

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

والبحث العلمي وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques

Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et la Géomantique

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Protection des végétaux

Intitulée

Biodiversité de la communauté fongique tellurique au niveau
de la rhizosphère du blé et biocontrôle des populations de
parasites

Présentée par : Mr. MAKHLOUF Kamel Eddine

Le 08/07/2023

Devant le jury :

Présidente	RIGHI ASSIA Fatiha	Pr	Université de Mascara
Examineur	MOUTASSEM Dahou	MCA	Université d'El Bordj Bou Aréridj
Examineur	BENDAHA M. El Amine	MCA	Université de Mascara
Examineur	RIGHI Kada	MCA	Université de Mascara
Encadrante	BOUNGAB Karima	Pr	Université de Mascara
Co-Encadrante	MERZOUG Aoumria	MCA	Université de Mascara

Année Universitaire : 2022-2023

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse a eu lieu au sein du Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et Géomatiques (LRSBG) de l'Université de Mascara. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr. HAMIMED A. pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie sincèrement ma directrice de thèse Pr. BOUNGAB K., pour sa précieuse direction et son soutien tout au long de la réalisation de ma thèse de doctorat. Son expertise, son engagement et son mentorat ont été essentiels pour mener à bien cette recherche académique. Ses conseils éclairés et son encouragement constant ont été une source d'inspiration pour moi.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au Dr. MERZOUG A. Co-promotrice de ma thèse qui m'a fait bénéficier de ces précieux conseils et directives. Ces contributions significatives à mon travail de recherche ont été inestimables.

J'adresse mes remerciements au Pr. RIGHI ASSIA F. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, Dr. RIGHI K., Dr. MOUTASSEM D. et Dr. BENDAHA M. A., d'avoir trouvé un intérêt pour le jugement scientifique de mon travail. Je suis reconnaissant pour l'opportunité d'avoir bénéficié de votre expertise et de votre évaluation rigoureuse.

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail : Dr. MOKRANI S., Dr. CHAMEKH R., Dr. TALEB M., Dr. ZAIM S., Dr. BEKKAR A.A, Dr. ELOUISSI A., Pr. BENYOUCEF M., Mr. DJAFRI T., Mr. BOUSEDRA D., Dr. SEKRANE Y., Dr. KOUADRI M., Mr. AKRICH A., M. ALIANE S., Mr. KHEIRENNES O. et Mr. DAIKH Z.

A cette occasion, je voudrais exprimer un immense remerciement à ma chère mère. Son soutien et ses encouragements constants ont été les fondements de ma réussite. Mes remerciements s'étendent également à ma famille. Je vous suis profondément reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi.

MAKHLOUF Kamel Eddine

Résumé

Le blé (*Triticum* spp.) constitue une céréale d'importance primordial à travers le monde. Cependant, cette culture est souvent attaquée par des bioagresseurs tels que les champignons telluriques ce qui entraîne des pertes de rendement. Des prospections réalisées lors des campagnes agricoles 2018-2019 et 2019-2020 dans le nord-ouest Algérien ont été consacrées à l'évaluation de l'importance des maladies telluriques et à l'isolement et à l'identification des espèces fongiques pathogènes, saprophytes et antagonistes présentes dans la rhizosphère du blé. L'inventaire des champignons telluriques a révélé la présence des genres suivants : *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Chaetomium* et *Cladosporium*, avec la dominance du genre *Fusarium* (17%). Ce dernier a fait l'objet d'une étude morphologique, pathologique et moléculaire. Les tests de pathogénicité ont montré que certaines de ces espèces sont responsables de la pourriture du collet chez les plantules de blé, avec une sévérité s'étant jusqu'à 86.83%. Afin de lutter contre les espèces les plus virulentes, des tests biologiques ont été réalisés avec des agents potentiellement antagonistes tels que les rhizobactéries et les champignons du genre *Trichoderma*. Les résultats ont démontré une variation de l'efficacité de ces agents en fonction des espèces ciblées. Le test de confrontation directe a révélé que *Pseudomonas azotoformans* et *Trichoderma gamsii* sont très efficaces avec une réduction de la croissance mycélienne des agents pathogènes supérieure à 65 %. Ces résultats ont été confirmés par des tests enzymatiques ainsi que d'autres tests pour l'identification de certains métabolites secondaires. Les propriétés métaboliques de ces souches microbiennes ont été quasiment différentes en fonction de l'espèce testée. Des essais en serre ont montré que l'application combinée de ces agents a permis de réduire significativement la sévérité de la maladie jusqu'à 90%, ainsi que d'améliorer la croissance des plantes. Par ailleurs, une autre approche de lutte biologique contre la pourriture des racines et du collet du blé a été étudiée en évaluant les propriétés antifongiques et antioxydantes de *Citrus aurantium*, dont l'huile essentielle extraite des feuilles a réduit la croissance mycélienne de *F. pseudograminearum* jusqu'à 98.41%. . La composition chimique de cette huile essentielle a révélé la présence de nombreux composés actifs, notamment le limonène, l'acétate de géranyle, le géraniol, le citral, le linalol et l'acétate de linalyle.

