillons de racines et de tiges prélevés de plantes infectées. Elles ont été immergées dans de l'hydroxyde de sodium (0,5 M) pendant 3 min pour ramollir les tissus des plantes. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle contenant une goutte du bleu de lactophénol. Les préparations histologiques ont été observées au microscope optique (grossissement $\times 10$ et $\times 40$) (Hemmati *et al.*, 2018).

2.5. Comportement des isolats de *Bipolaris* Bs1 et *Macrophomina* M1 vis-à-vis des facteurs abiotiques

Les conditions environnementales de développement d'une maladie phytopathogène ont une influence sur le comportement des agents pathogènes.

L'action de quelques facteurs abiotiques, tels que les facteurs nutritionnels (milieu de culture), physiques (température d'incubation) et chimiques (pH du milieu de culture), sur le développement des champignons a été évaluée *in vitro*. L'évaluation a consisté à apprécier, à différents milieux de culture et à différentes températures et valeurs de pH, la croissance mycélienne, la sporulation et la taille des conidies de 2 isolats : *Bipolaris sorokiniana* Bs1 et *Macrophomina pseudophaseolina* M1 qui ont fait l'objet d'une identification moléculaire.

Dans le but de cette étude, et pour chaque isolat, des cultures monospores ont été préparées sur milieu PDA. L'incubation a été réalisée à l'obscurité, pendant 10 jours à 25° C. Une pastille gélosée de 5 mm de diamètre prélevé aseptiquement de chaque culture a été ensemencée au milieu d'une boîte de pétri.

2.5.1. Effet des milieux de culture sur le développement de Bs1 et M1

L'effet de onze (11) milieux de culture solides sur le développement de Bs1 et M1 a été étudié (à savoir le milieu PDA, milieu Czapek, milieu Richard, milieu à base de carotte, milieu de Rose Bengale, milieu SDA (Sabouraud dextrose agar), milieu OGA (Oxytetracycline Glucose Agar), milieu SNA (Synthetic Nutrient Agar), milieu à l'extrait de Malt, milieu à base d'avoine et le milieu à base de Maïs). La composition respective de chacun de ces milieux est présentée en annexe 1.

Les onze (11) milieux de culture ont été coulés séparément dans des boîtes de pétri stériles de 9 cm de diamètre à raison de 20 ml par boîte. Après solidification, les boîtes ont

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

été ensemencées par un disque de chaque culture pure de Bs1 ou M1. Les cultures de champignons, sur les différents milieux de culture, ont été soumises à une température considérée comme optimale pour la croissance de chaque champignon (25°C pour l'isolat de *Bipolaris* (Dutbayev *et al.*, 2022) et 28°C pour l'isolat de *Macrophomina* (Sales Junior *et al.*, 2022)).

Des notations journalières concernant la croissance diamétrale et l'aspect des colonies de Bs1 et M1 sont effectuées.

Sur chaque milieu de culture, le nombre des conidies de *B. sorokiniana* Bs1 a été déterminé par 1 cm² de surface de colonie (Tribelhorn *et al.*, 2022) et la taille des conidies a été également mesurée. Concernant l'isolat de *M. pseudophaseolina* M1, la formation des microsclérotos a été notée, leur taille a été mesurée et leur nombre a été calculé dans un champ microscopique à faible grossissement (10x) (Iqbal et Mukhtar, 2020). Le nombre des microsclérotos est présenté sous la forme suivante :

- = absent ; + = faible ; ++ = moyen ; +++ = élevé, ++++ = très élevé.

2.5.2. Effet de la température et du pH sur le développement de Bs1 et M1

Le développement des 2 isolats (*B. sorokiniana* Bs1 et *M. pseudophaseolina* M1) est étudié sur une gamme de températures : 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C. Nous avons utilisé comme milieu de culture le PDA à pH neutre. L'incubation est réalisée à l'obscurité.

Dans le but d'apprécier l'action du pH sur la croissance des champignons étudiés, nous avons utilisé comme milieu de culture le PDA avec une large gamme de pH allant de 4 à 10. Les boîtes de pétri inoculées sont incubées à l'obscurité et à une température de 25°C et 28°C pour les isolats Bs1 et M1, respectivement.

La croissance mycélienne, mesurée par le diamètre moyen de chaque colonie, est enregistrée le 2^{ème}, 4^{ème} et le 7^{ème} jour après l'inoculation.

2.5.3. Traitement statistique

Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur abiotique étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test de Tukey à 5 %. Une analyse de corrélation a été effectuée dans le but de rechercher des corrélations entre les 11 milieux de culture utilisés par rapport aux paramètres de développement des champignons évalués. Une classification hiérarchique ascendante de ces milieux a été effectuée. Aussi, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour tous les milieux étudiés dans le but d'établir des relations entre les variables

mesurés (paramètres de développement) et définir le comportement d'individus (champignons) vis-à-vis de ces variables. Une régression linéaire a été réalisée dans le but de rechercher des corrélations entre les différents paramètres de développement des champignons (Croissance mycélienne, sporulation/formation des microsclérotés et tailles des conides/microsclérotés).

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de *Bipolaris* et *Macrophomina*

3.1.1. Caractérisation morphologique et biométrique de *Bipolaris* Bs1

La culture de l'isolat de *Bipolaris* (Bs1) sur le milieu PDA avait une texture veloutée, de couleur olive foncé avec un mycélium blanc duveteux (Fig. 30 a). Les conidiophores étaient bruns, non ramifiés avec des cloisons. Les conidies étaient de couleur brune foncé avec des cloisons horizontales (3 à 8 distosepta), droites ou légèrement incurvées, ovales à extrémités arrondies (Fig. 30 b et c) et mesuraient de 17,5 à 47,5 × 10 à 17,5 μm. Les caractéristiques morphologiques de l'isolat fongique étaient similaires à celles décrites pour *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (téléomorphe *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. ex Dastur) (Manamgoda *et al.*, 2014).

3.1.2. Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de *Macrophomina*

Six isolats fongiques ont été obtenus à partir des plantes de lentille infectées. Toutes les colonies étaient initialement hyalines mais sont devenues noires avec le temps d'incubation. Cependant, les cultures dans le verso des boîtes de pétri ont montré une pigmentation noire et foncée due à la production abondante des microsclérotés.

Les microsclérotés noirs, ronds à ovoïdes d'une taille moyenne de 68 μm se sont formés sur la culture 3 jours après l'incubation. Les pycnides produites *in vitro* étaient noires, arrondies, produisant de nombreuses petites pycnidiospores, unicellulaires, hyalines, rondes ou ovales (Fig. 31). Les caractéristiques morphologiques des isolats obtenues étaient typiques de celles du genre *Macrophomina* (Nouri *et al.*, 2020).

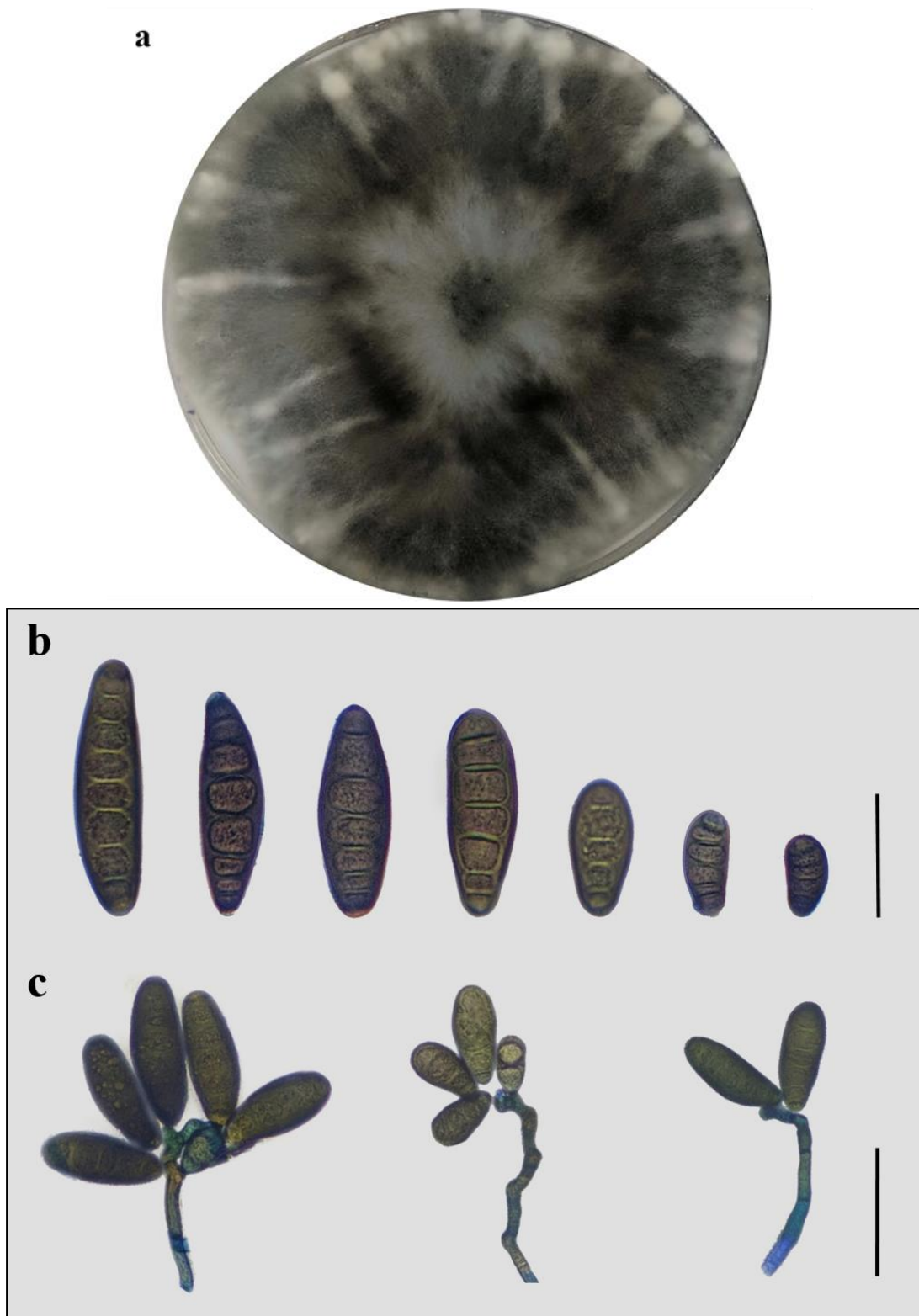


Figure 30: Aspect macro et microscopique de *Bipolaris* (Bs1) (Originale):

a : Colonie de Bs1 sur PDA après 10 jours d'incubation ; **b-c** : Conidiophores et conidies produites sur PDA (Echelle : **b** =20 μ m ; **c** =40 μ m)

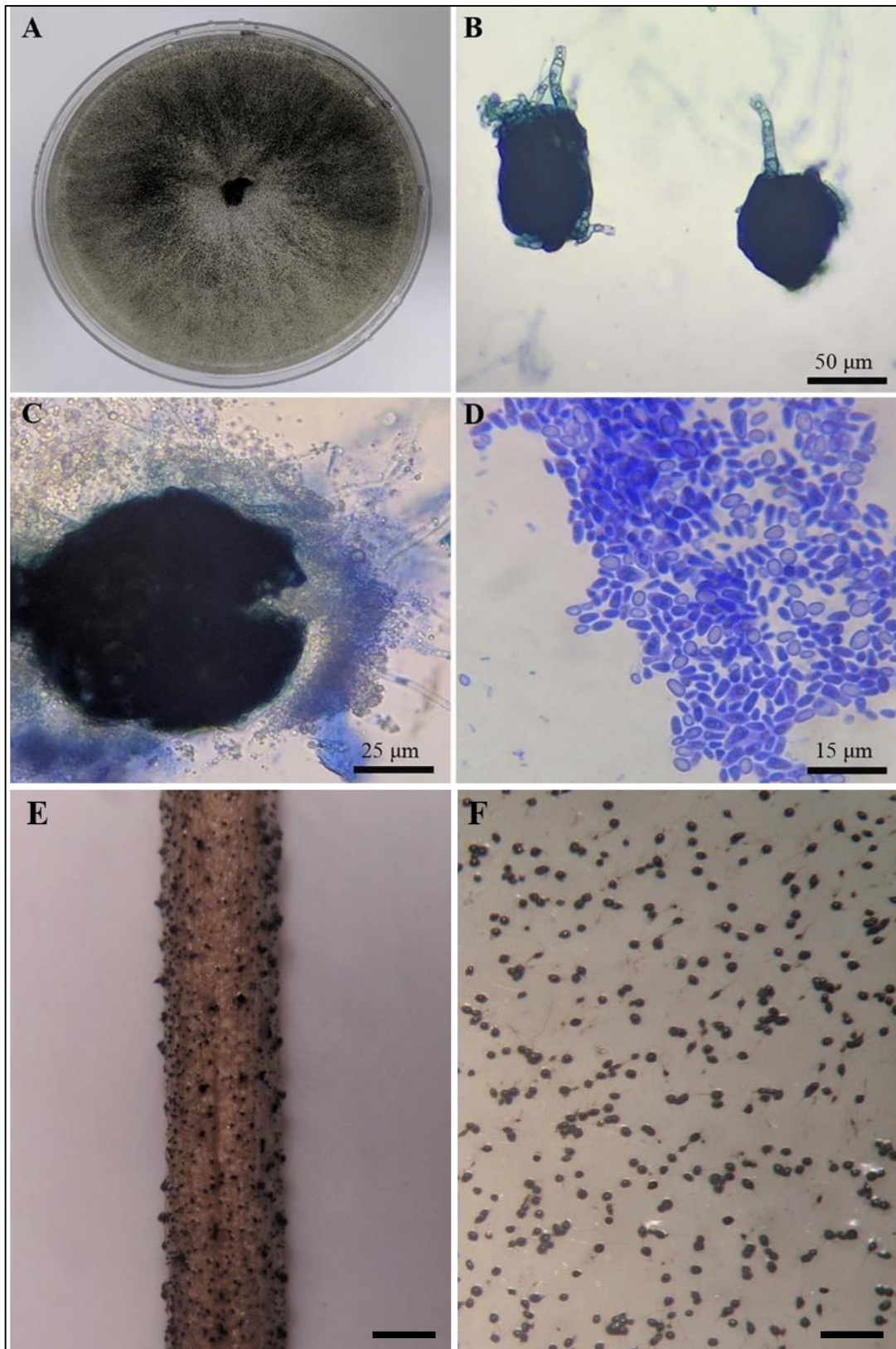


Figure 31: Aspect macro et microscopique de *Macrophomina* M1:

A : Culture cultivée sur gélose au dextrose de pomme de terre. **B** : Microsclérotés.
C : Pycnidiospores libérées du pycnidium. **D** : Pycnidiospores. **E** : Microsclérotés
produites sur une aiguille en bois imbibée en SNA (*Echelle* = 1 mm). **F** : Microsclérotés
produites sur eau gélifiée (*Echelle* = 1 mm).

3.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique

L'identification morphologique des isolats de *Bipolaris* Bs1 et de *Macrophomina* M1 et M2 a été confirmée par une identification moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS et du gène TEF1- α de l'ADN ribosomale. Ils ont été identifiés comme étant des espèces de *Bipolaris sorokiniana* (Bs1) et *Macrophomina pseudophaseolina* (M1 et M2).

3.2.1. Identification moléculaire de *Bipolaris sorokiniana* (Bs1)

Les séquences d'ADN obtenues de l'isolat Bs1 (Annexe 2), de la région ITS et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α), ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données NCBI GenBank. Les résultats ont montré une homologie de 100% avec les séquences ITS de *B. sorokiniana* (KJ830832, KM030311, KF512821) et de 98% d'homologie avec les séquences TEF (CP102789, LC546960, LC546959).

Les séquences de l'ADNr obtenues de la région ITS1/ITS4 et du gène TEF-1 α de *B. sorokiniana* Bs1 ont été déposées dans la base de données GenBank sous les deux numéros d'accèsion MW386302 et MW435412 respectivement.

L'arbre phylogénétique a été construit sur la base de séquences concaténées de régions de l'ITS et du TEF-1 α . Le dendrogramme montre une bonne cohérence de classification entre les caractères moléculaires des espèces de *Bipolaris* (Fig. 32). L'assemblage des données d'identification moléculaire et morphologique nous a permis de classer l'isolat Bs1 en tant que *B. sorokiniana*.

3.2.2. Identification moléculaire de *Macrophomina pseudophaseolina* (M1 et M2)

L'identité de deux isolats représentatifs de *Macrophomina* (M1 et M2) a été confirmée par l'analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS1/ITS4 et du gène TEF-1 α . Les séquences nucléotidiques obtenues ont été déposées dans la base de données NCBI GenBank sous les numéros d'accèsion : MW422257 et OK545879 pour l'ITS et TEF-1 α de M1 et MW420980 et MW779544 pour l'ITS et TEF-1 α de M2, respectivement (Annexe 3). La recherche BLASTn avec les séquences ITS des isolats M1 et M2 a montré une similarité de 100% avec la séquence de la souche de type *M. pseudophaseolina* ex CPC 21394 (KF951786). La séquence TEF de l'isolat M1 a montré une similarité de 99,52% avec les séquences MK511891, KU058905 et MZ476935, tandis que celle de M2 a montré une similarité de 96% avec les séquences MK511889, MK511891, MK511876. L'arbre phylogénétique des deux isolats M1 et M2 a été construit sur la base de séquences concaténées de régions ITS et TEF-1 α (Fig. 33). L'analyse phylogénétique des séquences concaténées a regroupé M1 et M2 systématiquement avec les souches de référence *M. pseudophaseolina*.

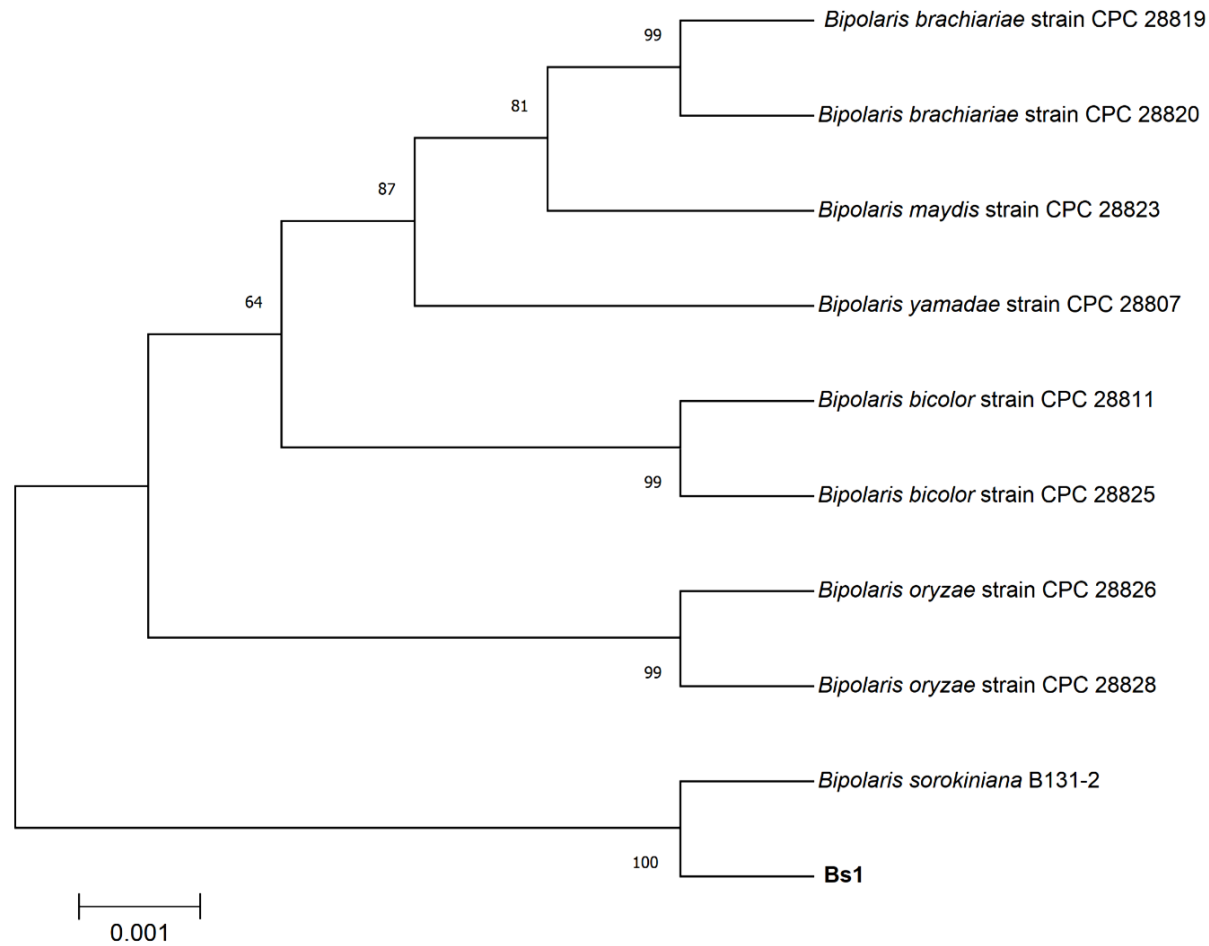


Figure 32: Arbre phylogénétique généré à partir de séquences concaténées de régions de l'espaceur transcrit interne (ITS) et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α) montrant la phylogénie de l'isolat Bs1 et d'autres espèces de *Bipolaris*. Sur la base de la méthode de Neighbor-joining, l'isolat Bs1 a été regroupé avec la souche B131-2 de *B. sorokiniana*. Les valeurs bootstraps (exprimées en pourcentage de 1000 répétitions) sont indiquées au point de branchement. L'isolat de la présente étude est en gras.

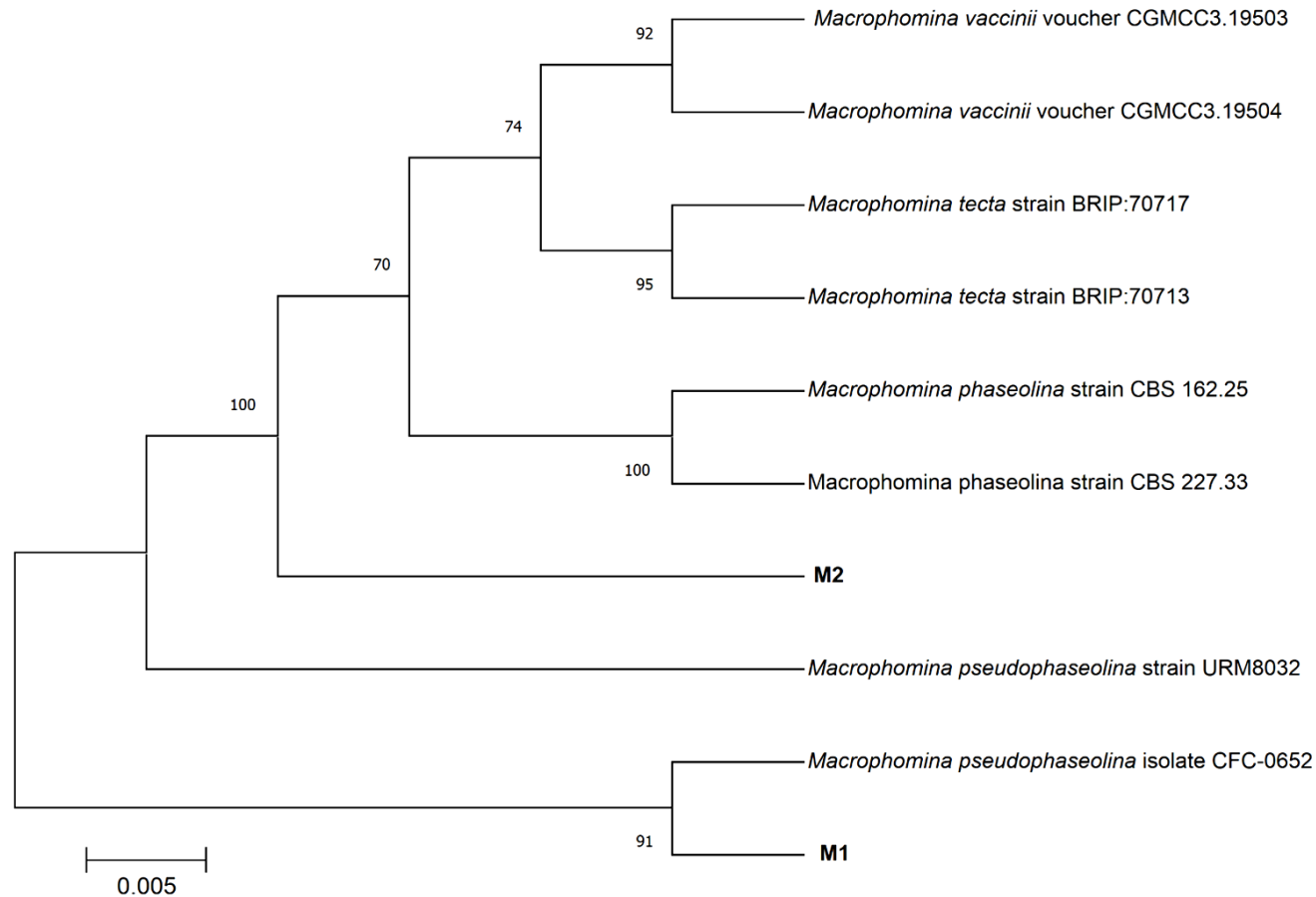


Figure 33: Arbre phylogénétique généré à partir de séquences concaténées de régions de l'espaceur transcrit interne (ITS) et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α) montrant la phylogénie des isolats représentatifs M1 et M2 et d'autres espèces de *Macrophomina* sp. Sur la base de la méthode de Neighbor-joining, nos isolats (M1 et M2) sont été regroupés avec les souches CFC-0652 et URM8032 de *M. pseudophaseolina*. Les valeurs bootstraps (exprimées en pourcentage de 1000 répétitions) sont indiquées au point de branchement. Les isolats de la présente étude est en gras.

3.3. Pathogénicité des isolats de *Bipolaris* et *Macrophomina*

3.3.1. Pathogénicité de *B. sorokiniana* (Bs1)

L'isolat de *B. sorokiniana* (Bs1), pulvérisé sur les feuilles de la variété Syrie 229, a provoqué des symptômes typiques de la tache helminthosporienne. Les altérations foliaires des plantules pulvérisées ont débuté par des petites lésions chlorotiques avec un halo brun (Fig. 34 A, B et C). Ces premiers symptômes observés ont été apparus 15 jours après la pulvérisation des feuilles.

Les lésions observées se sont étendues en une grande tache allongée le long des feuilles (Fig. 34 D, E et F). De tels symptômes, caractéristiques de la tache helminthosporienne, étaient similaires à ceux rapportés sur plusieurs cultures comme l'orge et le blé (Gupta *et al.*, 2018). Durant toute la durée de l'essai, les plantes témoins maintenues dans les mêmes conditions que les plantes inoculées, n'avaient manifesté aucun symptôme.

Ce test de pathogénicité a révélé que la variété Syrie 229 est sensible aux attaques de *B. sorokiniana*. La gravité du symptôme, basé sur la réponse de l'infection (RI), a été calculée 30 jours après l'inoculation. Une RI intermédiaire de 4,7 a été enregistrée qui correspond à des lésions nécrotiques de taille moyenne avec une marge chlorotique distincte mais restreinte. Plus de 80 % de la surface foliaire est atteinte de nécrose et de chlorose généralisée.

Le réisolement du Bs1 effectué à partir des feuilles inoculées artificiellement a permis de confirmer l'implication de cet agent pathogène dans l'induction des lésions nécrotiques. Les cultures fongiques issues des ré-isolements sont morphologiquement identiques à leur culture mère.

Selon Jahani *et al.* (2006, 2014), la virulence de *Bipolaris sorokiniana* est liée à la production d'un certain nombre de phytoalexines comme le bipolaroxine qui entraîne des lésions jaunes ou nécrotiques sur les feuilles de blé.

L'agent pathogène *B. sorokiniana* est connu pour avoir une large gamme d'hôtes y compris le blé, l'orge et d'autres céréales et graminées (Wiese, 1998). Après la récolte de ces derniers, la lentille est parmi les cultures de légumineuses la plus courante et la plus bénéfique utilisée en rotation, comme une plante non hôte, pour réduire l'impact des maladies foliaires (Chang et Wu, 1998). Donc, la source d'inoculum de *B. sorokiniana* existe en permanence dans les champs de lentille ; cela peut expliquer la présence du champignon Bs1 sur la culture de lentille à Relizane.

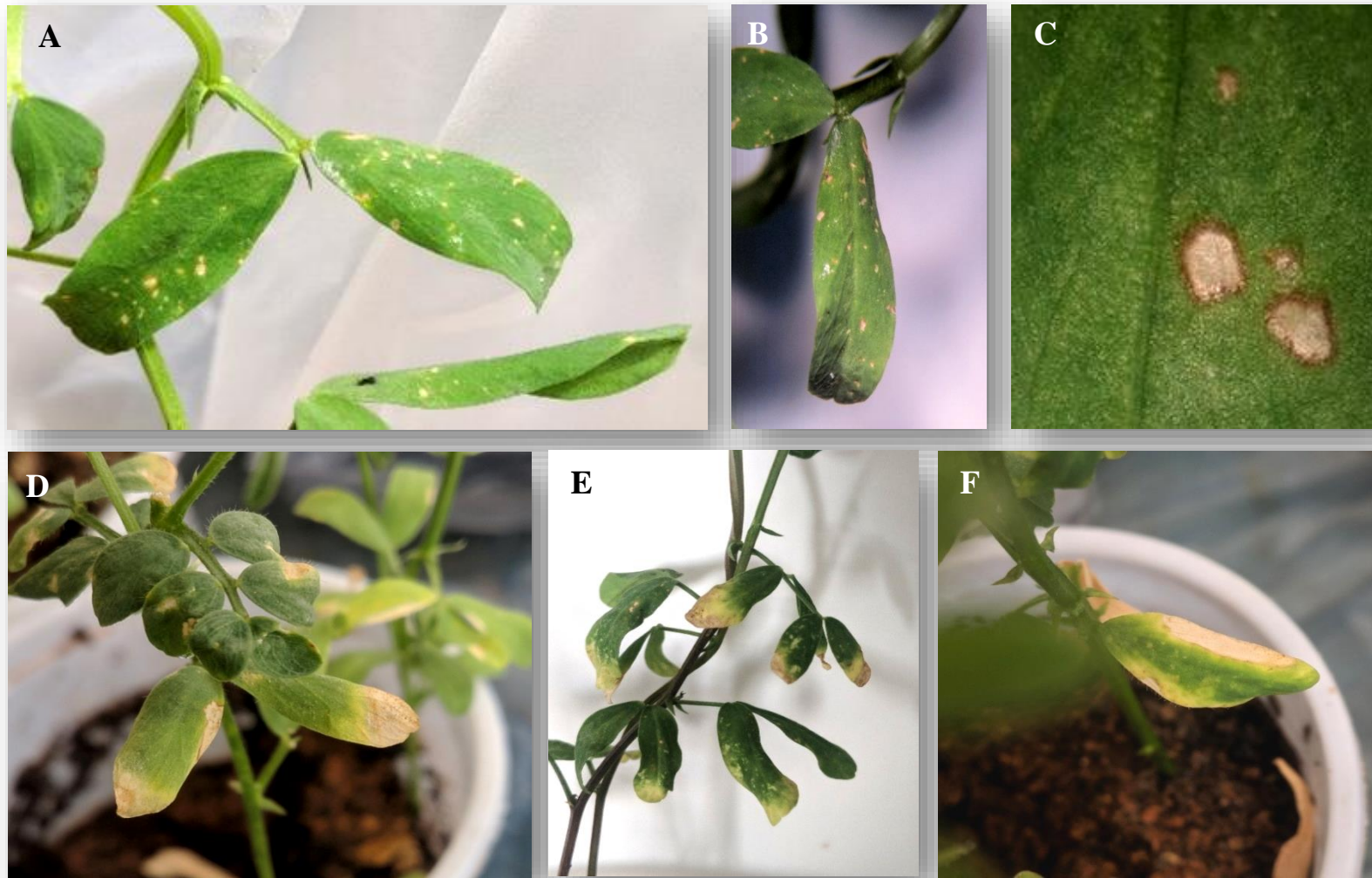


Figure 34: Symptômes de la tache helminthosporienne causés par *B. sorokiniana* Bs1 sur la lentille :

A, B et C : altérations foliaires sous forme de petites lésions chlorotiques avec un halo brun.

D, E et F : des lésions étendues en une grande tache allongée le long des feuilles.

La pathogénicité de *B. sorokiniana*, isolé à partir des feuilles du blé, a été testé in vitro par des inoculations artificielles sur les feuilles de 15 cultures différentes dont la lentille (Iftikhar *et al.*, 2009). Les symptômes typiques de la tache helminthosporienne ont été produits sur les feuilles de 11 cultures dont la lentille. Notre résultat montre qu'il s'agit du premier signalement de *B. sorokiniana* infectant naturellement la lentille en plein champs et provoquant la tache helminthosporienne sur les feuilles de la lentille en Algérie et au monde (Farr et Rossman, 2021). Ces résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en 2021 dans la revue spécialisée « New Disease Report » (Annexe 9).

3.3.2. Pathogénicité des isolats de *Macrophomina*

Les graines de lentille (variété Syrie 229) ont été inoculées artificiellement par six (06) isolats de *Macrophomina*. Le test de pathogénicité a montré que tous isolats de *Macrophomina* testés ont une capacité relativement forte à infecter la plante de lentille et ont provoqué des symptômes caractéristiques de la pourriture charbonneuse.

Le début d'apparition des symptômes a été observé 16 jours après le trempage des graines où les plantes présentaient des chloroses sur les feuilles (Fig. 35 A), une décoloration brune de la tige et des racines qui finissaient par sécher, provoquant la mort prématurée des plantules (Fig. 35 B et C). Ces symptômes sont identiques à ceux décrits en plein champ (Voir Fig. 29 dans le chapitre 3) et rapportés par Ulah *et al.*, (2019).

Suite à un examen visuel des plantes à l'aide d'une loupe binoculaire, des microsclérotés noirs et abondants ont été observés à la base de la tige et sur les racines (Fig. 35 D et E). En revanche, aucun symptôme n'a été observé sur les plantes témoins.

L'agent pathogène a été ré-isolé de toutes les plantes inoculées, répondant au postulat de Koch et témoignant la colonisation des plantes par l'agent pathogène.

Les notations réalisées sur chaque plantule, nous ont permis d'exprimer par un pourcentage, la réaction globale de la variété Syrie 229 de lentille pour son comportement à l'égard de six isolats de *Macrophomina*. L'incidence de la maladie enregistrée a été maximale (100%) chez tous les isolats testés à l'exception de l'isolat M6 où une incidence de 75% avec un indice de gravité de 2,4 ont été enregistrées. Cependant, l'isolat M1 était le plus virulent avec une gravité maximale de 5 suivis par M2 (4,8). Selon Basandrai *et al.*, (2021), la virulence de *Macrophomina* est liée à son mode d'action où il secrète des phytotoxines et enzymes dégradant la paroi cellulaire ainsi que l'obstruction des vaisseaux par les hyphes fongiques, ce qui perturbe la défense de l'hôte et entraîne la mort de la plante.

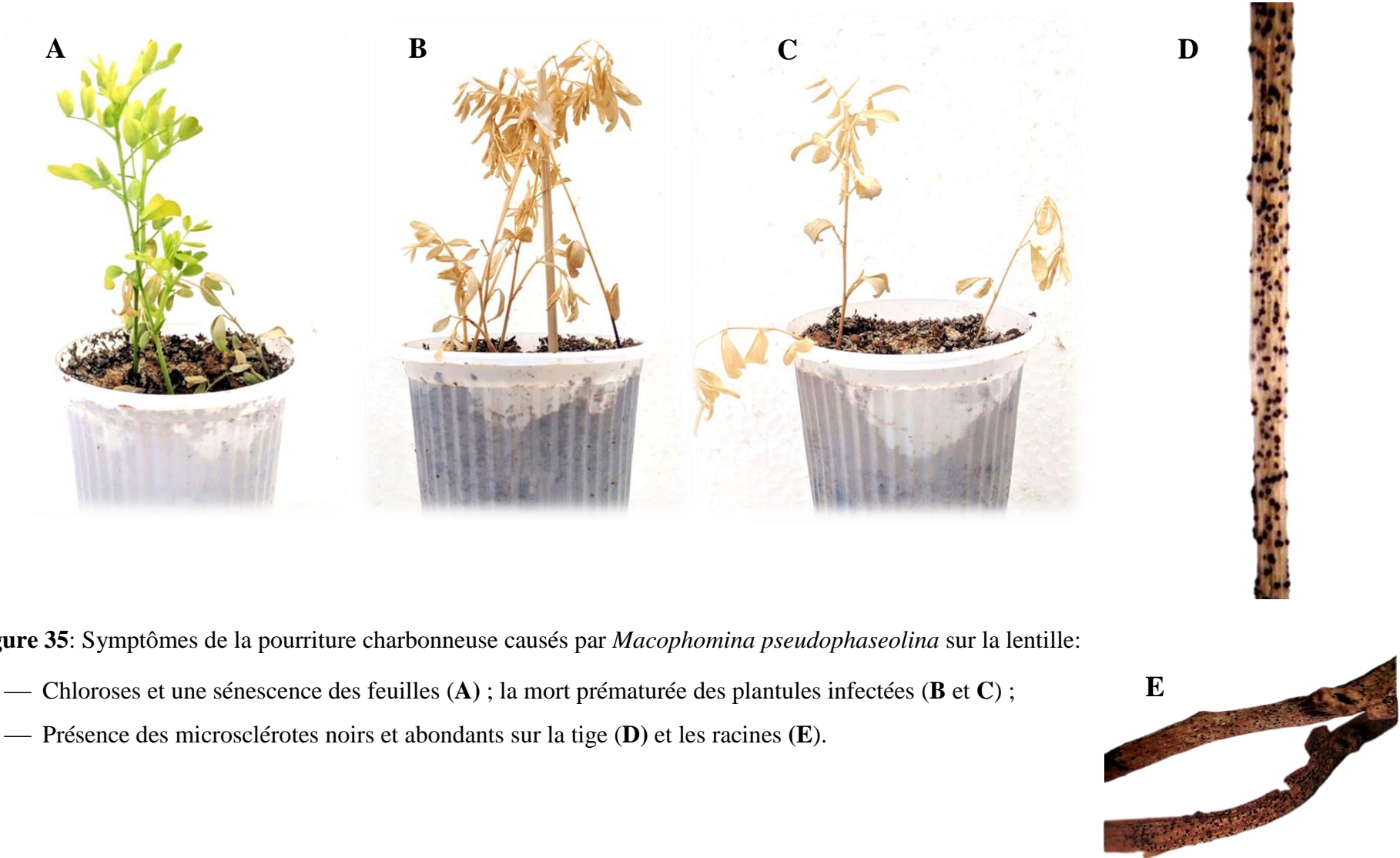


Figure 35: Symptômes de la pourriture charbonneuse causés par *Macrophomina pseudophaseolina* sur la lentille:

- Chloroses et une sénescence des feuilles (A) ; la mort prématurée des plantules infectées (B et C) ;
- Présence des microsclérotés noirs et abondants sur la tige (D) et les racines (E).

La méthode d'inoculation par trempage des graines dans une suspension de microsclérotés décrite par Khanzada *et al.* (2012) s'est avérée très efficace pour l'infection de l'hôte. En effet, elle a permis la manifestation rapide des symptômes de la pourriture charbonneuse après 16 jours d'inoculation.

La variété Syrie 229 de la lentille, utilisée dans ce test de pathogénicité, a montré une réaction de sensibilité envers les six isolats de *Macrophomina* testés. Elle ne s'oppose pas à l'installation du pathogène dans les tissus racinaires et de la tige de l'hôte. La sensibilité de cette variété est liée à la colonisation des tissus par le champignon.

L'observation des coupes histologiques des racines et des tiges infectées par *Macrophomina* a révélé la présence du pathogène à différents niveaux tissulaires (Fig. 36 A, B et C). Les observations nous ont permis de noter une colonisation remarquable des tissus fondamentaux et conducteurs ainsi que le cylindre central par la présence de filaments mycéliens et des microsclérotés en abondance (Fig. 36 A, B et C). Ces observations justifient l'envahissement du pathogène des différentes couches tissulaires (épiderme, collenchyme, parenchyme cortical et médullaire, xylème et phloème). La présence des microsclérotés sur les vaisseaux conducteurs (Fig. 36 B) peuvent conduire à leur obstruction.

Un brunissement des différents tissus a été constaté sur les racines infectées et le cylindre central s'est détaché du cortex (Fig. 36 C). Cela peut être dû à l'activité des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques produites par le champignon comme le suggère Kunwar *et al.* (1986) et Khan (2012). D'autres modifications structurales ont été observées sur les racines infectées comme l'étirement des cellules parenchymateuses (Fig. 36 C) où cela peut être le résultat d'une pression mécanique exercée par les microsclérotés en développement (Kunwar *et al.*, 1986 ; Siddique *et al.*, 2020).

L'étude histo-pathologique réalisée par Siddique *et al.*, (2020) sur les tiges et les racines de tournesol infecté par *Macrophomina phaseolina* a montré la pénétration inter- et intracellulaire de ces hyphes dans les cellules épidermiques, ce qui a entraîné un brunissement et une désintégration des tissus alors que les cellules autour des microsclérotés étaient compactées. Suite à l'envahissement de l'épiderme et du cortex, *M. phaseolina* colonise le système vasculaire en développant des microsclérotés sur les vaisseaux du xylème qui peuvent conduire à leurs obstructions. Le champignon provoque par la suite une désintégration des tissus et une occlusion des vaisseaux du phloème et du xylème. Les mêmes observations ont été signalées par Hemati *et al.*, (2018) sur les plantes de soja infectées par *M. phaseolina*.

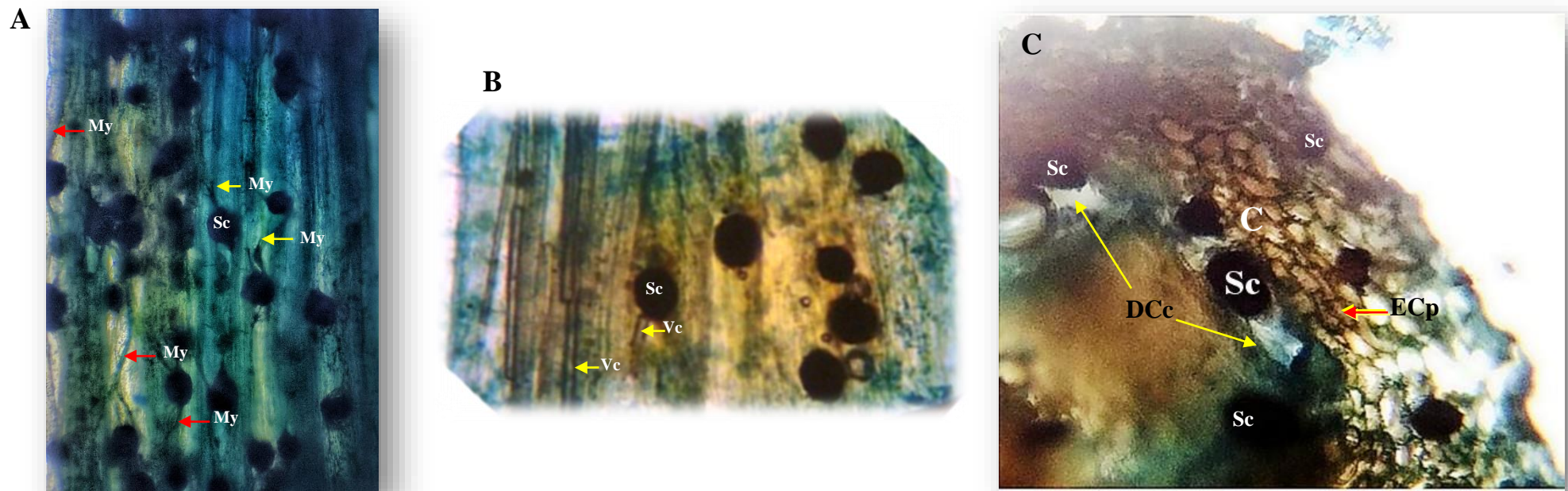


Figure 36: Coupes histologiques réalisées sur les tiges (A et B) et la racine (C) de lentille infectée par *Macrophomina pseudophaseolina*.

- **A-B-C** : Localisation des microsclérotés (Sc) dans les tissus infectés.
- **A (Gr:10x)**: Coupe histologique longitudinale d'une tige infectée montrant l'envahissement de filaments mycéliens (My) des différentes couches tissulaires et la présence en abondance des microsclérotés (Sc) ecto- et endophytes.
- **B (Gr:40x)**: Coupe histologique longitudinale d'une tige infectée : présence des microsclérotés (Sc) à différents niveaux tissulaires et particulièrement sur les vaisseaux conducteurs (Vc).
- **C (Gr:40x)**: Coupe histologique transversale d'une racine infectée :
 - Présence des microsclérotés (Sc) en abondance dans tous les tissus.
 - Modifications structurales observées : étirement (Ecp) et brunissement des cellules parenchymateuses ; cylindre central détaché (DCc) du cortex (C).

L'espèce *M. pseudophaseolina* a été décrite pour la 1^{ère} fois par Sarr *et al.*, (2014). En 2021, *M. pseudophaseolina* a été signalé sur 12 hôtes de plantes différentes (non-compris la lentille) et dans 3 pays seulement (Sénégal, Brésil et l'Australie) (Farr et Rossman, 2021). Nos résultats obtenus ont démontré que le *M. pseudophaseolina* est aussi pathogène sur la culture de la lentille provoquant la pourriture charbonneuse de la lentille en Algérie et dans le monde. Ces résultats ont également fait l'objet d'une publication en 2021 dans la revue spécialisée « Australasian Plant Disease Notes » (Annexe 10).

3.4. Comportement des isolats de *Bipolaris* Bs1 et *Macrophomina* M1 vis-à-vis des facteurs abiotiques

3.4.1. Effet des milieux de culture sur le développement de *B. sorokiniana* Bs1

Les résultats rapportés dans tableau 12 et les figures 37, 38, 39 et 40 font apparaître des différences de comportement de *B. sorokiniana* Bs1 sur les onze milieux de culture utilisés. Pour un temps donné d'incubation, un maximum de croissance mycélienne est obtenu sur le milieu à base d'avoine, suivi du milieu à base de carotte, du milieu à l'extrait Malt et du milieu SDA. Quant au milieu OGA, il s'est montré défavorable à la croissance du *B. sorokiniana* (Tableau 12 ; Fig. 37 et 38).

La figure 37 fait ressortir des variations considérables des caractères macroscopiques de Bs1 sur les onze milieux de culture testés. On a remarqué que l'aspect des colonies de *B. sorokiniana* diffère d'un milieu à l'autre.

Les nombre et la taille des conidies de Bs1 dépendent également du milieu de culture utilisé (Tableau 12 ; Fig. 39 et 40). La plus forte sporulation du champignon a été enregistrée sur le milieu à l'extrait de Malt, suivi par les deux milieux PDA et SDA. Le milieu à base de Maïs s'est montré défavorable à la sporulation du parasite (Tableau 12 ; Fig. 39). Cependant, les plus longues conidies ont été produites dans le milieu SNA, tandis que les conidies à petite taille étaient observées sur le milieu Richard (Tableau 12 ; Fig. 40).

Tableau 12: Effet des milieux de cultures sur les paramètres de croissance de *B. sorokiniana* Bs1

Milieu	Croissance (cm)*	Couleur de la colonie	Aspect de la colonie	Nombre de conidies* / cm ²	Mensuration (µm)*
PDA	3,95±0,62 ^c	Vert olivâtre foncé	Ras	88,6±25,73 ^{ab}	34,58±7,97 ^{bcd} x 10,41±1,88
Avoine	9±0,00 ^a	Gris	Duveteux	16±3,87 ^c	27,5±7,07 ^{cde} x 10,83±1,36
Richard	3,15±0,68 ^c	Vert olivâtre foncé	Ras	17±1,58 ^c	21,66±5,84 ^e x 11,66±2,58
Malt	8,25±0,25 ^a	Vert olivâtre avec marge blanche	Duveteux	112±24,78 ^a	37,91±4,85 ^{abc} x 13,33±1,02
Czapek	3,48±0,88 ^c	Vert olivâtre foncé	Ras	23,6±3,5 ^c	24,58±6,59 ^{de} x 10,83±3,76
SDA	8,1±0,60 ^a	Vert olivâtre avec marge grise	Duveteux	80,2±19,33 ^b	35,71±6,70 ^{abc} x 11,78±1,58
Rose B	3,95±0,69 ^c	Blanc	Duveteux	10,57±2,88 ^c	37,9±2,45 ^{abc} x 11,66±1,29
OGA	2,58±0,48 ^c	Vert olivâtre foncé	Ras	76,2±10,10 ^b	41,25±3,79 ^{ab} x 13,33±1,29
SNA	6,366±0,20 ^b	Gris	Ras	13,83±1,92 ^c	45,83±5,62 ^a x 12,5±0,00
Carotte	8,366±0,05 ^a	Vert pale	Duveteux	24,6±3,64 ^c	37,5±4,18 ^{abc} x 10±1,02
Maïs	5,6±0,57 ^b	Vert olivâtre clair	Ras	0	-

* : au niveau de chaque ligne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P \leq 0.05$) (Annexe 4).

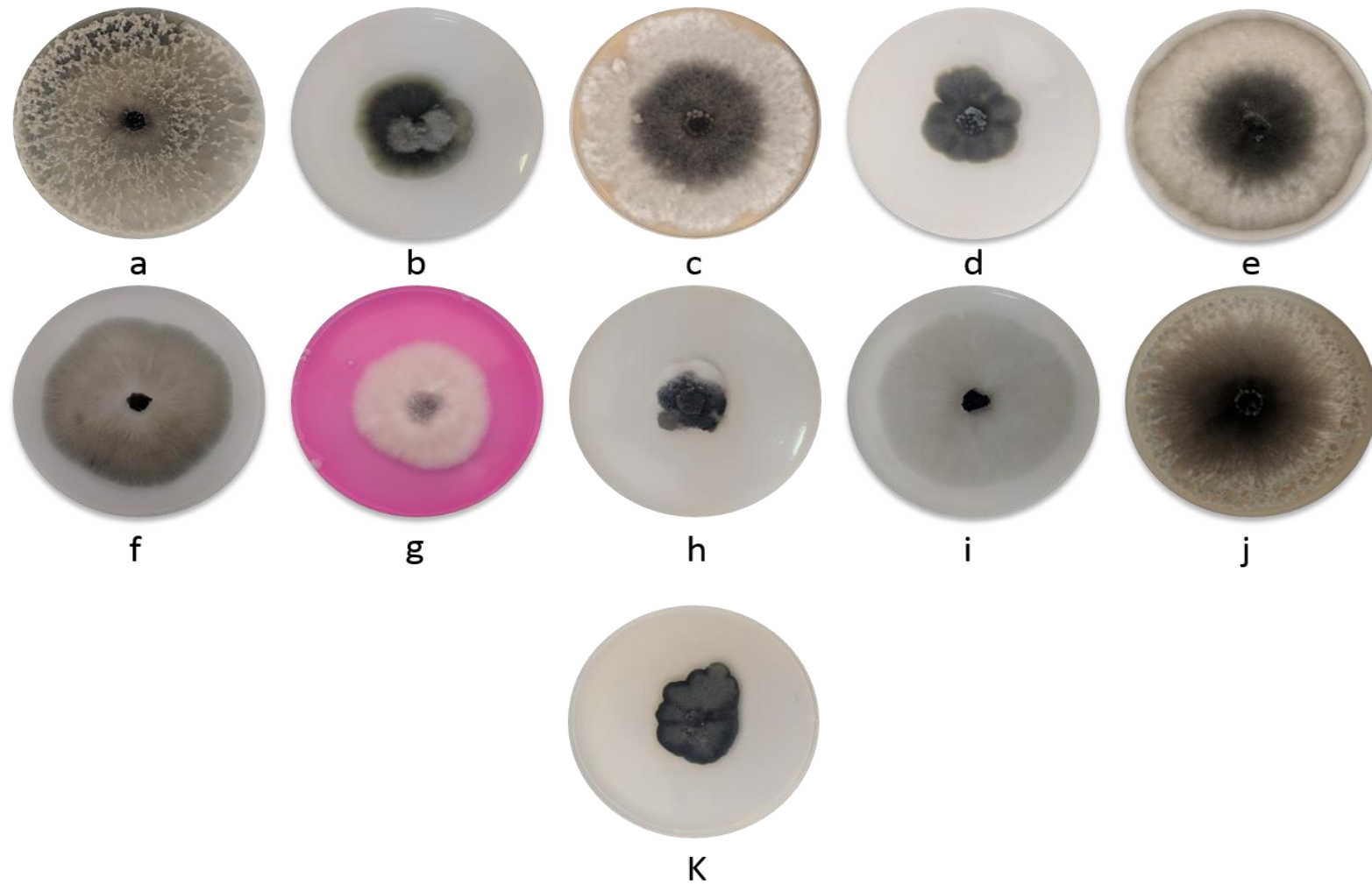


Figure 37: Aspect des colonies de *Bipolaris sorokiniana* Bs1 sur différents milieux de culture:

a : milieu à base d'avoine, **b** : Richard, **c** : Malt agar, **d** : Czapek, **e** : SDA, **f** : Milieu à base de Maïs, **g** : Rose Bengale, **h** : OGA, **i** : SNA, **j** : Carotte agar, **k** : PDA

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

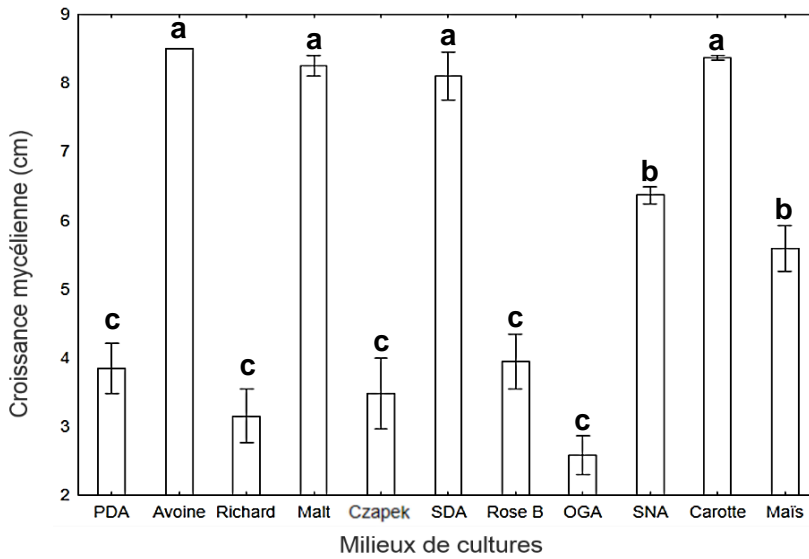


Figure 38 : effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne (cm) de *B. sorokiniana* après 7 jours d'incubation.