Mots clés

Fusarium spp., Blé, biocontrôle, *Trichoderma* spp., Rhizobactéries, *Citrus aurantium*.

Abstract

Wheat (*Triticum* spp.) is one of most important and strategic crops for the country's economic development. However, this crop is often attacked by soil-borne pathogens, such as fungi, resulting in yield losses. Our Studies were conducted during the 2019 and 2020 agricultural campaigns focused on isolating and identifying pathogenic, saprophytic, and antagonistic fungal species present in the wheat rhizosphere. The inventory of soil-borne fungi revealed the presence of the following genera: *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, and *Cladosporium*, with *Fusarium* dominating at 17%. This genus has been the subject of morphological, molecular and pathologic study. The pathogenicity tests demonstrated that some of these species are responsible for the crown rot in wheat seedlings, with severity reaching up to 86.83%. In order to biologically combat the most virulent species, tests were conducted using potentially antagonistic agents such as rhizobacteria and *Trichoderma* fungi. The results showed variability in the effectiveness of these agents depending on the targeted species. Direct confrontation tests revealed that *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* were highly effective, with a reduction exceeding 65%. These results were corroborated by enzymatic tests and other synthesized secondary metabolites tests. The obtained results demonstrated that the metabolic properties of these microbial strains were significantly different depending on the tested species. Greenhouse trials showed that the combined application of these agents significantly reduced the severity of the disease by up to 90% and improved plant growth. Additionally, another approach to biological control of root and crown rot in wheat was studied by evaluating the antifungal and antioxidant properties of *Citrus aurantium*. The essential oil extracted from the leaves of this plant exhibited significant antifungal activity against the mycelial growth of pathogenic agents. The chemical composition of this essential oil revealed the presence of numerous active compounds, including limonene, geranyl acetate, geranial, citral, linalool.

Key words

Fusarium spp., Wheat, biocontrol, *Trichoderma* spp., Rhizobacteria, *Citrus aurantium*.

الملخص

زراعة الحبوب في الجزائر تعد قطاعا استراتيجيا للتنمية الاقتصادية للبلاد. غالبا ما تتعرض محاصيل القمح لهجمات من الكائنات المجهرية كالفطريات الممرضة، مما يؤدي إلى خسائر في الإنتاج. تم إجراء دراسات لعزل وتحديد أنواع الفطريات الموجودة في منطقة الجذور، في المواسم الزراعية 2019 و2020. النتائج المتحصل عليها كانت كالاتي *Fusarium*، *Alternaria*، *Penicillium*، *Mucor*، *Aspergillus*، *Rhizoctonia*، *Ulocladium*، *Stemphylium*، *Bipolaris*، *Pythium*، *Trichoderma* و *Chaetomium* و *Cladosporium*، مع هيمنة جنس *Fusarium* (17%). أظهر اختبار الإصابة بالأمراض أن بعض هذه الأنواع مسببة لتعفن الجذور والساق لدى شتلات القمح بشدة تصل إلى 86.83%. من أجل مكافحة الأنواع الأكثر شراسة بطريقة بيولوجية، تم إجراء اختبارات باستخدام كائنات مجهرية مثل البكتيريا والفطريات الغير ممرضة. أظهرت النتائج تباينا في القوة التنافسية لهذه الكائنات اعتماداً على الأنواع المستهدفة، حيث كانت *Pseudomonas azotoformans* و *Trichoderma gamsii* فعالة بشكل خاص بتقليل الإصابة بأكثر من 65%. وتم دعم هذه النتائج بواسطة اختبارات إنزيمية واختبارات أخرى لتحديد بعض المركبات الثانوية. أظهرت النتائج المحصلة أن الخصائص الأيضية لسلاسلات الميكروبات كانت مختلفة تقريبا اعتماداً على الأنواع المختبرة. كما بينت التجارب في البيوت المحمية أن استخدام نوعين من الكائنات المجهرية معا قد سمح بتقليل شدة المرض بنسبة تصل إلى 90% بالإضافة إلى تحسين نمو النباتات. علاوة على ذلك، تم دراسة طريقة أخرى لمكافحة تعفن الجذور والساق في القمح باستخدام مستخلصات شجرة النارج، حيث أظهر الزيت العطري المستخرج من الأوراق نشاطاً مضاداً على نمو الفطريات الممرضة بالإضافة إلى خصائصه المضادة للأكسدة. كما كشف التحليل الكيميائي لهذا الزيت العطري وجود العديد من المركبات النشطة التي يمكن ان تكون مسؤولة عن النشاط المضاد للأكسدة، من بينها الليمونين، والجيرانيل، والجيرانيال، والسيترال، واللينالول، الليناليل.