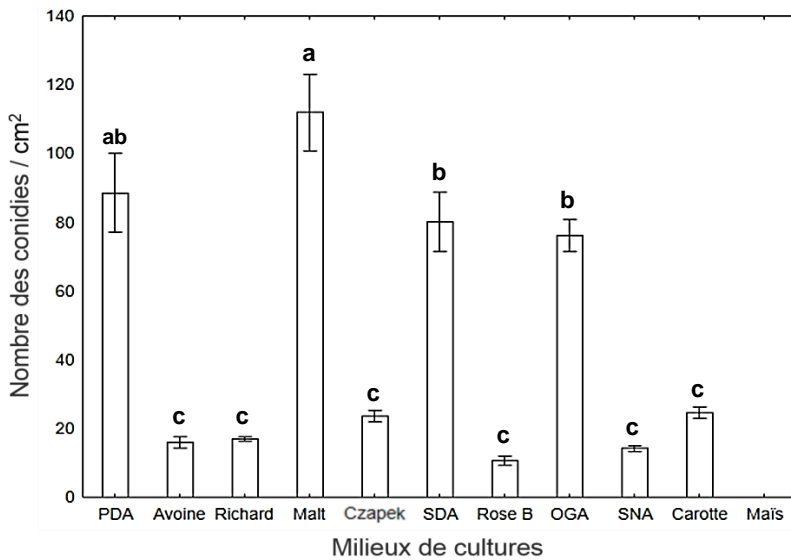


Figure 39 : Le nombre des conidies (en cm²) de *B. sorokiniana* produites sur les 11 milieux de culture après 7 jours d'incubation

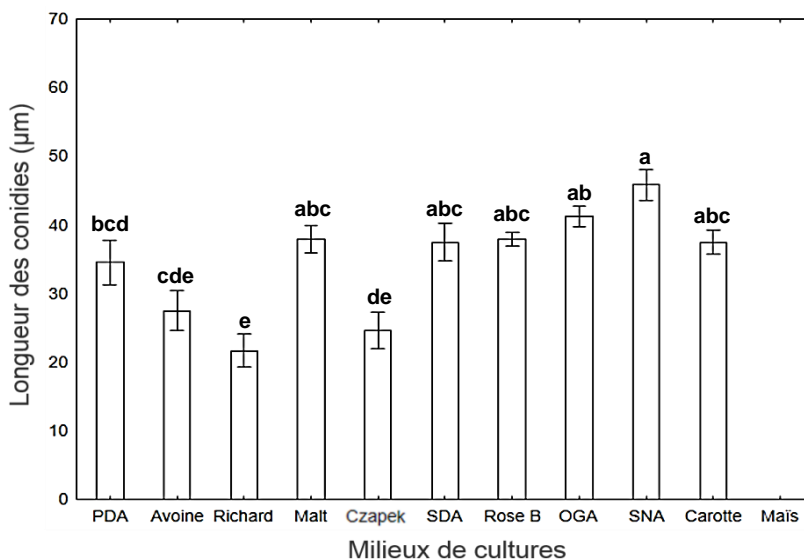


Figure 40 : La longueur des conidies (µm) de *B. sorokiniana* produites sur les milieux de culture après 7 jours d'incubation

Les coefficients de corrélations entre les 11 milieux de culture utilisés dans cette étude ont été calculés dans le but de chercher des associations possibles entre ces milieux. La figure 41 présente une matrice de corrélation entre l'ensemble des milieux de culture utilisés.

L'analyse de la figure 41 nous a permis de remarquer l'existence des corrélations parfaites ($r=1$) entre les milieux PDA et SDA, les milieux PDA et Malt et le milieu SNA avec rose Bengale. Des corrélations positives entre la plupart des milieux ont été enregistrées à l'exception du milieu à base de maïs où les corrélations étaient négatives.

Une classification des 11 milieux de culture a été réalisée suivant les paramètres notés (la croissance mycélienne, le nombre et la taille des conidies). La classification est projetée sur la figure 42 ; c'est une classification hiérarchique basée sur l'algorithme de Ward (Jongman *et al.*, 1995), qui calcule les distances euclidiennes entre les points des milieux de cultures à partir de leurs coordonnées dans les dimensions de l'espace factoriel virtuel. Trois (03) groupes principales (I, II et II) sont à distinguer de la figure 42 à une distance euclidienne de 50 sur le dendrogramme :

—Le groupe 1 est constitué de 4 milieux (PDA, SDA, Malt et OGA) qualifiés de bon à moyen, dans tous les paramètres étudiés. Une sporulation abondante du *B. sorokiniana* sur ces milieux a été notée par rapport au reste des milieux.

—Le groupe 2 comporte 6 milieux et divisé en 2 sous-groupes ; le 1^{er} sous-groupe (Avoine, Richard, Czapek) se caractérise par le faible nombre de conidies avec des tailles moyennes. Par contre, le 2^{ème} sous-groupe (rose Bengale, SNA et Carotte) est caractérisé par une sporulation faible mais des conidies longues.

—Le groupe 3 est constitué seulement du milieu à base de maïs. Ce milieu est défavorable pour la sporulation de *B. sorokiniana*.

Cette classification a été confirmée par une ACP (analyse en composante principales). La projection des milieux de cultures sur la carte factorielle est montrée dans la figure 43.

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

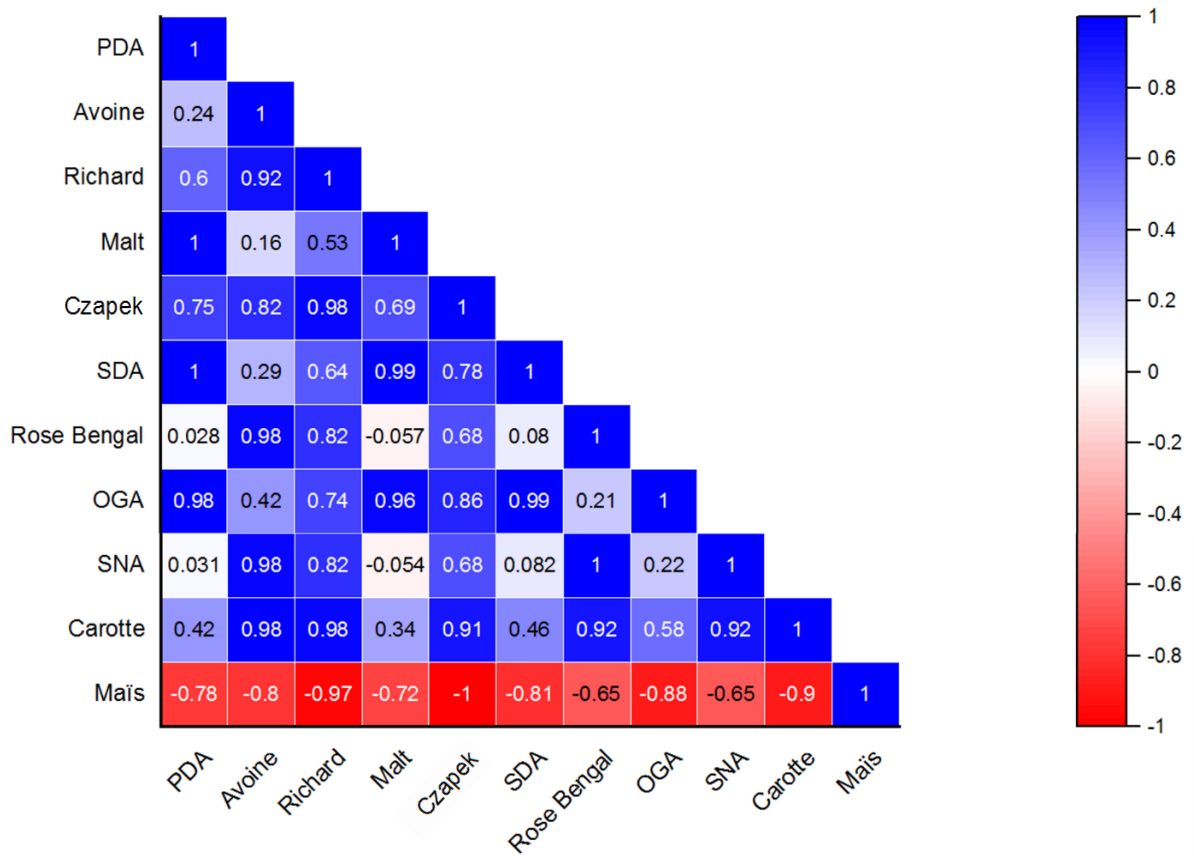


Figure 41 : Matrice de corrélation, entre les 11 milieux de culture testés, calculée suivant les différents paramètres de développement de *B. sorokiniana*

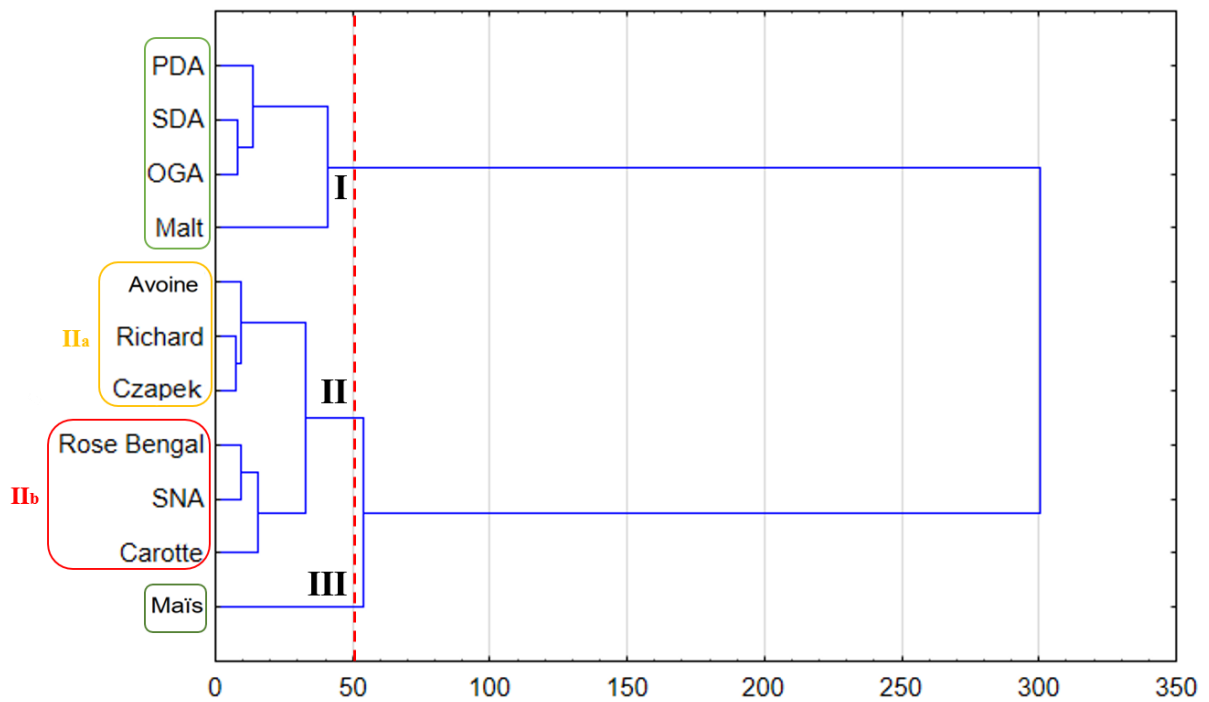


Figure 42 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 11 milieux suivant les 3 paramètres de développement de *B. sorokiniana*

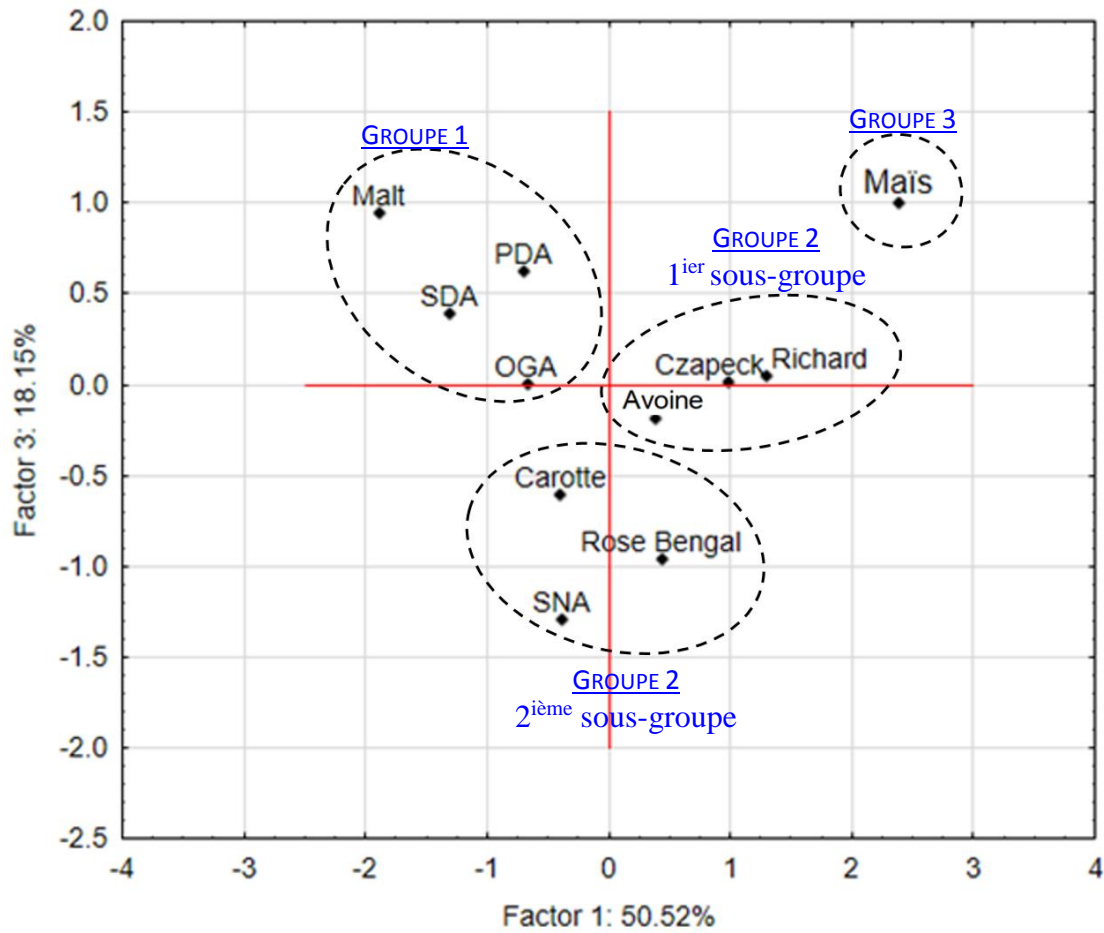


Figure 43 : Répartition des 11 milieux de culture suivant les paramètres de développement de *B. sorokiniana* étudiés par une ACP

D'autres corrélations possibles ont été recherchées entre les différents paramètres notés (la croissance mycélienne, la sporulation et la taille des conidies) au moyen d'un programme de régression linéaire. Les résultats obtenus et illustrés sur les figures 44, 45 et 46 ont montré une corrélation positive entre les 3 paramètres évalués.

Le tableau 13 présente une matrice de corrélation entre les paramètres évalués (la croissance mycélienne, la sporulation et la taille des conidies). Des corrélations presque nulles ont été notées entre le paramètre de la croissance mycélienne et la sporulation et celui de la taille des conidies ($r=0,106$ et $r=0,13$ respectivement). Il en ressort que ces deux paramètres sont faiblement liés l'un aux autres. Par contre, le coefficient de corrélation obtenu entre la sporulation et la taille des conidies est égale à $0,417$; ce qui peut démontrer une corrélation moyenne entre eux (Tableau 13).

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

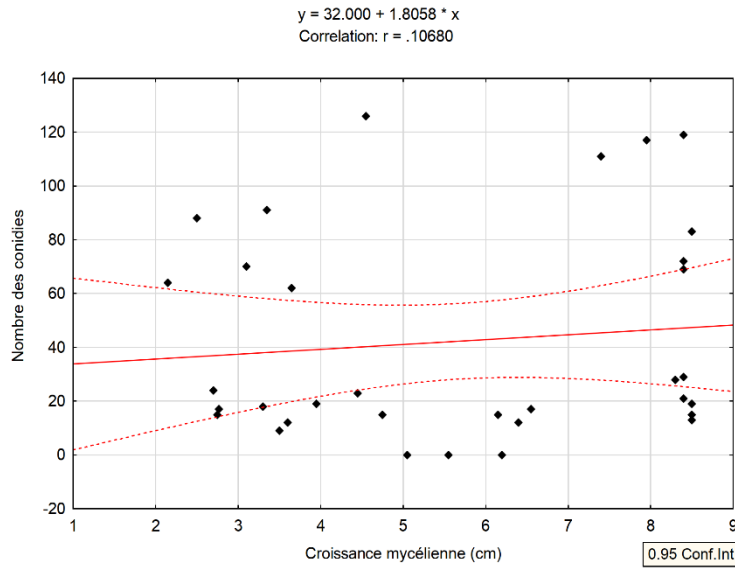


Figure 44 : Corrélation entre les valeurs de la croissance de *B. sorokiniana* sur les 11 milieux de culture et le nombre de conidies produites par cm^2

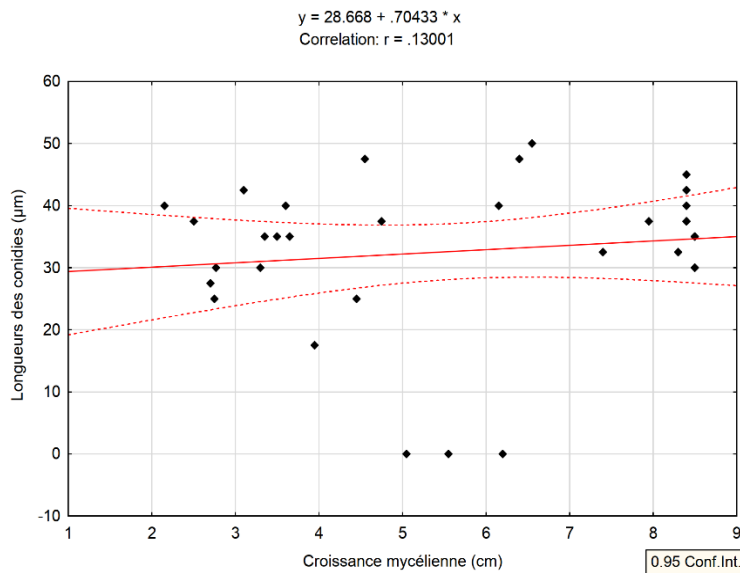


Figure 45 : Corrélation entre les valeurs de la croissance de *B. sorokiniana* sur les 11 milieux de culture et la longueur des conidies (μm)

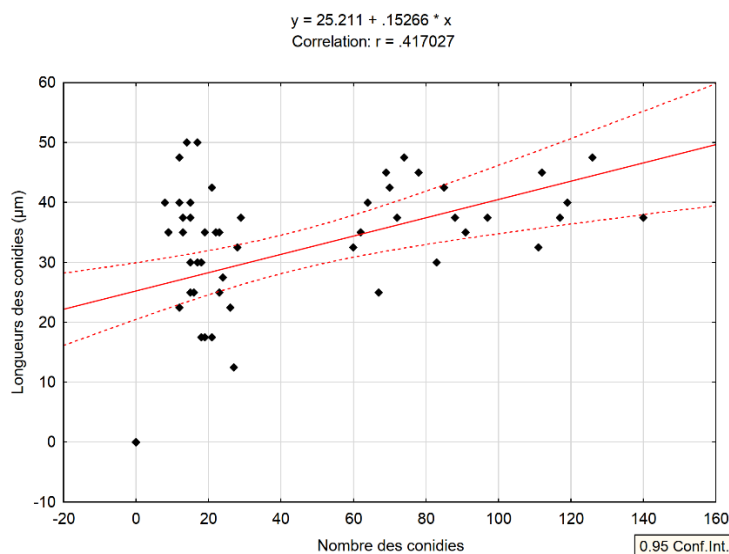


Figure 46 : Corrélation entre les valeurs du nombre de conidies ($/\text{cm}^2$) de *B. sorokiniana* produites sur les 11 milieux et la longueur des conidies (μm)

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

Tableau 13: Matrice de corrélation calculée sur les 3 paramètres évalués du développement de *B. sorokiniana* Bs1

Variables	Corrélations				
	Les corrélations marquées sont significatives à $p < 0,05$				
	Moyenne	Ecart type	Longueurs	Sporulation	Croissance mycélienne
Longueurs de conidies (μm)	32,65	12,56	1	0,417	0,130
Nombre de conidies ($/\text{cm}^2$)	42,21	39,20	0,417	1	0,106
Croissance mycélienne (cm)	5,65	2,31	0,130	0,106	1

3.4.2. Effet de la température et du pH sur le développement de *B. sorokiniana* Bs1

Les résultats de l'effet de la température sur la croissance mycélienne de *B. sorokiniana* Bs1 sont présentés sur le tableau 14 et la figure 47. Les résultats obtenus montrent que d'une façon générale, l'isolat Bs1 a une croissance qui augmente régulièrement à des températures de 10 à 30°C, ensuite elle diminue pour devenir nulle à 40°C. L'optimum de croissance se situe aux alentours de 30°C. Par contre, aucune croissance est observée à la température 4°C et 40°C.

L'analyse de la variance sur la croissance mycélienne, a montré qu'il y a des différences significatives entre les températures étudiées et l'isolat Bs1 (Annexe 4). Les températures sont classées selon l'ordre suivant, de l'ambiante à la défavorable: 30°C > 25°C > 20 °C > 15°C > 10°C > 35°C.

Les résultats obtenus montrent que le pH a un effet sur la croissance de *B. sorokiniana* (Tableau 14 et Fig. 48). Le pH optimal pour la croissance de Bs1 égale à 7. Le taux de croissance minimale est enregistré à pH=10 (3,05 cm de diamètre après 7 jours d'incubation). L'analyse de variance sur la croissance mycélienne montre des différences significatives entre les différentes valeurs de pH et l'isolat Bs1 (Annexe 4).

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

Tableau 14: Croissance mycélienne de Bs1 sur les différentes températures et pH

Croissance mycélienne (cm)			
Température (°C)	2 jours	4 jours	7 jours
4	0±0,00 ^d	0±0,00 ^f	0±0,00 ^f
10	0,1±0,00 ^d	0,25±0,15 ^{ef}	0,65±0,05 ^e
15	0±0,1 ^d	1,2±0,00 ^d	1,67±0,05 ^d
20	0,75±0,1 ^c	1,52±0,12 ^c	1,95±0,15 ^c
25	1,55±0,05 ^b	2,2±0,2 ^b	3,4±0,1 ^b
30	2,25±0,15 ^a	4,02±0,02 ^a	6,65±0,25 ^a
35	0,1±0,00 ^d	0,3±0,00 ^e	0,3±0,00 ^f
40	0±0,00 ^d	0±0,00 ^a	0±0,00 ^f
pH	2 jours	4 jours	7 jours
4	1,87±0,02 ^{abc}	2,67±0,57 ^b	3,7 ±0,1 ^c
5	2,02±0,42 ^{ab}	3,05 ±0,2 ^b	4 ±0,05 ^c
6	2,15±0,15 ^a	3,85±0,15 ^a	5,75 ±0,15 ^b
7	1,5±0,00 ^c	2,95±0,3 ^b	8±0,12 ^a
8	1,6±0,00 ^{bc}	2,5±0,00 ^b	5,5±0,25 ^b
9	1,57±0,05 ^{bc}	2,4±0,15 ^b	4,45±0,35 ^d
10	0,15±0,12 ^d	1,75±0,00 ^c	3,05±0,35 ^d

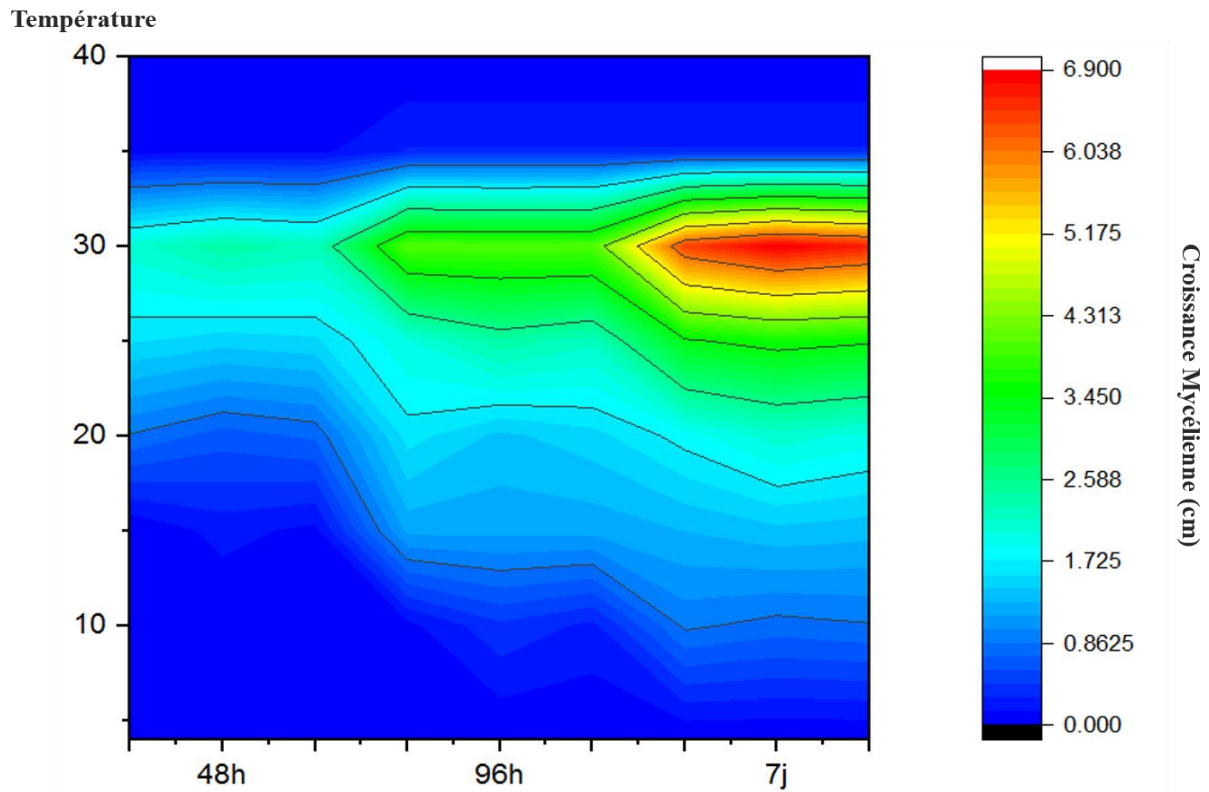


Figure 47: Effet de la température (°C) sur la croissance mycélienne de *B. sorokiniana* Bs1

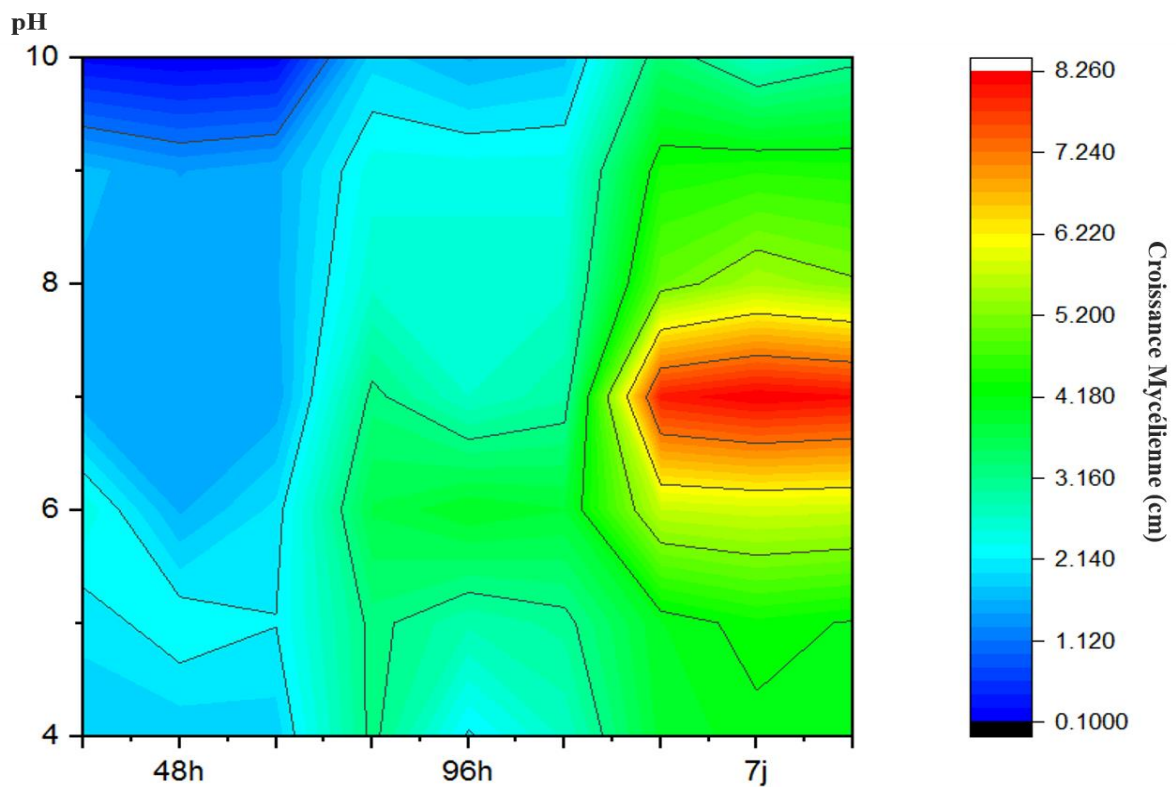


Figure 48 : Influence du pH sur la croissance mycélienne de *B. sorokiniana* Bs1

3.4.3. Effet des milieux de culture sur le développement de *M. pseudophaseolina* M1

La croissance mycélienne, la production et la taille des microsclérotos de l'isolat M1 ont été évaluées sur différents milieux de culture. Les résultats présentés dans le tableau 15 et la figure 50 ont révélé que la croissance mycélienne de l'isolat M1 a été rapide et maximale sur tous les milieux solides testés sauf sur le milieu rose Bengale qui a présenté une croissance de 8,8 cm.

Une formation abondante des microsclérotos a été observée sur le milieu à base de carotte, suivi par le milieu à l'extrait de Malt et le milieu PDA (Tableau 15 ; Fig. 51). Cependant, la formation minimale des microsclérotos a été observée sur les milieux SNA et le milieu à base de maïs. La taille des microsclérotos a été significativement différente selon le milieu utilisé (Tableau 15 ; Fig. 52). Les plus grandes tailles de microsclérotos ont été observées sur le milieu synthétique de Richard (92,14 x 92,50 μm), suivi par le milieu à base d'avoine et le milieu OGA avec (90,71 x 82,14 μm) et (80 x 80,35 μm) respectivement. Tandis que, la taille minimale des microsclérotos a été notée sur le milieu SNA (39,4 μm).

Nous avons noté que l'aspect des colonies change en fonction du milieu de culture testé (Figure 49).

Tableau 15: Effet des milieux de cultures sur les paramètres de croissance de *M. pseudophaseolina* M1

Milieu	Croissance (cm)	Couleur de la colonie	mycélium blanc	nombre des microsclérotés*	Formation des microsclérotés	Taille* (µm)
PDA	9	Grise foncée	-	86±1,73 ^{ab}	++++	68,92±8,27 ^{cd} x 68,21±5,53 ^{bc}
Malt	9	Noir	+	87±5,0 ^{ab}	++++	67,14 ± 8,09 ^{cd} x 66,07 ±11,53 ^{bc}
Richard	9	Bleu noir	+	54±10,44 ^c	+++	92,14 ±9,06 ^a x 92,50 ±14,50 ^a
Carotte	9	Grise	+	99±2,00 ^a	++++	52,85±7,27 ^{de} x 53,57 ±7,04 ^{cd}
Czapek	9	Vert noir	-	54±5,00 ^c	+++	73,57 ±12,14 ^{bc} x 73,92±15,12 ^{ab}
OGA	9	Noir	+	77±3,00 ^b	++++	80,00 ±17,85 ^{abc} x 80,35 ±6,52 ^{ab}
Avoine	9	Grise foncée	-	82±1,0 ^b	++++	90,71±9,54 ^{ab} x 82,14±12,02 ^{ab}
Rose B	8,8	Noir	-	62±5,00 ^c	+++	65,71 ±9,43 ^{cd} x 70,35 ±9,06 ^{bc}
SNA	9	Grise	-	17±3,00 ^e	+	36,42±5,56 ^e x 42,50±5,00 ^d
SDA	9	Noir	+	38±3,00 ^d	++	82,85 ±20,98 ^{abc} x 81,07 ±21,35 ^{ab}
Maïs	9	Grise	-	32±3,00 ^d	++	47,14±3,36 ^e x 41,07±3,77 ^d

* : au niveau de chaque ligne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P \leq 0.05$) (Annexe 5).

- Formation des microsclérotés : - = absent ; + = faible ; ++ = moyen ; +++ = élevé, ++++ = très élevé.

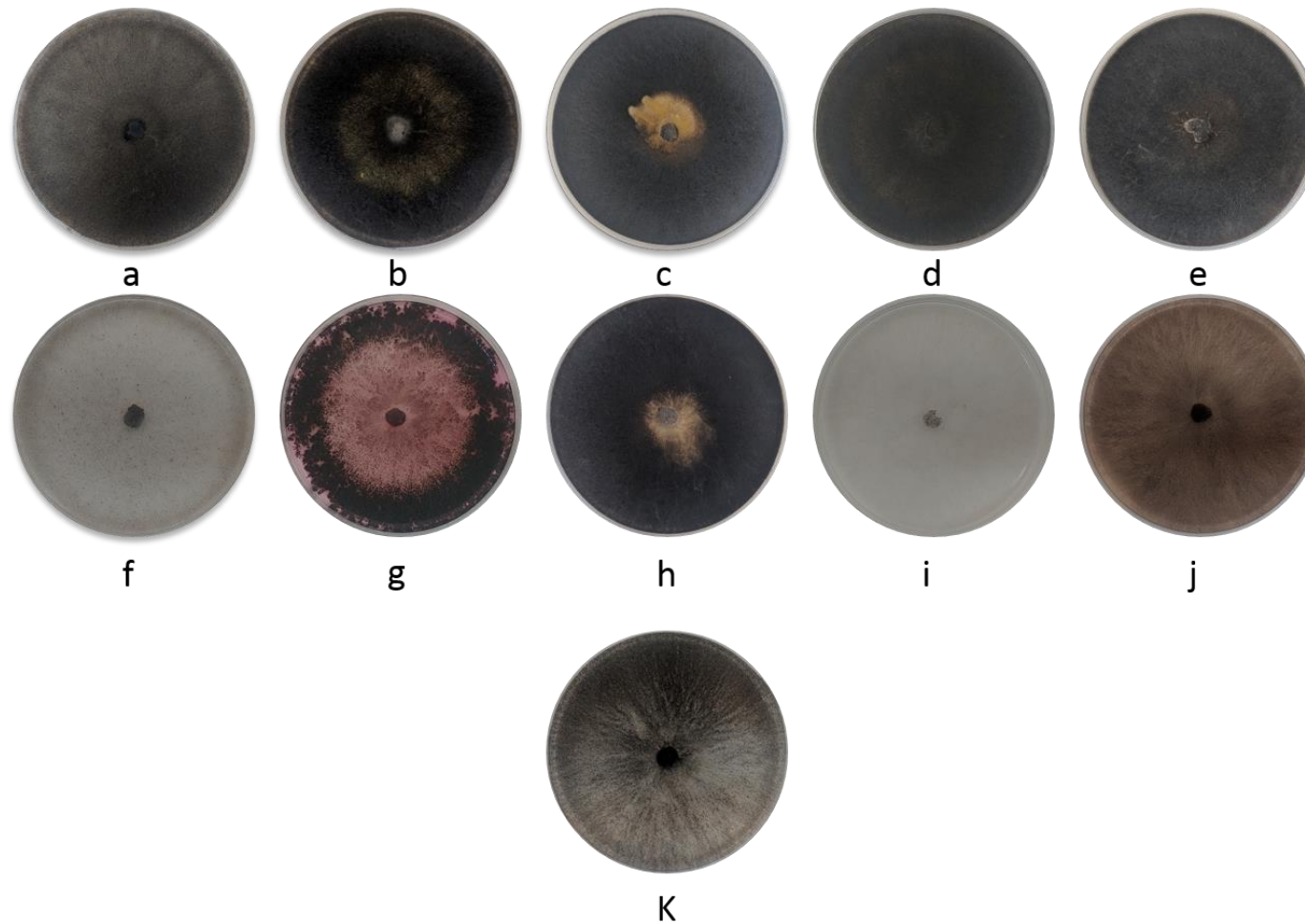


Figure 49: Aspect des colonies de *M. pseudophaseolina* M1 sur différents milieux de culture:

a : milieu à base d'avoine, **b** : Richard, **c** : Malt agar, **d** : Czapek, **e** : SDA, **f** : Milieu à base de Maïs, **g** : Rose Bengale, **h** : OGA,
i : SNA, **j** : Carotte agar, **k** : PDA

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

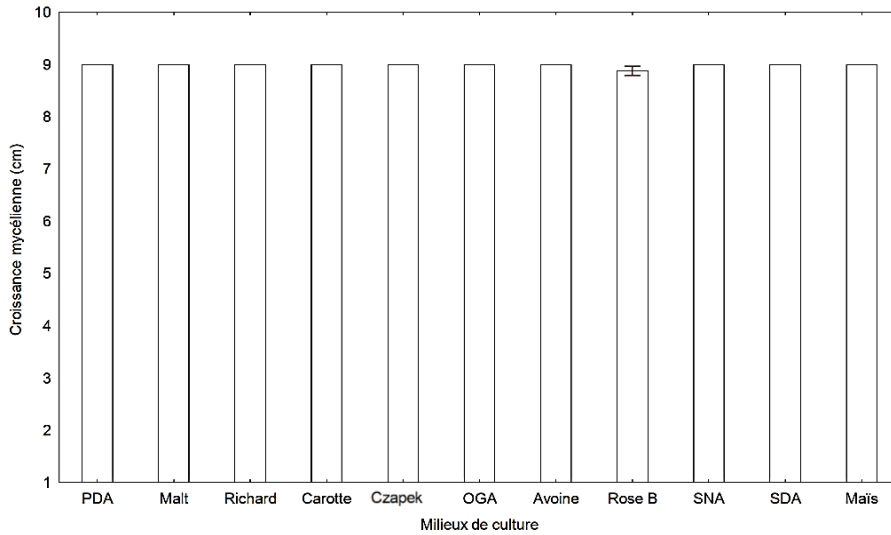


Figure 50: Effet des milieux de culture sur la croissance mycélienne (cm) de *M. pseudophaseolina* après 7 jours d'incubation.

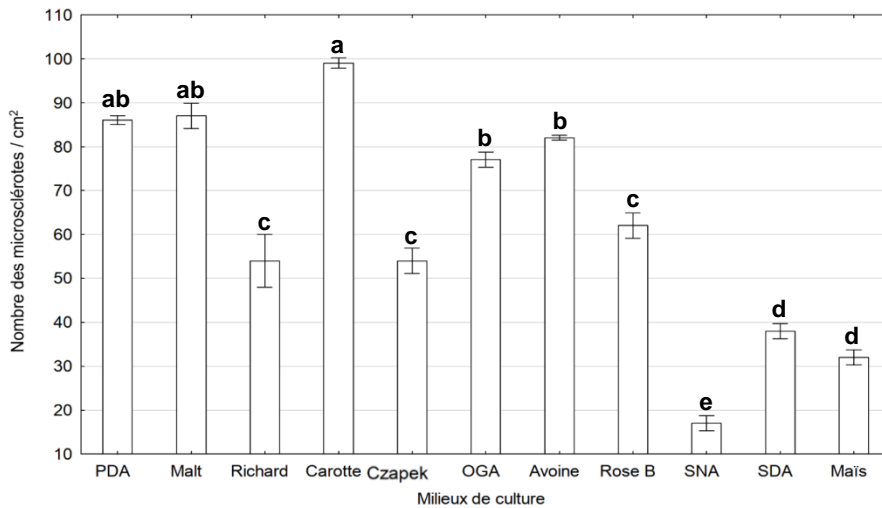


Figure 51: Le nombre des microsclérotés (/ cm²) de *M. pseudophaseolina* produite sur les milieux de culture testés

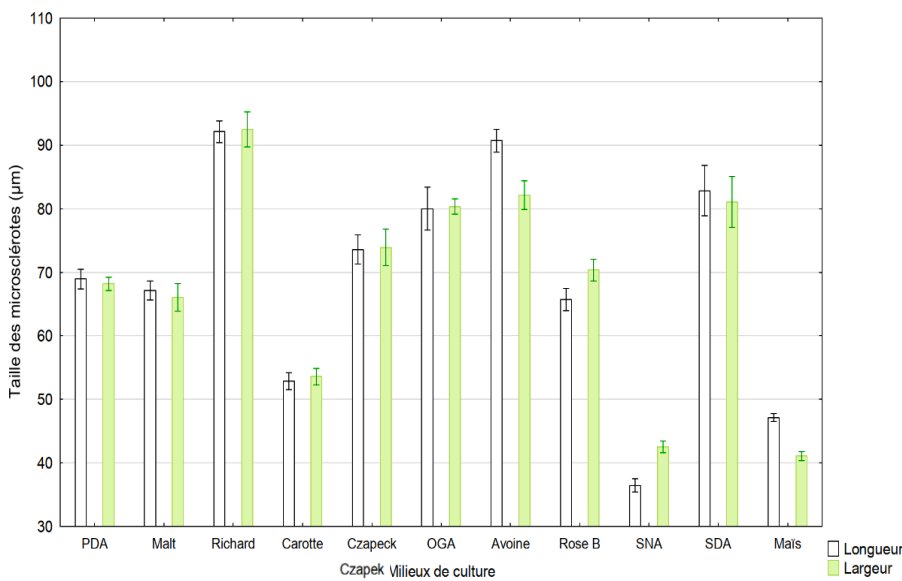


Figure 52: La taille des microsclérotés de *M. pseudophaseolina* produite sur les milieux de culture testés

La figure 53 présente une matrice de corrélation entre l'ensemble des milieux de culture utilisés dans cette étude. Les coefficients de corrélations entre les 11 milieux de culture ont été calculés dans le but de chercher des associations possibles entre ces milieux.

L'analyse de la figure 53 nous a permis de remarquer l'existence des corrélations parfaites ($r=1$) entre les milieux OGA et avoine, les milieux PDA et Malt, les milieux avoine et rose Bengale et le milieu Czapek avec milieu à base de maïs. Des fortes corrélations entre la plupart des milieux ont été enregistrées. Aucune corrélation négative n'a été enregistrée. La plus faible corrélation a été notée entre le milieu carotte avec les milieux SDA et SNA ($r=0,39$ et $r= 0,24$ respectivement).

Une classification des 11 milieux de culture a été réalisée suivant les paramètres notés (la croissance mycélienne, le nombre et la taille des microsclérotés). La classification est projetée sur la figure 54 ; c'est une classification hiérarchique basée sur l'algorithme de Ward (Jongman *et al.*, 1995), qui calcule les distances euclidiennes entre les points des milieux de cultures à partir de leurs coordonnées dans les dimensions de l'espace factoriel virtuel. Trois (03) groupes principales (I, II et II) sont à distinguer de la figure 54 à une distance euclidienne de 80 sur le dendrogramme :

—Le groupe 1 est constitué de 5 milieux et divisé en 2 sous-groupes ; le 1^{er} sous-groupe (PDA, Malt, Carotte) se caractérise par une production abondante de microsclérotés de taille moyenne. Par contre, le 2^{ème} sous-groupe (OGA et Avoine) est caractérisé par une production abondante de microsclérotés de grande taille.

—Le groupe 2 comporte 4 milieux et divisé en 2 sous-groupes ; le 1^{er} sous-groupe est composé des deux milieux Richard et SDA qui ont enregistré un faible nombre de microsclérotés de grande taille. Le 2^{ème} sous-groupe (Czapek et rose Bengale) est caractérisé par une production moyenne de microsclérotés avec des tailles moyennes.

—Le groupe 3 est constitué de 2 milieux (SNA et Maïs). Ces milieux se caractérisent par une production faible de microsclérotés de petite taille.

Cette classification a été confirmée par une ACP (analyse en composante principales). La projection des milieux de cultures sur la carte factorielle est montrée dans la figure 55.

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

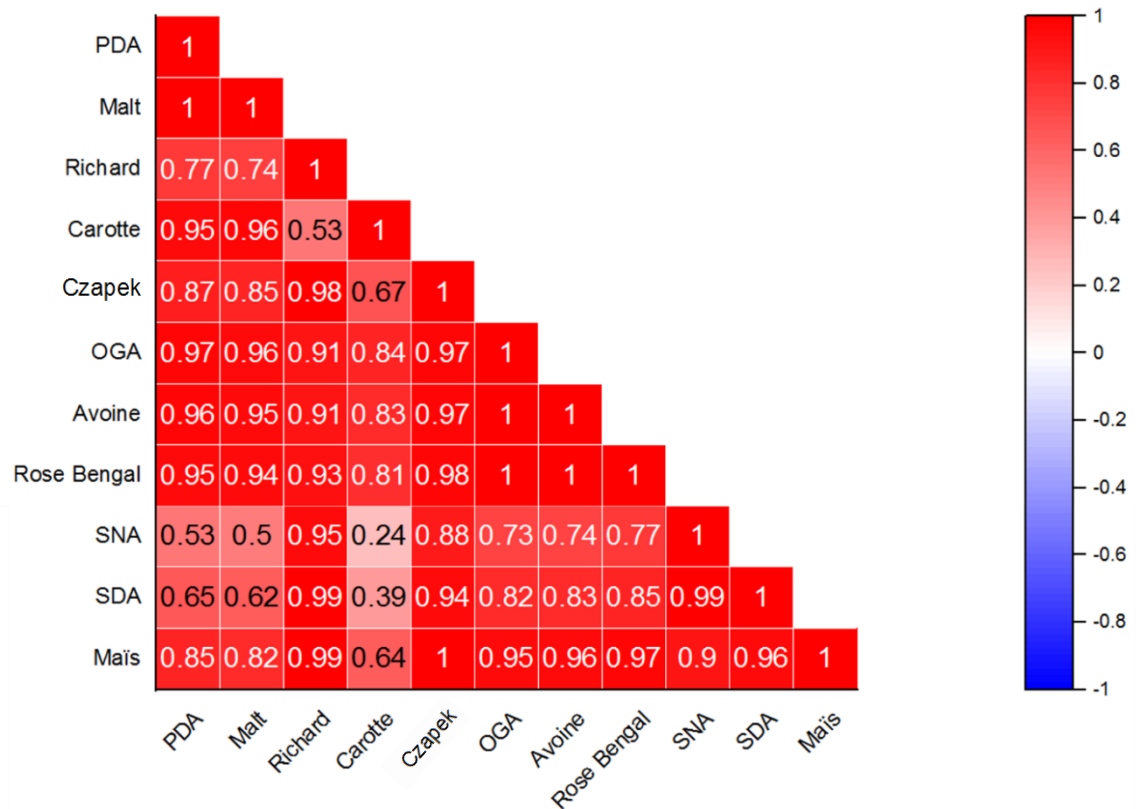


Figure 53: Graph de corrélation des 11 milieux calculée suivant les paramètres étudiés

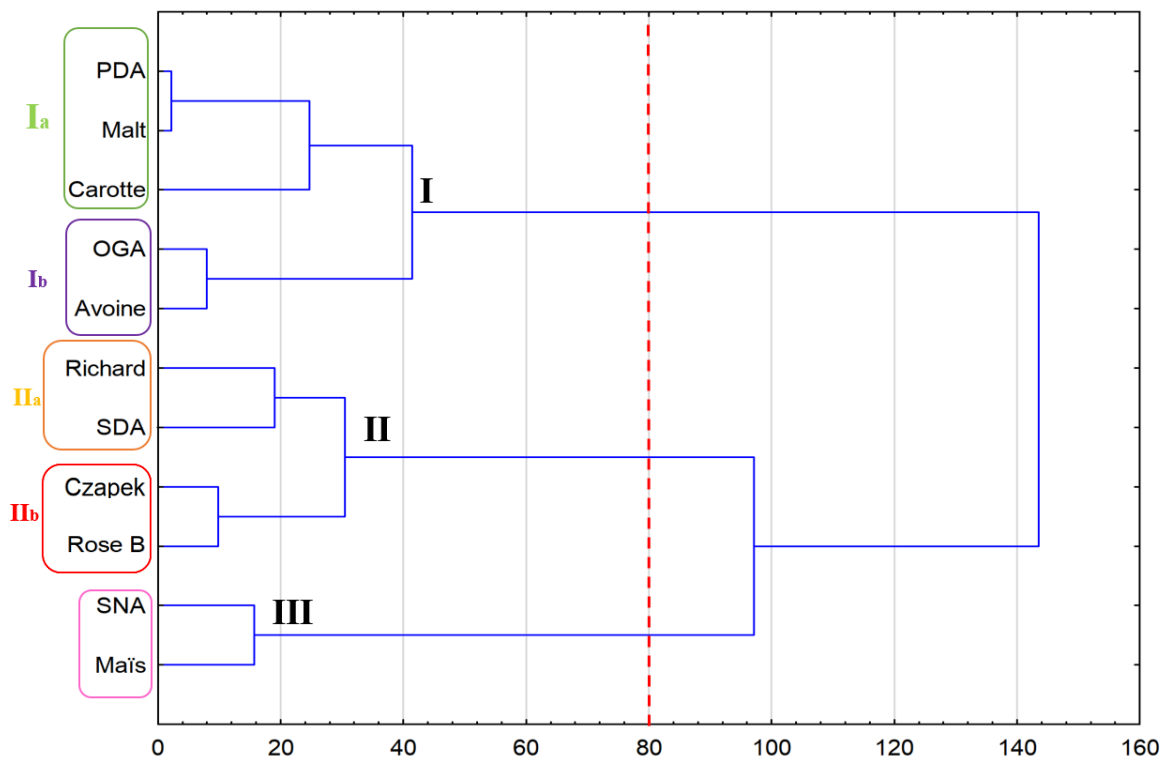


Figure 54: Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 11 milieux de culture suivant les 3 paramètres étudiés

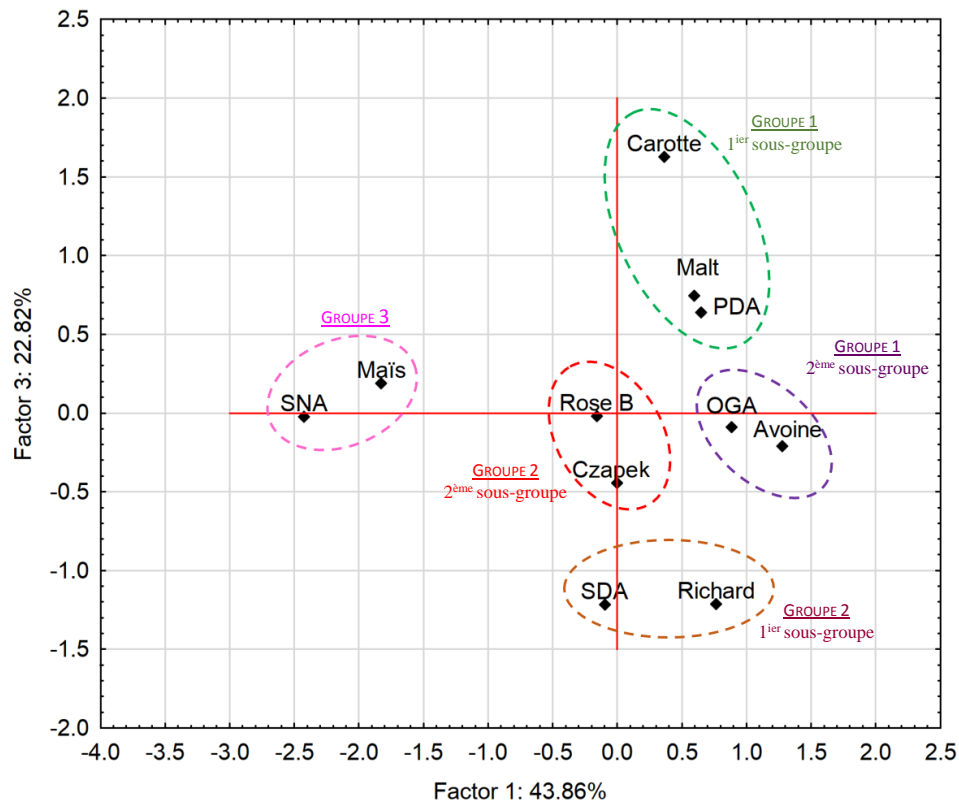


Figure 55: Répartition des 11 milieux de culture suivant les paramètres étudiés par une ACP

D'autres corrélations possibles ont été recherchées entre les différents paramètres notés (la croissance mycélienne, la production et la taille des microsclérotés de *M. pseudophaseolina*) au moyen d'un programme de régression linéaire. Les résultats obtenus et illustrés sur les figures 56, 57 et 58 ont montré une corrélation positive entre les 3 paramètres évalués.

Le tableau 16 présente une matrice de corrélation entre les paramètres évalués (la croissance mycélienne, le nombre des microsclérotés et leurs tailles). Une corrélation presque nulle a été notée entre le paramètre de la croissance mycélienne et le nombre des microsclérotés ($r=0,010$). Il en ressort que ces deux paramètres sont faiblement liés l'un à l'autre. Aussi, il n'y a pas de relation entre la croissance mycélienne et la taille des microsclérotés.

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

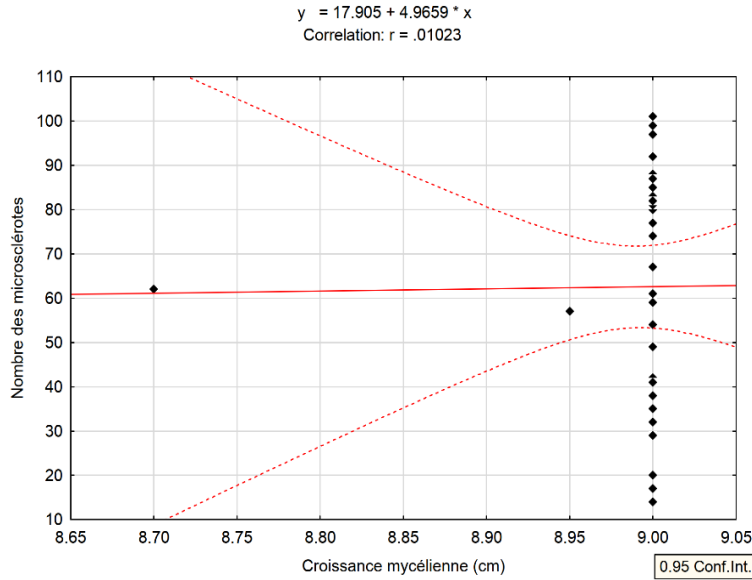


Figure 56: Corrélation entre les valeurs de la croissance de *M. pseudophaseolina* sur les 11 milieux de culture et le nombre des microsclérotés

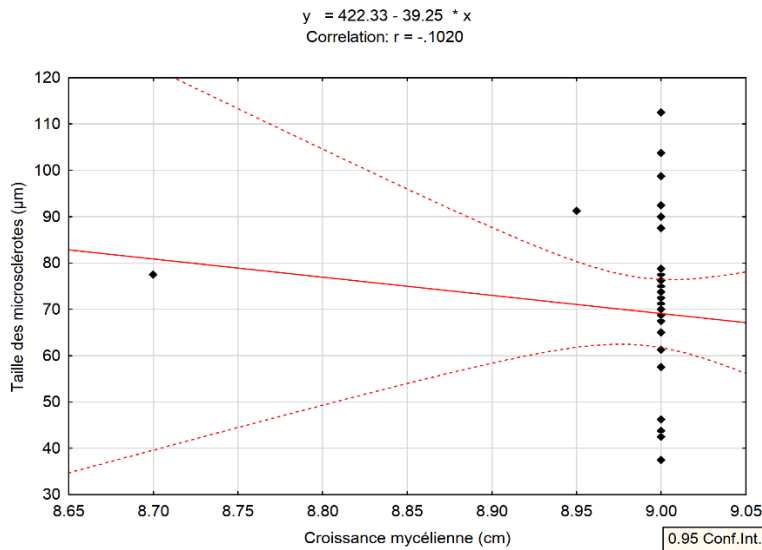


Figure 57: Corrélation entre les valeurs de la croissance de *M. pseudophaseolina* sur les 11 milieux de culture et la taille des microsclérotés

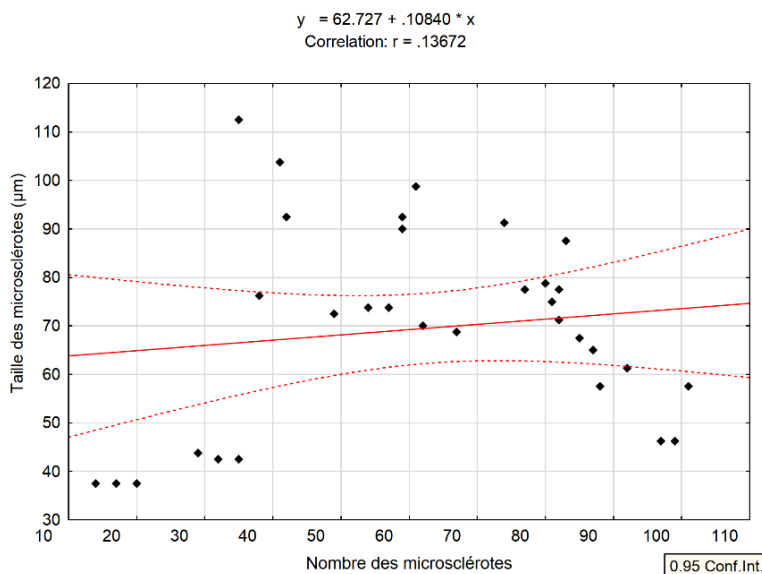


Figure 58: Corrélation entre les valeurs des nombres des microsclérotés produites par *M. pseudophaseolina* sur les 11 milieux de culture et leurs tailles.

Tableau 16: Matrice de corrélation calculée sur les 3 paramètres évalués du développement de *M. pseudophaseolina* M1

Variables	Corrélations				
	Les corrélations marquées sont significatives à $p < 0,05$				
	Moyenne	Ecart type	Taille	Croissance mycélienne	Nombre
Taille (μm)	69,50	20,27	1	-0,102	0,136
Croissance mycélienne (cm)	8,99	0,05	-0,102	1	0,010
Nombre de microsclérotés ($/\text{cm}^2$)	62,54	25,56	0,136	0,010	1

3.4.4. Effet de la température et du pH sur les paramètres de croissance de *M. pseudophaseolina* M1

L'effet de différentes températures, allant de 4° à 40°C, a été testé sur la croissance mycélienne de *M. pseudophaseolina* M1. Les résultats de ce test présentés dans le tableau 17 et la figure 59 ont montré que la croissance mycélienne optimale de l'agent pathogène M1 a été enregistrée à 35 °C, suivie par la température de 30°C après 48 heures d'incubation avec une formation abondante des microsclérotés (Tableau 17). Par contre, une faible croissance mycélienne (0,3 et 1,9 cm) accompagnée d'une absence de formation des microsclérotés a été observée à des températures de 10° et 40°C, respectivement.

La température 4°C semble être létale à la croissance de M1. Aucune croissance de pathogène n'a été observée à cette température après une semaine d'incubation

L'impact du pH du milieu PDA sur la croissance mycélienne et la formation des microsclérotés de *Macrophomina* M1 a été également étudié dans une gamme de pH de 4 à 10. *M. pseudophaseolina* a montré une adaptation impressionnante sur les différents gradients du pH avec une croissance maximale sur les pH de 4 à 9 (Tableau 17 ; Figure 60). Les pH acides et alcalins ne semblent pas être défavorables à la formation des microsclérotés. Le nombre maximal des microsclérotés est enregistré à un pH 7 et 8.

L'analyse de la variance sur la croissance mycélienne montre des différences significatives entre les températures et pH étudiées et l'isolat M1 (Annexe 5).

CHAPITRE IV : *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* :

deux espèces phytopathogènes nouvellement décrites sur la culture de la lentille en Algérie et dans le monde

Tableau 17: Effet de la température et pH sur la croissance mycélienne (cm) et la production des microsclérotos de M1

Croissance mycélienne (cm)						
Température (°C)	2 jours		4 jours		7 jours	
	Croissance (cm)	Microsclérotos	Croissance (cm)	Microsclérotos	Croissance (cm)	Microsclérotos
4	0±0,00 ^d	-	0±0,00 ^d	-	0±0,00 ^c	-
10	0±0,00 ^d	-	0,15±0,05 ^d	-	0,3±0,1 ^c	-
15	0±0,00 ^d	-	6,95±0,15 ^b	-	9±0,00 ^a	++
20	3,17±0,67 ^c	-	9±0,00 ^a	-	9±0,00 ^a	++
25	4,62±0,72 ^b	-	9±0,00 ^a	+	9±0,00 ^a	++
30	7,85±0,65 ^a	+	9±0,00 ^a	++	9±0,00 ^a	+++
35	8,3±0,70^a	+	9±0,00^a	++	9±0,00^a	++++
40	0±0,00 ^d	-	1,6±0,1 ^c	-	1,9±0,00 ^b	-
pH	2 jours		4 jours		7 jours	
4	5±0,5 ^c	-	9±0,00 ^a	+	9±0,00 ^a	++
5	4,97 ± 0,02 ^c	-	9±0,00 ^a	+++	9±0,00 ^a	+++
6	7,85±0,15 ^a	-	9±0,00 ^a	++	9±0,00 ^a	+++
7	6,45±0,95 ^b	-	9±0,00 ^a	++++	9±0,00 ^a	++++
8	7,15±0,15 ^{ab}	-	9±0,00 ^a	++++	9±0,00 ^a	++++
9	5,25±0,25 ^c	-	7±0,5 ^b	+	9±0,00 ^a	+++
10	0,8±0,4 ^d	-	3,65±0,35 ^c	+	7,37±0,72 ^b	++

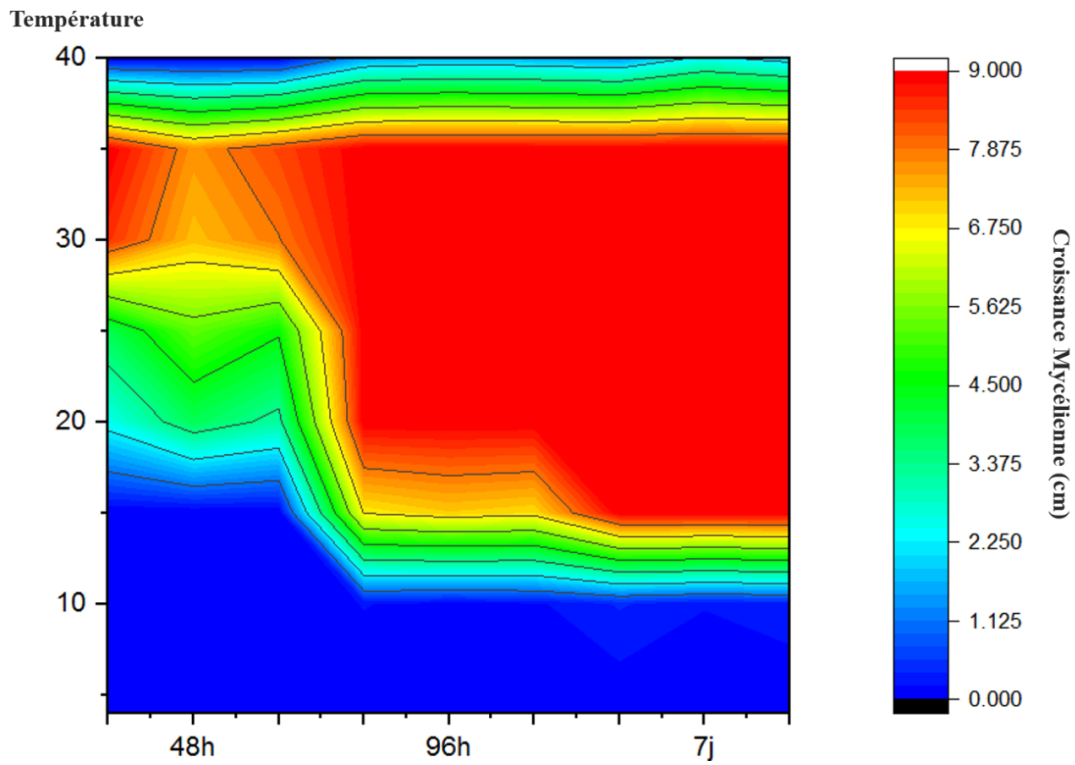


Figure 59: Effet de la température (°C) sur la croissance mycélienne (cm) de *M. pseudophaseolina*

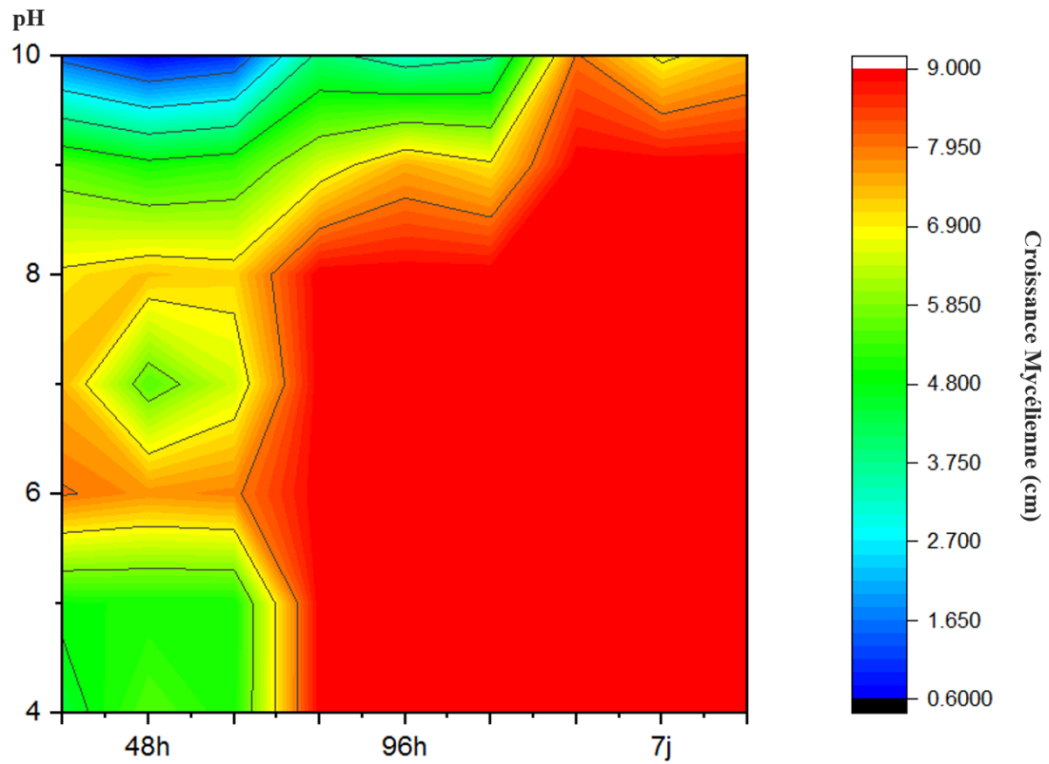


Figure 60: Influence du pH sur la croissance mycélienne (cm) de *M. pseudophaseolina*

3.4.5. Discussion des résultats obtenus de l'étude de l'effet des facteurs abiotiques sur le développement de Bs1 et M1

La nutrition des champignons est basée essentiellement sur deux sources de nutriments : une source de carbone et une source d'azote (Bessadat, 2014). Les résultats obtenus indiquent que pour un meilleur développement de *B. sorokiniana*, le champignon préfère les milieux de culture riches en azote (organique et minérale) et en source de carbone tels que le milieu à base de l'avoine, milieu à base de carotte, milieu SDA et le milieu Malt agar. Par contre, Sinijadas *et al.* (2018) ont rapporté que *B. sorokiniana* présentait une faible croissance dans le milieu à base de l'avoine.

L'influence des milieux de cultures a révélé une corrélation négative entre le taux de croissance, la sporulation et la taille des conidies de *Bipolaris*. La sporulation de *B. sorokiniana* a été favorisée sur les milieux riches en source de carbone inclut dans les sucres (dextrose, glucose) tels que les milieux Malt agar, PDA et SDA. Tandis que les conidies à grande taille sont observées sur le milieu SNA pauvre en nutriments.

Contrairement à ce qui est enregistré pour Bs1, le taux de croissance relativement élevé enregistré chez M1 indique que l'espèce *M. pseudophaseolina* a la possibilité d'utiliser une large gamme de sources de carbone et d'autres éléments nutritifs. Cependant, bien que le type milieu de culture ait peu d'effet sur le taux de croissance mycélienne enregistré, la taille et le nombre des microsclérotés produits étaient beaucoup plus affectée par ce paramètre. La formation des microsclérotés de *M. pseudophaseolina* semble également favorisée sur les milieux riches en source de carbone comme les milieux à base de carotte, Malt et PDA. En effet, plusieurs études ont confirmé l'effet des milieux de culture sur la formation des microsclérotés de *Macrophomina phaseolina* (Parmar *et al.*, 2018 ; Kumar, 2020). En outre, la taille des microsclérotés de M1 a été importante sur les milieux riches en potassium et magnésium tels que les milieux Richard et milieu d'avoine.

L'étude de caractérisation a été conclue avec l'effet de la température et du pH sur la croissance mycélienne des champignons. Dans cette étude, il est clair que les températures de 25 à 30°C sont optimales pour la croissance de Bs1. Ce résultat est en accord avec Prem *et al.* (2009) qui ont rapporté que 28°C est la température optimale pour la croissance de *Bipolaris sorokiniana*.

L'étude de l'influence de la température sur le développement de *M. pseudophaseolina* a montré clairement que ce champignon préfère des températures

élevées pour la croissance et la formation des microsclérotés. Les mêmes résultats ont été signalé par Sukanya *et al.*, (2016) où ils ont noté que la température optimale de la croissance de *M. phaseolina* cultivé sur milieu PDA était de 35°C.

Les résultats de l'effet du pH sur le développement des champignons Bs1 et M1 ont révélé que la croissance des deux isolats est favorisée à un pH neutre. En effet, les milieux alcalins et trop acides ne sont généralement pas reconnus comme favorable à la croissance des champignons. En revanche, *M. pseudophaseolina* a montré une adaptation impressionnante sur une large gamme de pH. Une telle adaptation a été observé chez la population de *M. phaseolina* étudiée par Csöndes *et al.*, (2012).

3.5. Conclusion

L'isolement à partir des échantillons infectés de lentille, collectés de différentes parcelles du nord-ouest Algérien, a révélé la présence de deux champignons (*Bipolaris* sp. et *Macrophomina* sp.), non signalés auparavant sur la lentille. Les deux espèces ont été identifiées phénotypiquement. Elles ont fait l'objet d'une identification moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS et du gène *tef 1* de l'ADNr et elles ont été confirmées comme étant *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* et enregistrées sur la banque des données NCBI GenBank.

La virulence des isolats obtenus est étudiée sur la variété de lentille Syrie 229 qui s'est montrée très sensible aux attaques de *B. sorokiniana* et *M. pseudophaseolina* causant la tache helminthosporienne et la pourriture charbonneuse, respectivement. Nous avons pu montrer l'importance de ces deux maladies qui constituent donc une menace pour la culture de la lentille en absence de toute mesure sanitaire.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont mis en évidence l'influence de certains facteurs abiotique sur le développement de *B. sorokiniana* et *M. pseudophaseolina*. A l'issue de l'analyse globale des résultats, la composition du milieu, la température et le pH constituent des paramètres physiologiques importants qui affectent significativement la croissance mycélienne, la sporulation et la taille des conidies ou les microsclérotés.

Les résultats inédits obtenus dans cette étude offrent sûrement une documentation nouvelle et des connaissances actuelles sur l'interaction de la lentille et les 2 champignons phytopathogènes *B. sorokiniana* et *M. pseudophaseolina*. Ils vont fournir un référentiel afin de soutenir le travail des diagnosticiens et des conseillers de terrain ainsi que les chercheurs en matière de santé des plantes.

Chapitre V

Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*

CHAPITRE V**Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*****1. Introduction**

Notre étude sur la pourriture charbonneuse de la lentille, présentée dans le chapitre précédent, est la première à rapporter la pathogénicité de *Macrophomina pseudophaseolina* chez la lentille, en Algérie et dans le monde. Le champignon a été détecté et identifié comme un nouvel agent pathogène de la lentille provoquant des symptômes caractéristiques de la pourriture charbonneuse. Le champignon *M. pseudophaseolina* produit des microsclérotés qui peuvent persister plusieurs années dans le sol ce qui rend difficile de développer des méthodes de lutte assez efficaces contre ce champignon. Cette nouvelle maladie fongique peut provoquer une infestation problématique et engendrer ainsi des pertes de récolte très importantes en réduisant le rendement, la productivité et la croissance de la culture de la lentille.

Dans ce contexte, la lutte biologique contre la pourriture charbonneuse de la lentille à l'aide de champignons antagonistes semble être une stratégie de lutte efficace envers *Macrophomina pseudophaseolina* par une approche exploitant l'effet bénéfique des *Trichoderma* originaires de la rhizosphère de la lentille.

Les stratégies du contrôle biologique des maladies des plantes ont acquis un intérêt particulier ces derniers temps comme des alternatives prometteuses à l'emploi des fongicides de synthèse qui ont un impact négatif sur l'environnement et la santé.

Ce chapitre fait l'objet de :

- L'obtention d'une collection des *Trichoderma* isolés à partir de la rhizosphère des plantes saines prélevée de la région de Tiaret (la région la plus productrice de lentille dans l'Ouest algérien),
- La sélection de *Trichoderma* antagoniste vis-à-vis le champignon phytopathogène *M. pseudophaseolina*,
- L'identification moléculaire de l'isolat de *Trichoderma* le plus antagoniste,
- Détermination de la réponse des isolats de *Trichoderma* obtenus aux différents tests *in vitro* mettant en évidence leurs capacités de produire des enzymes lytiques, à solubiliser le phosphate et à synthétiser l'hormone de croissance AIA,

▪ L'évaluation de leur effet bénéfique sur l'incidence de la pourriture charbonneuse de la lentille et sur la croissance des plantes.

2. Matériels et méthodes

2.1. Obtention des isolats de *Trichoderma* à partir de la rhizosphère

2.1.1. Prélèvement des échantillons de sols rhizosphériques

Dans le but d'obtenir des isolats de *Trichoderma*, des prélèvements des échantillons de sols rhizosphériques de plantes saines et vigoureuses de lentille ont été effectués au cours de la saison agricole 2018-2019 dans la région de Tiaret qui représente la région la plus productrice de lentille dans l'Ouest algérien.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule propre à une profondeur de 15-25 cm pour arracher entièrement la plante saine de la lentille avec le sol adhérent aux racines (la rhizosphère).

Les échantillons des sols prélevés ont été placés dans des sacs en papiers, bien fermés, transférés vers le laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C en vue de leurs analyses.

2.1.2. Isolement des champignons du genre *Trichoderma*

L'isolement de *Trichoderma* a été effectué par la technique de suspension-dilution décrite (Rapilly, 1968).

Les racines sont d'abord débarrassées de la terre facilement détachable, ensuite de chaque échantillon sont récupérés 1 g du sol adhérent aux racines.

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 1 g du sol rhizosphérique à 9 ml d'eau distillée stérile, puis à agiter pendant quelque minute, ce qui constitue la dilution 10^{-1} . Une série de dilution est réalisée à partir de la solution mère dont la concentration est de 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 1 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes, ajoutés chaque fois à 9 ml d'eau distillée stérile, vont constituer les dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} . Quatre dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7}) ont été choisies afin de les ensemercer sur le milieu de culture PDA puis mis à incuber à 25°C pendant 3 à 4 jours. Trois boîtes ont été préparées pour chaque dilution.

2.1.3. Purification et obtention des cultures monospores

Après incubation, les champignons ressemblant à *Trichoderma* qui ont poussé sur le milieu de culture ont été repiqués, cultivés dans de nouvelles boîtes de pétri contenant le milieu PDA et incubés à 25°C.

Après purification, une culture monospore des isolats a été effectuée afin d'obtenir des cultures pures et d'éviter des dérives génétiques des populations au cours des essais successifs.

Des cultures monospores sont obtenues à partir de cultures de *Trichoderma* âgées de 7 jours où elles sont recouvertes par 5 ml d'eau stérile. La surface de la colonie est grattée, et la suspension conidienne obtenue est diluée dans de l'eau distillée stérile, de façon à obtenir une faible concentration (20 conidie/ml). Ensuite, une goutte de la suspension est prélevée, déposée puis étalée à la surface du milieu PDA en boîte Pétri.

Après 24h d'incubation, à l'obscurité à 25°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, la délimitation des conidies germées est effectuée. Ces dernières ont été repiquées individuellement à raison de 03 à 04 conidies sur milieu PDA et incubées à 25°C pendant une semaine (Rappily, 1968).

2.1.4. Identification morphologique

L'identification des isolats de *Trichoderma* repose, dans un premier temps, sur une étude macroscopique des caractères cultureux sur milieu solide en observant l'aspect du mycélium, la couleur des colonies, la sporulation, la diffusion ou non d'un pigment dans la gélose...etc. et dans une seconde étape, une étude microscopique des caractères morphologiques des organes de reproduction asexuée et du mycélium (tels que les phialides, conidiophores et conidies).

L'examen direct au microscope optique d'un petit fragment de culture de champignon âgé de 4 à 7 jours entre lame et lamelle, dans une goutte de bleu de méthylène, permet d'observer la forme et la taille des conidies et des phialides.

L'identification des espèces fongiques isolées est effectuée en utilisant des clés d'identification du genre *Trichoderma* (Rifai, 1969 ; Samuels *et al.*, 1994 ; Samuels, 2006).

2.1.5. Conservation des isolats de *Trichoderma*

Les isolats de *Trichoderma* obtenus ont été conservés selon deux méthodes : sur gélose inclinée et sur papier filtre.

La 1^{ière} méthode consiste à repiquer le champignon purifié en tubes sur le milieu PDA incliné, les cultures sont maintenues pendant 3 jours à la température de 22°C puis stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

La 2^{ième} méthode consiste à ensemercer le champignon dans des boîtes de Pétri contenant des morceaux de papier filtre stérile imbibés d'une solution de milieu PDB (Annexe 1) puis les incubés à 25°C pendant 10 jours. Après le développement du

champignon, les boîtes sont disposées pendant 7 jours, dans une étuve réglée 30°C pour le séchage des morceaux de papier filtre ; ces derniers sont ensuite introduits dans des tubes stériles. Les tubes hermétiquement fermés sont conservés à la température ambiante. Cette méthode de conservation assure à l'espèce fongique une longévité de plusieurs années (Belabid, 2003).

2.2. Activité antagoniste «in vitro» des isolats de *Trichoderma* vis-à-vis *Macrophomina pseudophaseolina*

L'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* a été étudiée selon deux méthodes. Elle avait pour but de sélectionner l'espèce la plus antagoniste sur la base des effets inhibiteurs sur la croissance mycélienne du champignon phytopathogène *Macrophomina pseudophaseolina* M1 agent causal de la pourriture charbonneuse de la lentille.

La collection obtenue et qui est constituée de 7 isolats de *Trichoderma* a été testée pour évaluer leur pouvoir antagoniste et étudier leurs modes d'action employés à l'égard de *M. pseudophaseolina* M1.

2.2.1. Confrontation direct

La confrontation directe est réalisée selon la technique décrite par Dennis et Webster (1971). Cette technique consiste à déposer sur la même boîte de Pétri contenant le milieu PDA, deux pastilles gélosées de 5 mm, l'une portant l'isolat antagoniste (*Trichoderma*) et l'autre l'agent pathogène (*M. pseudophaseolina* M1), prélevées à partir de cultures âgées de 7 jours suivant un axe diamétral de 3 cm. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours.

Le témoin est constitué par un repiquage du pathogène au centre de la boîte de Petri contenant le milieu PDA sans l'antagoniste.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de M1 exercée par les isolats *Trichoderma* est calculé selon la formule suivante :
$$I(\%) = \frac{CT-CPA}{CT} \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance du pathogène

CT : Croissance radiale du témoin

CPA : Croissance radiale du pathogène en présence de l'antagoniste

2.2.2. Confrontation indirecte

La confrontation indirecte ou à distance, appelée également la technique des substances volatiles, est décrite par Comporta (1985). Elle consiste à déposer les deux pastilles gélosées du pathogène et de l'antagoniste dans deux boîtes de Pétri séparées, contenant du milieu PDA. Les deux boîtes sont ensuite assemblées de manière superposée où l'antagoniste est en bas et le pathogène est en haut dans des conditions aseptiques. Les deux fonds adhésifs sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Pour le témoin, un fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Les boîtes sont incubées aussi à 28°C pendant 7 jours.

Après incubation, le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré et l'inhibition de la croissance mycélienne est estimée comme la méthode décrite précédemment.

2.2.3. Répétition et traitement statistique

Trois répétitions sont retenues pour chaque paramètre étudié. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un programme informatique SPSS. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test de Tukey à 5 %.

2.3. Identification moléculaire de l'isolat le plus antagoniste

L'isolat de *Trichoderma* le plus antagoniste *in vitro* a fait l'objet d'une identification génotypique par le séquençage de la région ITS et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α). L'identification moléculaire a été réalisée suivant les mêmes étapes d'identification des pathogènes décrites dans le chapitre précédent. Elle a porté sur l'amplification puis le séquençage suivi de la comparaison des séquences obtenues à la base de données NCBI. L'alignement des séquences est réalisé avec logiciel Mega X, puis, l'arbre phylogénétique est établi en utilisant une analyse de phylogénie moléculaire suivant la méthode Neighbor-joining basée sur 1000 répliques bootstrap (Kumar *et al.*, 2018).

2.4. Caractérisation des isolats de *Trichoderma*

Un screening des activités PGP (Plant Growth Promoting) de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* a été réalisé dans le but de mettre en évidence leurs capacités à solubiliser

le phosphate (ayant un rôle dans la biofertilisation des plantes), à synthétiser l'hormone de croissance AIA (acide indole acétique), à produire l'ammoniac et à produire des enzymes (ayant un impact néfaste sur la croissance et le développement du pathogène)

2.4.1. Solubilisation du phosphate

La capacité des isolats de *Trichoderma* de solubiliser le phosphate a été testée sur milieu Pikovskayas solide (PVK) contenant 0,5% de phosphate tricalcique (PTC) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore et additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948).

Un disque de 5 mm d chaque isolat de *Trichoderma* est déposé au centre de la boîte pétri contenant le milieu PVK. Après 3 jours d'incubation à 28°C, la solubilisation du phosphate est traduite par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie sur milieu PVK. Les diamètres des halos de solubilisation ont été mesurés et l'efficacité de solubilisation a été calculée par la formule suivante (Nguyen *et al.*, 1992) :

$$\text{L'efficacité de la solubilisation \%} = (\text{diamètre du halo} / \text{diamètre de la colonie}) \times 100$$

2.4.2. Production des phytohormones (AIA)

La production de l'AIA ou des substances apparentées par *Trichoderma* a été vérifiée sur le milieu PDA additionné de tryptophane (5g/l) (Annexe 1) (Bric *et al.*, 1991). Un papier Watmann (No.2) stérile de 9 cm de diamètre est déposé directement sur des boîtes pétri contenant le milieu PDA additionné de tryptophane. Les boîtes de pétri ont été incubées en position inversée à 28 °C pendant 3 jours.

Après incubation, le papier Watmann a été imprégné de 2 ml du réactif de Salkowski puis ré-incubé pendant 20 min à l'obscurité. Les champignons qui synthétisent de l'AIA sont identifiées par le changement de couleur (rose-rouge) observée.

2.4.3. Production d'ammoniac (NH₃)

Ce test est réalisé selon la méthode modifiée décrite par (Ahmad *et al.*, 2008). Un explant mycélien de 5 mm de diamètre prélevé à partir des cultures de *Trichoderma* fraîchement cultivées est inoculé dans 10 ml d'eau peptonée (Annexe 1). Après incubation pendant 3 jours à 26°C, 0,5 ml du réactif de Nessler (Annexe 1) est ajouté dans chaque tube. L'apparition d'une couleur jaune-marron indique la production d'ammoniac (Saharan et Nehra, 2011).

2.4.4. Activités enzymatiques

2.4.4.1. Amylases

Pour vérifier la production de l'amylase par les isolats de *Trichoderma*, les explants mycéliens sont ensemencés séparément sur un milieu gélosé à base d'amidon (Abe *et al.*, 2015) (Annexe 1) et incubés à 26°C pendant 72h. Après incubation, les boîtes ont été inondé avec 5 ml de solution iodée (0,5% I₂ ; 1% KI) (v/v)) pendant quelques minutes et lavé par la suite avec de l'eau distillée.

La production des amylases est révélée par la présence d'un halo claire autour des explants ce qui indique l'hydrolyse de l'amidon et la présence d'activité amyliasique tandis que l'absence d'activité amyliasique est révélée par une couleur bleue noirâtre du milieu de culture (Abe *et al.*, 2015).

2.4.4.2. Chitinases

L'activité chitinolytique a été déterminée sur un milieu de détection de la chitinase en utilisant de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone (Annexe 1) (Kamala et Indira Devi, 2011). Après une incubation de 3 jours à 26°C, les boîtes ont été inondé avec 5 ml de solution iodée (0,5% I₂ ; 1% KI) (v/v)) pendant quelques minutes et lavé par la suite avec de l'eau distillée. Le changement de la couleur du milieu indique la dégradation de la chitine due à la présence d'une enzyme chitinase.

2.4.4.3. Pectinases

La production de la pectinase a été déterminée sur le milieu pectine agar (Annexe 1). Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les boîtes sont inondées avec une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 75% pendant 15 min. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu clair sur la gélose qui contient la pectine non dégradée. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo blanc autour des colonies ce qui indique la présence d'une pectinase.

2.4.4.4. Ligninases

La dégradation de la lignine par la polyphénol oxydase a été testée en sur un milieu d'acide tannique (Annexe 1) (Thomann *et al.*, 2002). La présence de polyphénol oxydase (PPO) sur le milieu est déterminé après 4 jours d'incubation à 28°C par la formation d'un pigment brun foncé autour du point de repiquage (Mukhlis *et al.*, 2013).

2.4.4.5. Cellulases

Pour démontrer la capacité des *Trichoderma* à produire la cellulase, la carboxyméthyl-cellulose (CMC) est utilisé comme source de cellulose pour déterminer l'activité de l'enzyme endoglucanase (Kausar *et al.*, 2010).

Un disque de 5 mm issu de précultures de *Trichoderma* est déposé sur le milieu de culture (Annexe 1) puis les boîtes sont incubées à 28°C pendant 2 à 3 jours. La production de l'endoglucanase (CMCase) a été observée après l'inondation des boîtes avec solution iodée pendant quelque minute. La dégradation de la cellulose a été visualisée sous forme de changement de couleur de la colonie fongique vers le jaune et la présence d'un halo autour des colonies (Abe *et al.*, 2015).

2.5. Efficacité *in vivo* de *Trichoderma longibrachiatum* T10 sur M1 en pots

L'isolat de *Trichoderma longibrachiatum* T10, le plus performant *in vitro*, a été sélectionné pour tester son efficacité *in vivo* en pots contre la pourriture charbonneuse de la lentille causée par *Macrophomina pseudophaseolina* M1.

2.5.1. Préparation des graines de lentille

Afin d'effectuer des inoculations artificielles, la variété de la lentille Syrie 229 est choisie sur la base de sa sensibilité vis-à-vis *M. pseudophaseolina* M1 ainsi que son abondance dans le nord-ouest de l'Algérie. Les graines ont été fournies par CCLS (coopérative des céréales et légumes secs) de Mascara.

Les graines de cultivar Syrie 229 de lentille sont préparées comme décrite précédemment (Chapitre 4, paragraphe 2.4.).

2.5.2. Préparation de l'inoculum de T10 et M1

L'isolat antagoniste *T. longibrachiatum* T10 a été cultivé sur milieu PDA pendant 7 jours à 25°C, puis les spores ont été récoltées et mélangées avec de l'eau distillée stérile. La concentration de propagule en suspension a été ajustée à 10⁸ spores/ml (Zaim *et al.*, 2018).

La suspension de microsclérotos du pathogène *M. pseudophaseolina* M1 a été préparée comme décrite précédemment (Chapitre 4, paragraphe 2.4.2.). La concentration de la suspension a été ajustée à 10⁴ microsclérotos/ml.

2.5.3. Inoculation et traitement des graines

L'inoculation par le champignon phytopathogène M1 a été réalisée par immersion des graines dans une suspension de microsclérotés (10^4 microsclérotés/ml) pendant 01 heure.

Les graines ont été traitées par trempage dans l'inoculum de l'antagoniste T10 (10^8 spores/ml) pendant 01 heure.

Les graines traitées par T10 et inoculées par M1 sont immergées dans un mélange (v/v) constitué d'une suspension de microsclérotés de M1 et d'une suspension de T10.

Des graines ont été traitées séparément avec l'antagoniste T10 sans que l'agent pathogène ne soit impliqué.

Les graines du témoin sont immergées dans l'eau distillée stérile.

Un semis en pot a été réalisé dans des pots en plastique (7 cm de diamètre), préalablement désinfectés par l'hypochlorite de sodium à 2%, et qui ont été remplis par le substrat désinfecté composé du mélange terre végétale – tourbe (1v : 1v). Le semis a été réalisé à raison de quatre graines par pot et 3 répétitions pour chaque traitement.

Les pots préparés sont ensuite placés dans la serre de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Mascara pendant une durée de 40 jours et arrosés si nécessaire.

2.5.4. Evaluation de l'efficacité de T10 sur M1

Les résultats sont évalués 40 jours après le semis. L'incidence de la maladie de la pourriture charbonneuse de la lentille a été évaluée par le pourcentage des plantes infectées en utilisant la formule suivante (Pandey *et al.*, 2021) :

$$IM (\%) = (\text{Nombre de plantes infectées} / \text{Nombre total de plantes}) \times 100.$$

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par Reznikov *et al.*, (2019) allant de 0 à 5 et qui a été décrit précédemment (Chapitre 4, paragraphe 2.4.2.).

La réduction de la maladie (RM) a été calculée en pourcentage en fonction de l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996) :

$$RM (\%) = [(IC - IT) / IC \times 100]$$

Où : **IC** est l'indice de gravité de la maladie due uniquement par M1

IT est l'indice de gravité de la maladie après inoculation par M1 et traitement par *Trichoderma* T10.

2.5.5. Effet de *T. longibrachiatum* T10 sur les paramètres de croissance des plantes de lentille

Après 40 jours de culture, les plantes issues de chaque traitement ont fait l'objet de mesures. Les plantes sont enlevées soigneusement des pots et les racines sont lavées avec de l'eau courante pour l'élimination de toutes les traces de sol restant jointes des racines.

Les paramètres de croissance étudiés sont la longueur de la tige (LT) et de la racine (LR), le poids frais et sec des plantes (PF et PS).

2.6. Analyses statistiques

Pour chaque paramètre étudié en triplicata, les résultats ont été analysés à l'aide d'un programme informatique SPSS. Une analyse de variance (ANOVA) a été d'abord effectuée et les moyennes ont été classées par la méthode de Tukey au seuil de 5% quand les effets analysés étaient significatifs.

Une analyse de corrélation et une analyse en composantes principales (ACP) ont été effectuées dans le but de rechercher des corrélations entre les différents tests étudiés.

Ainsi, une analyse de cluster hiérarchique bidirectionnelle utilisant la liaison complète, calculée par la distance euclidienne, a été appliquée pour montrer les relations globales entre les tests étudiés ainsi que les isolats de *Trichoderma* testés.

3. Résultat

3.1. Isolement et caractérisation morphologique et biométrique des isolats de *Trichoderma*

Les prélèvements de sols rhizosphériques effectués dans la région de Tiaret nous ont permis de constituer une collection de 7 isolats présentant des caractéristiques macroscopiques et microscopiques de *Trichoderma* spp.. Les isolats ont été désignés comme T1, T2, T3, T5, T7, T8 et T10 (Tableau 18).

Une étude morphologique de ces isolats a porté sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien et pigmentation du thalle et du mycélium sur milieu PDA) ainsi que les caractéristiques biométriques des conidies et des phialides. Par la suite, une identification morphologique a été effectuée à l'aide des clés d'identification de *Trichoderma*.

Au cours d'isolement, deux morphotypes mycéliens ont été rencontrés : duveteux et poudreux avec une pigmentation diversifiée sur le milieu PDA qui varie du vert clair au vert foncé (Fig. 61).

Une observation microscopique des isolats de *Trichoderma* a été réalisée ; l'ensemble des isolats est caractérisé par la présence abondante des conidies ovoïde ou ellipsoïdale portées par des phialides en forme de flasques ou de quilles. Trois espèces de *Trichoderma*, à savoir le *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* et *T. viride* ont été identifiées sur la base des caractères microscopiques. L'aspect macroscopique et les mensurations des conidies et des phialides produites par les isolats de *Trichoderma* obtenues figurent dans le tableau 18.

Tableau 18: Sept (07) isolats de *Trichoderma* obtenus à partir de sols rhizosphériques de la lentille

Isolat	Espèce	Couleur de colonie	Aspect de colonie	Mensuration (µm)	
				Conidies	Phialides
T1	<i>T. longibrachiatum</i>	Vert clair	poudreux	2,5-3 x 1,75	9,75-10,10 x 2,1-2,3
T2	<i>T. asperellum</i>	Vert foncé	poudreux	2,5-2,8 x 2,5	6,4-7,8 x 2-3,5
T3	<i>T. longibrachiatum</i>	Vert clair	poudreux	2,5-2,75 x 1,25-1,75	7,25 - 10,45 x 2,75 - 3
T5	<i>T. viride</i>	Vert	duveteux	2,25-3,75 x 2,5	5-6,5 x 2-3
T6	<i>T. viride</i>	Vert	duveteux	3,5-3,75 x 2	5,40-6,9 x 2-3
T8	<i>T. viride</i>	Vert	duveteux	2,5-3,25 x 1,25	5,25-7 x 2,2-2,9
T10	<i>T. longibrachiatum</i>	Vert clair	poudreux	2,5-3 x 1,25-1,75	6,25 - 11 x 2- 3

3.2. Etude de l'activité antagoniste *in vitro*

L'étude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* vis-à-vis la souche fongique phytopathogène *M. pseudophaseolina* M1, a montré des taux appréciables de réduction de la croissance aussi bien par la confrontation directe que la confrontation indirecte, ainsi que du nombre et la taille des microsclérotés par rapport au témoin.

3.2.1. Confrontation directe entre M1 et les isolats de *Trichoderma* spp.

L'isolat pathogène M1 n'occupe qu'une croissance diamétrale allant de 24,2 à 56,4 mm après 7 jours d'incubation ; ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de croissance mycélienne allant de 37,33 to 72,53%, selon l'isolat testé (Tableau 19).

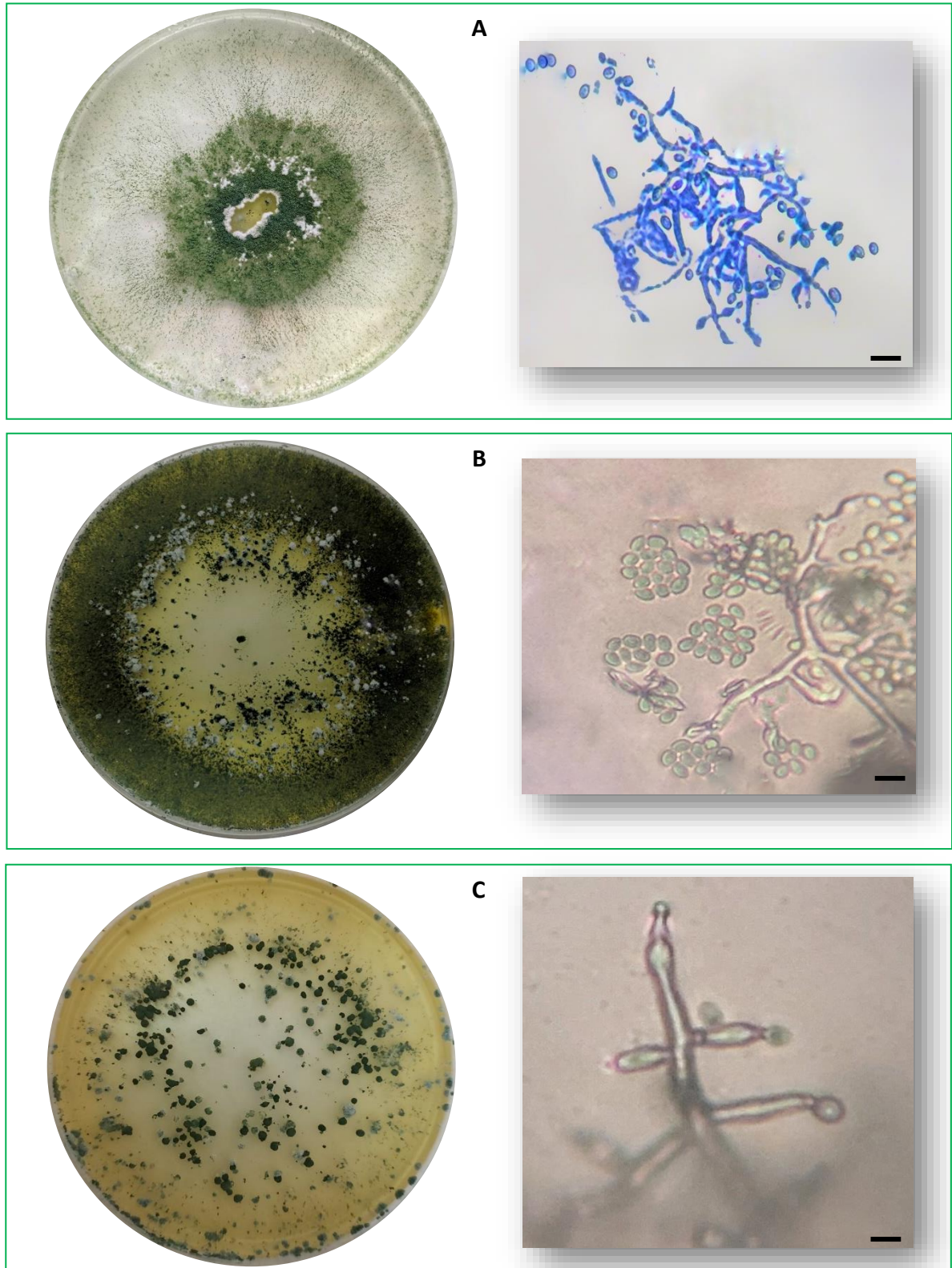


Figure 61: Aspect macroscopique et microscopique des 3 espèces de *Trichoderma* identifiées : **A:** *T. longibrachiatum*, **B:** *T. asperellum*, **C:** *T. viride* (Echelle **A, B** = 4 μm , **C** = 1 μm)

Tableau 19: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, réduction du nombre et de la taille des microsclérotés de M1 confronté aux 7 isolats de *Trichoderma*

Isolats de <i>Trichoderma</i>	Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (%)		Nombre des microsclérotés	Taille des microsclérotés (µm)
	Confrontation directe (CD)	Confrontation à distance (CAD)		
T ₁	61,07±10,39 ^{ab}	41,66± 1,11 ^a	87,5±0,7 ^{ab}	39,49±8,52 ^a
T ₂	37,33±8,45 ^c	33,88±0,55 ^b	134±2,82 ^b	46,66±4,9 ^{bcd}
T ₃	48,62±0,27 ^{bc}	30,55±0,96 ^b	98±24,04 ^{ab}	41,24±4,95 ^{abc}
T ₅	63,7±12,77 ^{ab}	27,77±3,33 ^{bc}	105±14,84 ^{ab}	47,91±5,18 ^{cd}
T ₆	62,88±10,02 ^{ab}	11,11±1,11 ^d	126±30,40 ^{ab}	49,5±4,05 ^d
T ₈	57,14±7,4 ^{abc}	22,59 ± 2,31 ^c	111,5±21,92 ^{ab}	40,41±8,8 ^{ab}
T ₁₀	72,53 ± 1,69 ^a	30,37± 4,62 ^b	59±11,31 ^a	35,49±5,27 ^a
Témoin	/	/	187,66±7,5 ^c	64,41±10,82 ^e

* Les valeurs d'une même colonne accompagnées de différentes lettres sont significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

L'évaluation du potentiel antagoniste des 7 isolats de *Trichoderma* en confrontation direct a montré que l'isolat T10 était le plus performant en raison de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de M1 avec un taux d'inhibition de 72,53%, suivi par les isolats T5, T6 et T1 qui ont manifesté un taux d'inhibition de 63,70, 62,88 et 61,07% respectivement. D'autre part, le pourcentage minimum d'inhibition a été enregistré par l'isolat T2 (37,33%) vis-à-vis de *M. pseudophaseolina* M1.

Après 10 jours d'incubation, il est à signaler qu'avec l'isolat T10, un envahissement total de la colonie du M1 est noté avec une sporulation abondante, révélant ainsi son pouvoir hautement mycoparasitaire lors de la confrontation directe (Fig. 62). Les résultats font donc ressortir une efficacité plus élevée de l'isolat T10 sur M1 alors qu'une variabilité est notée pour le reste des isolats.

Les observations microscopiques réalisées à partir de la zone de contact entre les protagonistes montrent l'existence de perturbations au niveau du mycélium du pathogène (Fig. 63) qui se traduit par une lyse et une dégradation du mycélium, un arrêt de la croissance mycélienne et la présence d'un enroulement du mycélium de *Trichoderma*

autour du M1 (Fig. 63). Les observations montrent également une réduction significative importante du nombre et de la taille des microsclérotos de *M. pseudophaseolina* M1.

Une production minimale de microsclérotos est enregistrée en présence de T10 suivi de T1 provoquant une réduction de 68,56 et 53,37 %, respectivement, par rapport au témoin. D'autre part, T2 a provoqué des réductions moins importantes sur la production de microsclérotos suivies de T6, entraînant respectivement des réductions de 28,59 et 32, 85% par rapport au témoin (Fig. 64).

De plus, les isolats de *Trichoderma* testés ont réduit considérablement la taille des microsclérotos de *M. pseudophaseolina*. Lors de l'observation microscopique, nous avons remarqué que la plus grande réduction de taille des microsclérotos a été enregistrée en présence de T10. Alors que la faible réduction de taille a été notée en présence de T6 (Fig. 65).