الكلمات المفتاحية

Fusarium spp.، القمح، مكافحة البيولوجية. *Trichoderma* spp.، بكتيريا التربة، *Citrus*

aurantium

TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale..... 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur la plante hôte	4
I.1- Historique et origine	4
I.2- Valeur nutritionnelle et énergétique	5
I.3- caractères taxonomiques	6
I.4- Caractères morphologiques	7
I.5- Cycle phénologique	8
I.6- Production et importance économique	10
I.6.1- Dans le monde.....	10
I.6.2- En Algérie	10
I.7- Les principales contraintes associées à la culture du blé	11
I.7.1- Les contraintes abiotiques	11
I.7.2- Les contraintes biotiques	11
II- La biodiversité rhizosphérique du blé	16
II.1- Introduction	16
II.2- Diversité de la flore fongique tellurique du blé	17
II.2.1- Les champignons symbiotiques	17
II.2.2- Les champignons saprophytes.....	18
II.2.3- Les champignons parasites	19
II.3- La Fusariose du blé	22
II.3.1- La maladie de la pourriture des racines et du collet	22
II.3.2- La maladie de la fusariose de l'épi.....	25
II.4- Gestion des risques de la fusariose de blé	26
III- Biocontrôle des champignons telluriques.....	29
III.1- Introduction	29
III.2- Biocontrôle par les agents antagonistes	30
III.2.1- Les rhizobactéries PGPR comme agents de lutte biologique.....	30
III.2.2- Les champignons antagonistes.....	34
III.3- Biocontrôle par les extraits végétaux	39
III.3.1- <i>Citrus aurantium</i> L.	40

III.3.2- Les huiles essentielles	41
III.3.3- Méthodes d'extraction	42
III.3.4- Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse.....	43
III.3.5- Composition chimique de l'HE	43
III.3.6- Activités biologiques des huiles essentielles	43
III.4- Production d'un biopesticide	45

MATERIEL ET METHODES

1- Prospection et échantillonnage	49
2- Isolement des champignons telluriques	50
2.1- Isolement à partir des racines et du collet.....	50
2.2- Isolement à partir du sol rhizosphérique.....	50
3- Purification des isolats fongiques	51
4- Identification des agents fongiques.....	52
4.1- Identification morphologique.....	52
4.2- Identification moléculaire	52
4.2.1- Extraction de l'ADN	52
4.2.2- Amplification des fragments de l'ADN.....	53
4.2.3- Révélation des produits PCR.....	53
4.2.4- Purification et séquençage	53
4.3- Etude phylogénétique.....	54
5- Conservation des isolats	54
6- Evaluation du pouvoir pathogène des isolats	55
6.1- Matériel fongique	55
6.2- Matériel végétal	55
6.3- Technique d'inoculation	55
6.4- Evaluation de la maladie.....	55
6.5- Ré-isolement des agents initiaux	56
7- Evaluation de l'activité antifongique des agents antagonistes vis-à-vis de <i>Fusarium</i> spp.	56
7.1- Agents phytopathogènes	56
7.2- Présentation des agents antagonistes.....	56
7.2.1- Les rhizobactéries	56
7.2.2- Champignons antagonistes	57
7.3- Etude de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	57
7.3.1- Confrontation par contact direct	57