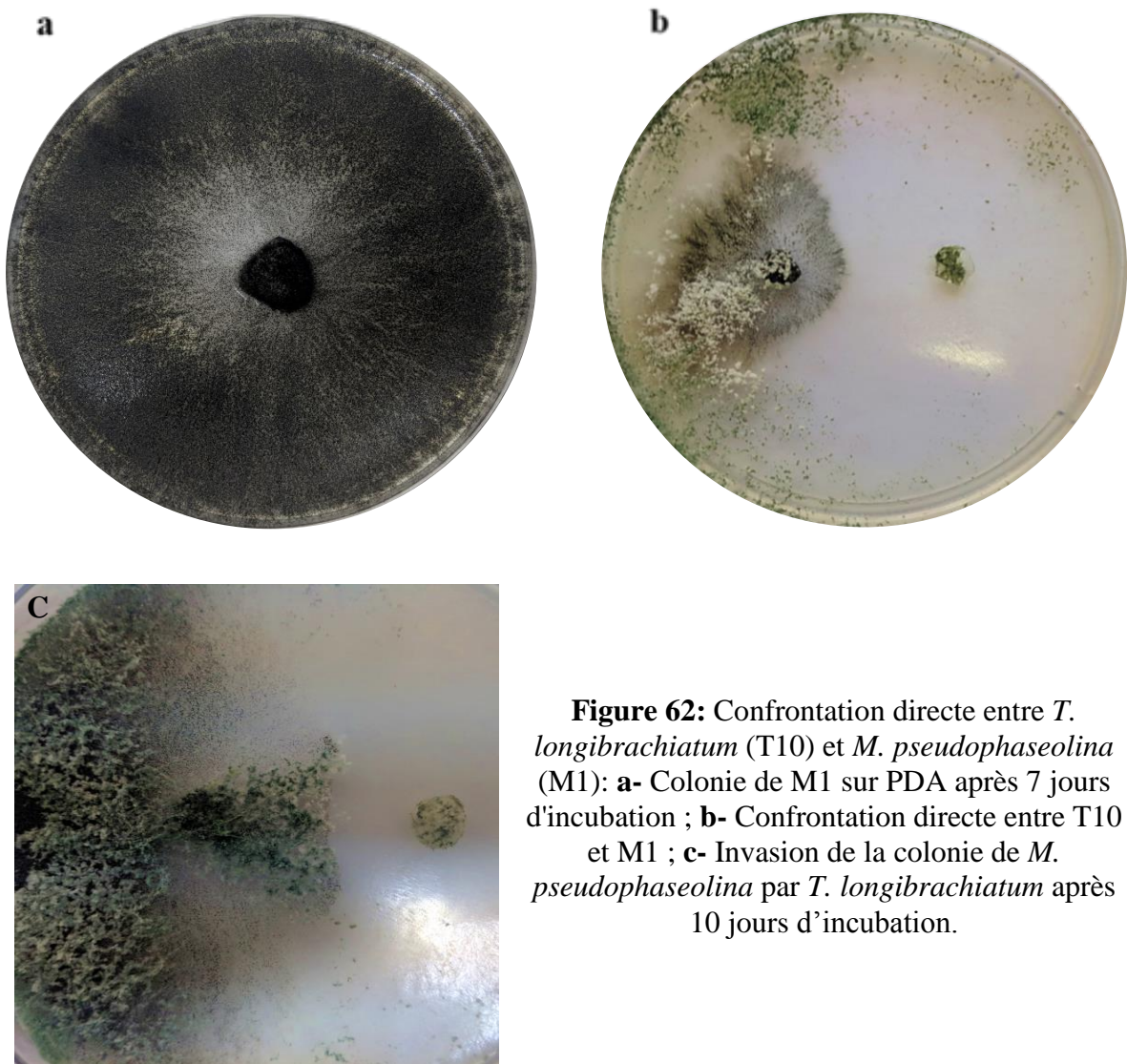


Figure 62: Confrontation directe entre *T. longibrachiatum* (T10) et *M. pseudophaseolina* (M1): **a-** Colonie de M1 sur PDA après 7 jours d'incubation ; **b-** Confrontation directe entre T10 et M1 ; **c-** Invasion de la colonie de *M. pseudophaseolina* par *T. longibrachiatum* après 10 jours d'incubation.

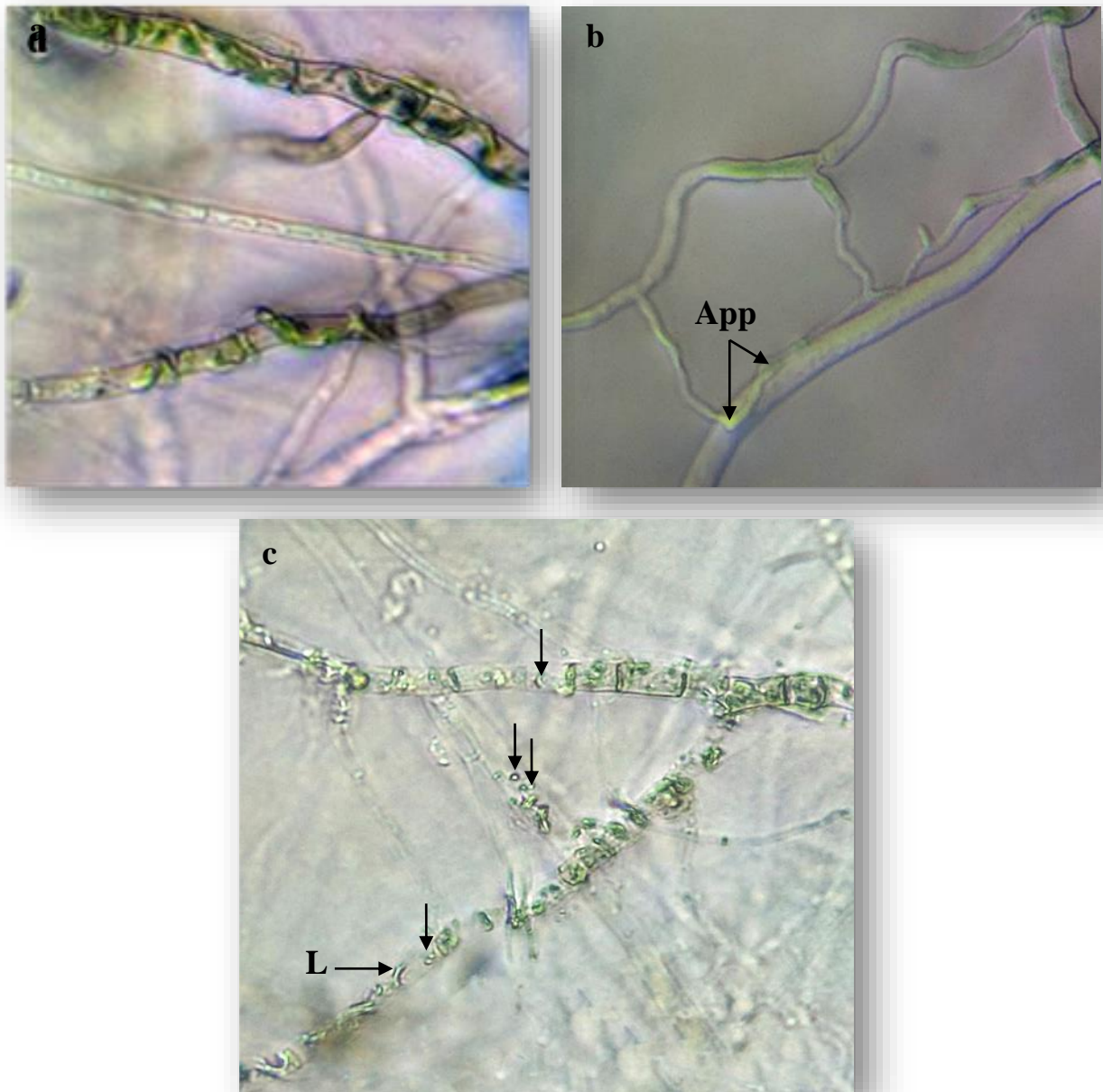


Figure 63: Observations microscopiques au niveau de la zone de confrontation directe entre les protagonistes :

a- Enroulement des hyphes de T10 sur M1 ; **b-** Formation d'un appressorium (App) de T10 dans le mycélium de M1 ; **c-** La lyse (L) et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène (voir flèches)

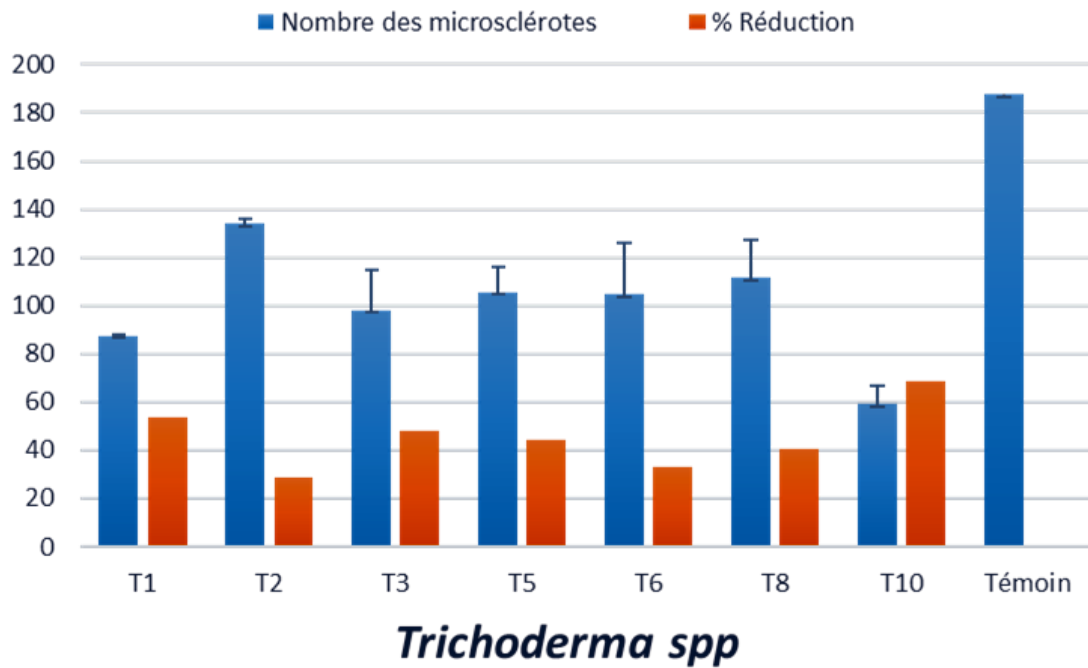


Figure 64: effet des isolats de Trichderma sur le nombre des microscélérotés produits par *M. pseudophaseolina* M1

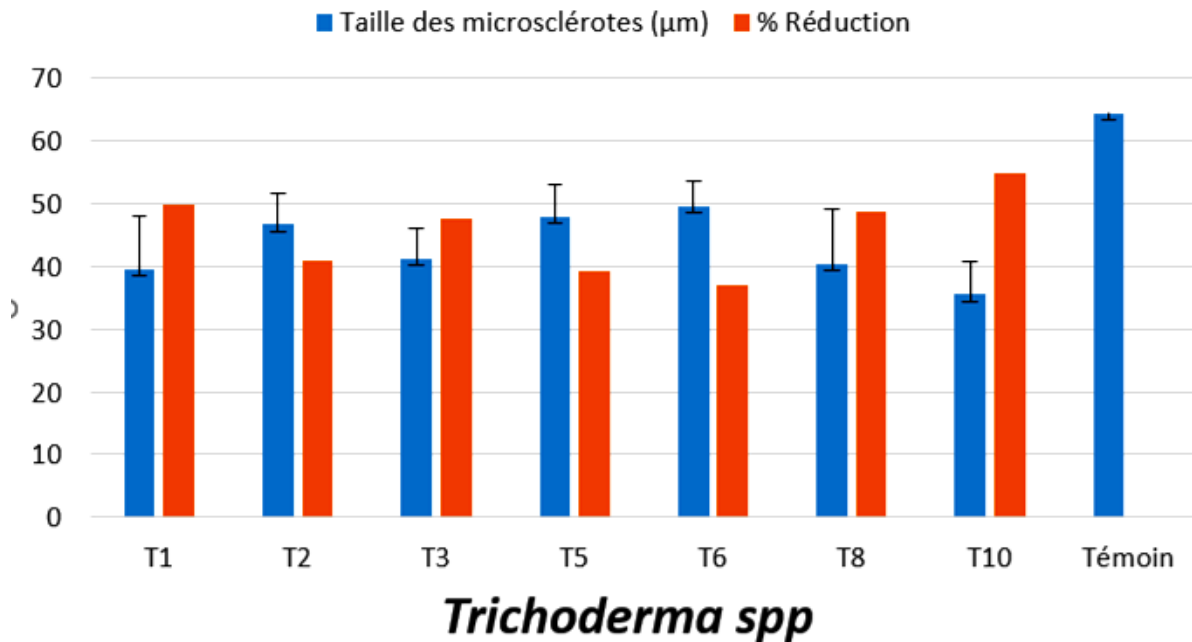


Figure 65: effet des isolats de Trichderma sur la taille des microscélérotés de *M. pseudophaseolina* M1.

3.2.2. Confrontation indirecte entre M1 et les isolats de *Trichoderma* spp.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance des isolats de *Trichoderma* sur *M. pseudophaseolina* M1.

Après 6 jours de confrontation, les résultats obtenus montrent l'existence d'un ralentissement de la croissance mycélienne de M1 malgré l'absence d'un contact direct entre l'antagoniste et l'agent pathogène. La réduction de la croissance variait de 11,11 à 41,66 % où T1 a enregistré la plus forte réduction (41%) suivi de T2, T3 et T10 avec une réduction de 33,88, 30,55 et 30,44 % respectivement (Tableau 19). Le très faible pourcentage d'inhibition de (11,11%) a été noté pour l'isolat T6.

3.3. Identification moléculaire de l'isolat T10 le plus antagoniste

L'efficacité des isolats de *Trichoderma* comme agents de lutte biologique contre *M. pseudophaseolina* a été évaluée puis,

L'isolat de *Trichoderma* (T10), avec l'activité antagoniste la plus élevée, a été sélectionné pour une identification moléculaire. L'isolat T10 a été identifié au tant que *Trichoderma longibrachiatum* sur la base des caractéristiques microscopique. L'identification morphologique de T10 a été confirmée par une identification moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α).

Les séquences d'ADN obtenues de l'isolat T10 (Annexe 6), de la région ITS et du gène TEF1- α de l'ADN ribosomale, ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données NCBI GenBank. Les résultats de la recherche BLAST de la séquence obtenue a révélé une similarité de 99,83 % avec plusieurs isolats de *T. longibrachiatum* (MF102214, KY764833, MW193401) pour la région ITS et une similarité de 100% avec les séquences de *T. longibrachiatum* pour la région TEF (MF782844, MT881880, MN195113). L'arbre phylogénétique construit pour les séquences de TEF avec d'autres séquences de *Trichoderma* a montré que T10 se regroupait avec *T. longibrachiatum* avec des valeurs de bootstrap élevées (Fig. 66).

Par conséquent, l'isolat T10 a été identifié comme *Trichoderma longibrachiatum* et les séquences ITS et TEF obtenues ont été déposées dans la banque des gènes NCBI sous les numéros d'accèsion MW818102 et OK500004 respectivement.

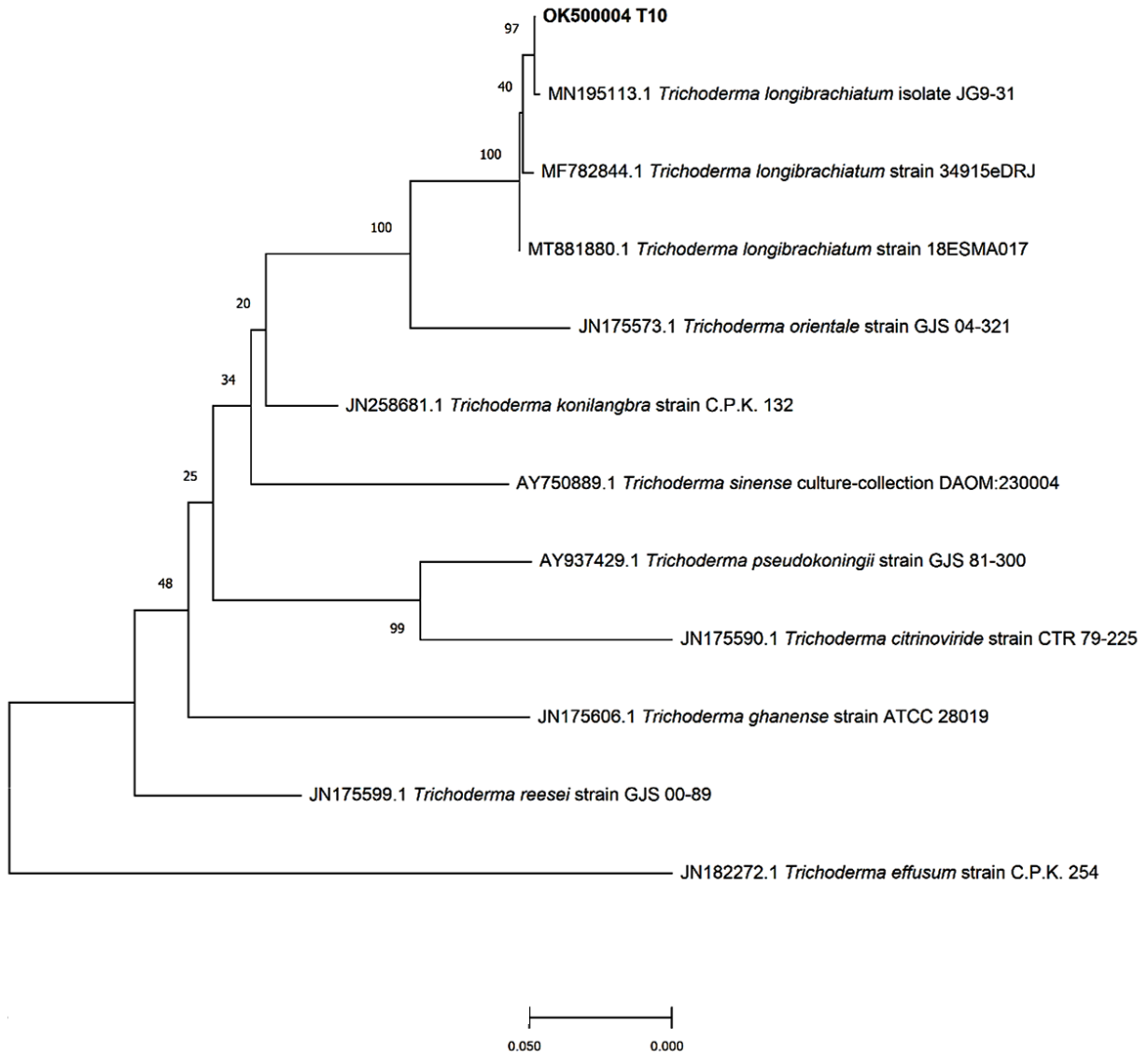


Figure 66: Arbre phylogénétique généré à partir de la région TEF montrant les relations phylogénétiques entre les espèces *Trichoderma* en utilisant la méthode de neighbor-joining. Les valeurs bootstrap (exprimées en pourcentage de 1000 répétitions) sont indiquées au point de branchement. L'isolé de la présente étude est en gras

3.4. Caractérisation des isolats de *Trichoderma*

3.4.1. Solubilisation de phosphate

Les 7 isolats de *Trichoderma* ont été testés pour leur capacité à solubiliser le phosphate (P) inorganique sur un milieu solide Pikovaskey (PVK) additionné de bleu de bromophénol et contenant le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (phosphate tricalcique) comme seule source de P. Après 3 jours d'incubation à 28°C, une zone jaune clair sur la surface inférieure du milieu PVK a été observée sur tous les isolats (Fig. 67), ce qui reflète la solubilisation de phosphate tricalcique.

Le calcul de pourcentage d'efficacité de la solubilisation a permis d'évaluer le pouvoir solubilisateur de *Trichoderma* et d'établir une comparaison entre les isolats testés (Tableau 20). Les résultats montrent que tous les isolats de *Trichoderma* possèdent un effet très significatif de solubilisation sur milieu PVK solide. L'isolat T10 s'est révélé très performant par rapport aux autres isolats testés avec une efficacité de 100% suivi de T8, T3 et T6 avec une efficacité de 97,90, 83,33 et 82,88% respectivement. Cependant, les faibles efficacités ont été enregistrés chez les deux isolats T1 (67%) et T2 (69,10%).

3.4. 2. Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)

La production qualitative de l'acide indole acétique (AIA) est réalisée sur milieu PDA additionné de tryptophane. La production d'AIA et/ou de ses composés dans le milieu de culture, est observée par l'intensité de la coloration rose à la suite de l'addition du réactif Salkowski après 20 min d'incubation (Fig. 68). Les résultats obtenus ont montré une coloration rose foncé chez les isolats T10, T1 et T3 (Tableau 20). Par contre, aucune coloration n'a été développée chez l'isolat T2 ce qui suggère que cet isolat n'a pas la capacité de produire l'AIA sur milieu PDA additionné de tryptophane.

3.4. 3. La production d'ammoniac (NH_3)

La production de NH_3 a été détectée chez tous les isolats testés avec des taux plus au moins intenses selon le virage de la couleur du jaune au marron après addition du réactif de Nessler (Tableau 20 ; Fig. 69).

CHAPITRE V

Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*

Tableau 20: solubilisation du phosphate, production d'AIA et de NH₃ par les isolats de *Trichoderma*

Isolats de <i>Trichoderma</i>		Solubilisation de Phosphate			Production d'AIA	Production de NH ₃
		Halo (cm)	Colonie (cm)	Pourcentage d'efficacité* (%)		
T1	<i>T. longibrachiatum</i>	4	5,97	67 ± 1,5 ^c	++++	Jaune ++
T2	<i>T. asperellum</i>	4,25	6,15	69,10 ± 0,3 ^c	-	Jaune+
T3	<i>T. longibrachiatum</i>	6,25	7,5	83,33 ± 0,1 ^{abc}	++++	Marron +
T5	<i>T. viride</i>	4	5,3	75,47 ± 3,8 ^{bc}	++	Marron +
T6	<i>T. viride</i>	4,6	5,55	82,88 ± 1,2 ^{abc}	+	Jaune ++
T8	<i>T. viride</i>	7	7,15	97,90 ± 0,6 ^{ab}	++	Marron +
T10	<i>T. longibrachiatum</i>	7,5	7,5	100 ± 0,0 ^a	++++	Marron ++

* (- : absence de coloration rose, + : légèrement rose, ++ : rose, ++++ : rose foncé)

* Les valeurs d'une même colonne accompagnées de différentes lettres sont significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

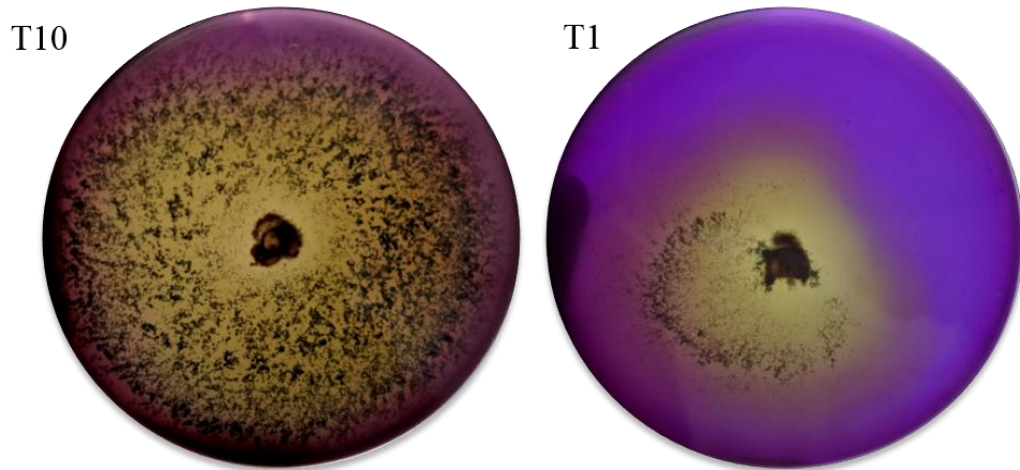


Figure 67: Halo clair autour des colonies de *Trichoderma* caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK après 3 jours d'incubation

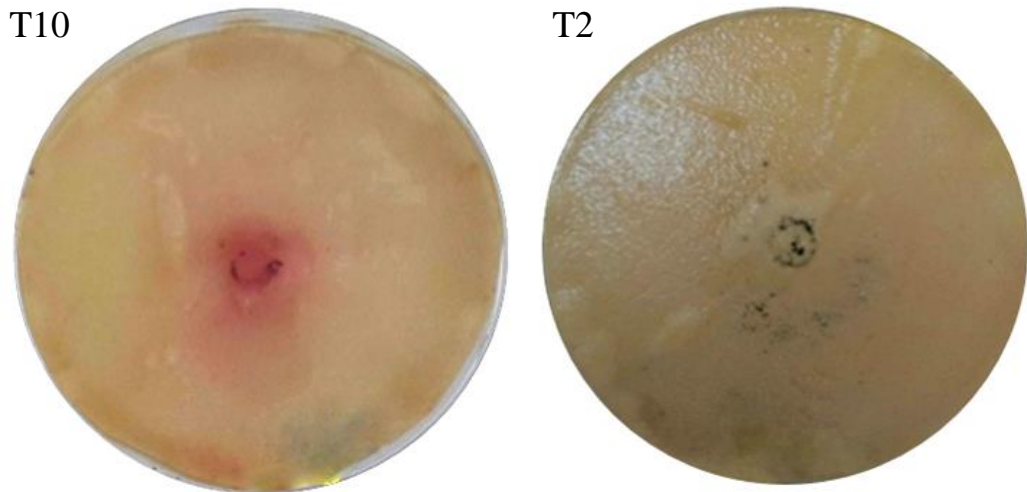


Figure 68: Production d'AIA sur le milieu solide additionné de tryptophane

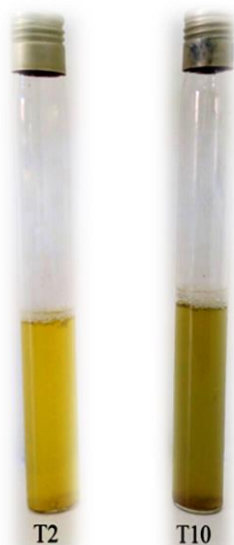


Figure 69: Production de NH_3 sur le milieu liquide additionné de réactif Nessler

3.5. Production des enzymes

3.5.1. Amylases

La production d'amylase a été révélée sur le milieu à base d'amidon par la présence d'un halo jaune clair autour de la colonie de chaque isolat (Fig. 70 A). Après incubation à 27°C pendant 3 jours, les cultures sont recouvertes avec 5 à 10 ml de solution iodée. Tous les isolats testés ont dégradé, à un certain degré, l'amidon. L'isolat T2 a exhibé une forte production d'amylase avec un halo enregistré de 7,45 cm suivi de près par T5 et T8 avec des diamètres de 7,35 et 7,30 cm respectivement. Par contre, le plus faible diamètre de la zone hydrolysée est enregistré par l'isolat T10 avec un halo de 5,5 cm (Tableau 21).

3.5.2. Chitinases

La production de chitinase a été révélée sur le milieu de détection en utilisant de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone. La production de chitinase dans le milieu de culture est observée par un changement de couleur de milieu vers le jaune à la suite de l'addition de la solution iodée après 3 jours d'incubation (Fig. 70 B). Les résultats montrent que tous les isolats testés ont dégradé la chitine. L'isolat T2 a enregistré une forte croissance sur le milieu de culture avec 6,45 cm suivi par T1, T6 et T8 avec des diamètres de 5,22, 5,20 et 5,20 cm respectivement. Par contre, le plus faible diamètre de la zone hydrolysée est enregistré par l'isolat T3 avec un halo de 4,4 cm (Tableau 21).

3.5.3. Pectinases

Les résultats du test ont montré la capacité des isolats de *Trichoderma* à dégrader la pectine incorporée dans le milieu pectinase. Après incubation à 28°C pendant 3 jours et l'addition d'acétate de cuivre (75%) sur les milieux de culture, un halo clair est formé autour du point d'inoculation du champignon comme indique la figure 70 C. Les plus grands diamètres du halo sont enregistrés par les 3 isolats T3 (4,5cm), T10 (3,7 cm) et T8 (3,4 cm). Le reste des isolats ont enregistré des diamètres entre 2,4 à 2,9 cm (Tableau 21).

3.5.4. Ligninases

Les isolats de *Trichoderma* testés ont pu se développer sur le milieu à base d'acide tannique, où la formation d'une zone brune foncée entourant les colonies après 4 jours d'incubation a indiqué la production de ligninase (Fig. 70 D). Les résultats montrent une faible croissance chez tous les isolats avec un diamètre allant de 1,4 à 2,5 cm (Tableau 21). Les isolats T5, T10 et T1 ont manifesté les plus grandes croissances avec des diamètres

d'halos de 2,5, 2,4 et 2,4 cm respectivement, tandis que T2 a enregistré le plus faible diamètre avec un halo 1,4 cm.

3.5.5. Cellulases

La production des cellulases a été détectée chez tous les isolats de *Trichoderma* testés. Ils ont démontré leur capacité à synthétiser l'enzyme endoglucanase sur le milieu CMC par la présence d'une zone claire autour des colonies avec des diamètres variables d'un isolat à un autre (Fig. 70 E).

Les isolats T10 et T2 ont montré une zone claire avec des diamètres similaires de 2,2 cm indiquant la possibilité de production des enzymes endoglucanases. Par contre, l'isolat de *T. harzianum* T2 s'est montré comme étant un faible producteur de cellulase avec un halo de 1,2 cm (Tableau 21).

Tableau 21: Activités enzymatiques des isolats de *Trichoderma* (diamètres des halos formés autour des colonies (cm))

Isolats de <i>Trichoderma</i>		Amylases	Chitinases	Pectinases	Ligninases	Cellulases
T1	<i>T. longibrachiatum</i>	6,4±1,5 ^{ab}	5,22±0,37 ^{ab}	2,9±0,06 ^b	2,4±0,35 ^a	1,5±0,05 ^{cd}
T2	<i>T. asperellum</i>	7,45±0,15 ^a	6,45±0,73 ^a	2,4±0,1 ^d	1,4±0,27 ^b	1,2±0,03 ^d
T3	<i>T. longibrachiatum</i>	5,8±0,3 ^{ab}	4,4±0,6 ^b	4,5±0,05 ^a	2,3 ±0,27 ^a	2,2±0,1 ^a
T5	<i>T. viride</i>	7,35±0,00 ^a	4,8±0,4 ^b	2,7±0,01 ^{cd}	2,5±0,05 ^a	1,7±0,09 ^{bc}
T6	<i>T. viride</i>	6,95±0,65 ^{ab}	5,2±0,3 ^{ab}	2,5±0,27 ^{cd}	1,9±0,19 ^{ab}	1,9±0,05 ^{ab}
T8	<i>T. viride</i>	7,3±0,05 ^a	5,2±0,3 ^{ab}	3,4±0,18 ^b	1,9±0,08 ^{ab}	1,5±0,3 ^{cd}
T10	<i>T. longibrachiatum</i>	5,5±0,00 ^b	4,9±0,1 ^{ab}	3,7±0,2 ^b	2,4±0,1 ^a	2,2±0,05 ^a

* Les valeurs d'une même colonne accompagnées de différentes lettres sont significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

CHAPITRE V

Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*

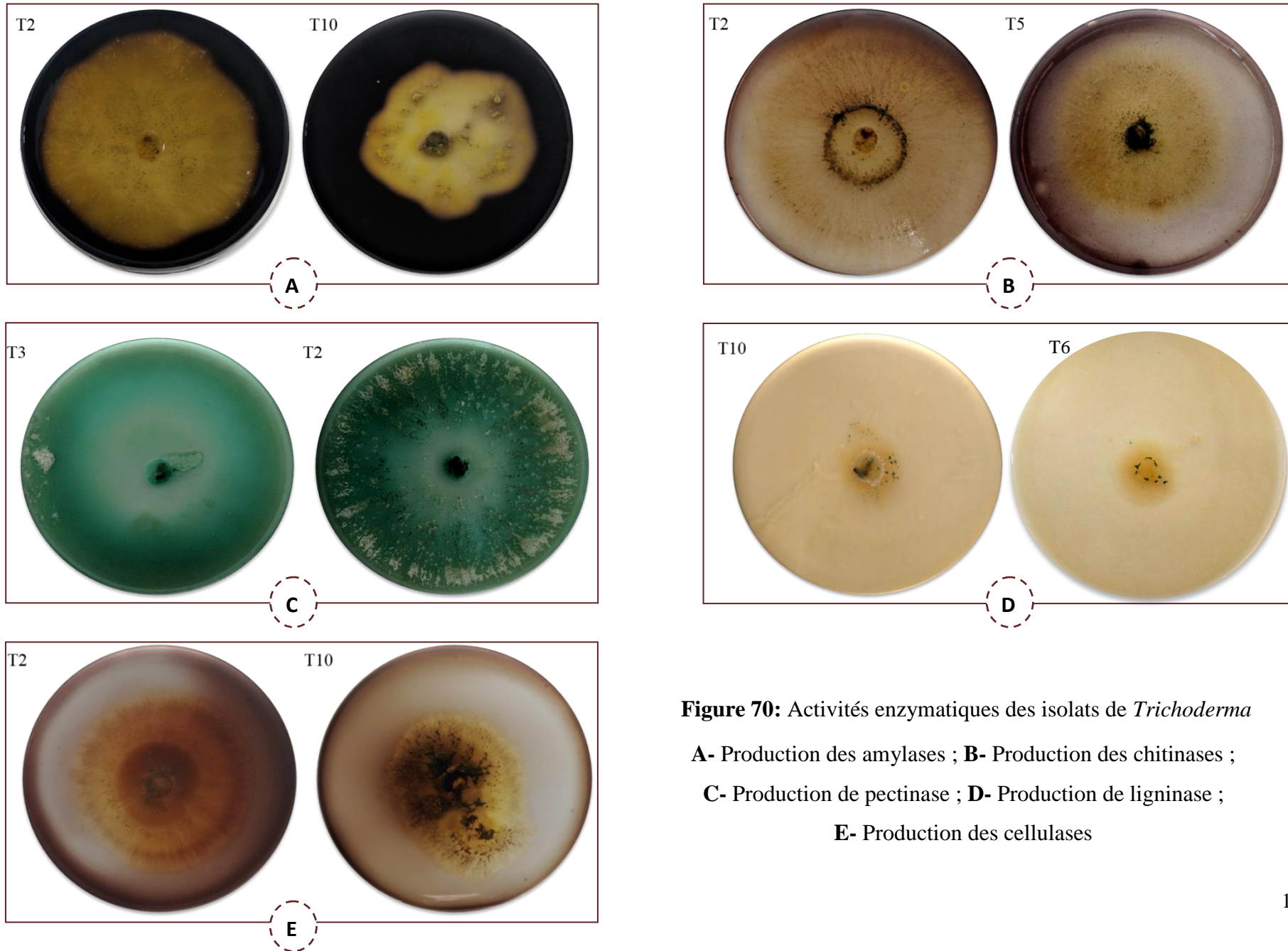


Figure 70: Activités enzymatiques des isolats de *Trichoderma*

A- Production des amylases ; **B-** Production des chitinases ;

C- Production de pectinase ; **D-** Production de ligninase ;

E- Production des cellulases

3.5.6. Relations entre les différents paramètres étudiés

Les coefficients de corrélations entre les 12 tests étudiés (Confrontation directe et à distance, le nombre et la taille des microsclérotos, la solubilisation du phosphate et la production de l'AIA et de NH₃, la production de l'amylase, la chitinase, la pectinase, la ligninase et la cellulase) ont été calculés dans le but de chercher des associations possibles entre eux. La figure 71 présente une matrice de corrélation entre l'ensemble des tests étudiés. L'analyse de la figure 71 nous a permis de remarquer l'existence d'une forte corrélation ($r=0,89$ et $r=0,87$) entre le test de l'AIA avec le test de ligninase et avec l'effet des *Trichoderma* sur le nombre des microsclérotos produits par M1, respectivement. Des corrélations positives entre la plupart des tests ont été enregistrées à l'exception des tests de chitinases et amylases où les corrélations étaient négatives.

Une classification a été réalisée par une ACP (analyse en composante principale). La projection des différents tests sur la carte factorielle en 3 dimensions est présentée dans la figure 72. La synthèse de données numériques sur la figure 72 a été effectuée par une analyse en composantes principales (ACP) qui a mis en évidence la corrélation entre les différents paramètres, projetée sur la figure 72. Les axes 1, 2 et 3 du graphe, présentent 58,37, 16,74 et 11,41% d'information, respectivement. La représentation graphique des données a confirmé les corrélations soulevées sur la matrice de corrélation (Fig. 71). L'ACP basée sur la matrice obtenue est utilisée pour comparer les activités PGPF exprimées par les différents isolats de *Trichoderma* testés (Fig. 72). L'analyse des données permet de mettre en évidence des corrélations négatives entre les tests d'amylase et chitinase avec le reste des tests (axes presque opposés).

L'outil d'analyse de cluster hiérarchique bidirectionnelle fournit le résumé des relations globales entre les tests étudiés ainsi que les isolats de *Trichoderma* testés. La couleur de chacun des blocs sur la carte thermique (allant du rouge au bleu) représente les pourcentages (entre 0 et 100) de l'efficacité des isolats pour chacun des tests sélectionnés (Fig. 73). Deux (02) groupes principaux (I et II) pour les tests appliqués aux *Trichoderma* sont à distinguer de la figure 73 ; le groupe I est constitué des 2 tests (chitinase et amylase), tandis que le groupe II comporte le reste des tests.

Dans l'autre côté, le dendrogramme des isolats de *Trichoderma* révèle la présence de 3 groupes. Le groupe I est constitué de 2 isolats (T3 et T10) qui ont prouvé une bonne activité dans tous les paramètres étudiés. Le groupe II regroupe de 3 isolats (T5, T8 et T6) qui ont une activité qualifiée de moyenne dans les 12 paramètres étudiés par rapport aux isolats regroupés dans le groupe 1. Le groupe III (isolats peu actifs) comporte les isolats T1 et T2.

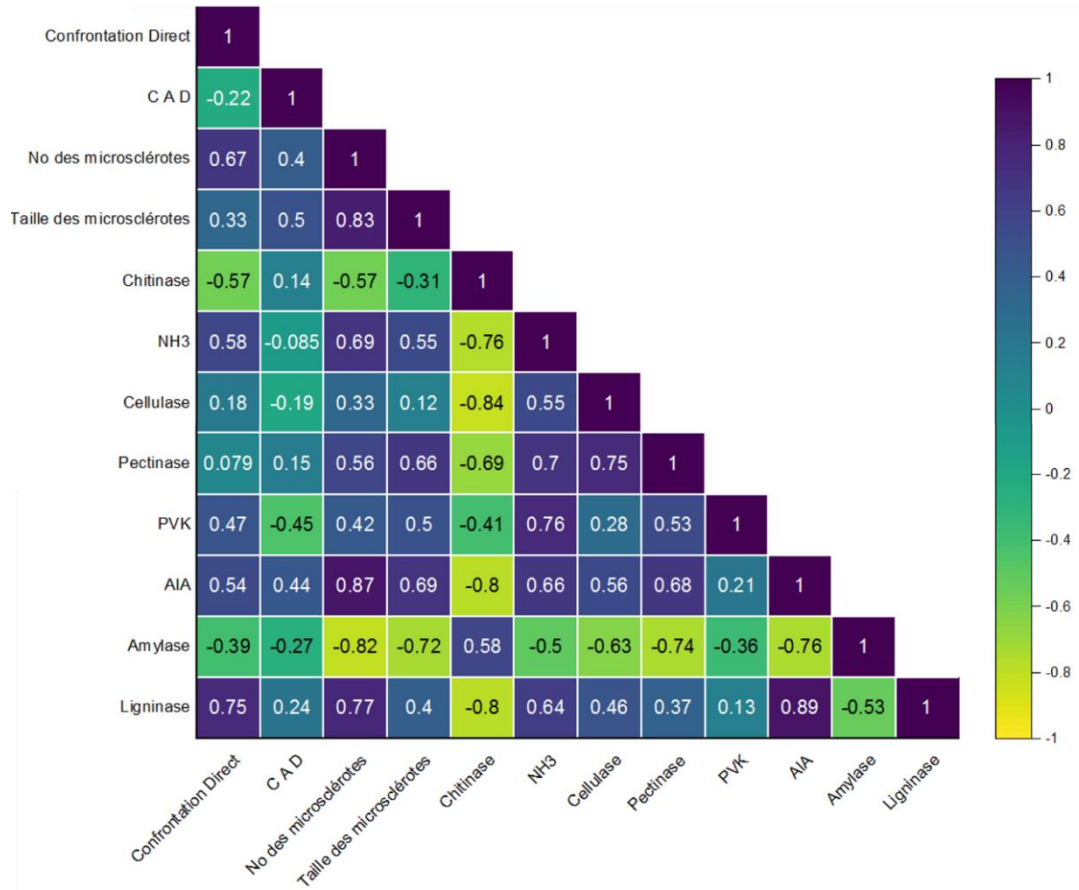


Figure 71: Matrice de corrélation des 12 tests étudiés

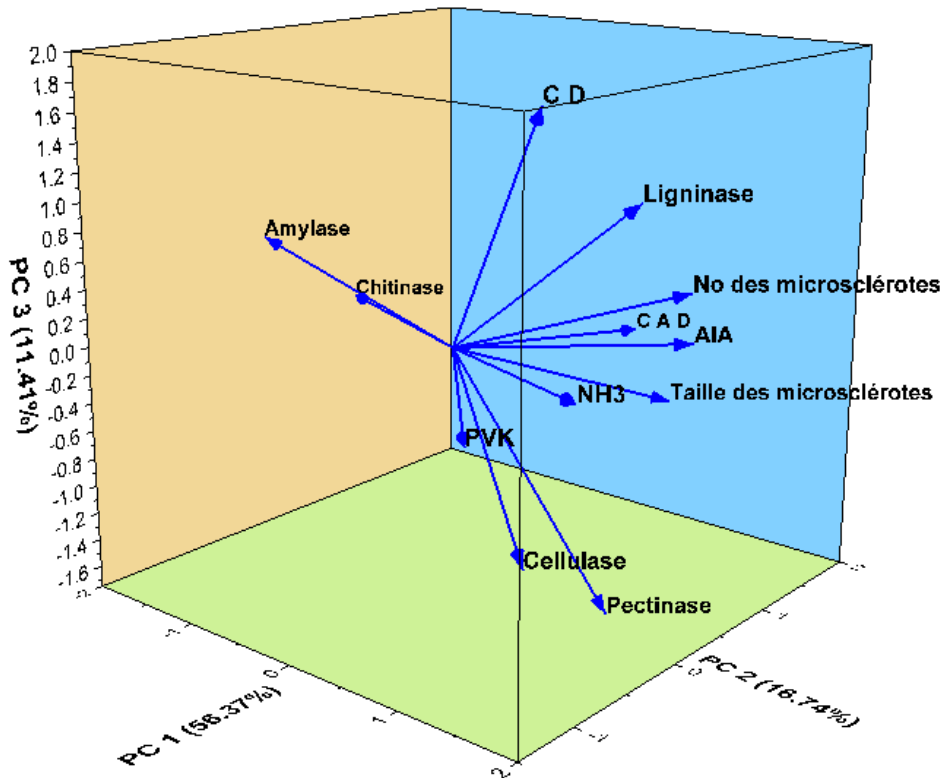


Figure 72: Répartition des 12 tests étudiés par une ACP.

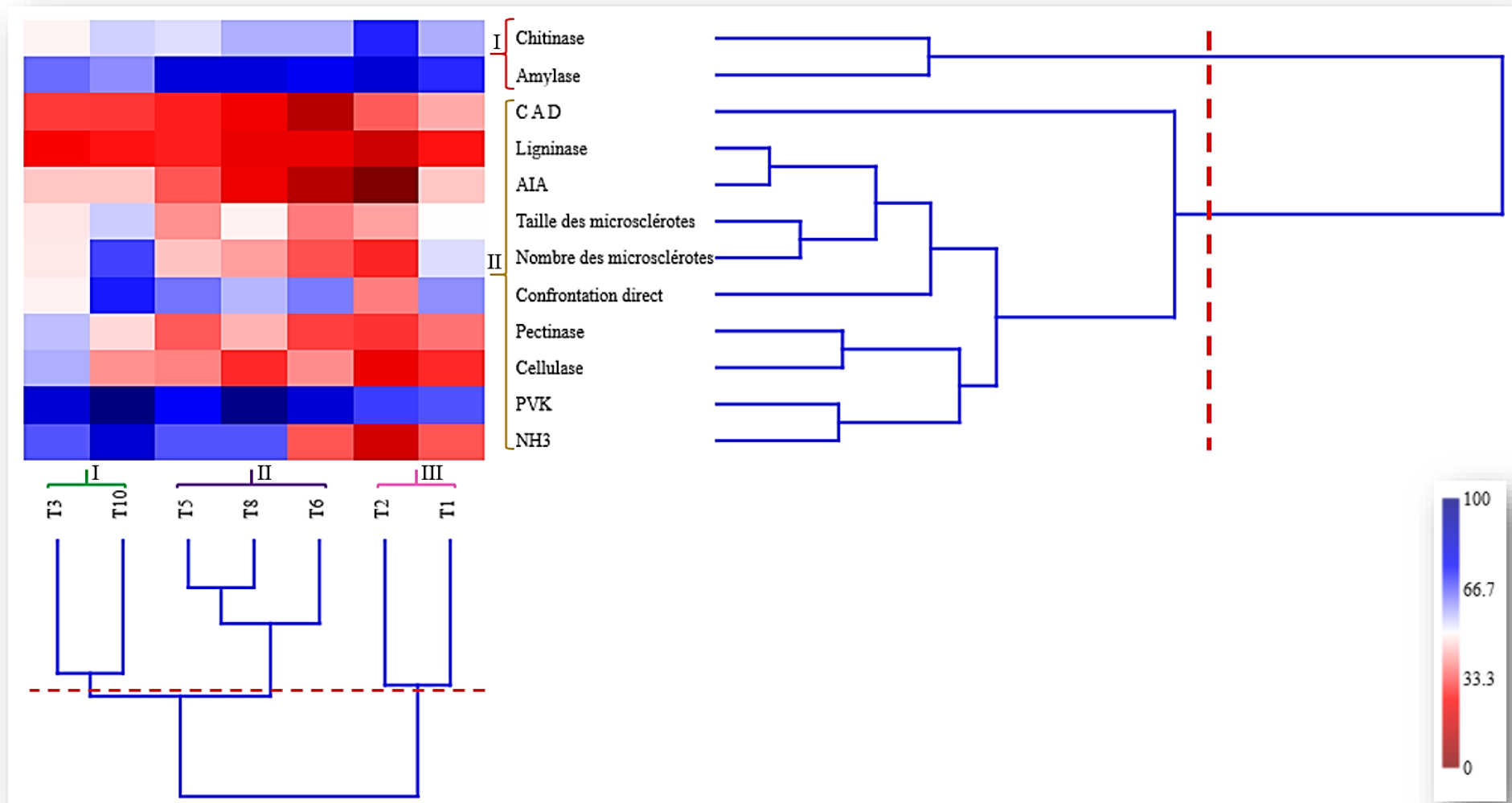


Figure 73: Analyse de cluster hiérarchique bidirectionnelle visualisée à l'aide d'un dendrogramme combiné à une carte thermique.

La carte thermique représente l'efficacité (en pourcentage) des isolats par rapport aux tests étudiés

3.6. Efficacité *in vivo* de *T. longibrachiatum* T10 sur l'incidence de la maladie

Durant cette expérience, l'effet protecteur de *T. longibrachiatum* T10 à l'égard de *M. pseudophaseolina* M1 responsable de la pourriture charbonneuse de lentille a été testé en pots sur le cultivar Syrie 229. L'efficacité *in vivo* de T10 sur l'incidence et la gravité de la maladie a été évaluée au bout de 6 semaines.

Les résultats obtenus montrent que les 1^{iers} symptômes ont été apparus le 16^{ième} jour après le semis en pots des graines inoculées uniquement avec M1 où nous avons observé que la maladie s'est installée rapidement. Les symptômes typiques de la pourriture charbonneuse se manifestent sous forme d'un retard à la levée, des mortalités élevées des plantules, un jaunissement de la partie aérienne de la plante (Fig. 74 B), une colonisation des tissus de tige et racine par des microsclérotés (Fig. 74 C) ainsi une inhibition importante de la croissance racinaire accompagnée d'un dessèchement. Au bout de 40 jours, un taux d'infection élevé de 100% a été enregistré qui correspond à une gravité de 5 (Tableau 22, Fig. 74 B).

Les plantules issues des semences inoculées par M1 et traitées par T10, les symptômes n'apparaissent qu'après 30 jours (Tableau 22). Une bioprotection des plantes *in vivo* a été induite suite à l'utilisation de T10 (Fig. 74 A). Au bout de 40 jours, une incidence faible de 8,3% a été enregistrée avec une gravité de 0,9. Les résultats obtenus confirment une fois de plus le pouvoir antagoniste de *T. longibrachiatum* T10 et justifient leur efficacité *in vivo* en retardant l'apparition des symptômes. En effet, leur application a réduit IM à 91,7% (Fig. 74 A). Aucune colonisation des tiges et des racines par les sclérotés n'a été observée.

Tableau 22: La durée d'apparition des 1^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots selon les traitements.

Traitements	La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes (jours)	Incidence de la maladie (IM %)	La gravité de la maladie (échelle de 0 à 5)	Réduction d'incidence de la maladie (RM%)
M1	16	100	5	-
M1 + T10	30	8,3	0,9	91,7%

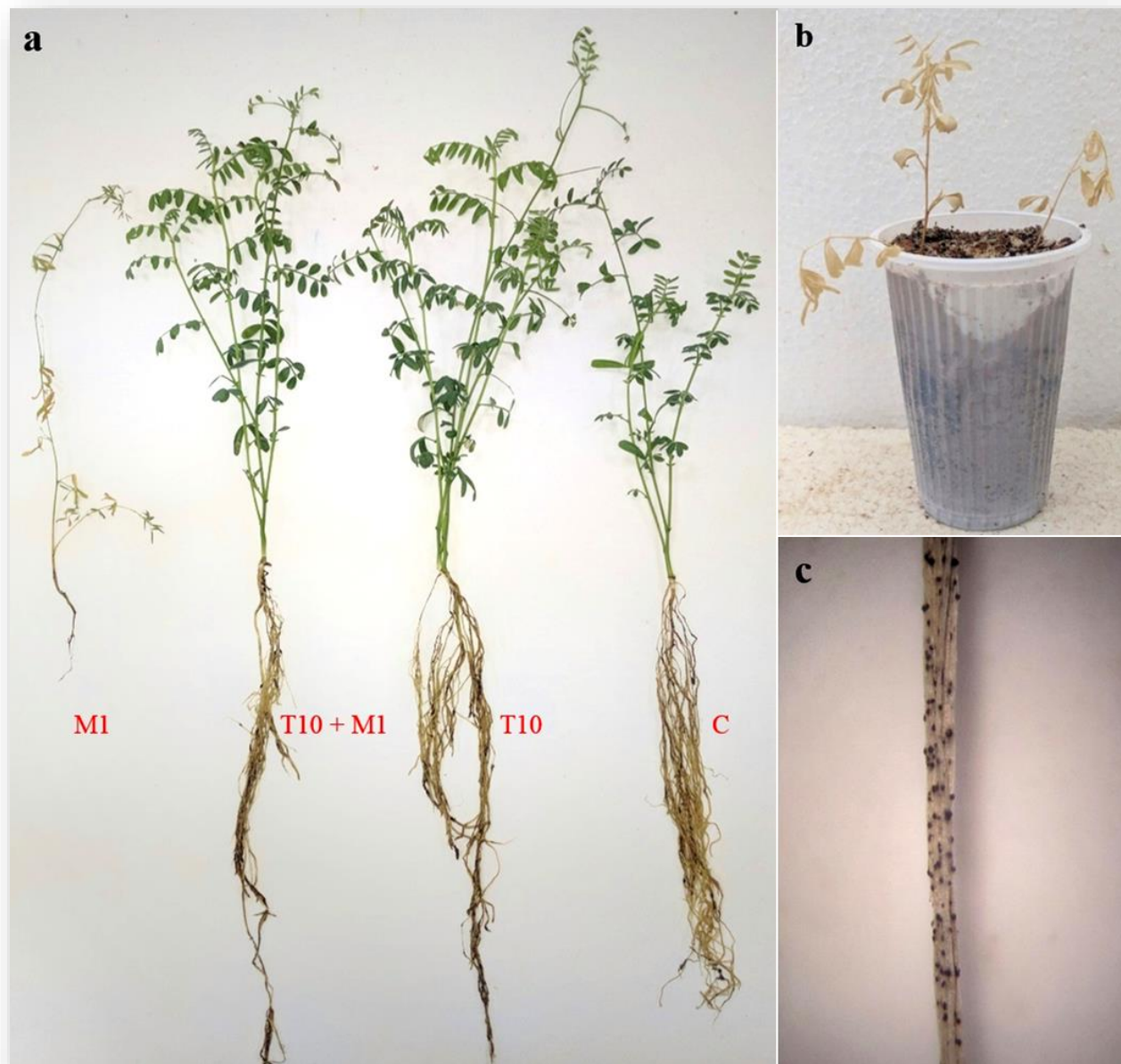


Figure 74: Essai de la lutte biologique en pots par l'utilisation de *T. longibrachiatum* T10 contre *M. pseudophaseolina* M1 :

A : Etat des plantes inoculées par le pathogène (M1) et par l'antagoniste (T10), comparativement à ceux du témoin sain (C) et traité, les plants traités par T10 présentent un développement végétatif plus important.

B : Plantes inoculées avec M1 montraient les symptômes caractéristiques de la pourriture charbonneuse après 40 jours de semés.

C : Colonisation de la tige de lentille par les microsclérotés du pathogène

3.7. Effet de *T. longibrachiatum* T10 sur la croissance et le développement de lentille

A la fin de l'expérience, les plantes ont été retirées des pots pour examiner l'état des plantes et mesurer certains paramètres de croissance.

L'observation de l'état des plantes inoculées par le pathogène et traitées par l'antagoniste, comparativement à celui du témoin sain (non inoculé et non traité), montre que les plants traités par T10 présentent un développement végétatif plus important (Fig. 74 A).

Les plantes traitées par T10 présentent un développement végétatif plus important comparativement à ceux du témoin sain et de plantes inoculées par M1 et traité par T10 (Fig. 74 A). De même, la comparaison du système racinaire des plantes montre une nette différence entre eux (Fig. 74 A). Comparativement au du témoin sain (non inoculé et non traité), les racines des plantes inoculées seulement par M1 sont gravement endommagées, de taille courte et présentent un dessèchement très accentué. Cependant, le système racinaire des plantes traitées par T10 se développe normalement et aucun symptôme n'est observé.

L'effet de l'isolat de *T. longibrachiatum* T10 sur la longueur de la tige et de la racine, le poids frais ainsi que le poids sec est représenté dans le tableau 23. Un effet significatif de l'amélioration de la croissance des plantes a été observé en présence de T10.

La longueur de la tige des plantes est variable de 16 à 20 cm (Tableau 23). Les plantes inoculées par T10 ont enregistré la longueur la plus élevée avec 20 cm en comparaison avec les plantes inoculées par M1 et traitées par T10 qui ont présenté une longueur de 17 cm. Les plantes inoculées uniquement par M1 ont présenté la plus petite longueur de la tige (16 cm).

La longueur de la racine des plantes est variée de 4 à 24.6 cm selon le traitement. Les plantes inoculées par T10 ont enregistré la longueur la plus élevée (24,6 cm) en comparaison avec les plantes inoculées par M1 et traitées par T10 et qui ont enregistré une longueur de 19,8 cm. Les plantes inoculées uniquement par M1 ont présenté la plus petite longueur de la racine (4 cm) (Tableau 23).

En outre, une amélioration importante du poids frais et du poids sec des plantes traitées avec *T. longibrachiatum* T10 est observée par rapport aux autres traitements. Les plants de lentilles traitées seulement avec l'isolat T10, ont présenté un poids frais et un poids sec de 1,8 et 0,34 g respectivement. Alors que, les plantes inoculées par M1 et traitées par T10 ont enregistré un poids frais et un poids sec de 1,5 et 0,2 g respectivement.

Cependant, les plantes inoculées uniquement par M1 ont enregistré un pois frais et un poids sec très faible avec 0,1 et 0,04 g, respectivement (Tableau 23).

Il est à rappeler que l'isolat testé *T. longibrachiatum* T10 avaient démontré *in vitro* une meilleure activité antagoniste contre le champignon phytopathogène *M. pseudophaseolina* M1, une capacité à produire l'hormone de croissance AIA, une bonne solubilisation de phosphate et une activité enzymatique importante.

Tableau 23: Effet de *T. longibrachiatum* T10 sur les paramètres de croissance des plantes de lentilles dans conditions contrôlées

Traitement	Paramètres de croissance			
	Longueur de tige (cm) *	Longueur des racines (cm) *	Poids frais (g) *	Poids sec (g) *
M1	16±0,4 ^c	4±0,00 ^d	0,1±0,00 ^c	0,04±0,002 ^c
M1+ T10	17±0,9 ^{bc}	19,8±0,197 ^c	1,5±0,07 ^b	0,2±0,03 ^b
T10	20±1,0 ^a	24,6±0,01 ^a	1,8±0,048 ^a	0,34±0,003 ^a
Témoin	18±0,5 ^b	21,2±0,4 ^b	1,7±0,012 ^a	0,22±0,005 ^b

* Les valeurs d'une même colonne accompagnées de différentes lettres sont significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

4. Discussion

4.1. Isolement et identification des champignons du genre *Trichoderma*

L'isolement par dilution à partir de la rhizosphère de la lentille nous a fourni 07 isolats présumés de *Trichoderma*. Ce genre est connu pour être un champignon cosmopolite que l'on trouve couramment dans divers agroécosystèmes. La plupart des études impliquant l'isolement et l'identification des espèces de *Trichoderma* ont été réalisées afin de les évaluer pour leurs potentiels de contrôle biologique vis à vis des agents phytopathogènes ou bien pour étudier l'abondance et la diversité des populations de ce champignon dans les champs de cultures spécifique ainsi que la distribution sur les différents agroécosystèmes (Al-Sadi *et al.*, 2015, Kumar et Ashraf, 2017). Par conséquent, *Trichoderma* s'est avéré être un agent antagoniste et un biofertilisant très efficace (Kubheka et Ziena, 2022) et l'un des champignons qui dominent différentes rhizosphères de terres agricoles (Jiang *et al.*, 2016).

Les 7 isolats obtenus au cours d'isolement possédaient des caractéristiques macro et microscope quasiment identiques, ce qui a rendu difficile d'effectuer une identification morphologique précise. Par conséquent, nous avons réalisé les tests de bio contrôle et de caractérisation, puis sélectionné l'isolat le plus performant pour une identification moléculaire. Actuellement, la caractérisation moléculaire basée sur l'analyse des séquences de multiples gènes tels que l'ITS et TEF représente la méthode la plus fiable pour identifier les champignons.

4.2. Etude de l'activité antagoniste *in vitro*

L'isolat indigène de *T. longibrachiatum* T10, utilisé au cours de nos travaux de thèse, fut isolé à partir de la rhizosphère des plantes de lentille saine et vigoureuse. L'utilisation d'isolats indigènes en lutte biologique est un facteur crucial, car ces isolats contribuent à l'équilibre des agrosystèmes tout en exprimant les caractéristiques agronomiques recherchés tels que la phyto-protection et la phyto-stimulation des plantes cultivées (Zin et Badaluddin, 2020). Cet isolat a été alors testé en confrontation directe avec M1, soit *in vitro* dans des conditions contrôlées de laboratoire, soit *in vivo* au niveau des graines de la lentille en situation préventive, afin de tester son pouvoir antagoniste vis-à-vis l'agent phytopathogène *M. pseudophaseolina*.

Les résultats de la confrontation directe *in vitro* ont montré que l'isolat T10 était le plus performant car il inhibait la croissance mycélienne du pathogène M1 au bout de 3 jours suivant l'inoculation et se terminait par une invasion complète des boîtes de pétri. Cela indique que T10 (*T. longibrachiatum*) a utilisé sa capacité de croissance rapide comme mécanisme d'antagonisme contre le champignon pathogène. Sharma et Sankaran (1988) ont rapporté que le taux de croissance rapide de ce champignon est une caractéristique d'un antagoniste prometteur. Selon Sobowale *et al.*, (2010), *T. longibrachiatum* possède un taux de sporulation rapide et élevé, ce qui lui permet de couvrir plus d'espace sur une boîte de pétri en courte durée. Il a également suggéré que la compétition pour les nutriments et l'espace fait partie du mode d'inhibition de l'agent pathogène.

Suite à l'interaction entre les isolats de *Trichoderma* (T10) et *Macrohomina* (M1) sous observation microscopique, des altérations au niveau microsclérotés ont été observées. Les isolats de *Trichoderma* avaient la capacité de réduire le nombre et la taille des microsclérotés. Semblable à cette découverte, Iqbal *et al.* (2020) ont rapporté que les

espèces de *Trichoderma* ont pu réduire significativement la taille et le nombre de microsclérotés de *Macrophomina phaseolina*.

L'activité des isolats de *Trichoderma* dans l'inhibition de la croissance de *M. pseudophaseolina* est attribuée à l'activité mycoparasitaire et à la production de composés actifs, notamment des antibiotiques et/ou des enzymes lytiques (Bekkar, 2016). De nombreuses études ont démontré que les espèces de *Trichoderma* produisent une variété de métabolites secondaires, (dont certains sont toxiques pour les agents phytopathogènes) et des enzymes, notamment les chitinases, cellulase (Sawant, 2014).

Le test de confrontation indirecte a révélé un taux d'inhibition inférieur à celui enregistré pour la confrontation directe où l'isolat T10 était le plus stable parmi les autres antagonistes testés. De plus, une pigmentation jaune a été observée sur les boîtes de pétri de pathogènes et antagonistes indiquant la synthèse de la Pyrone 6-PP (6-pentyl-2H-pyran-2-one) couramment produite par plusieurs espèces de *Trichoderma* (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). Il a été rapporté que le 6-PP est l'un des principaux composés organiques volatils (COV) ayant une activité antimicrobienne à fortes doses et peut être impliqué dans la signalisation plante-champignon conduisant à l'activation des mécanismes de défense des plantes et à la régulation de la croissance des plantes chez la tomate, pois et colza (Vinale *et al.*, 2008).

Les espèces de *Trichoderma* sont également connues pour produire une large gamme de métabolites secondaires volatils tels que les alcools, les cétones, les alcanes et les furanes (Stoppacher *et al.*, 2010 ; Alghuthaymier *et al.*, 2022), qui peuvent interférer avec divers processus biologiques tels que le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes (Vinale *et al.*, 2008).

4.3. Caractérisation des isolats de *Trichoderma*

Avec la surexploitation des différents pesticides chimiques et fertilisants, la nécessité de trouver des alternatives moins nocives pour l'environnement est croissante. Le besoin d'alternatives respectueuses de la santé humaine, animale et de l'environnement provient des conséquences de l'utilisation de produits chimiques non seulement sur le coût de la production et la rentabilité mais aussi sur la pollution dû au ruissellement d'azote et de phosphate (Chandini *et al.*, 2019). Le biocontrôle des pathogènes par des agents antagonistes comme les *Trichoderma* permet aussi la diminution de l'utilisation de

pesticides chimiques afin de contrôler les agents phytopathogènes (Topolovec-Pintarić, 2019).

Les activités PGP des 7 isolats de *Trichoderma* ont été mises en évidence par l'évaluation de leurs efficacités d'être des alternatives aux fertilisants chimiques et aux pesticides chimiques. Étant donné que la formulation des fertilisants utilise généralement le NPK comme engrais principale, nous avons ciblé certaines propriétés PGPF (solubilisation de phosphate, fixation d'azote sous forme de NH_3 et la production de la phytohormone AIA) qui permettent de jouer le même rôle que les engrais traditionnels.

La plupart des isolats que nous avons isolés présentaient au moins une caractéristique PGP positive durant les différents tests et tous les isolats possédaient des activités lytiques capables à dégrader les éléments de la paroi cellulaire des champignons. Nous avons donc pu démontrer la possibilité d'utiliser certaines d'entre eux comme un bio-pesticide et bio-fertilisant.

4.3.1. Solubilisation de phosphate

Le phosphore est un macronutriment très important pour la croissance des plantes. Malheureusement, environ 95 à 99% des phosphates présents dans les sols agricoles sont sous forme insoluble et donc non assimilable par les plantes. Les engrais phosphatés commerciaux contiennent des métaux cationiques (Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{++}) sous formes insolubles ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 et AlPO_4), qui peuvent se lessiver et contaminer les nappes phréatiques aussi bien que les cours d'eaux (Kalayu, 2019).

Dans ce contexte, plusieurs études ont été menées pour développer des alternatives à l'utilisation d'engrais chimiques et de s'orienter vers les microorganismes du sol ayant la capacité à solubiliser le phosphore indispensable à la plante et par conséquent à améliorer la croissance et le rendement des cultures (Tian *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus lors du test de solubilisation du phosphate montrent que tous les isolats de *Trichoderma* ont la capacité à solubiliser le phosphate tricalcique incorporé dans le milieu PVK solide. L'activité solubilisatrice s'est manifestée par l'apparition d'un halo jaune autour des colonies de *Trichoderma*. L'intensité de cette activité varie selon l'isolat testé. Plusieurs espèces de *Trichoderma* ont été isolées à partir de la rhizosphère de différentes plantes et se sont révélées capable à solubiliser le phosphore et à améliorer la croissance des plantes (Bononi *et al.*, 2020). D'autres champignons appartenant aux genres

Penicillium, Aspergillus et Talaromyces possèdent également cette activité (Doilom *et al.*, 2020).

Das *et al.* (2013) ont examiné l'activité solubilisatrice de plusieurs champignons du sol ; ils ont constaté que l'activité de la solubilisation chez les *Trichoderma asperellum*, *harzianum*, *viride* et *citrinoviride* était élevé par rapport aux espèces *Aspergillus niger* et *A. flavus*, tandis que la plus faible activité a été enregistré pour *Penicillium funiculosum*.

4.3.2. Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)

La synthèse des hormones de croissance des plantes par *Trichoderma*, dont l'AIA est le plus efficace, est une caractéristique intéressante étant donné que l'AIA est une phytohormone impliquée dans la croissance de la plante. Les résultats obtenus pour le test de la production de l'auxine ne sont pas surprenants étant donné qu'il a été démontré que la plupart des *Trichoderma* sont capables de produire de l'AIA (Illescas *et al.*, 2021). Les meilleurs producteurs d'AIA, parmi nos isolats, sont T10, T1 et T3. Il serait préférable de déterminer la quantité d'AIA produites par les différents isolats, car cette hormone peut s'avérer nocive pour la plante à des concentrations élevées (Patten et Glick, 1996). Le réactif de Salkowski utilisé dans ce test n'est pas spécifique seulement à l'AIA, mais il réagit également avec deux intermédiaires des voies de synthèse de l'AIA, l'acide indole pyruvique (IPyA) et l'indole-acétamide (IAM) (Glickmann et Dessaux, 1995). Dans ce cas, il serait recommandé de faire un test HPLC qui permet de déterminer si les isolats produisent de l'AIA ou bien on trouve des intermédiaires des voies de synthèses, voire un mélange. Cette méthode permet donc de séparer les composantes du mélange, de les identifier et de les quantifier.

4.3.3. La production d'ammoniac (NH₃)

La production d'ammoniac (NH₃) par *Trichoderma* joue un rôle clé dans la promotion de la croissance des plantes. Reghmit *et al.* (2022) ont rapporté que l'ammoniac est utile pour les plantes soit directement en favorisant la croissance, soit indirectement étant donné que l'ammoniac produit comme intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires qui sont assimilés par les microorganismes. Les résultats obtenus montrent que nos isolats peuvent produire de l'ammoniac, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par Mohiddin *et al.* (2017) qui ont rapporté que parmi 20 *Trichoderma spp.* isolés à partir la rhizosphère du piment, 13 isolats ont pu produire de l'ammoniac.

4.3.4. Production des enzymes

La paroi des champignons phytopathogènes contient un assemblage biologique complexe de polysaccharides et de protéines tel que la chitine. Les espèces de *Trichoderma* peut synthétiser des enzymes hydrolytiques tels que la chitinase capables à dégrader et détruire l'intégrité de la paroi cellulaire et par conséquent à inhiber la croissance des pathogènes (Bekkar *et al.*, 2016). La capacité de nos isolats à produire ces enzymes lytiques a été vérifiée.

Les essais *in vitro* concernant les activités enzymatiques ont révélé que les isolats de *Trichoderma* avaient un potentiel d'être des mycoparasites contre les phytopathogènes, où le mycoparasitisme implique également la synthèse d'un cortège des enzymes hydrolytiques y compris l'amylase, chitinases, pectinase, ligninase et cellulase.

L'amidon est un polysaccharide de stockage majeur qui peut être décomposé en monosaccharides par les champignons. Ces monosaccharides sont utilisés comme sources d'énergie ou comme précurseurs pour la biosynthèse de biomolécules par une série de réactions enzymatiques. L'amylase peut être importante pour la survie de *Trichoderma* sur le terrain, où elle intervient dans l'hydrolyse de l'amidon ou de tout autre glucane apparenté disponible (Wang *et al.*, 2020).

Aline *et al.* (2000) ont également rapporté dans une étude sur l'antagonisme de *T. harzianum* sur le champignon phytopathogène *Moniliophthora perniciosa*, que l'amylase a montré un effet sur la paroi cellulaire du phytopathogène *in vitro*. En effet, les espèces de *Trichoderma* sont déjà connus comme des producteurs d'amylase, (Calistru *et al.*, 1997), et c'est le même cas pour nos isolats qui ont également montré la capacité à hydrolyser l'amidon présent sur le milieu de culture.

Bien que d'autres enzymes puissent également être impliquées dans la dégradation complète des parois cellulaires des champignons phytopathogènes, la chitinase est généralement considérée parmi les enzymes les plus importantes puisque son substrat, la chitine, est le composant le plus abondant dans les parois cellulaires de nombreuses espèces de champignons (Baek *et al.*, 1999).

La chitine est considérée comme un matériau de construction qui renforce les exosquelettes des insectes, crustacées et la paroi cellulaire des champignons (Elieh-Ali-Komi et Hamblin, 2016). Actuellement, la dégradation de la chitine joue un rôle important dans divers processus biologiques et biotechnologiques, allant de l'exploitation et de la

dépollution environnementale des résidus chitineux aux systèmes de défense des plantes et à la lutte biologique.

Selon El-Katatny *et al.* (2000), la chitinase de *T. harzianum* a significativement inhibé la croissance de *S. rolfsii* (jusqu'à 61,8%). Kumar *et al.* (2012) ont également indiqué la présence de l'activité antagoniste de la chitinase de *Trichoderma* spp. sur la pourriture des racines et les pathogènes foliaires.

Une étude récente réalisée *in vitro* par Nguyen *et al.* (2020), a montré qu'un traitement de 60 U/mL de chitinase inhibait presque complètement la croissance de *Colletotrichum* sp. et *Sclerotium rolfsii*. Alors que les tests *in vivo* sur des plants d'arachides ont montré que la concentration de 20 U/ml de chitinase avait significativement réduit l'incidence d'infection par *S. rolfsii*. En outre, un traitement enzymatique préventif ou curatif de chitine à 40 U/mL peut également protéger les plantes de mangues et les piments contre les dégâts de l'antracnose causée par *Colletotrichum* sp. (Nguyen *et al.*, 2020).

La production de cellulase par *Trichoderma* spp. a été associée au biocontrôle des agents phytopathogènes. Il a été rapporté que la cellulase de *Trichoderma harzianum* Th22 interagissait avec les racines de maïs et induisait la résistance systémique (RSI) contre les maladies foliaires, et inhibait également le développement de *Fusarium graminearum* dans le maïs (Saravanakumar *et al.*, 2018).

De même, *Trichoderma* produit de la pectinase pour dégrader la lamelle moyenne des cellules afin qu'il puisse extraire les nutriments des tissus et insérer leurs hyphes fongiques. En 2017, Cherkupally et son équipe de recherche ont démontré que les espèces de *Trichoderma* étaient des agents de lutte biologique agressifs envers *Aspergillus* et *Fusarium moniliforme* expliqués par la libération d'enzymes telles que les pectinases, cellulases et amylases (Cherkupally *et al.*, 2017).

La ligninase peut jouer un rôle important dans les processus de dégradation des matières organiques, tels que la décomposition des débris de plantes et la production de compost (Bohacz et Kornilowicz-Kowalska, 2020). De plus, les ligninases libéré par *Trichoderma* peuvent également jouer un rôle dans l'activation des défenses des plantes (Daou *et al.*, 2021)

Durant le test de l'activité ligninolytique, le changement de couleur sur le milieu de culture à base de l'acide tannique est utilisé comme un indicateur de la synthèse d'enzyme polyphénol oxydase (PPO) nécessaire à la dépolymérisation de la lignine. Par conséquent,

l'acide tannique est utilisé comme un indicateur de synthèse de PPO et pour sélectionner les microorganismes ayant la capacité à dégrader la lignine. (Saud *et al.*, 2013). Les résultats obtenus dans ce test ont montré que tous les isolats de *Trichoderma* arrivent à dégrader la lignine.

4.4. Efficacité *in vivo* de *Trichoderma longibrachiatum* T10 sur M1 en pots

L'effet antagoniste de T10 à l'égard de M1 *in vivo* a été testé sur les plants de la lentille, et plus spécifiquement sur la variété Syrie 229. Cette variété est sensible à M1 qui déclenche rapidement les symptômes de jaunissement, flétrissements foliaires avec des pourritures racinaires sèches ainsi que la formation des microsclérotés sur le collet et les racines. En effet, les jeunes plants meurent après 35 à 40 jours d'infestation. L'efficacité protectrice de T10 sur l'incidence de la maladie a été évaluée durant les premiers 40 jours après inoculation. Le traitement des graines de la lentille avec T10 est très efficace, l'expression des symptômes de flétrissements aériens, la pourriture racinaire est quasiment stoppé. Ainsi, aucune présence des microsclérotés n'est signalée et d'ailleurs de nouvelles pousses foliaires apparaissent. En effet, aucun développement de symptômes de pourriture charbonneuse n'est alors diagnostiqué.

Les résultats obtenus ont clairement montré que le traitement des semences avec *T. longibrachiatum* T10 réduisait l'incidence de la pourriture charbonneuse et améliorait les paramètres de croissance des plantes de lentilles. De plus, les plantes traitées avec T10 avaient une longueur et un poids frais et sec plus élevés par rapport aux autres traitements. Ces résultats obtenus sont très importants, car elles confortent l'idée que T10 pourrait être un agent antagoniste potentiellement applicable dans un contexte préventif, à l'instar de quelques souches de *Trichoderma* déjà prouvé pour limiter la pathogénicité des phytopathogènes.

Plusieurs études ont constaté l'efficacité des espèces de *Trichoderma* à protéger efficacement les plantes de soja et du haricot mungo contre la pourriture charbonneuse causée par *M. phaseolina* (Khalili *et al.*, 2016 ; Iqbal., 2020). D'autres résultats obtenus par Khaledi et Taheri (2016) qui ont constaté que l'inoculation des graines de soja avec *T. harzianum* non seulement inhibait le développement de la pourriture charbonneuse, mais augmentait également l'activité de l'enzyme peroxydase et le contenu phénolique des racines de soja, entraînant l'activation de la défense et la promotion de la croissance des plantes.

CHAPITRE V

Essai de lutte biologique par l'utilisation des *Trichoderma* vis-à-vis *M. pseudophaseolina*

Comme exposé précédemment, plusieurs modes d'action ont été proposés pour expliquer le contrôle biologique exercé par T10 envers M1. Ils comprennent, notamment, une action directe par la compétition vis-à-vis l'espace et les nutriments et par le mycoparasitisme qui implique la sécrétion des métabolites secondaire possiblement secondée par une action indirecte en stimulant les réponses de l'immunité de la plante. La première action est difficile à démontrer in planta. Néanmoins, le comportement de T10 sur M1 quand ces deux souches sont cultivées ensemble sur le milieu PDA nous a permis de mettre en lumière quelques faisceaux d'indices très intéressants.

Les principaux résultats présentés dans ce chapitre ont donné lieu à un article soumis à la revue « Egyptian Journal of Biological Pest Control » annexe 11

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Pour cette étude, nous voulions recenser les principales maladies de la lentille dans la région du nord-ouest Algérien puis effectuer un isolement des champignons associés à cette culture. Dans ce contexte, la rouille causée par le champignon *Uromyces viciae fabae* s'est avérée être la maladie la plus signalée dans cette région. L'isolement des champignons associées à la lentille cultivée dans les régions prospectées a abouti à l'obtention de plusieurs isolats fongiques appartenant à 17 genres différents. Ainsi, l'isolement nous a permis à identifier deux nouveaux champignons jamais signalés sur la lentille en Algérie et dans le monde à savoir *Bipolaris sorokiniana* et *Macrophomina pseudophaseolina* responsables des maladies de la tache helminthosporienne et la pourriture charbonneuse, respectivement.

Le manque d'information sur ces nouvelles maladies sur la lentille nous a incité à réaliser des recherches approfondies sur les agents causals à travers une identification macro et microscopique, identification moléculaire, des tests de pathogénicité et des études du comportement des champignons vis-à-vis des facteurs abiotiques. Le champignons *Macrophomina pseudophaseolina* responsable de la pourriture charbonneuse qui a été identifier dans les trois régions prospectées avec des dégâts importants a été sélectionné pour les tests ultérieurs.

Dans le cadre d'élaboration d'une stratégie de lutte envers *M. pseudophaseolina*, nous avons réussi à isoler sept isolats de genre *Trichoderma*, évaluer leurs pouvoir antagoniste puis caractériser leurs potentiel PGPF par des tests qui révèlent la production des métabolites secondaire, enzymes et phytohormones qui possèdent des effets antifongique et/ou promotrice pour les plantes. Cela nous a permis à sélectionner l'isolat le plus performant T10 identifié comme *T. longibrachiatum* par approche moléculaire. Cet isolat a été testé in vivo sur pots pour évaluer leur effet protecteur à l'égard de *M. pseudophaseolina* M1 responsable de la pourriture charbonneuse. Le test in vivo a montré que T10 a protégé, de manière évidente la plante de lentille contre la pourriture charbonneuse en réduisant l'incidence de cette maladie à 91.7% en pots. Ainsi, l'effet répressif de *Trichoderma* a résulté également à une augmentation de la croissance végétative de la plante de lentille.

En conclusion, les résultats obtenus à travers ce modeste travail nous ont permis de détecter la présence de nouvelles maladies sur la plante de lentille et de préciser l'importance de *Trichoderma longibrachiatum* autant qu'agent de lutte biologique ainsi que l'obtention des

résultats très importantes lors du comportement variétal. Pour cela, nous pouvons affirmer avoir atteint nos objectifs d'études

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- Il faut s'intéresser à identifier les maladies émergentes sur les légumineuses et autres plantes cultivées en Algérie. Il est probable de trouver des résultats très importantes et non exploitées, et cela peut fournir des informations complémentaires sur la distribution des maladies et des champignons en Algérie.
- Il faut également rechercher à appliquer *Trichoderma longibrachiatum* T10 sur d'autres pathogènes de la lentille sur terrain, et même généraliser leur application sur d'autres cultures et pathogènes.
- Enfin, essayer de formuler les spores de T10 à l'échelle industrielle et l'utiliser comme un bio-fongicide local (Algérien).

Références Bibliographique

References

- Aada, A. (2013). Identification of pathogens and control of spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare*) by combining plant resistance and biological control (Doctoral dissertation, Newcastle University).
- Abbas, H. K., Bellaloui, N., Accinelli, C., Smith, J. R., & Shier, W. T. (2019). Toxin production in soybean (*Glycine max* L.) plants with charcoal rot disease and by *Macrophomina phaseolina*, the fungus that causes the disease. *Toxins*, 11(11), 645.
- Abbas, H. K., Bellaloui, N., Butler, A. M., Nelson, J. L., Abou-Karam, M., & Shier, W. T. (2020). Phytotoxic responses of soybean (*Glycine max* L.) to botryodiplodin, a toxin produced by the charcoal rot disease fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Toxins*, 12(1), 25.
- Abdullah, A. S., Moffat, C. S., Lopez-Ruiz, F. J., Gibberd, M. R., Hamblin, J., & Zerihun, A. (2017). Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1806.
- Abildgren, M. P., Lund, F., Thrane, U., & ELMHOLT, S. (1987). Czapek-Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 5(4), 83-86.
- Abo-Elyousr, K. A., Abdel-Rahim, I. R., Almasoudi, N. M., & Alghamdi, S. A. (2021). Native endophytic *Pseudomonas putida* as a biocontrol agent against common bean rust caused by *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Fungi*, 7(9), 745.
- Acharya, K., Dutta, A. K., & Pradhan, P. (2011). '*Bipolaris sorokiniana*'(Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9), 1064-1071.
- Adarsh, S., Jacob, J., & Giffy, T. (2019). Role of pulses in cropping systems: A review. *Agricultural reviews*, 40(3), 185-191.
- Adhikary, N. K., Chowdhury, M. R., Begum, T., and Mallick, R. (2019). Integrated management of stem and root rot of sesame (*Sesamum indicum* L.) caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8, 804–808. doi: 10.20546/ijcmas.2019.804.089
- Aggarwal, R., Tewari, A. K., Srivastava, K. D., & Singh, D. V. (2004). Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*, 157, 369-377.
- Agrawal, S.C., Prasad, K.V.V. (1997). *Diseases of Lentil*. Science Publishers, Inc., USA.
- Agrawal, S.C., Singh, K., Lal, S.S., (1993). Plant protection of lentil in India. In: Erskine, W., Saxena, M.C. (Eds.), *Lentil in South Asia, Proceedings of the Seminar on Lentils in South Asia*, 11e15 March 1991, New Delhi, India. ICARDA, Aleppo, Syria, pp. 147-156.
- Aidemark, M., Tjellström, H., Sandelius, A. S., Stålbrand, H., Andreasson, E., Rasmusson, A. G., & Widell, S. (2010). *Trichoderma viride* cellulase induces resistance to the antibiotic pore-forming peptide alamethicin associated with changes in the plasma membrane lipid composition of tobacco BY-2 cells. *BMC plant biology*, 10(1), 1-13.
- Alghuthaymi, M. A., Abd-Elsalam, K. A., AboDalem, H. M., Ahmed, F. K., Ravichandran, M., Kalia, A., & Rai, M. (2022). *Trichoderma*: An Eco-Friendly Source of Nanomaterials for Sustainable Agroecosystems. *Journal of Fungi*, 8(4), 367.

- Almi, H. (2016). Etude des myco-pathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de l'effet de deux souches de *Trichoderma harzianum*.
- Almi, H., Dehimat, L., & Chaouche, N. K. (2015). The pattern of pathogen diversity and abundance in Lentil (*Lens culinaris*) fields in Constantine region, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*, 10(13), 1536-1542.
- Al-Sadi, A. M. (2021). *Bipolaris sorokiniana*-Induced Black Point, Common Root Rot, and Spot Blotch Diseases of Wheat: A Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 118.
- Al-Sadi, A. M., Al-Oweisi, F. A., Edwards, S. G., Al-Nadabi, H., & Al-Fahdi, A. M. (2015). Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. *BMC microbiology*, 15(1), 1-11.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. H. O. M. A. S., & Harman, G. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 2926-2933.
- Andrabi, S. A., Kang, H. C., Haince, J. F., Lee, Y. I., Zhang, J., Chi, Z., ... & Dawson, V. L. (2011). Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly (ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nature medicine*, 17(6), 692-699.
- Andrews, M. and McKenzie, B.A. (2007). Adaptation and ecology. In: Yadav, S.S. et al. (eds.) *Lentil: An ancient crop for modern times*, pp. 23-32. Dordrecht, Springer Verlag.
- Ansari, M.M. (2010). Integrated management of charcoal rot of soybean caused by *M. phaseolina*. *Soybean Research*, 8, 39–47.
- Apoga, D., Åkesson, H., Jansson, H.-B., and Odham, G. (2002). Relationship between production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Eur. J. plant Pathol.* 108, 519–526.
- Ariyawansa, H. A., Thambugala, K. M., Manamgoda, D. S., Jayawardena, R., Camporesi, E., Boonmee, S., ... & Hyde, K. D. (2015). Towards a natural classification and backbone tree for Pleosporaceae. *Fungal Diversity*, 71(1), 85-139.
- Ashby, S. F. (1927). *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) comb. nov. the pycnidial stage of *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. *Transactions of the British Mycological Society*, 12(2-3), 141-147.
- Athira, K. (2017). Efficacy of fungicide and bio-control agent against root rot of black gram (*Vigna mungo* L.) caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 2601–2607.
- Ayana, G. T., Ali, S., Sidhu, J. S., Gonzalez Hernandez, J. L., Turnipseed, B., Sehgal, S. K. (2018). Genome-wide association study for spot blotch resistance in hard winter wheat. *Front. Plant Sci.* 9, 926. doi: 10.3389/fpls.2018.00926
- Babu, B. K., Saikia, R., & Arora, D. K. (2010). Molecular characterization and diagnosis of *Macrophomina phaseolina*: A charcoal rot fungus. *Molecular identification of fungi*, 179-193.

- Babu, B. K., Saxena, A. K., Srivastava, A. K., and Arora, D. K. (2007). Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia* 99, 797–803. doi: 10.3852/mycologia.99.6.797
- Baccelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., & Pazzagli, L. (2014). Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 175-184.
- Baek, J. M., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (1999). The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current genetics*, 35(1), 41-50.
- Bahl, P. N. (1993). An overview of the production and problems in southeast Asia. In *Lentil in South Asia. Proceedings of the seminar on lentils in South Asia, 1993* (pp. 1-10). ICARDA.
- Baker, C. J., Stavely, J. R., & Mock, N. (1985). Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant disease* (USA).
- Bakr, M.A. (1993). Plant Protection of Lentil in Bangladesh. In: *Lentil in South Asia* (pp 177– 186). Erskine W and Saxena MC (eds), International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Bandara, Y. M. A. Y., Weerasooriya, D. K., Liu, S., and Little, C. R. (2018). The necrotrophic fungus *macrophomina phaseolina* promotes charcoal rot susceptibility in grain sorghum through induced host cell-wall-degrading enzymes. *Phytopathology* 108, 948–956. Doi : 10.1094/PHYTO-12-17-0404-R
- Basandrai, A. K., Pandey, A. K., Somta, P., & Basandrai, D. (2021). *Macrophomina phaseolina*–host interface: Insights into an emerging dry root rot pathogen of mungbean and urdbean, and its mitigation strategies. *Plant Pathology*.
- Bastakoti, S., Belbase, S., Manandhar, S., and Arjyal, C. (2017). *Trichoderma* species as Biocontrol agent against soil borne fungal pathogens. *Nepal J. Biotechnol.* 5, 39–45. doi: 10.3126/njb.v5i1.18492
- Bayaa, B., Erskine, W. (1998). Diseases of lentil. In: Allen, D.J., Lenne, J.M. (Eds.), *The Pathology of Food and Pasture Legumes*. CABI, Oxford, pp. 423-471.
- Beckett, A., Porter, R.A. (1988). The use of complementary fractures and low temperatures scanning electron microscopy to study hyphal-host cell surface adhesion between *Uromyces viciae-fabae* and *Vicia faba*. *Can. J. Bot.* 66, 645-652.
- Beckett, A., Tatnell, J.A., Tylor, N. (1990). Adhesion and pre-invasion behavior of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* during germination on host and synthetic surfaces. *Mycol. Res.* 94, 865-875.
- Bejiga, G., Million, E., Yadeta, A. (1996). Improved cultivars and production technology of lentil in Ethiopia. Debre Zeit Agricultural Research Center, Alemaya University of Agriculture, Debre Zeit, Ethiopia. *Res. Bull.* 3.

- Bejiga, G., Negussie, T., Erskine, W. (1998). We fixed rust! Next, wilt and root rots. ICARDA Caravan 9, 12-14.
- Bejiga, G., Yohannes, D., Knight, R. (2000). Region 4: Sub-Sahara Africa. In: Knight, R. (Ed.), Linking Research and Marketing Opportunities for Pulse in the 21st Century, Proceedings of the Third International Food Legumes Research Conference, Adelaide, Australia, 22-26 September 1997. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 199-220.
- Bekkar, A. A. (2015). Pouvoir antagoniste et mode d'action du *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes (Doctoral dissertation, Université Mustapha Stambouli de Mascara, Département de Biologie).
- Beniwal, S.P.S., Bayaa, B., Weigand, S., Makkouk, K., Saxena, M.C. (1993). Field Guide to Lentil Diseases and Insect Pests. ICARDA, Aleppo, Syria, p. 106.
- Bessadat, N. (2014). Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat LMD).
- Bhandari, P. (2017). Developing QPCR assay to quantify disease severity in *Medicago truncatula* due to *Macrophomina phaseolina* infection (Doctoral dissertation, Wichita State University).
- Bhatty, R.S. (1988). Composition and quality of lentil (*Lens culinaris* Medik.): a review. Canadian Institute of Food Science and Technology 21:144-160.
- Bilgarmi, K. and Jamaluddin, S. and Rizvi, M. A. (1979). List of Fungi Part- I. List of References. Today and Tomorrow's Printers and Publishers New Delhi 110005 264 pp.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian journal of botany, 69(11), 2357-2372.
- Biswas, S. K., Srivastava, K. D., Aggarwal, R., Prem, D., & Singh, D. V. (2000). Antagonism of *Chaetomium globosum* to *Drechslera sorokiniana*, the spot blotch pathogen of wheat. Indian Phytopathology, 53(4), 436-440.
- Bohacz, J., & Kornilowicz-Kowalska, T. (2020). Modification of post-industrial lignin by fungal strains of the genus *Trichoderma* isolated from different composting stages. Journal of Environmental management, 266, 110573.
- Bononi, L., Chiamonte, J. B., Pansa, C. C., Moitinho, M. A., & Melo, I. S. (2020). Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. Scientific Reports, 10(1), 1-13.
- Boyd, L. A., Ridout, C., O'Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Trends in genetics, 29(4), 233-240.
- Brundrett, M. C., and Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytol. 220, 1108–1115. doi: 10.1111/nph.14976
- Buchwaldt, L., Džananović, E., & Durkin, J. (2018). Lentil anthracnose: epidemiology, fungicide decision support system, resistance and pathogen races. Canadian Journal of Plant Pathology, 40(2), 189-198.
- Burmeister, L., Hau, B. (2009). Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. BioControl 54, 575–585.

- Butler, E.J.(1918). Fungi and diseases in plants. Thatcher, Spink Co. Calcutta. 547 pp.
- Calistru, C., McLean, M., & Berjak, P. (1997). In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137(2), 115-124.
- Campanella, V., Mandalà, C., Angileri, V., Miceli, C. (2020). Management of common root rot and *Fusarium* foot rot of wheat using *Brassica carinata* break crop green manure. *Crop Prot.* 130, 105073. doi: 10.1016/j.cropro.2019.105073
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., & Warnock, D. W. (2013). Identification of Pathogenic Fungi. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118520055>
- Carlson, H., Nilsson, P., Jansson, H. B., & Odham, G. (1991). Characterization and determination of prehelminthosporol, a toxin from the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*, using liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 259-269.
- Carlson, H., Stenram, U., Gustafsson, M., and Jansson, H.-B. (1991). Electron microscopy of barley root infection by the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Can. J. Bot.* 69, 2724–2731
- Carr, P. M., Gardner, J. J., Schatz, B. G., Zwinger, S. W., & Guldan, S. J. (1995). Grain yield and weed biomass of a wheat–lentil intercrop. *Agronomy Journal*, 87(3), 574-579.
- Carrión, G., A. Romero y V. Rico-Gray, (1999). Use of *Verticillium lecanii* as a biocontrol agent against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Fitopatología* 34 (4): 214-219.
- Castro, A. C., Fleitas, M. C., Schierenbeck, M., Gerard, G. S., Simón, M. R. (2018). Evaluation of different fungicides and nitrogen rates on grain yield and bread-making quality in wheat affected by *Septoria tritici* blotch and yellow spot. *J. Cereal Sci.* 83, 49–57. doi: 10.1016/j.jcs.2018.07.014
- Chamorro, M., Domínguez, P., Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Romero, F. et al. (2015a). Assessment of chemical and biosolarization treatments for the control of *Macrophomina phaseolina* in strawberries. *Scientia Horticulturae*, 192, 361–368.
- Chamorro, M., Miranda, L., Domínguez, P., Medina, J.J., Soria, C., Romero, F. et al. (2015b). Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Protection*, 67, 279–286.
- Champion, R. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. Identifier les champignons transmis par les semences, 1-400.
- Chanclud, E., & Morel, J. B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1289-1297.
- Chand, R., Kumar, M., Kushwaha, C., Shah, K., & Joshi, A. K. (2014). Role of melanin in release of extracellular enzymes and selection of aggressive isolates of *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Current microbiology*, 69, 202-211.
- Chand, R., Pandey, S. P., Singh, H. V., Kumar, S., & Joshi, A. K. (2003). Variability and its probable cause in natural populations of spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana* of wheat (*T. aestivum* L.) in India. *Journal of Plant Disease and Protection* 110, 27–35.
- Chandini, R. K., Kumar, R., & Om, P. (2019). The impact of chemical fertilizers on our environment and ecosystem. *Research trends in environmental sciences*.
- Chang, N. and Wu, Y. (1997). Incidence and current management of spot blotch of wheat in China. *Helminthosporium blight of wheat: Spot blotch and tan spot*, 119-125

- Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., and Guha, A. K. (2014). International journal of biological macromolecules a study on antifungal activity of water-soluble chitosan against *Macrophomina phaseolina*. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 452–457. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.008
- Chaudhary, S. U., Iqbal, J., Hussain, M., & Wajid, A. (2011). Economical weed control in lentils crop. *J Anim Plant Sci*, 21, 734-737.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.
- Chen, W., Basandrai, A.K., Basandrai, D., Sabine, B., Bayaa, Buchwaldt, L., Davidson, J., Larsen, R., Rubiales, D., Taylor, P.W.J. (2009). Diseases and their Management. In: Erskine, W., Muehlbauer, F.J., Sarker, A., Sharma, B. (Eds.), *The Lentil: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 262-281.
- Chen, W., Sharma, H.C., Muehlbauer, F.J. (2011). *Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Cherkupally, R., Amballa, H., & Reddy, B. N. (2017). In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. *Ann. Plant Sci*, 6, 1784-1789.
- Chowdhury, A. K., Singh, G., Tyagi, B. S., Ojha, A., Dhar, T., and Bhattacharya, P. M. (2013). Spot blotch disease of wheat – a new thrust area for sustaining productivity. *J. Wheat Res.* 5, 1–11.
- Chowdhury, S., Basu, A., Ray Chaudhuri, T., and Kundu, S. (2014). In-vitro characterization of the behaviour of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid at the rhizosphere and during early infection of roots of resistant and susceptible varieties of sesame. *Eur. J. Plant Pathol.* 138, 361–375. doi: 10.1007/s10658-013-0335-z
- Clement, J.A., Porter, R., Butt, T.M., Beckett, A. (1997). Characteristics of adhesion pads during imbibition and germination of urediniospores of *U. viciae-fabae* on host and synthetic surfaces. *Mycol. Res.* 101, 1445-1458.
- Cohen, R., Omari, N., Porat, A. & Edelstein, M. (2012) Management of *Macrophomina* wilt in melons using grafting or fungicide soil application: Pathological, horticultural and economical aspects. *Crop Protection*, 35, 58–63.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., & López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1554-1563.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036.

Crook, D.G., Summerfield, R.J., Ellis, R.H. and Smith, N.O. (1998). Plant population density in autumn affects winter survival in lentil. In: Proceedings of the 3rd European Conference on Grain Legumes, pp. 154-155. Paris, France.

Crutcher, F. K., Moran-Diez, M. E., Ding, S., Liu, J., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., & Kenerley, C. M. (2015). A paralog of the proteinaceous elicitor SM1 is involved in colonization of maize roots by *Trichoderma virens*. *Fungal biology*, 119(6), 476-486.

Csondes, I., Baliko, K. & Degenhardt, A. (2008). Effect of different nutrient levels on the resistance of soybean to *Macrophomina phaseolina* infection in the field experiments. *Acta Agronomica Hungarica*, 56, 357–362.

Csöndes, I., Cseh, A., Taller, J., & Poczai, P. (2012). Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Molecular biology reports*, 39(3), 3259-3269.

Cubero, J. I. (1981). Origin, taxonomy and domestication. p. 15–38, Lentils. In: C. Webb and G. Hawtin (eds), CAB, London, UK.

Cummins, G.B., Hiratsuka, Y. (1983). *Illustrated Genera of Rust Fungi*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota

Da Luz, W. C., & Bergstrom, G. C. (1986). Temperature-sensitive development of spot blotch in spring wheat cultivars differing in resistance. *Fitopatologia Brasileira*.

da Silva, M. P., Klepadlo, M., Gbur, E. E., Pereira, A., Mason, R. E., Rupe, J. C., et al. (2019). QTL mapping of charcoal rot resistance in PI 567562A soybean accession. *Crop Sci.* 59, 474–479. doi: 10.2135/cropsci2018.02.0145

Dambal, G., Rashmi, D., Revanappa, S.B., Suma, M. & Saabale, P.R. (2019) Identification for resistant sources against dry root rot in black gram germplasm (*Vigna mungo* L.). *International Journal of Chemical Studies*, 7, 990–992.

Daou, M., Bisotto, A., Haon, M., Oliveira Correia, L., Cottyn, B., Drula, E., ... & Faulds, C. B. (2021). A putative lignin copper oxidase from *Trichoderma reesei*. *Journal of Fungi*, 7(8), 643.

Das A., Dutta B.K. et Barooah A. K. (2013). In vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Fungi Isolated from Tea Agroecosystem Soil of Barak Valley, Southern Assam. *International Journal of Microbiological Research*, 4 (3): 336-341.

Das, I. K., Kishore, B. B., Srivastava, A. K., Kumar, S., & Arora, D. K. (2015). Ecology, biology and management of *Macrophomina phaseolina*: An overview. *Agriculturally Important Microorganisms*, 1, 193-206.

Davidse, L. C., and Flach, W. (1978). Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochim. Biophys. Acta* 543, 82–90.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., & Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(3), 279-286.

Deising, H., Mendgen, K. (1992). Developmental control of enzyme production and cell wall modification in rust fungi, and defense reactions of the host plant. In: Stahl, U., Tudzynski, P. (Eds.), *Molecular Biology of Filamentous Fungi*. HC Verlag, Weinheim, pp. 27-44.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3), 363-IN2.

- Devi, H. M., Mahapatra, S., Das, S. (2018). Assessment of yield loss of wheat caused by spot blotch using regression model. *Indian Phytopathol.* 71, 291–294.
- Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. (1978). *Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina*. Viçosa/MG, Brasil: UFV, Imprensa Universitária.
- Di Pietro, A. (1990). *Studies on the biology of Chaetomium globosum Kunze and its mode of action as an antagonist of Pythium ultimum Trow* (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar).
- Diehl, J. A., Tinline, R. D., Kochhann, R. A., Shipton, P. J., & Rovira, A. D. (1982). The effect of fallow periods on common root rot of wheat in Rio Grande do Sul, Brazil [Cochliobolus sativus and other fungal pathogens, Triticum aestivum, effect of winter fallow on disease]. *Phytopathology*.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 838-853.
- Djonovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant physiology*, 145(3), 875-889.
- Djurle, A., Twengström, E., Andersson, B. (2018). Fungicide treatments in winter wheat: The probability of profitability. *Crop Prot.* 106, 182–189.
- Doilom, M., Guo, J. W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., ... & Xu, J. C. (2020). Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in microbiology*, 2443.
- Domiciano, G. P., Rodrigues, F. A., Moreira, W. R., de Oliveira, H. V., do Vale, F. X. R., Filha, M. S. X. (2010). Silicon on the progress of spot blotch on wheat leaf fag. *Trop. Plant Pathol.* 35, 186–189.
- Dongyou, L. (2010). *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. CRC Press Taylor and Francis group. USA. 524- 905.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., & Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, 9(10), 749-759.
- Duarte, V., Salcedo, S. S., & Barreto, R. W. (2018). *Rhizoctonia solani* AG4 causes lentil damping-off in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1), 1-2.
- Dubin, H. J., & Duveiller, E. (2000). Helminthosporium leaf blights of wheat: integrated control and prospects for the future. In *Proceedings of the International Conference on Integrated Plant Disease Management for Sustainable Agriculture* (pp. 575-579). New Delhi, India: Indian Phytopathological Society.
- Duke J A (1981) *Handbook of legumes of world economic importance*. Plenum Press, NewYork. P. 52–57.

- Dutbayev, Y., Kuldybayev, N., Daugaliyeva, S., Ismailova, E., Sultanova, N., Özer, G., ... & Yessimbekova, M. (2022). Occurrence of spot blotch in spring barley caused by *bipolaris sorokiniana* shoem. in South-Eastern Kazakhstan. *The Scientific World Journal*, 2022.
- Dutton, S., & Penn, C. W. (1989). Biological attributes of colony-type variants of *Candida albicans*. *Microbiology*, 135(12), 3363-3372.
- Duveiller, E. (2004). Controlling foliar blights of wheat in the rice-wheat systems of Asia. *Plant Dis* 88:552-556
- Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma, R. C., & Shrestha, S. M. (2005). Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology*, 95(3), 248-256.
- Duveiller, E. M., and Sharma, R. C. (2009). Genetic improvement and crop management strategies to minimize yield losses in warm non-traditional wheat growing areas due to spot blotch pathogen *cochliobolus sativus*. *J. Phytopathol.* 157, 521–534.
- Duveiller, E., & Gilchrist, L. (1994). Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. In *Wheat in Warm Area, Rice-Wheat Farming Systems*. Dinajpur (Bangladesh). 13-15 Feb 1993.
- DZARC (Debre Zeit Agricultural Research Center), (1993). Annual Research Report 1991/92. Debre Zeit, Ethiopia.
- Edwards, M.C., Bowling, D.J.F. (1986). The growth of rust germ tubes towards stomata in relation to pH gradients. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29, 185-196.
- Elad, Y., Chet, I., & Katan, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(2), 119-121.
- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3), 411.
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K. H., El-Katatny, M. S., & Gübitz, G. (2000). Production of chitinase and b-1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3), 173-180.
- Erskine, W. (1985). Perspectives in lentil breeding. In: M.C. Saxena and S. Varma (eds.) *Faba Beans, Kabuli Chickpeas and Lentils in the 1980's*. pp. 91-100. Aleppo, Syria: ICARDA
- Erskine, W. and EI Ashkar, F. 1993. Rainfall and temperature effects on lentil (*Lens culinaris*) seed yield in the Mediterranean environment. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 121:347-354.
- Erskine, W., Tufail, M., Russell, A., Tyagi, M. C., Rahman, M. M., & Saxena, M. C. (1993). Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73, 127-135.

- Erskine, W., Tufail, M., Russell, A., Tyagi, M.C., Rahman, M.M., Saxena, M.C. (1994b). Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73, 127-135.
- Eversmeyer, M.G., Kramer, C.L. (2000). Epidemiology of wheat leaf and stem rust in the central great plains of the USA. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 491-513.
- Farr, D.F. et Rossman, A.Y. (2020). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Consulté le 4 décembre 2020 sur <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Ferguson, M.E., Maxted, N., van Slageren, M. and Robertson, L. D. (2000). A re-assessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (Leguminosae, Papilionoideae, Viciae). *Bot J Linnean Soc* 133: 41– 59.
- Ferguson, M. (1998). PhD Thesis: Studies of genetic variation within the genus *lens*. School of Biological Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK.
- Fikre, A., Sarker, A., Ahmed, S., Ali, K., Erskine, W. (2007). Registration of “Teshale: lentil. *J. Plant Regist.* 1, 45.
- Fisher, M., Henk, D., Briggs, C. et al., (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186–194.
- Fones, H. N., Bebbler, D. P., Chaloner, T. M., Kay, W. T., Steinberg, G., & Gurr, S. J. (2020). Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food*, 1(6), 332-342.
- Francl, L. J., Wyllie, T. D., and Rosenbrock, S. M. (1988). Influence of crop rotation on population density of *Macrophomina phaseolina* in soil infested with *Heterodera glycines*. *Plant Dis* 72, 760–764.
- Frittrang, A.K., Deising, H., Mendgen, K. (1992). Characterization and partial purification of pectinesterase, a differentiation-specific enzyme of *Uromyces viciae-fabae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2213-2218.
- Gahlot, N. (2018). Physiological and management studies of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing root rot of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Nitisha Gahlot, MSc. Thesis, Sri Karan Narendra Agriculture University. Jobner.
- Gajera, H., Bambharolia, R., Patel, S., Khatrani, T., and Goalkiya, B. (2012). Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 3:149. doi: 10.4172/2157-7471.1000149
- Gams, W., Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd. pp. 3–34.
- Garkoti, A., Kumar, S., Lal, M., & Singh, V. (2013). Major diseases of lentil: Epidemiology and disease management-A review. *Agriways*, 1, 62-64.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209(4), 1496-1512.