7.3.2- Confrontation à distance	58
7.4- Caractérisation des isolats antagonistes	58
7.4.1- Etude de l'activité enzymatique	58
7.4.2- Solubilisation de phosphate	59
7.4.3- Production d'Acide Indole Acétique (AIA).....	60
7.4.4- Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	60
7.4.5- Production des sidérophores.....	61
7.5- Sélection des souches compatibles	61
7.6- Effet synergétique des souches sélectionnées sur le développement de la maladie <i>in vivo</i>	61
7.6.1- Préparation de l'inoculum microbien.....	61
7.6.2- Traitement des semences.....	62
7.6.3- Evaluation de la maladie	62
8- Evaluation de l'effet antifongique des extraits de <i>Citrus aurantium</i> à l'égard de <i>Fusarium</i> spp.	63
8.1- Matériel végétal	63
8.2- Screening phytochimique des extraits des feuilles	64
8.3- Préparation des extraits des feuilles de Bigaradier.....	65
8.4- Calcul du rendement.....	65
8.5- Activité antioxydante de l'huile essentielle	65
8.6- Analyse chimique par GC-MS	66
8.7- Activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux sur <i>Fusarium</i> spp. <i>in vitro</i>	66
8.8- Effet de l'HE sur l'émergence et le développement de coléoptile et de coléorhize	67
8.9- Effet de l'HE sur le développement de la maladie <i>in vivo</i>	68
9- Analyses statistiques	68

RESULTATS ET DISCUSSION

I- Diversité de la mycoflore tellurique du blé	70
I.1- Description des maladies fongiques telluriques dans les régions prospectées	70
I.2- Résultats d'isolement de la flore fongique.....	72
I.3- Evaluation de la fréquence d'isolement.....	72
I.4- Caractérisation morphologique de la flore parasite.....	74
I.4.1- Genre <i>Fusarium</i>	74
I.4.2- <i>Bipolaris sorokiniana</i>	74
I.4.3- <i>Pythium</i> sp.	75
I.4.4- <i>Rhizoctonia</i> sp.	76

I.5- Caractérisation de la flore saprophyte	76
I.6- Discussion	78
I.7- Conclusion	80
II- Caractérisation morphologique et pathogénique de <i>Fusarium</i> spp.	81
II.1- Caractérisation morphologique du genre <i>Fusarium</i>	81
II.1.1- <i>Fusarium graminearum</i>	83
II.1.2- <i>Fusarium pseudograminearum</i>	84
II.1.3- <i>Fusarium culmorum</i>	85
II.1.4- <i>Fusarium equiseti</i>	86
II.1.5- <i>Fusarium cerealis</i> (Synonyme <i>F. crookwellense</i>).....	87
II.1.6- <i>Fusarium verticillioides</i>	88
II.1.7- <i>Fusarium avenaceum</i>	88
II.2- Fréquence des espèces phytopathogènes.....	88
II.3- Caractérisation pathogénique des isolats.....	89
II.3.1- Evaluation de la sévérité de la maladie.....	91
II.3.2- Identification moléculaire et phylogénétique des isolats virulents.....	92
II.4- Discussion.....	94
II.5- Conclusion.....	96
III- La lutte biologique par l'utilisation des microorganismes telluriques	97
III.1- Caractérisation morphologique des antagonistes fongiques	97
III.1.1- <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T4)	97
III.1.2- <i>Trichoderma gamsii</i> (T2).....	98
III.1.3- <i>Trichoderma asperellum</i> (T3)	99
III.1.4- <i>Trichoderma harzianum</i> (T5).....	100
III.1.5- <i>Chaetomium globosum</i> (T1).....	100
III.2- Rhizobactéries antagonistes.....	101
III.3- Evaluation de l'activité antagoniste des agents étudiés <i>in vitro</i>	102
III.3.1- Confrontation directe	102
III.3.2- Confrontation à distance	108
III.4- Caractérisation des champignons antagonistes	109
III.4.1- Production de chitinase	110
III.4.2- Production d'amylase	110
III.4.3- Production de protéase	111
III.4.4- Production de lipase.....	111
III.4.5- Solubilisation de phosphate.....	112