- Gautam, R., Singh, S.K. & Sharma, V. (2014). RAPD and Nuclear rDNA ITS polymorphism within *Macrophomina phaseolina* isolated from arid legumes of western Rajasthan. *Proceedings of the National Academy of Science Sec B Biological Science*, 84, 171–181.
- Gerlach, W., Nirenberg, H., Eckart, I., Rummland, I., & Schwarz, R. (1982). The genus *Fusarium*: a pictorial atlas (Vol. 209, pp. 1-406). Berlin: Kommissionsverlag P. Parey.
- Ghosh, R., Tarafdar, A. & Sharma, M. (2017). Rapid and sensitive diagnoses of dry root rot pathogen of chickpea (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler) using loop-mediated isothermal amplification assay. *Scientific Reports*, 7, 42737.
- Ghosh, T., Biswas, M. K., Guin, C., and Roy, P. (2018). A review on characterization, therapeutic approaches and pathogenesis of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 19, 72–84.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 793-796.
- Gomez, A.O., De Faveri, J., Neal, J.M., Aitken, E.A.B. & Herrington, M.E. (2020). Response of strawberry cultivars inoculated with *Macrophomina phaseolina* in Australia. *International Journal of Fruit Science*, 20, 164–177.
- Gossen, B. D., & Morrall, R. A. A. (1983). Effect of ascochyta blight on seed yield and quality of lentils. *Canadian journal of plant pathology*, 5(3), 168-173.
- Gupta, A. K., Raj, R., Choudhary, R., Singh, S. P., Solanki, I. S. (2017). Effect of mineral nutrients, seed treatment and foliar fungicides on spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) severity and agronomic performance of wheat (*Triticum aestivum*) in hot-humid environment of eastern Gangetic plain in India. *Indian J. Agric. Sci.* 87, 505–511.
- Gupta, G.K., Sharma, S.K. & Ramteke, R. (2012a) Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of Phytopathology*, 160, 167–180.
- Gupta, P. K., Chand, R., Vasistha, N. K., Pandey, S. P., Kumar, U., Mishra, V. K., & Joshi, A. K. (2018). Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. *Plant pathology*, 67(3), 508-531.
- Gupta, P. K., Chand, R., Vasistha, N. K., Pandey, S. P., Kumar, U., Mishra, V. K., et al. (2018a). Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. *Plant Pathol.* 67, 508–531. doi: 10.1111/ppa.12781
- Hadar, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1979). Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum* [Soilborne pathogens, kidney beans, tomatoes, eggplants] (No. RESEARCH).
- Halila, M.H. (1995). Status and potential of winter-sowing of lentil in Tunisia. In: Keatinge, J.D.H. and Kusmenoglu, I. (eds.) *Towards improved winter-sown lentil production for the West Asian and North African highlands*. Proceedings of the workshop, pp. 172-183, Antalya, Turkey.

- Han, Q. M., Huang, L. L., Buchenauer, H., Wang, C. M., and Kang, Z. S. (2010). Cytological Study of Wheat Spike Infection by *Bipolaris sorokiniana*. *J. Phytopathol.* 158, 22–29. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01570. x.
- Hansen, J., & Renfrew, J. M. (1978). Palaeolithic–neolithic seed remains at Franchthi Cave, Greece. *Nature*, 271(5643), 349-352.
- Harman, G. E. (2011). *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39(2), 103-108.
- Harman, G. E., Taylor, A. G., & Stasz, T. E. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Disease*, 73(8), 631-637.
- Heiler, S., Mendgen, K., Deising, H. (1993). Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiation-specifically. *Mycol. Res.* 97, 77-85.
- Helbeck, H. (1959). Domestication of food plants in old World. *Science* 130: 365–372.
- Helbeck, H. (1963). Late Cypriote vegetable diet in Apliki. *Act. nstit. Athen. Reg. Sueciae.* Ser. 4: VIII:171–186.
- Helbeck, H. (1970). The plant industry in Hacilar. In: Mellart, J. Excavations at Hacilar Vol. I. Occasional Publications No.9 of the British Institute of Archaeology, Ankara. Edinburgh Univ.Press, pp. 189–244.
- Hemmati, P., Zafari, D., Mahmoodi, S. B., Hashemi, M., Gholamhoseini, M., Dolatabadian, A., & Ataei, R. (2018). Histopathology of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in resistant and susceptible cultivars of soybean. *Rhizosphere*, 7, 27-34.
- Holliday P, Punithalingam E. (1970). CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 275. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Hopf, M. (1962). Bericht Über die Untersuchung von Samen und Holzkohlenresten von der Argissa- Magula aus den prakermischen bis mittelbronzezeitlichen Schichten. In: V. Milojcic, J Boessneck und M Hopf: Die Deutschen Ausgrabungen auf der Argissa-Magula in Thessalien.I. Rudolf Habelt Verlag Bonn. PP. 101–119.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol* 6: 19–26.
- Hussain, M. A., Mukhtar, T., Irfan ul-Haque, M., & Kayani, M. Z. (2007). Mycoflora associated with lentil (*Lens esculenta* Moench) seeds from five localities of Punjab, Pakistan. *Pak. J. Bot.* 39(3), 903-906.

- Hussain, T., and Khan, A. A. (2020). Determining the antifungal activity and characterization of *Bacillus siamensis* AMU03 against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Indian Phytopathol.* 73, 507–516. doi: 10.1007/s42360-020-00239-6
- ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas), (2010). Morocco releases lentil variety. *Seed Info.* 39, 14-15.
- Illescas, M., Pedrero-Méndez, A., Pitorini-Bovolini, M., Hermosa, R., & Monte, E. (2021). Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens*, 10(8), 991.
- Indira, N. & Gayatri, S. (2003.) Management of blackgram root rot caused by *Macrophomina phaseolina* by antagonistic microorganisms. *Madras Agriculture Journal*, 90, 490–494.
- Iqbal, U., & Mukhtar, T. (2014). Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. *The Scientific World Journal Article ID*, 950175.
- Iqbal, U., & Mukhtar, T. (2020). Evaluation of biocontrol potential of seven indigenous *Trichoderma* species against charcoal rot causing fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, 72(2), 195-202.
- Ishikawa, M. S., de Batista Fonseca, I. C., Igarashi, S. (2012). Chemical treatment in seeds on the development of the spot blotch in wheat plants. *Cienc. Rural* 42, 1341–1346. doi: 10.1590/S0103-84782012000800002
- Islam, M., Haque, M., Islam, M., Emdad, E., Halim, A., Hossen, Q. M., et al. (2012). Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13:493. doi: 10.1186/1471-2164-13-493
- Jahani, M., Aggarwal, R., Dureja, P., Srivastava, K.D. (2006). Toxin production by *Bipolaris sorokiniana* and its role in determining resistance in wheat genotypes. *Indian Phytopathology* 59, 340–4.
- Jahani, M., Aggarwal, R., Gupta, S., Sharma, S., & Dureja, P. (2014). Purification and characterization of a novel toxin from *Bipolaris sorokiniana*, causing spot blotch of wheat and analysis of variability in the pathogen. *Cereal research communications*, 42(2), 252-261.
- Jain, P., and Pundir, R. K. (2019). “Biocontrol of soil phytopathogens by arbuscular mycorrhiza – a review,” in *Mycorrhizosphere and Pedogenesis*, eds A. Varma and D. Choudhary (Singapore: Springer).
- Jarvis, B. (1973). Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(4), 723-727.
- Jayasankar, N. P., & Graham, P. H. (1970). An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganisms. *Canadian journal of Microbiology*, 16(10), 1023-1023.
- Jiang, Y., Wang, J. L., Chen, J., Mao, L. J., Feng, X. X., Zhang, C. L., & Lin, F. C. (2016). *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. *PLoS One*, 11(8), e0160613.

- Johansen, C., Baldev, B., Brouwer, J. B., Erskine, W., Jermyn, W. A., Li-Juan, L., ... & Silim, S. N. (1994). Biotic and abiotic stresses constraining productivity of cool season food legumes in Asia, Africa and Oceania. In: Muehlbauer, F.J., Kaiser, W.J. (eds) *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 19. Springer, Dordrecht.
- Jones, D.G., Clifford, B.C. (1983). *Cereal diseases, their pathology and control*. John Wiley and Sons Limited.
- Jongman, R.H.G., Ter Braak, C.J.F. and Van Tongeren, O.F.R. (1995). *Data analysis in community and land- scape ecology*. Cambridge University Press. United King- dom.
- Jordaan, E., van der Waals, J. E., and McLaren, N. W. (2019). Effect of irrigation on charcoal rot severity, yield loss and colonization of soybean and sunflower. *Crop Prot.* 122, 63–69.
- Joseph, M.E., Hering, T.F. (1997). Effects of environment on spore germination and infec- tion by broad bean rust (*Uromyces viciae-fabae*). *J. Agric. Sci.* 128, 73-78.
- Joshi, A. K., Mishra, B., Chatrath, R., Ferrara, G. O., Singh, R. P. (2007). Wheat improvment in India: present status, emerging challenges and future prospects. *Euphytica* 157, 431–446. doi: 10.1007/s10681-007-9385-7
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertiliz- ers. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-7.
- Karunarathna S.C., Maharachchikumbura S.S., Ariyawansa H.A., Shenoy B.D., Jeewon R. (2021). Emerging Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
- Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Vallad, G. E., Chand, R., & Chauhan, V. B. (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2), 136-151.
- Kelly, J. P., & Funigiello, F. (1959). *Candida albicans*: A study of media designed to promote chlamydospore production. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 53(5), 807-809.
- Kendig, S. R., Rupe, J. C., and Scott, H. D. (2000). Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Dis.* 84, 895–900. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.8.895
- Khaled, A.A., El-Moity, S.M.H.A., Omar, S.A.M. (1995). Chemical control of some faba bean diseases with fungicides. *Egypt. J. Agr. Res.* 73, 45 (Abstract).
- Khaledi, N., & Taheri, P. (2016). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of plant protection research*, 56(1).
- Khalili, E., Javed, M. A., Huyop, F., Rayatpanah, S., Jamshidi, S., & Wahab, R. A. (2016). Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(3), 479-488.
- Khamari, B., Satapathy, S. N., & Patra, C. (2019). Effect of inoculum load and duration of exposure to *Macrophomina phaseolina* on disease incidence of sesame. *Int J Chem Stud*, 7(1), 1728-1730.

- Khamari, Bhagyashree & Hasmi, Safdar. (2019). Bio Intensive management of *Macrophomina phaseolina*, inciting stem and root rot of sesame. In: Current Research and Innovations in Plant Pathology (Volume - 7) pp 1-130
- Khambhati, V.H., Abbas, H.K., Sulyok, M., Tomaso-Peterson, M. & Shier, W.T. (2020). First report of the production of mycotoxins and other secondary metabolites by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Isolates from soybeans (*Glycine max* L.) symptomatic with charcoal rot disease. *Journal of Fungi*, 6, 332.
- Khan, K.A., Shoaib, A. & Akhtar, S. (2016). Response of *Vigna radiata* (L.) Wilczek genotypes to charcoal rot disease. *Mycopathology*, 14, 1–7.
- Khan, S. N. (2012). *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopath*, 5(2).
- Khare, M.N. (1981). Diseases of lentil. In: Webb, C., Hawtin, G. (Eds.), *Lentils*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK, pp. 163-172.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). *Diagnostic microbiology. The nonfermentative gram-negative bacilli*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 253-320.
- Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D. K., & Piechulla, B. (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in microbiology*, 6, 995.
- Kramm, M.V., Tay, J.U. (1984). A method to artificially inoculate lentil rust. *LENS Newslett.* 11, 24.
- Krupinsky, J. M., & Tanaka, D. (2000). Leaf spot diseases on spring wheat cultivars influenced by the application of potassium chloride. In *Proc. Great Plains Soil Fertility Conference* (Vol. 8, pp. 171-176).
- Kubheka, B. P., & Ziena, L. W. (2022). *Trichoderma*: A Biofertilizer and a Bio-Fungicide for Sustainable Crop Production. IntechOpen.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... & Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome biology*, 12(4), 1-15.
- Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowska, M., Sándor, E., & Druzhinina, I. S. (2007). Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *Chemistry & biodiversity*, 4(6), 1068-1082.
- Kulkarni, N. B., & Patil, B. C. (1966). Taxonomy and discussion on the nomenclature of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, and its isolates from India. *Mycopathologia*, 28, 257-264.
- Kulkarni, S., Shobharani, M. & Raja. (2019). Integrated management of dry root rot of blackgram caused by *Rhizoctonia bataticola*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 8, 853–858.
- Kumar J, Schafer P, Huckelhoven R et al. (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3, 185–95.

- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R. C. (2012). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian journal of microbiology*, 52(2), 137-144.
- Kumar, M., & Ashraf, S. (2017). Role of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent of fungal plant pathogens. In *Probiotics and plant health* (pp. 497-506). Springer, Singapore.
- Kumar, V., Kumar, A., and Kharwar, R. N. (2007). Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of charcoal rot of chickpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *J. Environ. Biol.* 28, 15–20.
- Kumar, V., Singh, B.M., Singh, S. (1997). Genetics of lentil resistance to rust. *LENS Newslett.* 24, 23-25.
- Kunwar, I. K., Singh, T., Machado, C. C., & Sinclair, J. B. (1986). Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 76(5), 532-535.
- Kusmenoglu, I., & Aydin, N. (1995). The current status of lentil germplasm exploitation for adaptation to winter sowing in the Anatolian highlands. Autumn-sowing of lentil in the Highlands of West Asia and North Africa, 63-71.
- Ladizinsky, G. (1979a). The Origin of lentil and its wild genepool. *Euphytica*. 28: 179–187.
- Ladizinsky, G. (1979b). Species relationships in the genus *Lens* as indicated by seed protein electrophoresis. *Bot Gaz* 140:449–451
- Ladizinsky, G. (1979c). The genetics of several morphological traits in the lentils. *J Hered* 70:135.
- Ladizinsky, G. (1986). A new *Lens* species from the Middle East, *Notes R Bot Gard, Edinburgh* 643: 489.
- Ladizinsky, G. (1993). Wild Lentils. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12:169–184.
- Lakhran, L., Ahir, R. R., Choudhary, M., and Choudhary, S. (2018). Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid caused dry root rot of chickpea. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7, 3314–3317.
- Lal, H.C., Upadhyay, J.P., Jha, A.K., Atul, K., (2006). Effect of spacing and date of sowing on rust severity and yield of lentil. *J. Res.* 18, 89-91.
- Lamdan, N. L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M., & Horwitz, B. A. (2015). Secretome of *Trichoderma* Interacting with Maize Roots: Role in Induced Systemic Resistance*[S]. *Molecular & cellular proteomics*, 14(4), 1054-1063.
- Latha, P., Karthikeyan, M. & Rajeswari, E. (2017). Development of bioformulations for the management of blackgram dry root rot caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub Butler). *Advances in Research*, 9, 1–12.
- Lodha, S. & Mawar, R. (2020). Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. *Journal of Phytopathology*, 168, 1–17.
- Lodha, S., Sharma, S. K., and Aggarwal, R. K. (1997). Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Pathol.* 46, 186–190. doi: 10.1046/j.1365-3059.1997.d01-223.x

- Lokesh, R., Rakholiya, K. B., and Thesiya, M. R. (2020). Evaluation of different fungicides against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid. causing dry root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in vitro. *Artic. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 9, 1–11. doi: 10.20546/ijcmas.2020.907
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., & Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83(3), 302-307.
- Lygin, A.V., Hill, C.B., Zernova, O.V., Crull, L., Widholm, J.M., Hartman, G.L. et al. (2010) Response of soybean pathogens to glyceollin. *Phytopathology*, 100, 897–903.
- Machado, A. R., Pinho, D. B., Soares, D. J., Gomes, A. A. M., & Pereira, O. L. (2019). Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153(1), 89-100.
- Mahmoud, A. F., Abou-Elwafa, S. F., and Shehzad, T. (2018). Identification of charcoal rot resistance QTLs in sorghum using association and in silico analyses. *J. Appl. Genet.* 59, 243–251. doi: 10.1007/s13353-018-0446-5
- Malaker, P. K., Mian, L. H., Khandaker, M. M., & Reza, M. M. A. (2007). Survival of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker in soil and residue of wheat. *Bangladesh Journal of Botany*, 36(2), 133-137.
- Malhotra, R.S. and Saxena, M.C. (1993). Screening for cold and heat tolerance in cool-season food legumes. In: Singh, K.B. and Saxena, M.C. (eds.) *Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes*. pp. 227-244. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK
- Manamgoda D.S., Rossman A.Y., Castlebury L.A., Crous P.W., Madrid H., Chukeatirote E., Hyde K.D. (2014). The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221–288
- Mandal, S., Srivastava, K. D., Aggarwal, R., & Singh, D. V. (1999). Mycoparasitic action of some fungi on spot blotch pathogen (*Drechslera sorokiniana*) of wheat. *Indian Phytopathology*, 52, 39-43.
- Maraite, H., Di Zinno, T., Longree, H., Daumerie, V., and Duveiller, E. (1998). Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. *Helminthosporium blights wheat Spot blotch tan spot*. CIMMYT, Mex. DF, 293–300.
- Marquez, N., Giachero, M. L., Declerck, S., & Ducasse, D. A. (2021). *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Marquez, N., Giachero, M. L., Gallou, A., Debat, H. J., Cranenbrouck, S., Di Rienzo, J. A., et al. (2018). Transcriptional Changes in Mycorrhizal and Nonmycorrhizal soybean plants upon infection with the fungal pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 31, 842–855. doi: 10.1094/MPMI-11-17-0282-R
- Marquez, N., Giachero, M. L., Gallou, A., Debat, H. J., Declerck, S., and Ducasse, D. A. (2019). Transcriptome analysis of mycorrhizal and nonmycorrhizal soybean plantlets upon infection with *Fusarium virguliforme*, one causal agent of sudden death syndrome. *Plant Pathol.* 68, 470–480. doi: 10.1111/ppa.12964
- Martinez-Medina, A., Pozo, M. J., Cammue, B. P. A., and Vos, C. M. F. (2016). “Belowground defence strategies in plants: the plant–*Trichoderma* dialogue,” in *Belowground Defence*

Strategies in Plants, eds C. M. F. Vos and K. Kazan (Cham: Springer International Publishing), 301–327.

Mastan, A., Bharadwaj, R. K. B., Kushwaha, R. K., & Vivek Babu, C. S. (2019). Functional Fungal Endophytes in *Coleus forskohlii* Regulate Labdane Diterpene Biosynthesis for Elevated Forskolol Accumulation in Roots. *Microbial Ecology*, 78, 914–926.

Mathre, D.E. (1987). In: *Compendium of Barley Diseases*. Am Phytopathol Soc, St. Paul, MN. 78 p.

McKenzie, B. A., & Hill, G. D. (2004). Water use in grain legumes. In *Proceedings of the 5th European Conference on Grain Legumes/2nd International Conference on Legume Genomics and Genetics*, AEP–l'Association Européenne de Recherche sur les Protéagineuses, Paris, France (Vol. 61, p. 62).

McWilliam, J. R. (1986). The national and international importance of drought and salinity effects on agricultural production. *Functional plant biology*, 13(1), 1-13.

Mehta, Y.R. (1993). Spot blotch. In: Mathur SB, Cunfer BM (eds) *Seedborne disease and seed health testing of wheat*. Copenhagen, Denmark, Jordhurgsforlaget, pp 105-112

Mehta, Y.R. (1997). Constraints on the Integrated Management of Spot Blotch of wheat. Instituto Agronomico do arana- IAPAR, Londrina, PR, Brazil. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A (eds) *Proc. Int. Workshop Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot*, 9-14 February 1997, CIMMYT, El Batan, Mexico, DF, pp 18-27

Mehta, Y. R. (1998). Constraints on the integrated management of spot blotch of wheat. *Helminthosporium Blight of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*, 18-27.

Mendgen, K., Schneider, A., Sterk, M., & Fink, W. (1988). The differentiation of infection structures as a result of recognition events between some biotrophic parasites and their hosts. *Journal of Phytopathology*, 123(3), 259-272.

Mengistu, H., Negussie, T., (1994). Chickpea and lentil disease research in Ethiopia. In: Telaye, A., Bejiga, G., Saxena, M.C., Solh, M. (Eds.), *Cool Season Food Legumes in Ethiopia*. Alemaya University of Agriculture, Institute of Agricultural Research and International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria, pp. 346-366.

Mishra, G. P., Mishra, S. K., Tiwari, S. K., & Kumar, A. (2008). Inheritance of lentil (*Lens culinaris*) resistance to rust (*Uromyces fabae*). *Indian J. Agric. Sci.* 78, 994-996.

Mishra, S., Singh, B. R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A. H., Singh, H. B. (2014). Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PloS One* 9, e97881. doi: 10.1371/journal.pone.0097881

Mmbaga, M. T., Mackasmiel, L. M., and Mrema, F. A. (2018). Evaluation of biological agents for control of macrophomina root rot and powdery mildew in flowering dogwood (*Cornus Florida L.*). *HortScience* 53, 1461–1466. doi: 10.21273/HORTSCI13071-18

Mohiddin, F. A., Bashir, I., Padder, S. A., & Hamid, B. (2017). Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Trichoderma* species. *J Pharmacogn Phytochem*, 6(6), 563-569.

Mohy-ud-Din, G., Khan, M. A., & Khan, S. M. (1999). Evaluation of seed and foliar applied fungicides to control lentil rust. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 11, 77-80.

- Morrall, B. A. A., McKenzie, D. L., Duczek, L. J., & Verma, P. R. (1972). qualitative survey of diseases of some specialty crops in Saskatchewan in 1970 and 1971: sunflower, safflower, buckwheat, lentil, mustards, and field pea. Canadian plant disease survey.
- Mossel, D. A. A., Kleynen-Semmeling, A. M. C., Vincentie, H. M., Beerens, H., & Catsaras, M. (1970). Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *Journal of Applied Bacteriology*, 33(3), 454-457.
- Muehlbauer, F.J., Cubero, J. I., and Summerfield, R. J. (1985). Lentil (*Lens culinaris* Medik.). p. 266– 311. In: R J Summerfield and E I I Roberts (eds) *Grain Legume Crops*. Collins, 8 Grafton Street, London, UK.
- Muehlbauer, F. J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K. E., Coyne, C. J., Rajesh, P. N., & Ford, R. (2006). Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*, 147, 149-165.
- Muehlbauer, F.J., Cubero, J.I. and Summerfield, R.J. (1985). Lentil (*Lens culinaris* Medik.). In: Summerfield, R.J. and Roberts, E.I.I. (eds.) *Grain Legume Crops*. pp. 266-311. Collins, 8 Grafton Street, London, UK.
- Muehlbauer, F.J., Kaiser, W.J., Clement, S.L. and Summerfield, R.J. (1995). Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy* 54:283-332.
- Muriel J, THIRTYMALACHAR M. (1977). Identity of Fungi inciting Charcoal Rot Disease. Paper presented at: Sydowia: *Annales Mycologici*.
- Murray, G. A., Eser, D., Gusta, L. V., & Eteve, G. (1988). Winterhardness in pea, lentil, faba bean and chickpea. *World crops: Cool season food legumes: A global perspective of the problems and prospects for crop improvement in pea, lentil, faba bean and chickpea*, 831-843.
- Nafady, N. A., Hashem, M., Hassan, E. A., Ahmed, H. A. M., and Alamri, S. A. (2019). The combined effect of arbuscular mycorrhizae and plant-growth-promoting yeast improves sunflower defense against *Macrophomina phaseolina* diseases. *Biol. Control* 138:104049.
- Nakajima, H., Isomi K., Ichinoe, T.H.M. (1994). Sorokinianin: a novel phytotoxin produced by the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *Tetrahedron Letters* 35, 9597–600.
- Nasraoui, B. (2008). Principales maladies fongiques des céréales et des légumineuses en Tunisie. Kef : Centre de Publication Universitaire.
- Navathe, S., Chand, R., Mishra, V. K., Pandey, S. P., Kumar, U., Joshi, A. K. (2019). Management of spot blotch and heat stress in spring wheat through Azoxystrobin-mediated redox balance. *Agric. Res.* 9, 169–178.
- Ndiaye, M., Sarr, M. P., Cisse, N., & Ndoye, I. (2015). Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? *African Journal of Microbiology Research*, 9(45), 2232-2238.
- Negussie, T, Pretorius, ZA, McTaggart, AR and Shivas, RG (2015) National Diagnostic Protocol for *Uromyces viciae-fabae*. (Eds. Subcommittee on Plant Health Diagnostics) Reviewer Toome, M. ISBN 978-0-9945112-1-8.
- Negussie, T., & Pretorius, Z. A. (2012). Lentil rust: Present status and future prospects. *Crop Protection*, 32, 119-128.

- Negussie, T., (2004). Epidemiology of lentil rust in Ethiopia with special references to disease progress and yield loss assessment. Ph.D. Thesis, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
- Negussie, T., Bejiga, G., Million, E., (1998). Lentil rust outbreak in Gimbichu district, Ethiopia. *AgriTopia* 1, 8.
- Negussie, T., Pretorius, Z.A., (2005). A settling tower for quantitative deposition of urediniospores of *U. viciae-fabae*. *S.A. J. Plant Soil* 22, 141-144.
- Negussie, T., Pretorius, Z.A., (2008). Yield loss of lentil caused by *Uromyces viciae- fabae*. *S.A. J. Plant Soil* 25, 32-41.
- Negussie, T., Pretorius, Z.A., Bender, C.M., (2005a). Components of rust resistance in lentil. *Euphytica* 142, 55-64.
- Negussie, T., Pretorius, Z.A., Bender, C.M., (2005b). Effect of some environmental factors on in vitro germination of urediniospores and infection of lentils by rust. *J. Phytopathol.* 153, 43-47.
- Negussie, T., Pretorius, Z.A., Yalemshet, W.A., (2007). The effect of rust (*Uromyces viciae-fabae*) on dry matter degradability, and nitrogen, phosphorus and crude protein contents of lentil. *Ethiop. J. Agric. Sci.* 19, 79-90.
- Nema KG, Joshi LH. (1973). Spot blotch disease of wheat in relation to host age, temperature and moisture. *Indian Phytopathol* 26:41-48
- Nene, Y. L. (2006). Indian Pulses through the Millennia. *Asian Agri. History.*10: 179–202.
- Nene, Y.L., Sheila, V.K. (1996). world list of chickpea and pigeonpea pathogens.
- Nene, YL, Shelia VK, Sharma, S.B. (1996). A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. 5th ed. Hyderabad: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics; p. 27.
- Neupane, A. C., Sharma, R. C., Duveiller, E., and Shrestha, S. M. (2010). Sources of *Cochliobolus sativus* Inoculum Causing Spot Blotch under Warm Wheat Growing Conditions in South Asia. *Cereal Res. Commun.* 38, 541–549. doi:10.1556/crc.38.2010.4.11.
- Neves, D. L., Bruening, B., Knott, C. A., Lee, C. D., & Bradley, C. A. (2021). First Report of Spot Blotch Caused by *Bipolaris sorokiniana* on Winter Rye in Kentucky. *Plant Disease*, 105(12), 4160.
- Nguyen, H. L., Nguyen, D. H., Hoang, T. Q., Tran, T. L., & Ha, T. T. T. (2020). Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *International Biomechanics*, 11(1).
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Kallsen, C. E., & Trouillas, F. P. (2020). Macrophomina crown and root rot of pistachio in California. *Plants*, 9(2), 134.
- Olbe, M., Sommarin, M., Gustafsson, M., and Lundborg, T. (1995). Effect of the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* toxin prehelminthosporol on barley root plasma membrane vesicles. *Plant Pathol.* 44, 625–635.
- Ortuño, N., Castillo, J. A., Miranda, C., Claros, M., & Soto, X. (2017). The use of secondary metabolites extracted from *Trichoderma* for plant growth promotion in the Andean highlands. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 32(4), 366-375.

- Palti J (1981). In: Cultural practices and infectious plant diseases, Springer-verlag, New York
- Pandey, A. K., Burlakoti, R. R., Rathore, A., & Nair, R. M. (2020). Morphological and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolated from three legume crops and evaluation of mungbean genotypes for resistance to dry root rot. *Crop Protection*, 127, 104962.
- Pandey, A.K. & Bansadrai, A.K. (2021) Will *Macrophomina phaseolina* spread in legumes due to climate change? A critical review of current knowledge. *Journal of Plant Disease and Protection*, 128, 9–18.
- Pandey, S. P., Kumar, S., Kumar, U., Chand, R., and Joshi, A. K. (2005). Sources of inoculum and reappearance of spot blotch of wheat in rice--wheat cropping. *Eur. J. plant Pathol.* 111, 47–55.
- Parmar, H. V., Kapadiya, H. J., and Bhaliya, C. M. (2017). Efficacy of different fungicides against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causing castor root rot. *Int. J. Chem. Stud.* 5, 1807–1809.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220.
- Pawlowski, M. L., Bowen, C. R., Hill, C. B., and Hartman, G. L. (2016). Responses of soybean genotypes to pathogen infection after the application of elicitors. *Crop Prot.* 87, 78–84. doi: 10.1016/j.cropro.2016.04.022
- Perez-Brandán, C., Arzeno, J. L., Huidobro, J., Grümberg, B., Conforto, C., Hilton, S., et al. (2012). Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Prot.* 40, 73–82.
- Perrenoud S. (1990). Potassium, Plant Health. 2nd edition, International Potash Institute, Bern, Switzerland (IPI Research Topic No. 3)
- Poudel, B., Shivas, R. G., Adorada, D. L., Barbetti, M. J., Bithell, S. L., Kelly, L. A., ... & Vaghefi, N. (2021). Hidden diversity of *Macrophomina* associated with broadacre and horticultural crops in Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 1-23.
- Prasada, R., Verma, U.N., (1948). Studies on lentil rust, *Uromyces fabae* (Pers.) De Bary in India. *Indian Phytopathol.* 1, 142-146.
- Prem N, Biswas SK, Kumar U, Rajik M (2009). Effect of media, pH, temperature, host range and fungicides on *Bipolaris sorokiniana*. *Ann Plant Prot Sci* 17 :394–397
- Prevot, V. (2013). Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide (Doctoral dissertation, Reims).
- Qader, M. M., Kumar, N. S., Jayasinghe, L., Araya, H., & Fujimoto, Y. (2017). Bioactive sesquiterpenes from an endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* isolated from a popular medicinal plant *Costus speciosus*. *Mycology*, 8(1), 17-20.
- Quinn, M. A. (2009). 15 Biological Nitrogen Fixation and Soil Health Improvement. *The Lentil*, 229.
- Rajpurohit, T. S. (2002). Influence of intercropping and mixed cropping with pearl millet, green gram and mothbean on the incidence of stem and root rot (*Macrophomina phaseolina*) of sesame. *Sesame Safflower Newsl.* 17, 40–41.

- Ramos, A. M., Gally, M., Szapiro, G., Itzcovich, T., Carabajal, M., and Levin, L. (2016). In vitro growth and cell wall degrading enzyme production by Argentinean isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causative agent of charcoal rot in corn. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 267–273. doi: 10.1016/j.ram.2016.06.002
- Rauscher, M., Mendgen, K., & Deising, H. (1995). Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Experimental Mycology*, 19(1), 26-34.
- Reddy, R. R., & Khare, M. N. (1984). Further studies on factors influencing the mechanism of resistance in lentil (*Lens culinaris* M.) to rust (*Uromyces fabae* (Pers.) de Bary). *Lentil Experimental News Service*.
- Reghmit, A., Farida, B. T., Mourad, D., Rima, H., Zahia, O., & Fatma, S. H. (2022). Effective Biofertilizer *Trichoderma* Spp. Isolates with Enzymatic Activity and Metabolites Enhancing Plant Growth. *International Microbiology*, 25(4), 817-829.
- Regmi, A., Ladha, J., Pasuquin, E., Pathak, H., Hobbs, P., Shrestha, L., ... & Duveiller, E. (2002). The role of potassium in sustaining yields in a long-term rice-wheat experiment in the Indo-Gangetic Plains of Nepal. *Biology and Fertility of Soils*, 36, 240-247.
- Reis, E. M. (1991). Integrated disease management: The changing concepts of controlling head blight and spot blotch. In 3. International Conference on Wheat for the Nontraditional Warm Areas, Foz do Iguaçu (Brazil), 29 Jul-3 Aug 1990. CIMMYT.
- Reis, E. M., Madeiros, C., & Casa, R. T. (1998). Control of leaf blights of wheat by the elimination of the inoculum source. In *Proceedings of the Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot Workshop* (pp. 327-332).
- Renfrew, J. M. (1969). The archaeological evidence for the domestication of plants: methods and problems. *The archaeological evidence for the domestication of plants: methods and problems*.
- Renfrew, J. M. (1973) *Palaeoethnobotany*. Columbia Univ. Press, New York.
- Rennie, D. C., Holtz, M. D., Turkington, T. K., Leboldus, J. M., Hwang, S. F., Howard, R. J., & Strelkov, S. E. (2015). Movement of *Plasmodiophora brassicae* resting spores in windblown dust. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(2), 188-196.
- Reznikov, S., Chiesa, M. A., Pardo, E. M., De Lisi, V., Bogado, N., González, V., ... & Castagnaro, A. P. (2019). Soybean-*Macrophomina phaseolina*-specific interactions and identification of a novel source of resistance. *Phytopathology*, 109(1), 63-73.
- Reznikov, S., Vellicce, G. R., González, V., de Lisi, V., Castagnaro, A. P., and Ploper, L. D. (2016). Evaluation of chemical and biological seed treatments to control charcoal rot of soybean. *J. Gen. Plant Pathol.* 82, 273–280. Doi : 10.1007/s10327-016-0669-4
- Reznikov, S., Vellicce, G. R., Mengistu, A., Arias, R. S., Gonzalez, V., De Lisi, V., et al. (2018). Disease incidence of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on soybean in north-western Argentina and genetic characteristics of the pathogen. *Can. J. Plant Pathol.* 40, 423–433. doi: 10.1080/07060661.2018.1484390
- Richmond, D.V. (1983). A light microscopic method for studying rust-infected plants. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80, 561-564.
- Rifai M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*-*Mycol. Pap.* 116: 1-56.

- Romero Luna, M. P., Mueller, D., Mengistu, A., Singh, A. K., Hartman, G. L., & Wise, K. A. (2017). Advancing our understanding of charcoal rot in soybeans. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1).
- Roquebert, M. F. (1981). Antagonism between *Trichoderma viride* and *Botrytis cinerea*. Preliminary study. *Cryptogamie Mycologie*.
- Rosyara, U. R., Duveiller, E., Pant, K., Sharma, R. C. (2007). Variation in chlorophyll content, anatomical traits and agronomic performance of wheat genotypes differing in spot blotch resistance under natural epiphytotic conditions. *Australas. Plant Pathol.* 36, 245–251. doi: 10.1071/AP07014
- Rosyara, U. R., Subedi, S., Duveiller, E., and Sharma, R. C. (2010). The effect of spot blotch and heat stress on variation of canopy temperature depression, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of hexaploid wheat genotypes. *Euphytica* 174, 377–390. doi:10.1007/s10681-010-0136-9.
- Rosyara, U. R., Vromman, D., and Duveiller, E. (2008). Canopy temperature depression as an indication of correlative measure of spot blotch resistance and heat stress tolerance in spring wheat. *J. Plant Pathol.* 90, 103–107.
- S̆varta, A., Bims̆teine, G. (2019). “Winter wheat leaf diseases and several steps included in their integrated control: A review,” in *Research for Rural Development*. Eds. Treija, S., Skujeniece, S. (Jelgava: Latvia University of Agriculture).
- Saharan, B., & Nehra, V. (2011). Assessment of plant growth promoting attributes of cotton (*Gossypium hirsutum*) rhizosphere isolates and their potential as bio-inoculants. *J Environ Res Develop*, 5, 575-583.
- Sahu, R., Sharaff, M., Pradhan, M., Sethi, A., Bandyopadhyay, T., Mishra, V. K., et al. (2016). Elucidation of defense-related signaling responses to spot blotch infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J.* 86, 35–49. doi: 10.1111/tpj.13149
- Sakr, B., Sarker, A., El-Hassa, H., Kadah, N., Karim, B.A., Erskine, W., (2004). Registration of “Hamria” lentil. *Crop Sci.* 44, 686.
- Salam, A. A., Jarjees, M. M., & Juer, K. S. (2006). Enhancement of *Alternaria solani* isolates for sporulation on culture media and evaluation of their pathogenicity. *State Broad for Agric. Res., College of Agric., Univ. Abo-Gharib, Iraq*.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 15-26.
- Sales Junior, R., SILVA NETO, A. N. D., NEGREIROS, A. M. P., GOMES, T. R. R., AMBRÓRIO, M. M. D. Q., & Armengol, J. (2020). Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in Cowpea. *Revista Caatinga*, 33, 395-401.
- Salvatore, M. M., Félix, C., Lima, F., Ferreira, V., Naviglio, D., Salvatore, F., et al. (2020). Secondary metabolites produced by *Macrophomina phaseolina* isolated from eucalyptus globulus. *Agriculture* 10:72.

- Samuels G.J., Petrini O., and Manguin S., (1994). Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86:421-435.
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E. L. K. E., & Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1), 71-88.
- Samuels G.J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96:195-206.
- Sandhu, J.S., and Singh, S. (2007). History and origin. In: Yadav, S.S. et al. (eds.), *Lentil: An ancient crop for modern times*, pp. 1-9. Dordrecht, Springer Verlag.
- Saravanakumar, K., Dou, K., Lu, Z., Wang, X., Li, Y., & Chen, J. (2018). Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 130-136.
- Saravanakumar, K., Li, Y., Yu, C., Wang, Q. Q., Wang, M., Sun, J., ... & Chen, J. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., & Chen, J. (2016). Biodiversity of *Trichoderma* community in the tidal flats and wetland of southeastern China. *PloS one*, 11(12), e0168020.
- Sarkar, J., Chakraborty, U., Chakraborty, B. N. (2018). Induced defense response in wheat plants against *Bipolaris sorokiniana* following application of *Bacillus safensis* and *Ochrobactrum pseudogrignonense*. *Indian Phytopathol.* 71, 49–58. doi: 10.1007/s42360-018-0006-2
- Sarkar, T. S., Biswas, P., Ghosh, S. K., & Ghosh, S. (2014). Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions. *PLoS One*, 9(9), e107348.
- Sarker, A., Erskine, W., Hassan, M.S., Afzal, M.A., Murshed, A.N.M.M. (1999). Registration of ‘Barimasur-4’ lentil. *Crop Sci.* 39, 876.
- Sarr, M. P., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 250.
- Saud, H. M., Sariah, M., Ismail, M. R., Habib, S. H., & Kausar, H. (2013). Potential lignocellulolytic *Trichoderma* for bioconversion of oil palm empty fruit bunches. *Australian Journal of Crop Science*, 7(3), 425-431.
- Saunders, D.A. (1988). Characterization of tropical wheat environments: Identification of production constraints and progress achieved in South and South East Asia. In: Klatt AR (ed) *Wheat Production Constraints in Tropical Environments*. CIMMYT, Mexico DF, pp 12-26
- Sawant, I. S. (2014). *Trichoderma*-foliar pathogen interactions. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.

- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., & Kubicek, C. P. (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *The FEBS journal*, 273(18), 4346-4359.
- Sentelhas, P. C., Pedro Júnior, M. J., & Felício, J. C. (1993). Effects of different conditions of irrigation and crop density in microclimate and spot blotch and powdery mildew occurrence. *Bragantia*, 52, 45-52.
- Sepulveda, R.P., Alvarez, A.M., (1989). Chemical control of rust (*Uromyces viciae-fabae*) on lentils (*Lens culinaris* Med.). *Agric. Tech. Santiago* 49, 309-313 (Abstract).
- Shah, S., Nasreen, S., & Sheikh, P. A. (2012). Cultural and morphological characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease of *Pleurotus* spp. in Kashmir. *Research Journal of Microbiology*, 7(2), 139.
- Sharma, J.K., Sankaran, K.V. 1988. *Biocontrol of Plant Diseases, Vol. II*, Boca Raton (FL): CRC Press. *Biocontrol of rust and leaf spot diseases*. (KFRI Scientific Paper No. 133); p. 1–23.
- Sharma, R. C., & Duveiller, E. (2003). Effect of stress on *Helminthosporium* leaf blight in wheat. In *Proceedings of Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop*, Bemidji, Minnesota, USA, 21-24 July, 2002 (pp. 140-144). Agricultural Experiment Station, North Dakota State University.
- Sharma, R. C., & Duveiller, E. (2004). Effect of *Helminthosporium* leaf blight on performance of timely and late-seeded wheat under optimal and stressed levels of soil fertility and moisture. *Field Crops Research*, 89(2-3), 205-218.
- Sharma, R. C., & Duveiller, E. (2006). Spot blotch continues to cause substantial grain yield reductions under resource - limited farming conditions. *Journal of Phytopathology*, 154(7 - 8), 482-488.
- Sharma, I., Kumari, N. & Sharma, V. (2014) Defense gene expression in *Sorghum bicolor* against *Macrophomina phaseolina* in leaves and roots of susceptible and resistant cultivars. *Journal of Plant Interactions*, 9, 315–323.
- Sharma, P. (2023). Biocontrol strategies—retrospect and prospects. *Indian Phytopathology*, 1-13.
- Sharma, R. C., & Dubin, H. J. (1996). Effect of wheat cultivar mixtures on spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) and grain yield. *Field Crops Research*, 48(2-3), 95-101.
- Sharma, R. C., and Bhowmik, T. P. (1986). Estimation of yield losses in groundnut due to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Indian J. Plant Pathol.* 4, 108–112.
- Sharma, R. C., Duveiller, E., and Ortiz-Ferrara, G. (2007b). Progress and challenge towards reducing wheat spot blotch threat in the Eastern Gangetic Plains of South Asia: Is climate change already taking its toll? *F. Crop. Res.* 103, 109–118.
- Sharma, S., Sahu, R., Navathe, S., Mishra, V. K., Chand, R., Singh, P. K., et al. (2018). Natural variation in elicitation of defense-signaling associates to field resistance against the spot blotch disease in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 9:636.
- Sharma-Poudyal, D., Duveiller, E., & Sharma, R. C. (2005). Effects of seed treatment and foliar fungicides on *Helminthosporium* leaf blight and on performance of wheat in warmer growing conditions. *Journal of Phytopathology*, 153(7 - 8), 401-408.

- Shivas, R. G., Beasley, D. R., & McTaggart, A. R. (2014). Online identification guides for Australian smut fungi (Ustilaginomycotina) and rust fungi (Pucciniales). *IMA fungus*, 5(2), 195-202.
- Shoemaker, R. A. (1959). Nomenclature of Drechslera and Bipolaris, grass parasites segregated from "Helminthosporium." *Can. J. Bot.* 37, 879–887.
- Shresthal, K. K., Timilal, R. D., Mahto, B. N., & Bimb, H. P. (1997). Disease incidence and yield loss due to foliar blight of wheat in Nepal. Spot Blotch and Tan Spot, 67.
- Siddique, A. B., Hossain, M. H., Duveiller, E., & Sharma, R. C. (2006). Progress in wheat resistance to spot blotch in Bangladesh. *Journal of Phytopathology*, 154(1), 16-22.
- Siddiqui, A., Dawar, S., Javed Zaki, M. & Hamid, N. (2011). Role of ultra violet (UV-C) radiation in the control of root infecting fungi on groundnut and mungbean. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 2221–2224.
- Simonetti, E., Viso, N. P., Montecchia, M., Zilli, C., Balestrasse, K., and Carmona, M. (2015). Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. *Microbiol. Res.* 180, 40–48. doi: 10.1016/j.micres.2015.07.004
- Singh, D., Pande, S. K., Kavita, J. K. Y., & Kumar, S. (2018). Bioefficacy of Trichoderma spp. against Bipolaris sorokiniana causing spot blotch disease of wheat and barley. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(3), 2322-2327.
- Singh, I.S., Singh, J.P., Singh, A.K., Chauhan, M.P., (1994). Pant lentil 4: a high- yielding, rust-, wilt-, and blight-resistant variety for the North Western plains of India. *LENS Newslett.* 21, 8-9.
- Singh, K., (1985). Effect of seed treatment on lentil rust development (*Uromyces fabae*) development. *LENS Newslett.* 12, 26-27.
- Singh, S. K., Gupta, V., Razdan, V. K., Singh, V. B., Vikas, G. (2012). Effect of fertilizers on severity of spot blotch caused by *Bipolaris sorokiniana* and yield of Wheat. *Ann. Plant Prot. Sci.* 20, 411–413.
- Singh, U. B., Malviya, D., Singh, S., Kumar, M., Sahu, P. K., Singh, H. V., et al. (2019). Trichoderma harzianum-and methyl jasmonate-induced resistance to *Bipolaris sorokiniana* through enhanced phenylpropanoid activities in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Microbiol.* 10, 1697. doi: 10.3389/fmicb.2019.01697
- Singh, V., Singh, R. N. (2007). Management of spot blotch of wheat (*Triticum aestivum*) caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Indian J. Agric. Sci.* 77, 323–326.
- Sinha, R.P., Yadav, B.P., (1989). Inheritance of resistance to rust in lentil. *LENS Newslett.* 16, 41.
- Smith, G. S., and Carvil, O. N. (1997). Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis.* 81, 363–368.
- Sobowale, A. A., Jonathan, S. G., Odu, B. O., Ayansina, A. D. V., & Ojikutu, T. K. (2010). Trichoderma longibrachiatum as an antagonist of Botrydiplodia theobromae. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(5), 479-484.
- Sohn, J., Voegelé, R.T., Mendgen, K., Hahn, M., (2000). High level activation of vitamin B1 biosynthesis genes in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 629-636.

- Spagnoletti, F. N., Cornero, M., Chiocchio, V., Lavado, R. S., and Roberts, I. N. (2020). Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. *Eur. J. Plant Pathol.* 156, 839–849.
- Spagnoletti, F. N., Leiva, M., Chiocchio, V., and Lavado, R. S. (2018). Phosphorus fertilization reduces the severity of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) and the arbuscular mycorrhizal protection in soybean. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 181, 855–860.
- Spagnoletti, F., Carmona, M., Gómez, N. E. T., Chiocchio, V., and Lavado, R. S. (2017). Arbuscular mycorrhiza reduces the negative effects of *Macrophomina phaseolina* on soybean plants in arsenic-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 121, 41–47.
- Sridharan, A., Thankappan, S., Karthikeyan, G., and Uthandi, S. (2020). Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiol. Res.* 236:126436. doi: 10.1016/j.micres.2020.126436
- Stack RW, McMullen M (1988) In: Root and crown rots of small grains. NSDU extension service Bulletin, Fargo, North Dakota, USA, p785
- Stasz, T. E., Harman, G. E., & Weeden, N. F. (1988). Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia*, 80(2), 141-150.
- Stiling, P., & Cornelissen, T. (2005). What makes a successful biocontrol agent? A meta-analysis of biological control agent performance. *Biological control*, 34(3), 236-246.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Sugha, S.K., Chauhan, R.S., Singh, B.M., 1994. Sensitivity of aeciospores and uredospores of the pea rust pathogen to selected systemic fungicides. *Trop. Agric.* 71 ,27- 30.
- Sukanya, R., Ayalakshmi, S. K., & Girish, G. (2016). Effect of temperature and pH levels on growth of *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. Infecting sorghum. *International Journal of Agriculture Sciences*, 8(37), 1768-1770.
- Sultana, S., Adhikary, S. K., Rahman, S. M. M., Islam, M. M. (2018). Sexuality and compatibility of *Bipolaris sorokiniana* and segregation pattern in teleomorph (*Cochliobolus sativus*): geographic origin and segregation ratio. *Indian Phytopathol.* 71, 365–375.
- Sultana, S., Adhikary, S. K., Rahman, S. M., & Islam, M. M. (2018). Sexuality and compatibility of *Bipolaris sorokiniana* and segregation pattern in teleomorph (*Cochliobolus sativus*): geographic origin and segregation ratio. *Indian Phytopathology*, 71, 365-375.
- Taylor, P., Lindbeck, K., Chen, W., & Ford, R. (2007). Lentil diseases. In *Lentil* (pp. 291-313). Springer, Dordrecht.
- Tembo, B., Sibiya, J., Tongoona, P. (2018). Genetic variability among wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm for resistance to spot blotch disease. *J. Agric. Rural Dev. Trop. Subtropics* 119, 85–93.
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158.

- Topolovec-Pintarić, S. (2019). Trichoderma: invisible partner for visible impact on agriculture. *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*, 15
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., and Audisio, M. C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol. Res.* 182, 31–39.
- Tripathi, H. S. (2015). Advances in diseases of lentil (*Lens culinaris* Medik). In *Recent Advances in the Diagnosis and Management of Plant Diseases* (pp. 55-68). Springer, New Delhi.
- Tseng, S. C., Liu, S. Y., Yang, H. H., Lo, C. T., & Peng, K. C. (2008). Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 6914-6922.
- Van Ginkel, M., & Rajaram, S. (1993). Breeding for durable resistance to diseases in wheat: an international perspective. *Durability of disease resistance*, 259-272.
- van Ginkel M, Rajaram S, (1998). Breeding for resistance to spot blotch in wheat Global perspective. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A, eds. *Helminthosporium Blight of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. Mexico, DF: CIMMYT, 162–9.
- van Zeist, W., & Bottema, S. (1971). Plant husbandry in early neolithic Nea Nikomedeia, Greece. *Acta botanica neerlandica*, 20(5), 524-538.
- Vankudoth, K. R., Boda, A., Sivadevuni, G., & Solipuram, M. R. (2016). Effect of indigenous fungi on ochratoxin A produced by two species of *Penicillium*. *Animal Nutrition*, 2(3), 225-228.
- Vannacci, G., & Harman, G. E. (1987). Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(10), 850-856.
- Vasebi, Y., Safaie, N., and Alizadeh, A. (2013). Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists in vitro and greenhouse condition. *J. Crop Prot.* 2, 139–150.
- Viedma, L. Q., & Kohli, M. M. (1997). Spot blotch and tan spot of wheat in Paraguay. In *Proc. Int. Workshop Helminthosporium Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*, CIMMYT, El Batán, Mexico, DF: CIMMYT (pp. 126-133).
- Villa-Rodríguez, E., Parra-Cota, F., Castro-Longoria, E., López-Cervantes, J., de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biol. Contr.* 132, 135–143.
- Villajuan-Abgona R., Kagayama K., Hyakumachi M., (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia damping-off* of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 227-235.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 72(1-3), 80-86.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., (2008a). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1-10.
- Vos, C. M., De Cremer, K., Cammue, B. P., & De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular plant pathology*, 16(4), 400-412.
- Vyas, S.C. (1981). Diseases of sesame and Niger in India and their control. *Pesticides*. 15:10-15. Walther, D.,
- Gindrat, D. (1988). Biological control of damping off of sugarbeet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas* sp. *Can J Microbiol* 34: 631- 637
- Wang, B. T., Hu, S., Yu, X. Y., Jin, L., Zhu, Y. J., & Jin, F. J. (2020). Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in fungi. *Polymers*, 12(3), 530.
- Weindling, R., & Fawcett, H. (1936). Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. *Hilgardia*, 10(1), 1-16.
- Wiese, M.V. (1998). Compendium of wheat diseases. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A (eds) Proc. Int. Workshop Helminthosporium Disease of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. 9-14 Feb. 1997, CIMMYT, El Batan, Mexico, DF, pp 114-118
- Williams, P.C. and Singh, U. (1988). Quality screening and evaluation in pulse breeding. In: Summerfield, R.J. (eds.) *World Crops: Cool Season Food Legumes*. pp. 445-457. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Williams, P.C., Bhatta, R.S., Deshpande, S.S., Hussein, L.A. and Savage, G.P. (1994). Improving nutritional quality of cool season food legumes. In: Muehlbauer, F.J. and Kaiser, W.J. (eds.) *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. pp: 113-129. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wrather, A., Shannon, G., Balardin, R., Carregal, L., Escobar, R., Gupta, G. K., ... & Tenuta, A. (2010). Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress*, 11(1), 29.
- Wrather, A., & Koenning, S. (2009). Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. *Plant Health Progress*, 10(1), 24.
- Wynn, W.K., (1981). Tropic and taxic responses of pathogens to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19, 237-255.
- Yadav, B., Singh, R., Kumar, A. (2013). Effect of micronutrients and fungicides on spot blotch of wheat. *Vegetos* 26, 212–219.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235(2), 235-242.
- Yeoman, D.P., Lapwood, D.H., McEwen, J., (1987). Effects of a range of fungicides used to control rust (*Uromyces viciae-fabae*) on spring-sown field beans (*Vicia faba*) in the U.K. *Crop Prot.* 6, 90-94.
- Young, P. A. (1949). Charcoal Rot of Plants in East Texas. *Bulletin Texas Agricultural Experimental Station* No. 33.
- Yuen, G. Y., Steadman, J. R., Lindgren, D. T., Schaff, D., & Jochum, C. (2001). Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*, 20(5), 395-402. 202

- Yusuf, M., Singh, N. P., & Dastane, N. G. (1979). Effect of frequency and timings of irrigation on gram yield and water use efficiency of lentil [chickpea, India]. *Annals of Arid Zone*.
- Zadoks, J. C., & Schein, R. D. (1979). *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press, New York . 429 pp.
- Zhang, Q., Gao, X., Ren, Y., Ding, X., Qiu, J., Li, N., et al. (2018). Improvement of *Verticillium* wilt resistance by applying arbuscular mycorrhizal fungi to a cotton variety with high symbiotic efficiency under field conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 19:241. doi: 10.3390/ijms19010241
- Zhao, L., Cai, J., He, W., & Zhang, Y. (2019). *Macrophominavaccinii* sp. nov. causing blueberry stem blight in China. *MycKeys*, 55, 1.
- Zillinsky, F. J. (1983). *Common diseases of small grain cereals. A guide to identification*. Common diseases of small grain cereals. A guide to identification. pp.141
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.
- Zohary, D. (1972). The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Econ Bot* 26: 326–332.
- Zohary, D. (1976). Lentil. Pages 163–164 in *Evolution of crop Plants* (N.W.Simmonds, ed.). Longman, London, UK

Annexes

Annexe 1

Composition des différents milieux de cultures utilisées

❖ **Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)** (Rapilly, 1968)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

❖ **Milieu liquid PDB (Potato Dextrose Broth)** (Rapilly, 1968)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

❖ **Milieu Czapek** (Salam et *al.*, 2006)

Sucrose	30 g
Nitrate de Sodium	2 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sulfate de magnésium	0.5 g
Chlorure de potassium	0.5 g
Sulfate ferreux	0.01
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 7.3 ± 0.2

Annexe 1

❖ **Milieu de gélose synthétique de Richard**

Nitrate de potassium	10 g
Le phosphate de monopotassium	5 g
Sulfate de magnésium	2.5 g
Le chlorure de fer (III)	0.02 g
Sucrose	50 g
Agar	15 g

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

❖ **Milieu gélosé à base de carotte**

Carottes fraîches	400 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

❖ **Milieu de Rose Bengal (Jarvis, 1973)**

Dextrose	10 g
Peptone de soja	5 g
Le phosphate de monopotassium	1 g
Sulfate de magnésium	0.5 g
Chloramphénicol	0.1 g
Rose Bengal	0.05 g
Agar	15 g
Eau déminéralisée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 7.2 ± 0.2

Annexe 1

❖ **Milieu SDA (Sabouraud dextrose agar)** (Dongyou, 2010)

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 5.6 ± 0.2

❖ **Milieu OGA (Oxytetracycline Glucose Agar)** (Mossel, 1970)

Glucose	10 g
Extrait de levure	5 g
Agar bactériologique	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 10 minutes. pH 6.5 ± 0.2

❖ **Milieu SNA (Synthetic low-nutrient Agar)** (Gerlach, 1982)

Phosphate de monopotassium	1 g
Nitrate de potassium	1 g
Sulfate de magnésium anhydre	0.5 g
Chlorure de potassium	0.5 g
Glucose	0.2 g
Sucrose	0.2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 5.4 ± 0.2

Annexe 1

❖ Milieu gélose à l'extrait de malt (Dutton et Penn, 1989)

Extrait de malt	20 g
Glucose	20 g
Peptone	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 5.4 ± 0.2

❖ Milieu gélose à base d'avoine (Koneman, 1997)

Flocons d'avoine	30 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 7.2 ± 0.2

❖ Milieu gélose à base de Maïs (Kelly et Funigiello, 1959)

Farine de maïs	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH 6.0 ± 0.2

❖ Milieu Pikovaskey solide de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948)

Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Glucose	10 g
FeSO ₄	0,005 g
Bleu bromophénol	0,25 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

Annexe 1

❖ Réactif de Salkowski

Chlorure ferrique	0.5 M (8.125 g sur 100 ml E.D)
Acide perchlorique	49 ml de 35%
Eau distillée	100 ml

❖ Réactif de Nessler

Iodure de potassium	2 g
Iodure de mercure (II)	3 g
hydroxyde de potassium	4g (30%)
Eau distillée	20 ml

❖ Milieu utilisé pour la production d'amylase (Abe *et al.*, 2015)

Extrait de levure	3 g
Amidon soluble	2 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes

❖ Milieu utilisé pour la production de chitinase (Reniwick *et al.*, 1991)

Glucose	5 g
Na ₂ HPO ₄	3g
NH ₄ Cl	1g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1
MgSO ₄	0,12g
chitine colloïdale	1% (p:v)
Agar	20g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

Annexe 1

❖ **Milieu utilisé pour la production de Pectinase** (Jayasankar et Graham, 1970)

Pectine	1 g
Extrait de levure	1 g
Agar	3 g
Eau distillée	200 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. pH : 7,0

❖ **Milieu utilisé pour la production de ligninase** (Thomann *et al.*, 2002)

Acide tannique	5 g
Extrait de Malt	15 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

❖ **Milieu utilisé pour la production de cellulase** (Kamala et Indira Devi, 2011)

Carboxy-méthyl-cellulose(CMC)	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ces milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

Annexe 2

Séquence de *Bipolaris sorokiniana* (Bs1)

Amplification de la région ITS : 559 pb

Numéro d'accension

MW386302

GGGGGAAAAAATATGAAGGCCTGGCTTCGCGGCCGGCTGAAATATTTTTTTCACCC
ATGTCTTTTGC GCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCAAACC
ATAAACCTTTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTT
GCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTCCCTCTTTCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGATT
GGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCGCTTTGTATCAGGAG
AAAAGGACGGTAATCCATCAAGACTCTACATTTTAACTTTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Séquence de *Bipolaris sorokiniana* (Bs1)

Amplification de la région TEF : 582 pb

Numéro d'accension

MW435412

GGGGGAAAAAATATGAAGGCCTGGCTTCGCGGCCGGCTGAAATATTTTTTTCACCC
ATGTCTTTTGC GCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCAAACC
ATAAACCTTTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTT
GCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTCCCTCTTTCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGATT
GGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCGCTTTGTATCAGGAG
AAAAGGACGGTAATCCATCAAGACTCTACATTTTAACTTTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Séquence de *Macrophomina pseudophaseolina* (M1)Amplification de la région **ITS** : 807 pb

Numéro d'accèsion

MW422257

GAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTGATTCGGGGCTCCGTCCCCGATCCTCCCA
 CCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCC
 CCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAA
 CGTTGCAGTCTGAAAAAATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTG
 GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
 TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGC
 ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCT
 TTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAAT
 ACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCCGCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCT
 CAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
 CGGAGGAAATCATTACCGAGTTGATTCGGGGCTCCGTCCCCGATCCTCCACCCTTTGTAT
 ACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGG
 GGGTGGCTAGTGC
 CGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTTAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAAATATTA
 ATAACTAAAACCTTTCACAACGGATCTCTTGGGTTCTGGCATCGATGAAG

Séquence de *Macrophomina pseudophaseolina* (M1)Amplification de la région **TEF** : 417 pb

Numéro d'accèsion

OK545879

TTTTTTTGGTGGGGTTGATTCGCGCTAAGCCGCATTCAGCCTTCGGCAAATCTCCGC
 TTACGGATTTTTTTTTTCGACCGGCGTGCGACCGATGCGCGAGCCTCTCCCACATTTTT
 GGCCACTCGTGTCTTCCCAGCGAGCACAAGCTAACTGCGGCTATTACAGGAAGCCG
 CTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCTG
 AGCGTGAACGTGGTATCACCATCGACATCGCCCTCTGGAAGTTCGAGACCCCGAAGT
 ACTATGTCACCGTCATCGACGCCCCGGTCACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCA
 CTGGTACCTCCCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTT
 CGAGGCTGGTATCTC

Séquence de *Macrophomina pseudophaseolina* (M2)Amplification de la région **ITS** : 549 pb

Numéro d'accèsion

MW420980

CATTACCGAGTTGATTCGGGGCTCCGTCCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACC
TCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGG
CTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAA
AATATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA
TTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA
GACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCG
TAAGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATC
AGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCA

Séquence de *Macrophomina pseudophaseolina* (M2)Amplification de la région **TEF** : 475 pb

Numéro d'accèsion

MW779544

ATGAGGCTGTCGCTGCACCAGAATTTGCCGTATCTCATTTACTGAGGGGCATTTTTTTT
GGTGGGGTTGGTCCGCGCTAAGCCGCATTCAGCCTTCGGCAAATCTCCGCATGTGG
ATTTTTTTTTTCGACCGGCGTGCGACCGATGCGCGAGCCCCTCCCACATTTTTGGCCAC
TCGTGTTCTTCTCTGCGAGCATAAGCTAACTGCGGCTATTATAGGAAGCCGCTGAGCT
CGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCCTTGACAAGCTCAAGGCTGAGCGTGA
GCGTGGTATCACCATCGATATCGCCCTCTGGAAGTTCGAGACCCCGAAGTACTATGT
CACCGTCATCGACGCCCCCGGTCACCGTGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTAC
CTCCCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCT
GGTATCTCAAAGGG

Annexe 4

- Analyse de la variance de l'effet de Milieux de culture sur les paramètres de développement Bs1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
<i>Croissance Mycélienne</i>	<i>Entre Groupes</i>	165.680	10	16.568	57.302*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	6.361	22	0.289	
	<i>Total</i>	172.041	32		
<i>Nombre des conidies</i>	<i>Entre Groupes</i>	75827.345	10	7582.735	46.139*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	7231.200	44	164.345	
	<i>Total</i>	83058.545	54		
<i>Longueur des conidies</i>	<i>Entre Groupes</i>	9702.841	10	970.284	32.404*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	1646.875	55	29.943	
	<i>Total</i>	11349.716	65		

- Analyse de la variance de l'effet de Température sur la croissance mycélienne de Bs1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
	<i>Entre Groupes</i>	108.795	7	15.542	1243.371*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.200	16	.013	
	<i>Total</i>	108.995	23		

- Analyse de la variance de l'effet de pH sur la croissance mycélienne de Bs1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
	<i>Entre Groupes</i>	58.023	6	9.670	189.021*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.716	14	.051	
	<i>Total</i>	58.739	20		

*Significative à un niveau de 5% de probabilité (p<0,05) ; F : test de Tukey

Annexe 5

- Analyse de la variance de l'effet de Milieux de culture sur les paramètres de développement M1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
<i>Croissance Mycélienne</i>	<i>Entre Groupes</i>	0.037	10	0.004	1.581*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.052	22	0.002	
	<i>Total</i>	0.089	32		
<i>Nombre des conidies</i>	<i>Entre Groupes</i>	20462.18	10	2046.218	98.721*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	456	22	20.727	
	<i>Total</i>	20918.18	32		
<i>Longueur des conidies</i>	<i>Entre Groupes</i>	22080.03	10	2208.003	17.371*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	8389.286	66	127.11	
	<i>Total</i>	30469.32	76		
<i>Largeur des conidies</i>	<i>Entre Groupes</i>	19254.06	10	1925.406	14.944*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	8503.571	66	128.842	
	<i>Total</i>	27757.63	76		

- Analyse de la variance de l'effet de Température sur la croissance mycélienne de M1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
	<i>Entre Groupes</i>	390.660	7	55.809	1717.187*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.520	16	0.033	
	<i>Total</i>	391.180	23		

*Significative à un niveau de 5% de probabilité (p<0,05) ; F : test de Tukey

Annexe 5

- Analyse de la variance de l'effet de pH sur la croissance mycélienne de M1

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
<i>Entre Groupes</i>	6.790	6	1.132	20.280*
<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.781	14	0.056	
<i>Total</i>	7.571	20		

*Significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Tukey

Annexe 6

Séquence de *Trichoderma longibrachiatum* (T10)

Amplification de la région **ITS** : 601 pb

Numéro d'accesion

MW818102

GTTTCCAAC TCCCAAACCCCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGG
ATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAG
GACCAACTCCAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGGCTCCCGTCGCGGGCTCTGTTT
TATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAAT
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT
CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGG
CCGCCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT
GCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAAC
TTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAGGCGGG

Séquence de *Trichoderma longibrachiatum* (T10)

Amplification de la région **TEF** : 568 pb

Numéro d'accesion

OK500004

CCCTTCAATTTTCGGACGATTTCTGTGCCTCTGCCCAACATCTTTTTTTTACC
ACCCCGCTTTCTCCTACCCCTCCTTTGGGCGACGCAAATTTTTTTTGTGCGTTT
CGGGTTTTAGTGGGGATGCACCTCCAGCAAACCACTATCCTCTGCCGCCCTCTG
CTCTCGTCTCCAACACCTTTGGCGCTTGCATCAACCTTCCAACAGTCTGCG
CAGCAATGCTAATCATTTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCGAAGTCCGGCAAGGG
TTCCTTCAAGTACGCGTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTG
GTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCA
CCGTCATTGGTATGTTTGATCCCGTGCATCATTGCATCATCGCCACAACAACA
TACTAATGCCCTCTGACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATG
ATCACTGGTACTTCCCAGGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGTACT
GGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGG

Annexe 7

- Analyse de la variance de la confrontation direct et indirect entre les 7 isolates de *Trichoderma* et *M. pseudophaseolina* M1

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
<i>Confrontation directe</i>	<i>Entre Groupes</i>	2380.440	6	396.740	5.542*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	1002.288	14	71.592	
	<i>Total</i>	3382.728	20		
<i>Confrontation à distance</i>	<i>Entre Groupes</i>	1642.740	6	273.790	46.111*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	83.128	14	5.938	
	<i>Total</i>	1725.867	20		

*Significative à un niveau de 5% de probabilité (p<0,05) ; F : test de Tukey

- Analyse de la variance de l'effet de T10 sur les paramètres de croissance des plantes de lentille

	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
<i>Poids frais</i>	<i>Entre Groupes</i>	5.663	3	1.888	1027.490*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.015	8	0.002	
	<i>Total</i>	5.677	11		
<i>Poids sec</i>	<i>Entre Groupes</i>	.137	3	.046	194.456*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.002	8	.000	
	<i>Total</i>	0.139	11		

Annexe 7

<i>Longueur des Tiges</i>	<i>Entre Groupes</i>	26.250	3	8.750	15.766*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	4.440	8	.555	
	<i>Total</i>	30.690	11		
<i>Longueur des racines</i>	<i>Entre Groupes</i>	755.770	3	251.923	5062.938*
	<i>A l'intérieur des groupes</i>	0.398	8	0.050	
	<i>Total</i>	756.168	11		

*Significative à un niveau de 5% de probabilité ($p < 0,05$) ; F : test de Tukey

Lentil rust in north-west of Algeria caused by *Uromyces viciae-fabae*

Mohamed El Amine Kouadri, Souad Zaim and *Ahmed Amine Bekkar

Laboratory of research on Biological Systems and Geomatics, Department of Agronomy, Faculty of Life and Natural Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria

*Corresponding author's email: a.bekkar@univ-mascara.dz; amisou09@yahoo.fr

Abstract

Lentil rust, caused by the fungal pathogen *Uromyces viciae-fabae* is a devastating disease and one of the major biotic constraints that can limit lentil production. Even though the northwest of Algeria is known for lentil production, there is no detailed information regarding the distribution, incidence and severity of lentil rust. The surveys were conducted during the 2018-2020 agricultural campaign in three regions of the Northwestern of Algeria (Mascara, Relizane and Tiaret). A total of 15 fields were surveyed. Rust incidence and severity were recorded from and plant samples were transferred to the laboratory for microscopic observation of the fungus. The result indicated that means rust incidence and severity value greater than 83.7% and 7.6, respectively were recorded in all filed surveyed and in the two agricultural years. Disease severity was classified as very high. The variety Syrie 229 was highly susceptible to rust disease. Two spore forms uredospores and teliospores of *U. viciae-fabae* were observed. Rust disease is mostly managed by chemical fungicides, but an integrated management approach that includes cultural measures, the use of resistant cultivars and biological control is recommended to control this disease.

Keywords: Algeria, *Lens culinaris*, Rust disease, Susceptible variety.

Introduction

Lentil (*Lens culinaris* Med.) is one of the major pulse crops in the world with high nutritional food and feed values. It constitutes a prominent source of proteins with an important amount of carbohydrates, dietary fibers, minerals, vitamins and antioxidant compounds (Joshi *et al.*, 2017). Lentil has been cultivated for its ability to fix nitrogen biologically where it is included in crop rotations with cereals for effective cultural control of weeds, diseases and pests by breaking up their life cycles (Kumar *et al.*, 2013). Lentil plants are generally grown as annual plants with hairy branches, the stems are narrow and light green in color (Gaad *et al.*, 2018).

Lentil is a potential adapted crop for dry areas in North Africa, South Asia, Sub-Saharan Africa, West Asia, and North Africa (Kumar *et al.*, 2013). In Algeria, it is one of the most consumed legumes after faba bean, chickpea and peas (Tabti *et al.*, 2018). However, its yield is still very low due to various biotic and abiotic constraints (Taylor *et al.*, 2007).

Lentil is affected by several diseases that can reduce plant growth and yield. Fungal pathogens are the most important one, which can decrease productivity by infection and damaging leaves, stems, roots and pods, as well as reducing marketability by discoloring seeds (Taylor *et al.*, 2007). Rust of lentils caused by *U. viciae-fabae* is a destructive disease that has a wide distribution and can impede lentil production (Negussie *et al.*, 2008). This disease can cause 100% losses in some countries where the development of the fungus is

favoured by moderate temperatures and humid conditions (Bejiga *et al.*, 2000). Rust disease affects all aerial parts of lentil plant; the earliest symptoms begin with aecial development on the leaflet during February. The aecia appear in a yellow single, round or elongated spots that gradually turns brown (Negussie, 2004). Brown uredinia are developed on both sides of the leaves, petiole, stems and pods and are formed in circular or oval shape (Khare, 1981). Telia are dark brown to black in colour, with a firm texture, and appear in the later stages of the plant, mostly on stems (Agrawal and Prasad, 1997). In severe infection, plants become stunted, dried showing burnt appearance and plants eventually die before seed formation (Chen *et al.*, 2009).

The present study aimed to survey and evaluate the lentil rust disease in the northwest of Algeria and to provide more information regarding the current state of lentil culture to rust disease attacks.

Materials and Methods

Surveys and disease assessment

Surveys were carried out in different lentil production regions, during the 2018-2020 agricultural campaign, data were collected from three regions (Mascara, Relizane and Tiaret) located in north-west of Algeria. The different symptoms are described.

The estimation of rust disease is carried by randomly selecting and diagonally 100 infected plants per parcel, the parameters determined during

these surveys are incidence and severity.

Disease incidence (DI) was calculated as the percentage of plants affected by rust per parcel, a plant with a leaf or stem showing symptoms is considered the "minimum threshold" for judging that a plant is infected with rust.

Disease severity (DS) was estimated as the percentage of infected tissue per plant which represents an estimate of the rate of symptom area developed on leaves and stems relative to the total plant area. Rust severities were scored on a 1–9 scale where 1 = no visible pustules and 9 = extensive pustules on leaves, petioles and stems, killing leaves and entire plant (Khare *et al.*, 1993).

Sampling and examination of infected plants

Samples of plants infected with rust were collected at random from different farmers' fields for examination in the laboratory.

Results and Discussion

Lentil rust symptoms were found in all prospected sites during the period from 2018 to 2020. Rust disease is easily spotted in field; symptoms include dark-brown to black pustules on the leaves (Fig. 1A and B) and burnt stems (Fig. 2A and B). Typical lentil rust symptoms were observed as describes by Khare (1981), Negussie *et al.* (2004) and Chen *et al.* (2009, 2011). The percentage of infected plants varied from one plot to another, which is greater than 83.7% (Fig. 3), almost the same percentages were recorded in each crop year. The average disease assessment over the two agricultural years is presented in Figure 3. The highest disease incidence was recorded in Tiaret zone with 96.3%, followed by those evaluated at Relizane and Mascara zones (90.1% and 83.7%, respectively). The disease severity varies from 7.6 to 9 for all the sites prospected.

Uromyces viciae-faba is one of the yield limiting factors of lentil in Algeria, Morocco, Pakistan, Bangladesh, Ethiopia, India, Canada, Italy, Nepal, Syria, Turkey and South America (Bascur, 1993; Beniwalet *et al.*, 1993; Erskine *et al.*, 1994). This disease has the potential to cause yield losses of more than 60% and up to 100% reported in Ethiopia and India (Khare, 1981; Singh *et al.*, 1986).

The variety cultivated in all the plots surveyed is Syrie 229 (microsperma type), the recorded percentages of plants affected by the disease show that this Algerian variety is susceptible to rust. This variety is cultivated in the north-west Algerian fields for these agronomic characters (early, round seed (microsperma), green yellow color, high yield). It's moderately drought tolerant (Fatiha *et al.*, 2019), and also cultivated especially for the high height of the lowest pods (14.9 cm) in comparison with other varieties cultivated on the Algerian fields (Gaad *et al.*, 2018). Height of the lowest pods above the soil is an important character for mechanization in lentil.

The presence of two forms of *Uromyces* spores (Uredospores and Teliospores) was observed microscopically on slides prepared from the infected samples; uredospores released from the pustules were unicellular, well grouped dikaryotic spores, light brown color, globular in shape, surrounded by a visible, pigmented and rough wall 20–30 × 18–26 μm (Fig. 4A). Urediospores are airborne and can induce new infections cycles during the season.

Teliospores produced from pustules were single-celled, subglobose, ovate or ellipsoidal, light brown with thick wall and papillate apex, 25–38 × 18–27 μm (Fig. 4B). Teliospores are the dormant stage of rust disease.

Rust pathogen *U. viciae-fabae* is a macrocyclic, autoecious fungus forming all spore forms (spermatia, aecidiospore, uredospore, teliospore and basidiospore) on a single crop with no alternative host (Cummins *et al.*, 1983).

During this study, we managed to observe two types of spores only (Uredospore and teliospores). In the epidemiology of lentil rust, teliospores play a critical role, they allow *U. viciae-fabae* to survive adverse conditions and produce basidia and basidiospores, which can infect lentil plants and initiate the infection cycle of rust disease.

Lentil rust disease can be managed through the application of fungicides as foliar sprays and seed-dressings; their efficacy is dependent on the time and number of treatments applied, as well as the stage of infection (Sugha *et al.*, 1994). Among the fungicides which are effective against lentil rust: Mancozeb, benomyl, thiram, zinc sulphate, carbendazim and triadimefon (Singh, 1985; Mohyud-Din *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2011; Emeran *et al.*, 2011).

The use of fungicides, on the other hand, is not fully efficient and may cause the selection of new resistant strains of pathogens, besides being costly and environmentally damaging. In many countries, the use of potentially harmful chemical sprays is regarded with dissatisfaction (Harman *et al.*, 2004). However, the most economically viable and environmentally sustainable method of control is the development of rust resistant varieties (Rubiales *et al.*, 2011). Lentil genotypes with some resistance to rust are now used in breeding programs where rust is a serious problem (Nleya *et al.*, 2016).

Several varieties resistant to lentil rust were reviewed by Chen *et al.* (2011) and Negussie *et al.* (2012) and which are available in Bangladesh, India, Ethiopia, Morocco, Ethiopia, Pakistan and Chile. The collection of Algerian accessions of lentil provided by Gaad *et al.* (2018) does not cite any of varieties resistant to lentil rust listed by Chen *et al.* (2011) and Negussie *et al.* (2012).

Several studies have been performed to explore the genetics of *U. viciae-fabae* resistance in lentil (Erskine *et al.*, 1994; Negussie *et al.*, 2005, 2012; Rubiales *et al.*, 2011, 2013), partial and hypersensitive resistance to rust in lentil have been

reported based on reducing and retarding epidemic built-up and resulting from prolonged latency period and reduced pustule density and size.

Pests and diseases including rust are affected by the different cultural measures such as soil preparation, planting date, plant density, fertilization, weeding, infected debris elimination etc, such practices can also influence plant health and thus the crop's growth and yield. For example, Mittal (1997) proved that delaying the sowing date significantly reduced the incidence rust disease, moreover, a maximum reduction in rust severity on lentil has been reported using a wider row spacing (15 cm) (Lal *et al.*, 2006).

Biological control is a promising alternative over chemical fungicide application. Among the antagonistic microorganisms, *Cryptococcus* and *Sporobolomyces* yeasts and *Trichoderma* spp. have

been used for the biocontrol of *U. viciae-fabae* (Parker and Blakeman, 1984b). Isolates of *Trichoderma* displayed several mechanisms to suppress pathogenic activity of fungal parasites, including production of a wide range of broad-spectrum antifungal metabolites, mycoparasitism, and competition with pathogen of nutrients and space (Harman *et al.*, 2004).

In conclusion, this study showed that the lentil variety cultivated in northwest of Algeria (Syria 229) is very susceptible to rust attacks. Further work is required on rust resistance in lentil through screening of local germplasm, including cultivated varieties, will provide important insights for disease management.

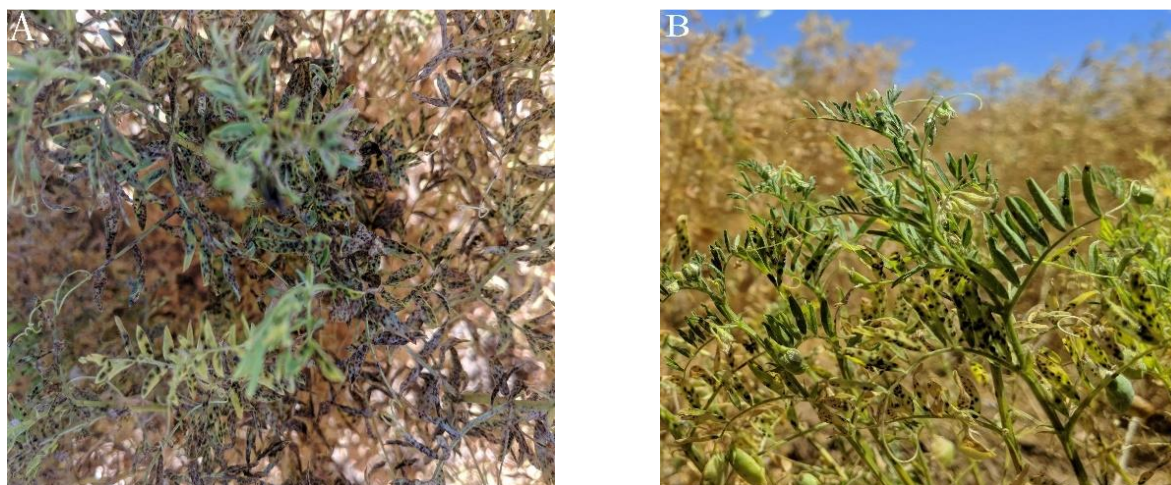


Fig. 1: Lentil plants infected with rust disease caused by *Uromyces viciae-fabae*. Leaves covered with black pustules.

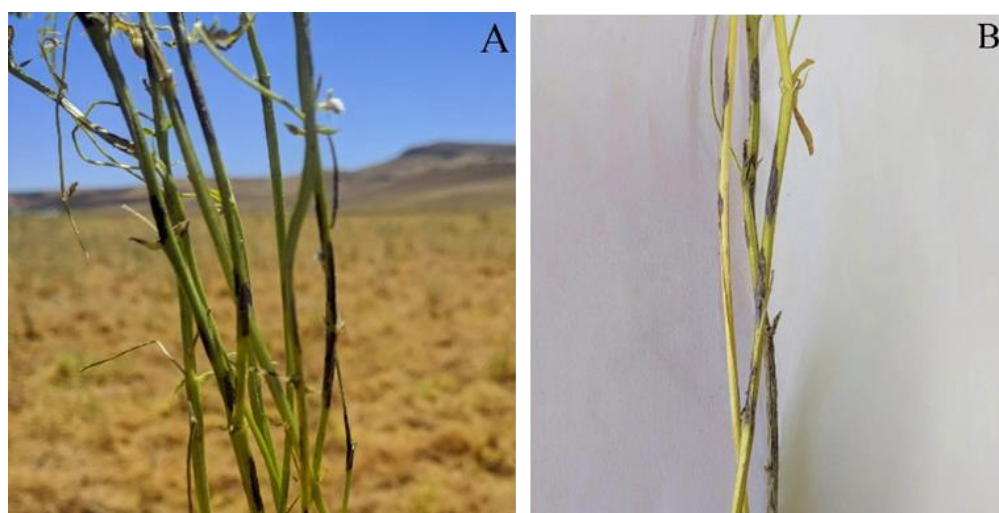


Fig. 2: Stem portions of lentil infected with rust.

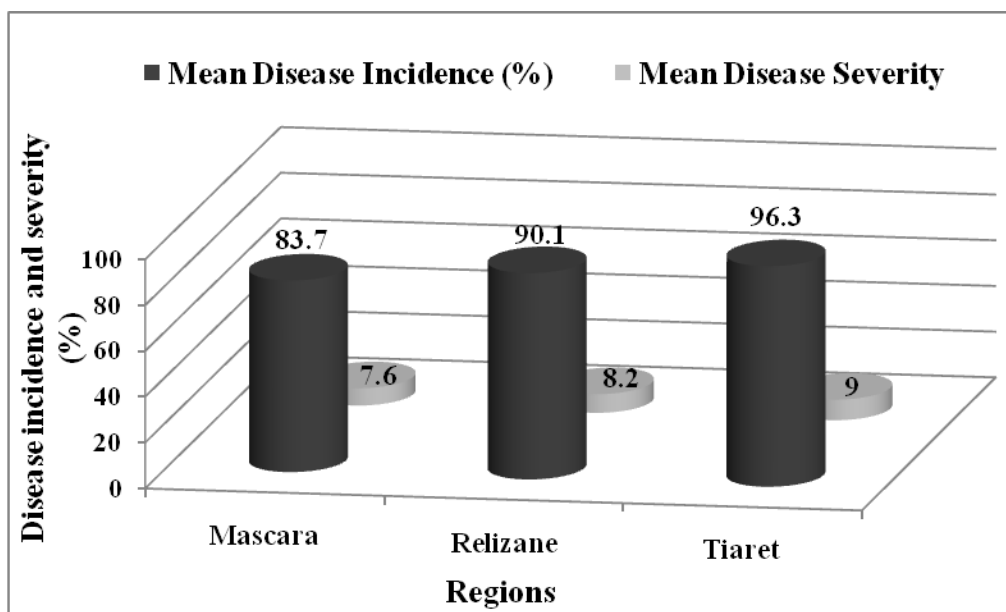


Fig. 3: The average incidence and severity of lentil rust recorded in different regions of northwest Algeria.

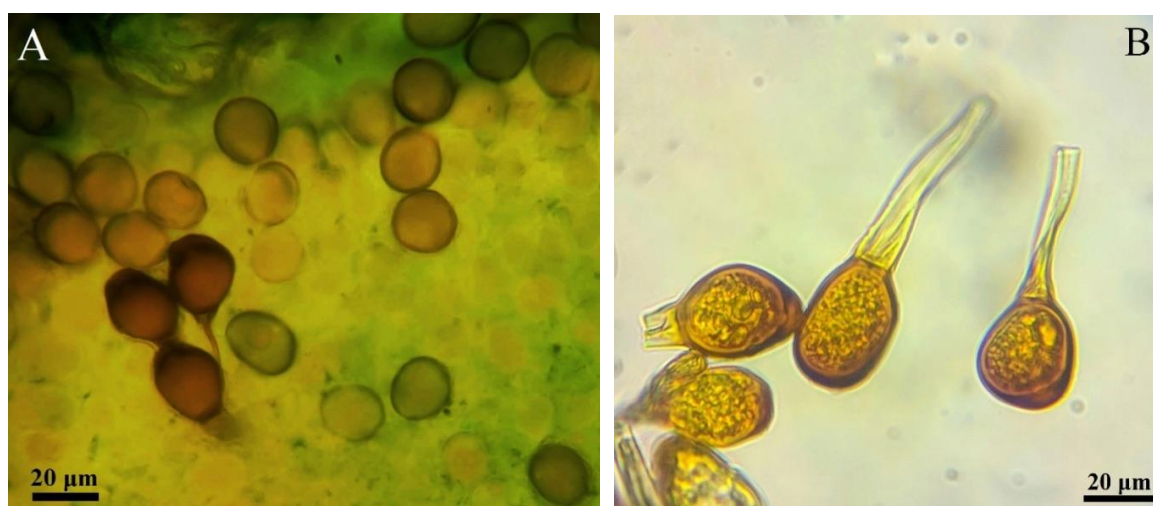


Fig. 4: Microscopic observation of uredospores (A) and teliospores (B) of lentil rust pathogen *Uromyces viciaefabae*

References

- Agrawal SC, Prasad KVV, 1997. Diseases of lentil. Science Publishers, Inc., USA.
- Bascur GB, 1993. Lentil and Faba Bean in Latin America: their importance, limiting factors and research. ICRDA, Aleppo, Syria
- Bejiga G, Yohannes D, Knight R, 2000. Region 4: Sub-Sahara Africa. In: Knight, R. (Ed.), Linking research and marketing opportunities for pulse in the 21st Century, proceedings of the third international food legumes research conference, Adelaide, Australia, 22-26 September 1997. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 199-220.
- Beniwal SPS, Bayaa B, Weigand S, Makkouk K and Saxena MC, 1993. Field guide to lentil diseases and insect pests. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Chen W, Basandrai AK, Basandrai D, Sabine B, Bayaa B, Buchwaldt L, Davidson J, Larsen R, Rubiales D, Taylor PWJ, 2009. Diseases and their management. In: Erskine W, Muehlbauer FJ, Sarker A, Sharma B. (Eds.), The lentil: botany, production and uses. CAB International, Wallingford, UK, pp. 262-281.
- Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ, 2011. Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Cummins GB, Hiratsuka Y, 1983. Illustrated genera

- of rust fungi. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesot.
- Emeran A, Sillero J, Fernández-Aparici M, Rubiales D, 2011. Chemical control of faba bean rust (*Uromycesviciae-fabae*). *Crop Protection*, **30**: 907-912.
- Erskine W, Tufail M, Russell A, Tyagi MC, Rahman MM, Saxena MC, 1994. Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, **73**: 127-135.
- Fatiha T, Abdelkrim H, Mostefa K, Waffa R, 2019. Study of morpho-physiological and biochemical behavior of cultivated legume (*Lens culinaris*) in dry area of Algeria. *Ukrain. J. Ecol.*, **9**: 535-541.
- Gaad D, Laouar M, Gaboun F, Abdelguerfi A, 2018. Collection and agro morphological characterization of Algerian accessions of lentil (*Lens culinaris*). *Biodiversitas*, **19**: 183-193.
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**: 43-56.
- Joshi M, Timilsena Y, Adhikari B, 2017. Global production, processing and utilization of lentil: A review. *J. Integr. Agric.*, **16**: 2898-2913.
- Khare MN, 1981. Diseases of lentil. In: Webb, C., Hawtin, G. (Eds.), *Lentils*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK, pp. 163-172.
- Khare MN, Bayaa B, Beniwal SPS, 1993. Selection methods for disease resistance in lentil. In: Singh, KB, Saxena MC. (Eds.), *Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes*. The International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) and Sayce Publishing, Chichester, UK, pp. 107-121.
- Kumar J, Srivastva E, Singh M, 2013. Genetics of early growth vigour in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *J. Genet.*, **92**: 323-326.
- Lal HC, Upadhyay JP, Jha AK, Atul K, 2006. Effect of spacing and date of sowing on rust severity and yield of lentil. *J. Res.*, **18**: 89-91.
- Mittal RK, 1997. Effect of sowing dates and disease development in lentil as sole and mixed crop with wheat. *J. Mycol. Plant Pathol.*, **27**: 203-209
- Mohyud-Din G, Khan MA, Khan SM, 1999. Evaluation of seed and foliar applied fungicides to control lentil rust. *Pak. J. Phytopathol.*, **11**: 77-80.
- Negussie T, 2004. Epidemiology of lentil rust in Ethiopia with special references to disease progress and yield loss assessment. Ph.D. Thesis, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
- Negussie T, Bender C, van Wyk P, Pretorius Z, 2012. Hypersensitivity of rust resistance in lentil. *S. Afr. J. Plant Soil*, **29**: 25-29.
- Negussie T, Pretorius ZA, 2005. A settling tower for quantitative deposition of urediniospores of *U. viciae-fabae*. *S. Afr. J. Plant Soil*, **22**: 141-144.
- Negussie T, Pretorius ZA, 2008. Yield loss of lentil caused by *Uromycesviciae-fabae*. *S. Afr. J. Plant Soil*, **25**: 32-41.
- Nleya T, Vandenberg A, Walley FL, Deneke D, 2016. Lentil: Agronomy. Encyclopedia of Food Grains. 10.1016/B978-0-12-394437-5.00193-5.
- Parker A, Blakeman J B, 1984b. Stimulation of *Uromycesviciae-fabae* in vitro and in vivo by the phylloplane yeast *Cryptococcus*. *Physiol. Plant Pathol.*, **24**: 119-1128.
- Rubiales D, Castillejo MA, Madrid E, Barilli E, Rispail N, 2011. Legume breeding for rust resistance: lessons to learn from the model *Medicago truncatula*. *Euphytica*, **180**: 89-98.
- Rubiales D, Rojas-Molina M, Sillero J, 2013. Identification of pre- and posthaustorial resistance to rust (*Uromyces viciae-fabae*) in lentil (*Lens culinaris*) germplasm. *Plant Breed.*, **132**: 676-680.
- Singh K, 1985. Effect of seed treatment on lentil rust (*Uromyces fabae*) development. *Lens Newslett.*, **12**: 26-27.
- Singh K, Jhooty JS, 1986. Assessment of losses in lentil yield due to rust caused by *Uromycesfabae*. *Lens Newslett*, **13**: 28.
- Sugha SK, Chauhan RS, Singh BM, 1994. Sensitivity of aeciospores and uredo-spores of the pea rust pathogen to selected systemic fungicides. *Trop. Agric.*, **71**: 27-30.
- Tabti DM, Laouar K, Rajendran S, Kumar A, Abdelguerfi A, 2018. Identification of desirable mutants in quantitative traits of lentil at early (M2) generation. *J. Environ. Biol.*, **39**: 137-142.
- Taylor P, Lindbeck K, Chen W, Ford R, 2007. Lentil diseases. In: Yadav SS, McNeil D and Stevenson PC (eds.) *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*. Springer, Dordrecht. The Netherlands. pp. 291-313.

NEW DISEASE REPORT

First report of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of lentil in Algeria

M. El Amine Kouadri  | A. Amine Bekkar  | S. Zaim

Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics, Department of Agronomy, Faculty of Life and Natural Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, ALGERIA

Correspondence

M. El Amine Kouadri, Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics, Department of Agronomy, Faculty of Life and Natural Sciences, University of Mustapha Stambouli Mascara, Mascara, Algeria.

Email: melamine.kouadri@univ-mascara.dz

KEYWORDS

Lens culinaris, *Cochliobolus sativus*

Lentil (*Lens culinaris*) is an annual cool season plant with a high nutritional value (Laskar *et al.*, 2019). It is one of the most consumed legumes after chickpea and faba bean in Algeria (National Office of Statistics, 2018). In May 2020, necrotic leaf spots were observed on 7% of the lentil plants in fields (c. 6 ha) in Relizane (northwest Algeria). Diseased leaves were surface disinfected with 2% sodium hypochlorite for three minutes, rinsed thrice with sterile distilled water, dried on sterile filter paper then placed onto potato dextrose agar (PDA) culture medium and incubated at 25°C. After five days of incubation, a fungal culture was purified using the single hyphal tip technique. The culture was velvety, dark olive in colour with fluffy white mycelium (Fig. 1). Conidiophores were brown, unbranched with septations. Conidia were dark brown in colour with septations (3 to 8 distosepta), straight or slightly curved, ovate with rounded tips (Fig. 2) and 17.5–47.5 × 10–17.5 µm in size. Morphological characteristics of the fungal isolate were similar to those described for *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (teleomorph *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. ex Dastur) (Manamgoda *et al.*, 2014).

To confirm the identity of the fungus, DNA was extracted from the mycelium of a single-spore culture (Bs1) grown on PDA for one week, using a NucleoSpin® Food commercial kit (Macherey Nagel, Germany). The internal transcribed spacer region was amplified using primers ITS1 and ITS4. BLAST analysis showed that the resulting sequence had 100% identity with several *B. sorokiniana* isolates (e.g. KJ830832, KM030311, KF512821) (Fig. 3). The ITS sequence of Bs1 was deposited in GenBank (Accession No. MW386302)

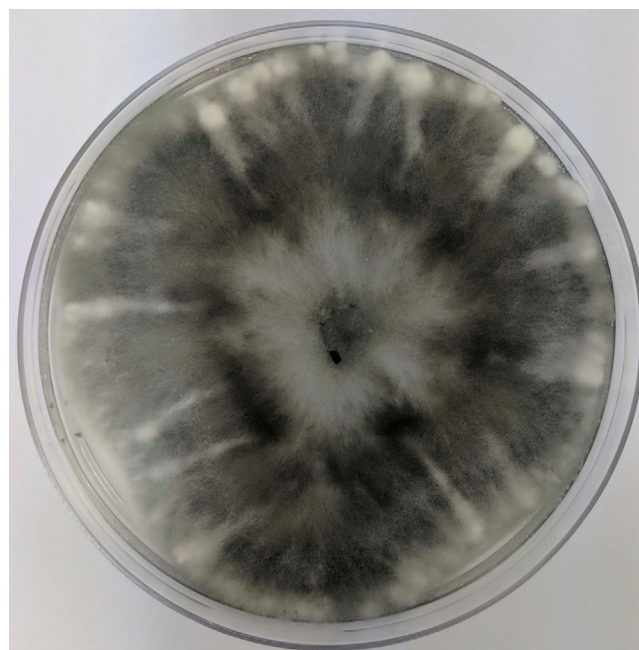


FIGURE 1 Colony of *Bipolaris sorokiniana* on potato dextrose agar in 90 mm Petri dish after ten days incubation

A pathogenicity test was conducted on lentil seedlings grown in pots in triplicate. A conidial suspension (10^5 conidia/ml) of *B.*

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *New Disease Reports* published by British Society for Plant Pathology and John Wiley & Sons



FIGURE 2 Conidia of *Bipolaris sorokiniana* attached to conidiophore

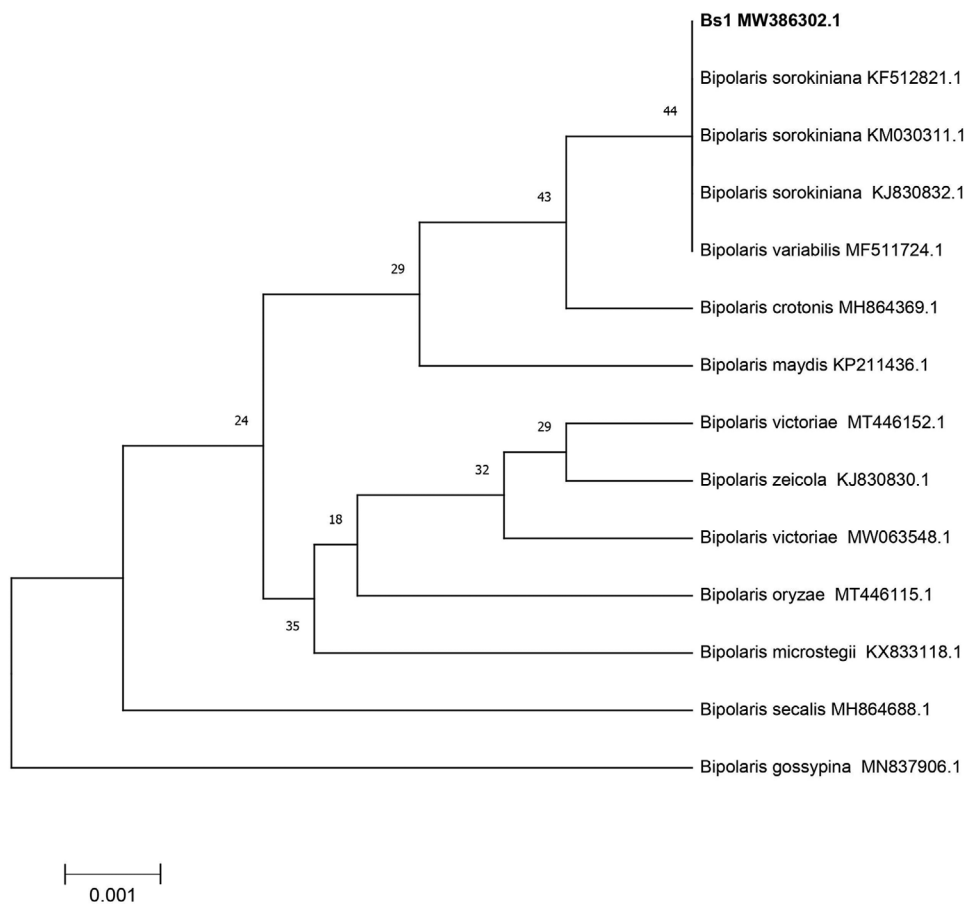


FIGURE 3 Phylogenetic tree generated from the ITS region showing the phylogenetic relationships among *Bipolaris* spp using neighbor-joining method. Relevant bootstrap values (expressed as a percentage of 1000 replicates) are shown at branch point. Isolate in the present study in bold



FIGURE 4 Symptoms of spot blotch disease on lentil plants during pathogenicity tests. **A.** oval necrotic lesions surrounded by chlorotic halo. **B.** Spot blotch development along the leaf. **C.** Healthy lentil leaf

sorokiniana was prepared from ten-day-old cultures and sprayed on leaves of healthy lentil plants. Control plants were treated with sterile distilled water. Afterwards, all plants were enclosed with polythene bags for two days and placed in a controlled greenhouse at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 14-hr photoperiod. Fifteen days after inoculation, small chlorotic lesions with a brown halo appeared. Thereafter, these lesions expanded into a large, elongated blotch along the leaves (Fig. 4a-b). These lesions were similar to those observed in the field. Control plants were asymptomatic. Koch's postulates were fulfilled by re-isolating the fungus from infected leaves; the re-isolated fungus had similar morphological characteristics to the isolates used as inoculum.

The fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* has been reported to have a wide host range, including wheat, barley and other cereals and grasses (Wiese, 1998). Lentil was previously reported as an experimental host of *B. sorokiniana* (Iftikhar *et al.*, 2009). To our knowledge this is the first report of *B. sorokiniana* naturally infecting and causing spot blotch of lentil in Algeria and worldwide (Farr & Rossman, 2021). This pathogen is a potential threat for legume and cereal production; therefore, further research should be conducted to study the distribution and the potential effect of this pathogen in Algeria. This finding will help to plan effective disease management strategies against spot blotch disease in Algeria.

ORCID

M. El Amine Kouadri <https://orcid.org/0000-0002-9969-3497>

A. Amine Bekkar <https://orcid.org/0000-0002-3896-1195>

REFERENCES

- Farr DF, Rossman AY, 2020. *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections*, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Accessed 8 January 2021.
- Iftikhar S, Asad S, Munir A, Sultan A, Ahmad I, 2009. Hosts of *Bipolaris sorokiniana*, the major pathogen of spot blotch of wheat in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 41, 1433–1436.
- Laskar RA, Khan S, Deb CR, Tomlekova N, Rafiq MW, Raina A, Amin R, 2019. Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Diversity, Cytogenetics and Breeding. In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D. eds. *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes*. Cham, Switzerland: Springer, 319–369. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3_9
- Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Hyde KD, 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79, 221–288. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- National Office of Statistics (Algeria), 2018. Agricultural Production 2017–2018. https://www.ons.dz/IMG/pdf/e.production_agricole2017-2018.pdf. Accessed 8 January 2021.
- Wiese MV, 1998. *Compendium of Wheat Diseases*. St. Paul, USA: APS Press, 112 pp.

How to cite this article: Kouadri, M. E. A., Bekkar, A. A., & Zaim, S. (2021) First report of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of lentil in Algeria. *New Dis Rep.* 43, e12009. <https://doi.org/10.1002/ndr.212009>



First report of *Macrophomina pseudophaseolina* infecting *Lens culinaris*

Mohamed El Amine Kouadri¹ · Souad Zaim¹ · Ahmed Amine Bekkar¹

Received: 24 May 2021 / Accepted: 21 September 2021 / Published online: 24 September 2021
© Australasian Plant Pathology Society Inc. 2021

Abstract

In 2019 and 2020, charcoal rot symptoms were observed on lentil plants in fields located in the Northwest of Algeria (Mascara Tiaret and Relizane). Based on morphological and molecular identification using the internal transcribed spacer (ITS) sequence analyses, two representative isolates were identified as *Macrophomina pseudophaseolina*. Pathogenicity tests were performed and Koch's postulates were verified and fulfilled. To our knowledge, this is the first report of *Macrophomina pseudophaseolina* as the causal agent of charcoal rot of lentil in the world.

Keywords Lentil · Charcoal rot · Dry rot

Lentil (*Lens culinaris*) is one of the world's major pulse crops. In Algeria, it is one of the most consumed legumes after faba bean, chickpea and peas (Tabti et al. 2018). Lentil has the potential to fix nitrogen biologically. It has been included in crop rotations with cereals for effective cultural control of weeds, diseases and pests by breaking up their life cycles (Kumar et al. 2013). It is a potential adapted crop for dry areas in North Africa, South Asia, Sub-Saharan Africa, West Asia, and North Africa (Kumar et al. 2013).

Field surveys were conducted during 2019 and 2020 in the agricultural areas where lentil (*Lens culinaris*) is grown in three regions of Northwestern Algeria: Mascara, Tiaret and Relizane. In the field, the characteristic symptoms of charcoal rot were observed on infected plants which showed leaf chlorosis, brown discoloration of stem and roots that eventually dried causing premature death of seedlings. When plants were examined, black and abundant microsclerotia were observed at the stem base and on roots (Fig. 1). To isolate the causal agent, small pieces of symptomatic roots and stems were surface disinfected with 2% w/v sodium hypochlorite solution for 3 min, after which they were washed with sterilized water 3 times. After subsequent drying between sterile filter papers they were cultured on potato

dextrose agar (PDA) medium and incubated at 28°C. All isolates were purified using the single hyphal tip method and observed with a light microscope for description of the morphology of the fungus. Pure cultures of fungal isolates were initially hyaline but turned to black over time. Masses of black, round to ovoid microsclerotia with an average size of 64µm formed on the culture 3 days after incubation. Pycnidiospores were produced in vitro by culturing the fungus on oatmeal agar medium and exposing the petri plates to UV light for 72h (Zhao et al. 2019). Pycnidiospores were numerous, small, single celled, hyaline and round or oval released from a rounded black pycnidium (Fig. 2). Morphological features of the isolates were typical of those of genus *Macrophomina* (Nouri et al. 2020). Voucher specimens of the isolates M1 and M2 were deposited at the phytopathological herbarium of Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA, ex. INA, Algiers, Algeria) under accession numbers Herbar INA 0101 and 0100 respectively.

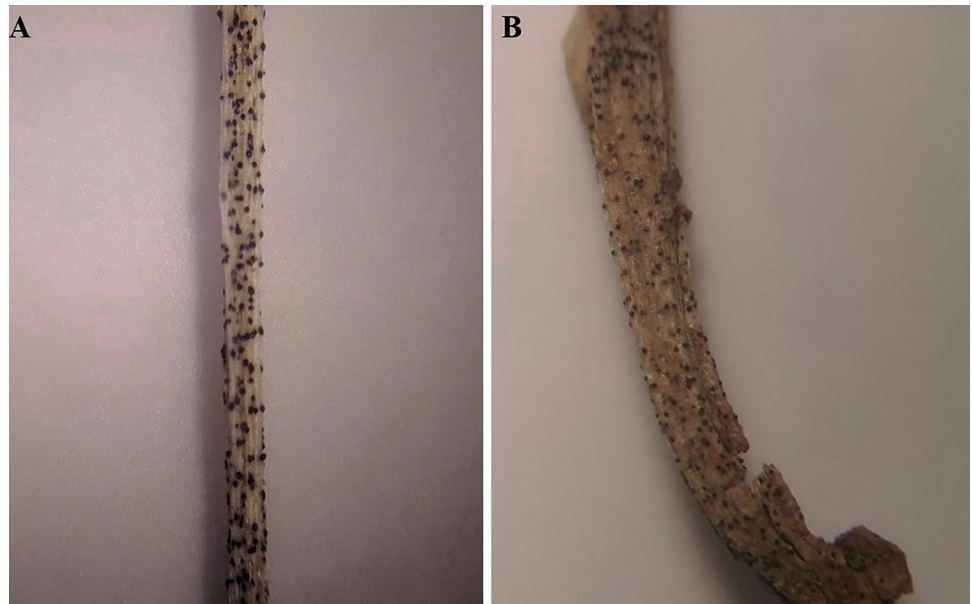
The identity of the isolates M1 and M2 was further confirmed by analysis of nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions amplified using the primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990). The nucleotide sequences obtained were submitted to GenBank with accession numbers MW422257 and MW420980. The BLASTn search with the ITS sequences of isolates M1 and M2 showed 100% similarity with the sequence of *Macrophomina pseudophaseolina* ex-type strain CPC 21394 (KF951786).

Pathogenicity tests were conducted in triplicate three times using two methods. First, for the seed infestation method lentil seeds were soaked in microsclerotia

✉ Mohamed El Amine Kouadri
melamine.kouadri@univ-mascara.dz

¹ Laboratory of Research On Biological Systems and Geomatics (L.R.S.B.G), Department of Agronomy, Faculty of Life and Natural Sciences, University of Mustapha Stambouli Mascara, Mascara, Algeria

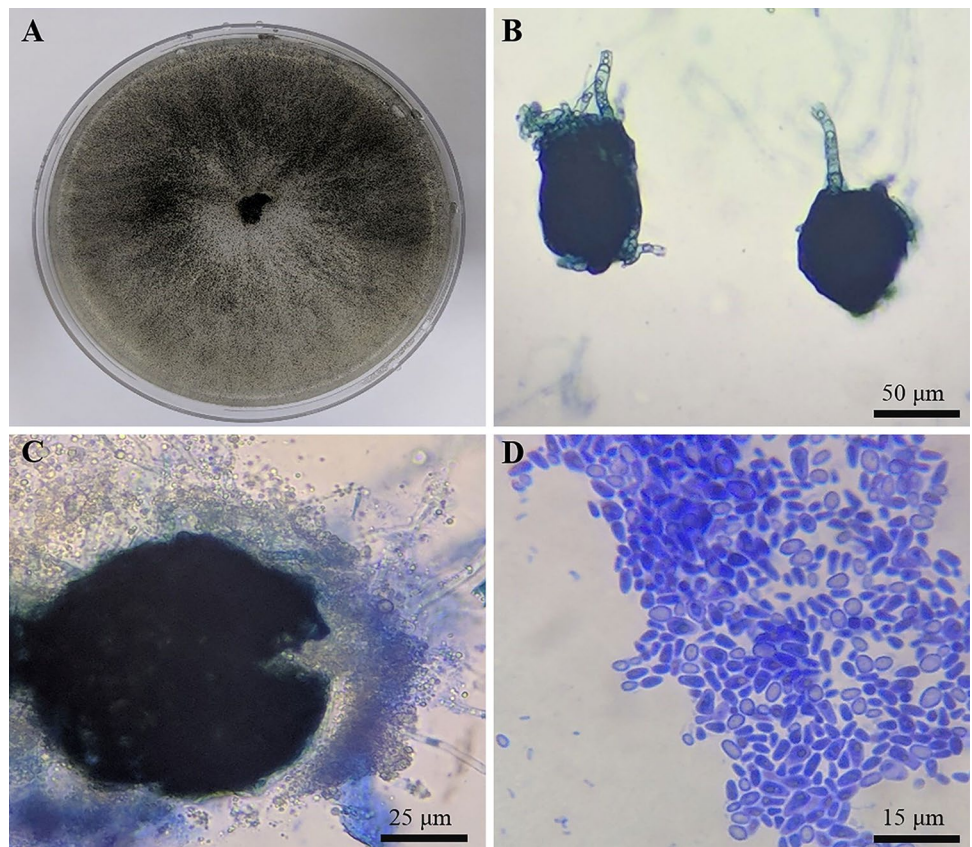
Fig. 1 Charcoal rot symptoms observed on lentil plants (A) Stem base (B) Root



suspension (10^4 ml^{-1}) for one hour and then transferred to 7 cm diameter pots containing sterile soil (Khanzada et al. 2012). Second, 60 ml of microsclerotia suspension (10^4 ml^{-1}) was poured into pots containing 10 days old lentil plants (Ullah et al. 2019). Control plants were treated with sterile distilled water. All plants were maintained in a greenhouse

at 28°C. Charcoal rot symptoms were observed on all inoculated plants, similar to those observed in the field, after 16 and 20 days respectively for the two methods, but no symptoms were seen on control plants. The infected plants were later collected and the pathogenic fungi were reisolated to fulfill Koch's postulates.

Fig. 2 Morphological characteristics of *Macrophomina pseudophaseolina* (A) Culture grown on potato dextrose agar (B) Microsclerotia (C) Pycnidiospores released from pycnidium (D) Pycnidiospores



Macrophomina pseudophaseolina was first detected in Senegal (Sarr et al. 2014). It has been reported on 10 hosts, including two legumes; cowpea (*Vigna unguiculata*) and peanut (*Arachis hypogaea*) (Farr and Rossman 2021). In Algeria, this is the first report of *M. pseudophaseolina* on any crops. To our knowledge, this is the first report of *M. pseudophaseolina* causing charcoal rot on lentil plants in the world.

References

- Farr DF, Rossman AY (2021) Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Retrieved May 22, 2021
- Khanzada AM, Lodhi AM, Shah N, Maitlo SA (2012) Effect of different inoculation methods and inoculum levels of *Macrophomina phaseolina* on okra. *Int J Phytopathol* 1:01–05. <https://doi.org/10.33687/phytopath.001.01.0009>
- Kumar J, Srivastva E, Singh M (2013) Genetics of early growth vigour in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *J Genet* 92:323–326. <https://doi.org/10.1007/s12041-013-0257-8>
- Nouri MT, Lawrence DP, Kallsen CE, Trouillas FP (2020) *Macrophomina* crown and root rot of pistachio in California. *Plants* 9(2):134
- Sarr MP, Ndiaye M, Groenewald JZ, and Crous P W (2014) Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathol Medit* 53(2):250–268. (53208)
- Tabti DM, Laouar K, Rajendran S, Kumar A, Abdelguerfi A (2018) Identification of desirable mutants in quantitative traits of lentil at early (M_2) generation. *J Environ Biol* 39:137–142. <https://doi.org/10.22438/jeb/39/2/MRN-476>
- Ullah N, Akhtar KP, Asghar MJ (2019) Abbas G (2019) First report of *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of lentil in Pakistan. *J Plant Pathol* 101:429. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00202-5>
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes form phylogenetics. In: Innis MA, Gelfrand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Zhao X, Ni Y, Liu X, Zhao H, Wang J, Chen YC, Chen W, Liu H (2019) A simple and effective technique for production of pycnidia and pycnidiospores by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis* 104:1183–1187. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1795-RE>

RESEARCH

Open Access



First report of using *Trichoderma longibrachiatum* as a biocontrol agent against *Macrophomina pseudophaseolina* causing charcoal rot disease of lentil in Algeria

Mohamed El Amine Kouadri^{*} , Ahmed Amine Bekkar and Souad Zaim

Abstract

Background Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is one of the major pulse crops in the world. The present study aimed to evaluate the effect of *Trichoderma* isolates to control the charcoal rot disease caused by *Macrophomina pseudophaseolina* recently reported on lentil plants.

Results In this study, antagonistic effects of seven isolates of *Trichoderma* spp. isolated from the rhizosphere of lentil were evaluated in vitro against *Macrophomina pseudophaseolina* M1. All isolates of *Trichoderma* significantly reduced the mycelial growth of M1 in vitro. Maximum reduction of the pathogen growth was observed at T10 (72.53%), followed by T5 (63.7%) and T6 (62.88%), while T2 caused the minimum reduction (37.33%). Likewise, *Trichoderma* isolates significantly reduced the size and number microsclerotia. M1 produced the minimum number of microsclerotia in the presence of T10, followed by T1 causing reduction of 68.56 and 53.37% over control, respectively. The maximum reduction of microsclerotia's size was observed in the presence of T10 (54.92%), followed by T1 (49.84) and T8 (48.68%). Results also revealed that production of volatile metabolite, components and inhibition of the test pathogen by volatile metabolites varied among different antagonistic *Trichoderma*. T1 produced the most volatile compounds, followed by T2 and T3 and T10 causing mycelial growth inhibition of 41.66, 33.88, 30.55 and 30.37%, respectively. The efficacy of the antagonistic biocontrol agents on charcoal rot was evaluated in vivo. Seed treatment with T10 significantly protected lentil seedlings from *M. pseudophaseolina* as compared to untreated plants and also improved their growth. T10 isolate was identified based on molecular tools, using internal transcribed spaces and Translation elongation factor of ribosomal DNA. The results identified T10 as *Trichoderma longibrachiatum* with accession number MW818102 and OK500004 deposited in NCBI GenBank database.

Conclusion The study revealed the first report of using *Trichoderma longibrachiatum* as a promising biological agent against *M. pseudophaseolina* causing charcoal rot disease of lentil.

Keywords *Lens culinaris*, *Trichoderma longibrachiatum*, Charcoal rot, *Macrophomina pseudophaseolina*, Biocontrol

*Correspondence:

Mohamed El Amine Kouadri
melamine.kouadri@univ-mascara.dz
Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics (L.R.S.B.G),
Department of Agronomy, Faculty of Life and Natural Sciences, University
Mustapha Stambouli of Mascara, Mascara, Algeria

Background

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is one of the world's most important and the oldest legume, having been cultivated for over 7000 years (McVicar et al. 2010). Its seeds are rich of protein and micronutrients for human and animal diets (Laskar et al. 2019). This plant has been cultivated for its capacity to fix nitrogen naturally where included

in crop rotations with cereals for effective cultural control of pests, diseases and weeds, by breaking up their life cycles (Kumar 2013). In Algeria, lentil is one of the most cultivated legumes after faba bean and chickpea (FAOstat 2019). However, it is often affected by several constraints, including biotic and abiotic factors. Fungal pathogens are major factors that limit its overall yield and seeds quality such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* causing Fusarium wilt disease, *Ascochyta lentis* responsible for ascochyta blight disease and *Uromyces viciae-fabae*, the causal agent of rust disease (Kouadri et al. 2021a).

In recent years, several new diseases were identified on lentil plants including; spot blotch and charcoal rot caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Macrophomina phaseolina*. *Macrophomina phaseolina* is a fungus that incites charcoal rot disease. It has the widest host range as phytopathogenic fungus with more than 882 cultivated and wild plants including legumes and cereals (Farr and Rossman 2022). *M. phaseolina* is a soil and seed-borne pathogen that affects plants at all stages of development, from seedling to maturity (Purkayastha et al. 2006). The characteristic symptoms of charcoal rot are dryness of stem and roots, yellowing of leaves, and a black mass appearance of microsclerotia on stems and roots. *M. phaseolina* affects plants by secreting a number of cell wall degrading enzymes, including pectinases, xylanases, cellulases, and proteases (Javaid and Saddique 2012). In severe infection, plants eventually die from exposure to phaseoline toxin, along with vascular obstruction by fungal mycelium (Bhattacharya et al. 1994).

Recently, four new species of the genus *Macrophomina* were identified such as *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbicola*, *M. vaccini* and *M. tecta* (Poudel et al. 2021). In 2020, *M. pseudophaseolina* was reported for the first time in Algeria as a new pathogen of lentil plants causing charcoal rot disease (Kouadri et al. 2021b). Control of charcoal rot disease has become difficult due to the long-term persistence of microsclerotia in soil and plant residues, pathogen's large host range, and lack of resistant cultivars; it is mainly managed by chemical fungicides (Iqbal and Mukhtar 2020a). Although chemical fungicides provide rapid and efficient protection against plant pathogens, their intensive application poses a serious threat to human health, environment and soil beneficial organisms (Aktar et al. 2009). However, the use of the same fungicides for the same pathogen leads to the development of resistant strains of the pathogens. Therefore, the researcher's efforts were focused on developing alternative eco-friendly disease control strategies, including the use of biological control agents such as *Trichoderma* bioagent. *Trichoderma* (teleomorph *Hypocrea*) fungi has long been used as a biocontrol agent against fungal plant

pathogens (Atalla et al. 2020). *Trichoderma* spp. inhibit the pathogen's activity through various mechanisms such as nutrient competition, hydrolytic enzymes, antibiotic production, plant growth promotion and defense response activation (Pal and Gardener 2006).

This study aimed to assess the efficacy of different isolates of *Trichoderma* as a biocontrol agent against *M. pseudophaseolina* in vitro and under greenhouse conditions for the control of charcoal rot disease of lentil.

Methods

Fungal material

Pathogen

In the present study, one isolate of *M. pseudophaseolina* M1 (MW422257, OK500004) causing charcoal rot was obtained from lentil (*Lens culinaris* Medik) from Relizane (Algeria) and was deposited at the phytopathological herbarium of the Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA, ex. INA, Algiers, Algeria) (Kouadri et al. 2021b). The isolate was stored on potato dextrose agar (PDA, Difco) at 4 °C. Prior to use, it was maintained and grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C in darkness for 7 days.

Antagonists

Seven isolates of *Trichoderma* spp. were isolated from rhizosphere soils of healthy lentil plants collected from the northwest region of Algeria (Tiaret) during the period from 2019 to 2020, in order to be used as natural biocontrol agents. The samples were placed in polyethylene bags, closed tightly, and stored in a refrigerator at 4 °C until needed. Isolation of fungal antagonists was performed using a soil dilution plate method as described by Aneja (2003). One gram of dried soil samples was suspended in 9 ml sterile distilled water, agitated for 1 min. The suspension was subsequently diluted from 10^{-1} to 10^{-7} . The 0.1 ml soil dilutions of 10^{-3} to 10^{-7} were separately plated on potato dextrose agar (PDA) medium, in triplicate. The plates were then incubated at 25 °C for 3 days. After incubation, representative colonies with typical characteristics and morphological appearances of *Trichoderma* were selected and re-streaked on a new plate containing the same medium, to obtain pure colonies. Subsequently, the isolates were stored on PDA at 4 °C for until use.

Plant material

Lentil cultivar (Syrie 229), used in this experiment (in vivo), is a widely grown cultivar in Algeria and provided by the Algerian Office of Cereals.

Evaluation of antagonistic activity of *Trichoderma* isolates on mycelial growth of *M. pseudophaseolina* in vitro

Dual culture

In vitro inhibition of mycelial growth of *M. pseudophaseolina* (M1) by the *Trichoderma* isolates was tested using the dual culture technique described by Sivan and Chet (1989). A mycelial disc (5 mm) of 7-day-old culture from *M. pseudophaseolina* (M1) was placed in a Petri plate (90 mm diameter). At the opposite side of the Petri plate, a disc of *Trichoderma* (5 mm) of each isolate was placed separately with 3 cm of distance on a PDA medium for 5 days at 25 ± 1 °C. In control plates, the mycelial disc of test pathogen was put in the middle of the Petri plates. The experiment was repeated three times. After five days, the percentages of pathogen growth inhibition were calculated according to the following formula:

$$GI (\%) = (C - T)/C \times 100$$

Where: GI = Growth inhibition (%); C: radial growth of the pathogen in the control; T: radial growth of the pathogen in dual culture (with the antagonist).

After 2–6 days of incubation, the interface region was observed under light microscope. The effect of *Trichoderma* spp. on microsclerotia production was evaluated by counting the number of microsclerotia. The size of microsclerotia was measured using an ocular micrometer after calibration. The averages of 40 microsclerotia from each treatment were taken to calculate their size.

Fungal growth inhibition by *Trichoderma* volatile metabolites

Radial growth inhibition of the pathogen through the release of volatile substances was measured, following the method of Dennis and Webster (1971). Briefly, mycelial plug of 5 mm ϕ of each *Trichoderma* isolate was placed at the center of plate containing PDA. Then, the lid was replaced by another PDA plate with an *M. pseudophaseolina* mycelial plug of 5 mm ϕ at the center. The two plates were sealed together with parafilm and incubated at 25 °C for 5 days, registering mycelium growth every 24 h. As control, a non-inoculated PDA plate was used as a cover. Each test was replicated three times. Radial growth inhibition mycelial was calculated as describe previously in dual culture.

Efficacy of *Trichoderma* isolates on lentil charcoal rot in vivo

Fungal pathogen inoculum preparation

The pathogenic fungal of *M. pseudophaseolina* (M1) was used as a target pathogen in this experiment. The microsclerotia suspension was prepared by incubating the pathogenic fungal in potato dextrose agar (PDA) at

28 ± 2 °C for 7 days. The spore suspension was prepared by removing the microsclerotia from the culture edges and adding 5 ml of sterile distilled water for better separation. The suspension was filtered through two layers of sterile cheesecloth, subsequently, was determined to 10^4 microsclerotia/ml (Khanzada et al. 2012).

Trichoderma inoculum preparation

Trichoderma isolate (T10) was selected as the best and efficient antagonist in this experiment. T10 was grown on PDA plates at 25 °C till the colonies became green. Then, conidial concentration was adjusted to 10^8 conidia/ml with sterile distilled water (Zaim et al. 2018).

Pot experiment and seed treatment procedure

A pot experiment was conducted in 2019 and 2020 to evaluate the performance of *Trichoderma* as a biocontrol agent against *M. pseudophaseolina*. Four treatments and three replicates were done. Lentil seeds (cultivar Syrie 229) were surface sterilized with 1% sodium hypochlorite for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water than dried. Each three lentil seeds were sowed in a 7 cm diameter sterilized plastic pot, filled 2/3 full with a sterilized soil mixture and peat (V/V). Sterilization was done at 120 °C for 1 h three times in three days.

The experiment included the following preparations:

Preparation 1 including the non-inoculated control, the seeds were immersed in sterile distilled water without fungal inoculum.

Preparation 2 seeds were immersed only in *M. microsclerotia* suspension (with pathogen and no *Trichoderma*).

Preparation 3 including seeds treated with *Trichoderma* and inoculated with *M. microsclerotia* suspension (with *Trichoderma* and pathogen).

Preparation 4 containing separately immersed seeds in conidial suspension of the *Trichoderma* isolate but without *M. microsclerotia* of the pathogen (*Trichoderma* + no pathogen).

Pots were distributed in a completely randomized block design with three replicates per treatment and kept under observation of Charcoal-rot symptoms for 5 weeks compared with the control pots. After 40 days of culture, 5 plants per treatment and control were analyzed. Dry and fresh weight of the aerial part and roots were determined.

Disease assessment

The charcoal rot disease severity (DS) of infection and colonization was assessed as described by Lamini et al. (2020). After 40 days of inoculation, charcoal rot disease symptoms on lentil plants were assessed using disease rating scale from 0 to 5 based on the level of infection and *M. microsclerotia* presence and

abundance observed in stem, root tissues, where 0: no symptoms on plants, 1: minor root infection with few *microsclerotia*, 2: 30% of root tissue showing lesions, 3: extensive lesions on roots and lower area of stem 4: most of the roots are affected, with high number of *microsclerotia* on stem and roots, 5: severe infection with plant mortality. Stem colonization results in a considerable amount of *microsclerotia* produced in the stem. It was measured according to the distance between the collar and the last *microsclerotia* appearing on the stem.

Disease incidence (DI) was assessed, using the following formula (Lamini et al. 2020):

$$DI\% = \frac{\text{Number of infected plants}}{\text{Totale number of plants}} \times 100$$

The experiments were conducted using completely randomized block designs.

Molecular identification and phylogenetic analysis of efficient antagonistic *Trichoderma* T10

For DNA extraction, fungal isolate T10 was cultivated on PDA (slants) at 25 °C for 7 days. The total genomic DNA was extracted from T10 isolate, using the following protocol of the NucleoSpin® Food commercial kit from Macherey Nagel (Germany). An ITS and TEF regions of the 5.8S rDNA gene were amplified by PCR with universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') and EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (White et al. 1990; Carbone and Kohn 1999; Elsehemy et al. 2020), in a IcyclerdeBiorad type thermocycler (Thermal Cycler) (Biorad, USA).

A total volume of 25 µl containing 2 µl of T10 genomic DNA, 10 µM of each of the primers indicated above and five units of Taq polymerase (Solis Biodyn) was used to perform the PCR. Conditions for PCR amplification were initial denaturation of 1 cycle at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 45 s; final extension step at 72 °C for 7 min. The amplified products were revealed after electrophoresis on 1.5% agarose gel and purified by Wizard® SV Gel kit and Promega's PCR Clean-Up System. The amplifiers b sequenced by Applied Biosystems Big Dye v3.1 kit and PCR primers used for amplification. The sequences obtained were analyzed and cleaned using the CHROMAS PRO software, and then identified by BLAST Program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast). Also, a phylogenetic tree was constructed using MEGA X software with Neighbor-joining method based on 1000 bootstrap replicates (Kumar et al. 2018).

Statistical analysis

Collected data from in vitro and in vivo assays were analyzed by statistical variance (ANOVA), using SPSS software (Statistical Package for Social Science) and the treatments were compared by Tukey's test ($p < 0.05$). Each treatment consisted of three replicates. The experiment was conducted in a completely randomized design.

Results

Morphological and molecular identification of *Trichoderma longibrachiatum*

A total of seven *Trichoderma* isolates were obtained, by dilution isolation technique, from rhizosphere samples of lentil. Colony morphology and morphological features of the isolates typically resembled those of the genus *Trichoderma*. The T10 was the isolate that had the most important activity antagonist against *M. pseudophaseolina*, was selected for morphological observations and characterization by ITS and TEF sequences analysis.

T. longibrachiatum produces yellowish green pigmentation at the bottom of the culture plate. The phialids are solitary. The conidia are smooth and ellipsoid (Fig. 1). Chlamydo spores are common, terminal or intercalated. The amplification of DNA region with ITS1-ITS4 and TEF1-α primers was successfully used to identify T10. A BLAST search of the obtained sequence revealed 99.83% and 100% similarity with several *T. longibrachiatum* isolates (MF102214, KY764833, MW193401) and (MF782844, MT881880, MN195113) for ITS and TEF sequences, respectively. A phylogenetic tree built for TEF region sequences with other *Trichoderma* spp. showed that the T10 isolate was clustered with *T. longibrachiatum* with a high bootstrap value (Fig. 2). T10 was identified as *T. longibrachiatum* and the sequence was deposited in NCBI GenBank under accession number MW818102 and OK500004 for ITS and TEE, respectively.

Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *M. pseudophaseolina*

The results of the in vitro antagonistic activity determined by dual culture revealed that from 2 to 6 days after incubation, all isolates of *Trichoderma* were increasingly effective in inhibiting the mycelial growth of *M. pseudophaseolina* M1. Table 1 shows the percentage of radial growth inhibition by the different *Trichoderma* isolates against *M. pseudophaseolina* M1. All isolates of *Trichoderma* reduced the mycelial growth of M1 from 37.33 to 72.53%. T10, T5, T6, and T1 isolates were the most effective in vitro, inhibiting M1 growth by more than 50%. The highest inhibitory effect was noted in the isolate T10, in

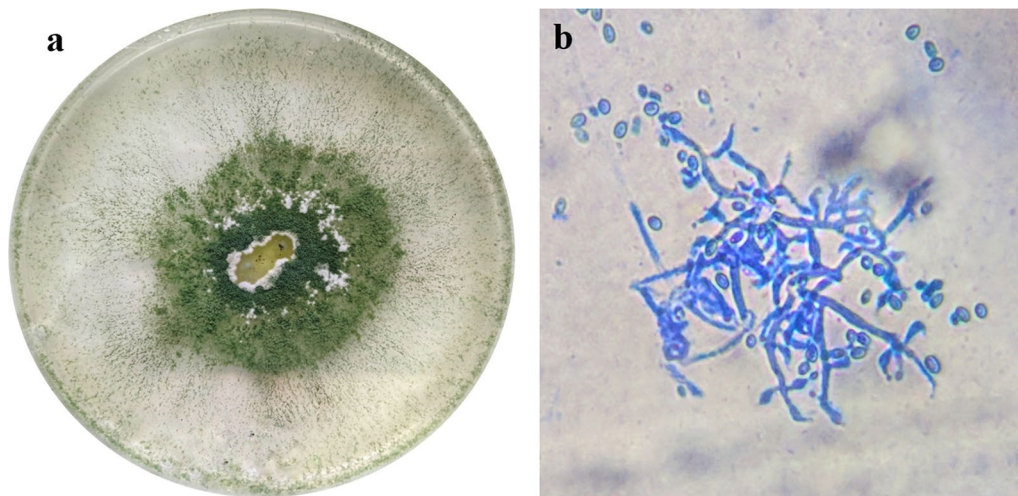


Fig. 1 Morphology of *Trichoderma longibrachiatum* (T10) **a** colony on PDA after 4 days, **b** microscopic observation of the fungus showing phialides and conidia

contrast to the isolate T2 showed the lowest inhibitory effect. After 10 days of incubation, the colony of *M. pseudophaseolina* was totally invaded by *T. longibrachiatum* (T10) with intense sporulation (Fig. 3c). In addition to mycelial growth, the number and size of microsclerotia were also affected by *Trichoderma* isolates. The control treatment showed the highest mycelium density and most branched hyphae (Fig. 3a). M1 produced a minimal number of *microsclerotia* in the presence of T10, followed by T1, causing 68.56 and 53.37% reduction, respectively over the control. On the other hand, T2 caused the minimum reductions of *microsclerotia* production, followed by T6, resulting in 28.59 and 32.85% reductions, respectively, over the control (Fig. 4a). Moreover, the isolates of *Trichoderma* spp. can significantly reduce the *microsclerotia* size of *M. pseudophaseolina*. The highest reduction in size of *microsclerotia* was caused by T10, while T6 caused the lowest reduction in size (Fig. 4b).

The effect of volatile compounds on *M. pseudophaseolina* was evaluated to determine the mechanisms used by *Trichoderma* isolates. As presented in Table 1, all *Trichoderma* isolates have the capacity to produce volatile substances that inhibit the mycelial growth of *M. pseudophaseolina*. In comparison to the controls, T1 is the most isolate inhibitor of M1 mycelial growth by volatile compounds, followed by T2, T3 and T10. The inhibition rate varied from 11.11 to 41.66%. *T. longibrachiatum* (T10) isolate had the greatest antifungal activity against *M. pseudophaseolina* than the other *Trichoderma* spp. (Table 1). That is why this isolate was selected for further experiments in vivo.

Efficacy of *T. longibrachiatum* against *M. pseudophaseolina* under greenhouse experiment

Biocontrol efficacy of *T. longibrachiatum* T10 was evaluated in the greenhouse whose seeds were inoculated with *M. pseudophaseolina* M1 and treated with T10 (Table 2).

Typical symptoms of charcoal rot were noticed in treatments with the pathogen (Fig. 5b). Seedlings of Syria 229 cultivar showing chlorotic foliage, dry stem, and roots. On the other hand, no symptoms were observed on roots and stems when treated with *Trichoderma* and inoculated with the pathogen (Fig. 5a). The stem colonizing of M1 isolates was recorded at 24%. Figure 5b shows the colonization of lentil stem inoculated with M1 after 21 days. The *microsclerotia* clearly developed externally to the stem. No disease was noticed in 40 day-old control plants; whereas 91.7% reduction in disease incidence was recorded in the plants inoculated with M1 *M. pseudophaseolina* and treated *T. longibrachiatum* T10 as compared to the plants inoculated only with M1.

As shown in Table 2, a significant effect of the treatment on the charcoal rot disease incidence (DI) and severity (DS) at 40 days after sowing was recorded. In all seedlings, DI and DS were significantly reduced through the action of seed treated with T10. In fact, the treatment induced a significant decrease in the disease incidence DI values. Meanwhile, the DS values were significantly reduced to 82%. Disease severity score of lentil plants recorded 40 days after the sown has been compiled in (Table 2). Seeds inoculated with *M. pseudophaseolina* M1 exhibited the highest severity scores (5). Minimum disease severity with 0.9 scores was observed when T10 was applied (significant at $p \leq 0.05$).

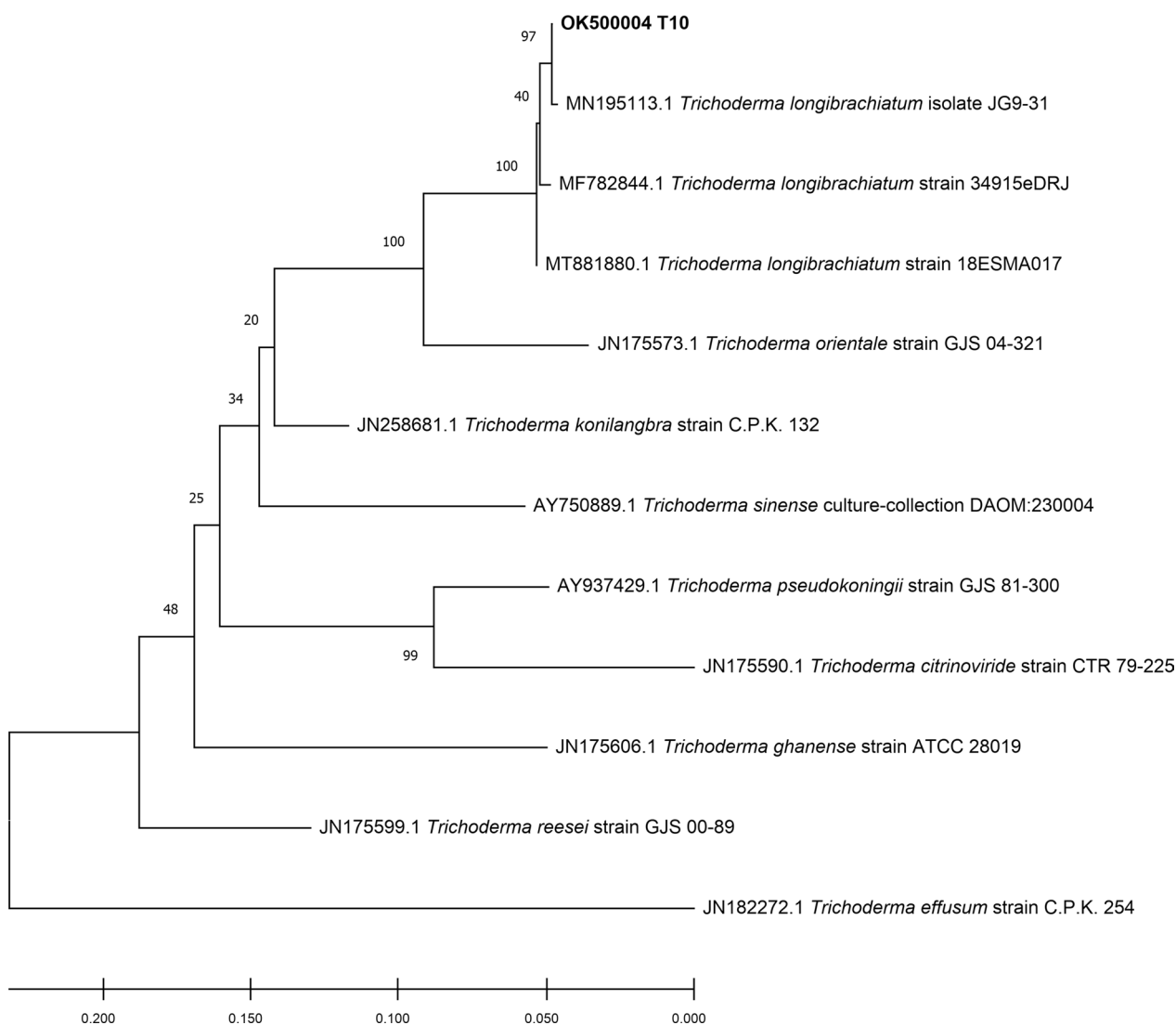


Fig. 2 Phylogenetic tree of the *Trichoderma* spp. inferred by Neighbor Joining method of TEF1-α sequence. The bootstrap values from 1000 replication are indicated on the branches

Table 1 In vitro effect of *Trichoderma* isolates on *Macrophomina pseudophaseolina* growth

Treatments	Radial growth inhibition percentage (%)		Number of <i>microsclerotia</i>	Size of <i>microsclerotia</i> (µm)
	Dual culture	Volatile compounds		
M ₁ + T ₁	61.07 ^{ab}	41.66 ^a	87.5 ± 0.7 ^{ab}	39.49 ± 8.52 ^a
M ₁ + T ₂	37.33 ^c	33.88 ^b	134 ± 2.82 ^b	46.66 ± 4.9 ^{bcd}
M ₁ + T ₃	48.62 ^{bc}	30.55 ^b	98 ± 24.04 ^{ab}	41.24 ± 4.95 ^{abc}
M ₁ + T ₅	63.7 ^{ab}	27.77 ^{bc}	105 ± 14.84 ^{ab}	47.91 ± 5.18 ^{cd}
M ₁ + T ₆	62.88 ^{ab}	11.11 ^d	126 ± 30.40 ^{ab}	49.5 ± 4.05 ^d
M ₁ + T ₈	57.14 ^{abc}	22.59 ^c	111.5 ± 21.92 ^{ab}	40.41 ± 8.8 ^{ab}
M ₁ + T ₁₀	72.53 ^a	30.37 ^b	59 ± 11.31 ^a	35.49 ± 5.27 ^a
Control	/	/	187.66 ± 7.5 ^c	64.41 ± 10.82 ^e

Data shown (mean ± SD) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$)

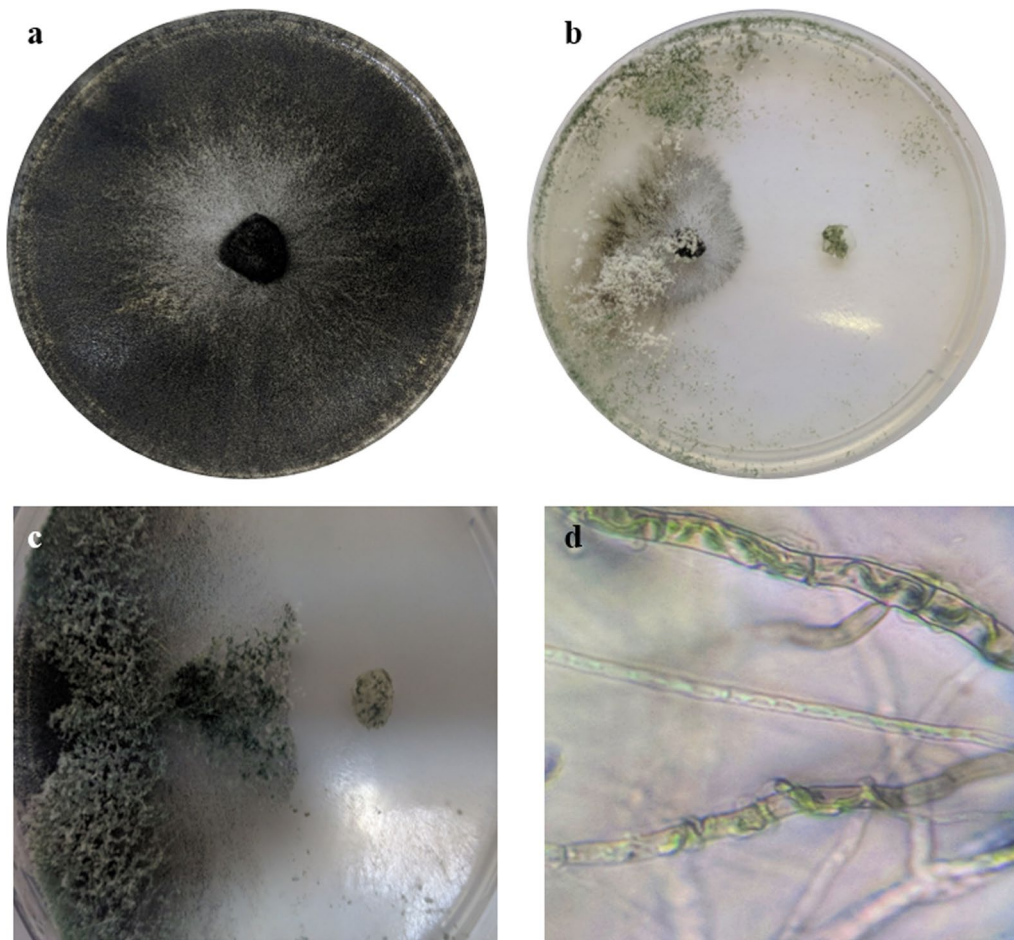


Fig. 3 Direct in vitro confrontation between *Trichoderma longibrachiatum* (T10) and *Macrophomina pseudophaseolina* (M1). **a** Colony of isolate M1 on PDA after 7 days of incubation. **b** Direct confrontation between T10 and M1. **c** Invasion of *M. pseudophaseolina* colony by *T. longibrachiatum* after 10 days. **d** Microscopic observation showing coiling hypha of *T. longibrachiatum* on *M. pseudophaseolina*

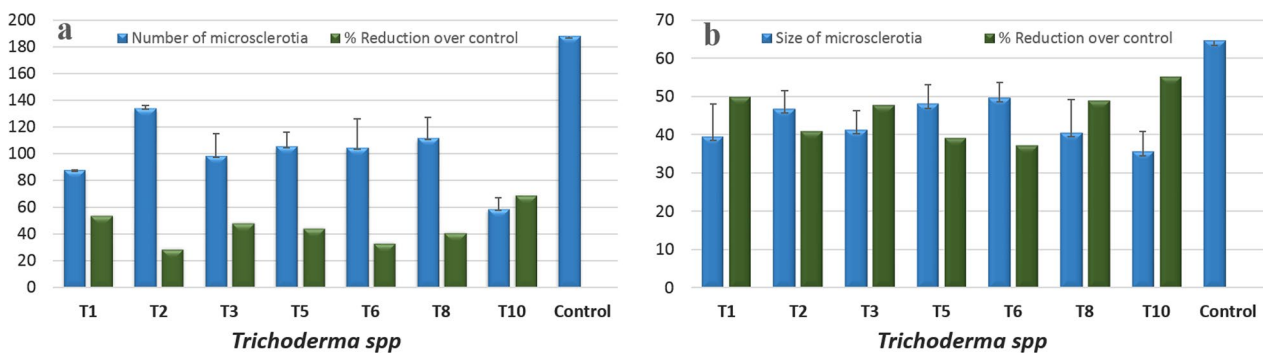


Fig. 4 Effect of *Trichoderma* isolate on number and size of microsclerotia of *Macrophomina pseudophaseolina*

Growth response measurement of lentil plants

Root alteration of plants lentil as a result of charcoal rot infection affect the root's ability to function properly, resulting in stunted growth and death of seedlings in the

severe infection. In light of these changes, it is important to measure the stem and root length, fresh and dry weight of the infected and treated lentil plants in order to determine the degree of damage caused by this disease

Table 2 Effect of *Trichoderma longibrachiatum* on charcoal rot disease of lentil, and plant growth parameters under greenhouse conditions

Treatments	Disease incidence (%)	Stem colonization (%)	Severity	Growth parameters			
				Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Stem length (cm)	Root length (cm)
M1	100	24	5 ± 0.00	0.1 ± 0.00 ^c	0.04 ± 0.002 ^c	16 ± 0.4 ^c	4 ± 0.00 ^d
M1 + T10	8.3	0	0.9 ± 0.264	1.5 ± 0.07 ^b	0.2 ± 0.03 ^b	17 ± 0.9 ^{bc}	19.8 ± 0.197 ^c
T10	/	/	/	1.8 ± 0.048 ^a	0.34 ± 0.003 ^a	20 ± 1.0 ^a	24.6 ± 0.01 ^a
Control	/	/	/	1.7 ± 0.012 ^a	0.22 ± 0.005 ^b	18 ± 0.5 ^b	21.2 ± 0.4 ^b

Data shown (mean ± Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$)



Fig. 5 Biocontrol efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* species against *Macrophomina pseudophaseolina* under greenhouse conditions. **a** In vivo test, **b** symptoms of charcoal rot (chlorotic foliage) on lentil plant, **c** colonization of lentil stem by the pathogen's microsclerotia

and the impact of the biocontrol agent on growth parameters. Lentil plant growth was measured 40 days after *T. longibrachiatum* T10 inoculation. The results pertaining to the efficacy of T10 in disease suppression and plant growth enhancement against the charcoal rot disease of lentil have been compiled in (Table 2). In contrast to

untreated plants, the use of T10 with or without M1 significantly ($p \leq 0.05$) enhanced the plant growth parameters. Compared to the un-inoculated control, infection by M1 caused significant decreases in plant height (16 cm), root length (14.76 cm), fresh and dry weights (0.1 and 0.04 g/plant, respectively) (Table 2). The seedling

growth parameters were significantly increased ($p < 0.05$) in plants colonized by *T. longibrachiatum* T10 as compared to untreated seedlings (Table 2). Accordingly, T10 increased the stem and root length by 11.11 and 16.03%, respectively, and fresh and dry weights by 5.88 and 54.54%, respectively.

Discussions

M. pseudophaseolina was first detected on lentil in Algeria in 2021 (Kouadri et al. 2021b). In order to fight against this pathogen, several control methods have been used (Marquez et al. 2021). Therefore, its biocontrol by antagonistic agents such as *Trichoderma* allows less reliance on chemical pesticides, are commonly employed to control plant pathogens (Topolovec-Pintarić 2019). The use of native isolates in biological control is a crucial factor because they contribute to the balance of agro-systems, while expressing the desired agronomic characteristics such as phytoprotection and phytostimulation of cultivated plants (Zin and Badaluddin 2020). *Trichoderma* isolates used in the present study are indigenous isolated from the rhizosphere of healthy lentils.

Vinale et al. (2008) have demonstrated that hyperparasitism is connected with the direct contact of an antagonist with a pathogen and is composed of such stages as: pathogen recognition, attack, gradual penetration of the pathogen cells and death.

The present results demonstrated that *T. longibrachiatum* was the most effective and antagonistic against *M. pseudophaseolina*. The ability of *Trichoderma* spp. to overgrow and degrade pathogen mycelia with an inhibition in *microsclerotia* production was positively correlated with *M. pseudophaseolina* growth inhibitions during antagonism. The significant antagonistic property of *Trichoderma* against *Macrophomina* sp. has been reported by many workers (Bastakoti et al. 2017). Sridharan et al. (2020) reported that the antagonistic activity of *T. longibrachiatum* caused an inhibition in *microsclerotia* production of *Macrophomina* sp.

In dual culture plate tests or through the production of volatile compounds, *Trichoderma* isolates showed a significant inhibition of *Macrophomina* sp. growth. Sridharan et al. (2020) demonstrated that antibiosis via microbial volatile organic compounds (mVOCs) was observed in addition to inhibiting the growth of *M. phaseolina* during a direct interaction with *T. longibrachiatum*. These mVOCs reduce *M. phaseolina* mycelial growth by altering the mycelial structure.

Sharma and Sankaran (1988) reported that the fast growth rate of *T. longibrachiatum* is characteristic of a promising antagonist. According to Sobowale et al. (2010), *T. longibrachiatum* has a fast and high sporulation rate, which allows it to cover more space per time on

a Petri plate; it was also suggested that the competition for nutrients and space is part of inhibition mode of the pathogen.

The activity of *Trichoderma* isolates in inhibiting *M. pseudophaseolina* growth is attributed to mycoparasitic activity and production of active compounds, including antibiotics and/or lytic enzymes (Zaim et al. 2018). Many studies have demonstrated that *Trichoderma* spp. produces a variety of secondary metabolites, some of which are toxic to the pathogens and enzyme production, including chitinases, proteases and glucanases (Gajera and Vakharia 2012). *Trichoderma* species are also capable of producing cell wall degrading enzymes, such as cellulase, xylanase, pectinase, glucanase, lipase, amylase, arabinase, and protease (Strakowska et al. 2014), as well as many volatile metabolites, such as 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP).

Trichoderma species are also capable of producing a wide range of volatile secondary metabolites such as alcohols, ketones, alkanes, furanes and pyrone 6-PP (6-n-pentyl-2H-pyran-2-one) which can interfere with various biological processes such as biocontrol and plant growth promotion (Garnica-Vergara et al. 2016). Vinale et al. (2008) reported that 6-PP is one of the major volatile organic compounds VOCs, which has antimicrobial activity at high concentrations and can be involved in plant–fungus signaling leading to the activation of plant defense mechanisms and the regulation of plant growth in tomato, pea, and canola.

Following interaction with *Trichoderma* isolates, damage on the *Macrophomina* (M1) *microsclerotia* was observed. *Trichoderma* spp. had the ability to reduce the number and size of *microsclerotia*. Similar results were reported for *Trichoderma* species having a significant effect on reducing *Macrophomina phaseolina* *microsclerotia* size and number (Iqbal and Mukhtar 2020b). Previous published studies gave an evidence that the rhizospheric *Trichoderma* have been isolated and tested for their antagonistic effects against *Macrophomina* spp. Several isolates were quite effective in reducing disease incidence and promoting host plant growth traits (Martínez-Salgado et al. 2021).

In most of the earlier studies, *Trichoderma* mediated plant growth promotion has been attributed to indirect mechanisms viz. control of plant pathogens and induced resistance. The results presented here also demonstrated a significant increase in growth of lentil plants for each of the parameters; plant height, fresh and dry weight, under greenhouse condition.

T. longibrachiatum T10 isolate was selected to be applied in the greenhouse conditions as it recorded the highest inhibition rate accompanied with reduction in size and number of *microsclerotia*. The obtained results

clearly showed that seed treatment with *T. longibrachiatum* reduced the incidence of charcoal rot disease and improved lentil plant growth parameters. In addition, plants treated with T10 had higher length and weight of stem and root than other treatments. Several reports indicated that *Trichoderma* species can effectively suppress charcoal rot caused by *M. phaseolina* on different plants such as soybean and Mung bean (Iqbal and Mukhtar 2020b). Other results obtained by Khaledi and Taheri (2016) revealed that inoculating soybean seeds with *Trichoderma* suspension not only suppressed the development of charcoal rot disease, but also increased the activity of peroxidase enzyme and phenolic contents of the soybean roots, resulting in defense activation and plant growth promotion.

Beside the suppression of the pathogen's growth, the results showed that plant height and weight were increased in plants treated with *T. longibrachiatum*, and this may be due to the production of secondary metabolites hormones enhancing root and stem growth as well as making some nutrients more available to plants. This is in line with the findings showing that *Trichoderma* can promote plant growth by producing IAA and ACC deaminase (Ali et al. 2014).

Conclusion

The present study is the first report to use *T. longibrachiatum* as a biocontrol agent against *M. pseudophaseolina*, a new pathogen of lentil plants causing charcoal rot disease in Algeria. The results demonstrated that *T. longibrachiatum* had the ability to control the pathogenic fungus, reduce the infection of charcoal rot on lentil, and promote plant growth. Therefore, these findings strongly support the use of *T. longibrachiatum* as an effective biological control agent in the management of charcoal rot disease. Future studies will aim to determine the efficacy of the selected isolates under field conditions.

Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
ITS1	Internal transcribed spacers
TEF1	Translation elongation factor1-alpha
GI (%)	Growth inhibition
DI	Disease incidence
DS	Disease severity

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

KM initiated the research, conceived and performed the experiments, data analysis and curation, wrote the first draft manuscript. BA contributed to conceptualization, data analysis and validation, writing—original draft, review and editing. ZS contributed in Methodology, data analysis, revision of the manuscript, approving the final draft. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated and analyzed during this study are indicated in the manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 December 2022 Accepted: 21 March 2023

Published online: 10 April 2023

References

- Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2:1–12
- Ali S, Charles TC, Glick BR (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Biochem* 80:160–167
- Aneja KR (2003) Experiments in microbiology and plant pathology. New Age International Pvt. Ltd., New Delhi
- Atalla SM, Abdel-Kader MM, El-Gamal NG, El-Mougy NS (2020) Using maize wastes, fermented by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens*, as grain dressing against m maize diseases under field conditions. *Egypt J Biol Pest Control* 30(1):1–8
- Bastakoti S, Belbase S, Manandhar S, Arjyal C (2017) *Trichoderma* species as biocontrol agent against soil borne fungal pathogens. *Nepal J Biotechnol* 5(1):39–45
- Bhattacharya D, Dhar TK, Siddiqui KA, Ali E (1994) Inhibition of seed germination by *Macrophomina phaseolina* related to phaseolinone production. *J Appl Bact* 77:129–133
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553–556
- Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc* 57:41–48
- Elsehemy IA, El Deen AMN, Awad HM, Kalaba MH, Moghannem SA, Tolba IH, Farid MA (2020) Structural, physical characteristics and biological activities assessment of scleroglucan from a local strain *Athelia rolfsii* TEMG. *Int J Biol Macromol* 163:1196–1207
- FAOstat, Food and Agriculture Organization of the United Nations—agricultural data (2019) <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Farr DF, Rossman AY (2022) Fungal databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. https://nt.ars-grin.gov/fungal_databases/. Accessed 17 Dec 2022
- Gajera HP, Vakharia DN (2012) Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Braz J Microbiol* 43:43–52
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2016) The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol* 209(4):1496–1512
- Iqbal U, Mukhtar T (2020a) Inhibitory effects of some fungicides against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot. *Pak J Zool* 52(2):709–715
- Iqbal U, Mukhtar T (2020b) Evaluation of biocontrol potential of seven indigenous *Trichoderma* species against charcoal rot causing fungus, *Macrophomina Phaseolina*. *Gesunde Pflanz* 72(2):195–202

- Javaid A, Saddique A (2012) Control of charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina* by extracts of *Datura metel*. *Nat Prod Res* 26:1715–1720. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.605363>
- Khaledi N, Taheri P (2016) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *J Plant Prot Res* 56(1):21–31. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0004>
- Khanzada AM, Lodhi AM, Shah N, Maitlo SA (2012) Effect of different inoculation methods and inoculum levels of *Macrophomina phaseolina* on Okra. *Int J Phytopathol* 1:1–5. <https://doi.org/10.33687/phytopath.001.01.0009>
- Kouadri MEA, Zaim S, Bekkar AA (2021a) Lentil rust in north-west of Algeria caused by *Uromyces viciae-fabae*. *Mycopath* 18(2)
- Kouadri MEA, Zaim S, Bekkar AA (2021b) First report of *Macrophomina pseudo-phaseolina* infecting *Lens culinaris*. *Austral Plant Dis Not* 16(1):1–3. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00440-0>
- Kumar S (2013) *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *Int J Agric Sci Vet Med* 1(3):106–121
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549
- Lamini S, Cornelius EW, Kusi F, Danquah A, Attamah P, Mukhtaru Z, Mensah G (2020) Prevalence, incidence and severity of a new root rot disease of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in Northern Ghana. *West Afr J Appl Ecol* 28(2):140–154
- Laskar RA, Khan S, Deb CR, Tomlekova N, Rafiq MW, Raina A, Amin R (2019) Lentil (*Lens culinaris* Medik.) diversity, cytogenetics and breeding. In: *Advances in plant breeding strategies: legumes*, pp 319–369. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3_9
- Marquez N, Giachero ML, Declerck S, Ducasse DA (2021) *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. *Front in Plant Sci* 12:634397
- Martínez-Salgado SJ, Andrade-Hoyos P, Parraguirre Lezama C, Rivera-Tapia A, Luna-Cruz A, Romero-Arenas O (2021) Biological control of charcoal rot in peanut crop through strains of *Trichoderma* spp., in Puebla, Mexico. *Plants* 10(12):2630
- McVicar R, McCall P, Brenzil C, Hartley S, Panchuk K, Mooleki P (2010) Lentils in Saskatchewan. Saskatchewan Ministry of Agriculture
- Pal KK, Gardener BM (2006) Biological control of plant pathogens. *Plant Health Inst.* <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Poudel B, Shivas RG, Adorada DL, Barbetti MJ, Bithell SL, Kelly LA, Vaghefi N (2021) Hidden diversity of *Macrophomina* associated with broadacre and horticultural crops in Australia. *Eur J Plant Pathol* 161:1–23
- Purkayastha S, Kaur B, Dilbaghi N, Chaudhury A (2006) Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathol* 55:106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01317.x>
- Sharma JK, Sankaran KV (1988) Biocontrol of rust and leaf spot diseases. In: *Biocontrol of plant diseases*, pp 1–23
- Sivan A, Chet I (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 135:675–682. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-3-675>
- Sobowale AA, Jonathan SG, Odu BO, Ayansina ADV, Ojikutu TK (2010) *Trichoderma longibrachiatum* as an antagonist of *Botrydiploia theobromae*. *Arch Phytopathol Plant Prot* 43(5):479–484
- Sridharan AP, Thankappan S, Karthikeyan G, Uthandi S (2020) Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiol Res* 236:126436
- Strakowska J, Błaszczyk L, Chelkowski J (2014) The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J Basic Microbiol* 54(5):S2–S13
- Topolovec-Pintarić S (2019) *Trichoderma*: invisible partner for visible impact on agriculture. In: *Trichoderma—the most widely used fungicide*, p 15
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M (2008) A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 72:80–86
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zaim S, Bekkar AA, Belabid L (2018) Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Arch Phytopathol Plant Prot* 51(3–4):217–226
- Zin NA, Badaluddin NA (2020) Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agric Sci* 65(2):168–178

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)