III.4.6- Production d'AIA sur milieu liquide.....	112
III.4.7- Interaction entre les différentes activités enzymatiques étudiées.....	114
III.5- Caractérisation des rhizobactéries.....	115
III.5.1- Production enzymatique.....	115
III.5.2- Solubilisation de phosphate.....	117
III.5.3- Production d'AIA sur milieu solide.....	117
III.5.4- Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	118
III.5.5- Production de sidérophores	119
III.5.6- Interaction entre les différentes activités enzymatiques étudiées.....	120
III.6- Sélection des souches compatibles.....	121
III.7- Effet synergétique des deux souches sur le développement de la maladie <i>in vivo</i>	121
III.7.1- Effet sur la sévérité de la maladie.....	121
III.7.2- Effet sur les paramètres de croissance	125
III.8- Discussion	126
III.9- Conclusion	132
IV- Control biologique par l'utilisation d'une plante aromatique issue de la flore Algérienne	133
IV.1- Introduction.....	133
IV.2- Screening phytochimique.....	133
IV.3- Rendement de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	134
IV.4- Analyse chimique de HE par GC-MS	134
IV.5- Activités biologiques de l'huile essentielle (HE).....	135
IV.5.1- Activité antioxydante	135
IV.5.2- Effet antifongique des extraits sur <i>Fusarium spp. in vitro</i>	136
IV.5.3- Effet de l'HE sur l'émergence et le développement de coléoptile et de coléorhize	138
IV.5.4- Effet de l'HE sur l'incidence et la sévérité de la maladie	139
IV.5.5- Effet du traitement sur les paramètres de croissance.....	142
IV.6- Discussion	143
IV.7- Conclusion	146
Conclusion Générale et perspectives	148
Références Bibliographiques.....	152
Annexes.....	178
Publications	

Liste des Figures

Figure 1 : La phylogénie des espèces domestiquées de <i>Triticum</i> spp. .	5
Figure 2 : Morphologie d'un plant de blé.	8
Figure 3 : Cycle phénologique du blé.	9
Figure 4 : Évolution de superficie, production et collecte des blés durant les années 1998-2019.	11
Figure 5 : Les étapes de l'endomycorhization à arbuscule.	18
Figure 6 : A. <i>Fusarium graminearum</i> et B. <i>Fusarium culmorum</i> .	21
Figure 7 : A- fonte de semis et B- la pourriture du collet.	23
Figure 8 : Cycle de développement de la fusariose du blé.	24
Figure 9 : Symptômes de la fusariose de l'épi sur le blé dur.	26
Figure 10 : Modes d'action des rhizobactéries bénéfiques, effets de phytostimulation ou de phytoprotection du blé.	31
Figure 11 : Mécanismes de mycoparasitisme exercés par <i>Trichoderma</i> sp..	36
Figure 12 : Mécanismes d'induction de la résistance systémique par <i>Trichoderma</i> sp. au niveau du système racinaire.	38
Figure 13 : Fruits, feuilles et fleurs de Bigaradier.	40
Figure 14 : Les différentes parties du Bigaradier avec leurs substances bioactives les plus abondantes.	41
Figure 15 : L'évolution du nombre d'applications de nouveaux biopesticides (substances actives), par rapport à pesticides synthétiques, dans l'Union Européen.	46
Figure 16 : Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage d'une collection d'organismes.	47
Figure 17 : Localisation des zones de prélèvements	49
Figure 18 : Méthode de préparation d'une suspension dilution du sol	51
Figure 19 : Etapes de l'identification moléculaire des espèces fongiques	54
Figure 20 : Le bigaradier (<i>Citrus aurantium</i> L)	63
Figure 21 : Symptômes de la pourriture des racines et du collet au champ	71
Figure 22 : Symptômes de la fusariose de l'épi du blé	71
Figure 23 : Fréquence d'isolement moyenne de la mycoflore rhizosphérique	73
Figure 24 : Fréquence de différents genres fongiques selon les phylums	74
Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	75
Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Pythium</i> sp.	75
Figure 27 : Observation microscopique de <i>Rhizoctonia</i> sp.	76
Figure 28 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Fusarium graminearum</i>	83
Figure 29 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. pseudograminearum</i> .	84
Figure 30 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. culmorum</i> .	85
Figure 31 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. equiseti</i> .	86
Figure 32 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. cerealis</i> .	87
Figure 33 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. verticillioides</i> .	88
Figure 34 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>F. avenaceum</i> .	88
Figure 35 : Symptômes de la fonte de semis provoqués par <i>F. pseudograminearum</i>	89
Figure 36 : Symptômes causée par différentes espèces de <i>Fusarium</i>	90
Figure 37 : Sévérité moyenne des différentes espèces de <i>Fusarium</i> .	92
Figure 38 : Arbre phylogénétique réalisée à partir d'une séquence de la région (ITS) de la souche F10.	93

Figure 39: Arbre phylogénétique réalisée à partir d'une séquence de la région (ITS) de la souche F4.....	93
Figure 40: Caractéristiques morphologiques représentatives de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T4).....	98
Figure 41: Aspects macroscopique et microscopique de <i>T. gamsii</i>	99
Figure 42: Caractéristiques morphologiques représentatives de <i>Trichoderma asperellum</i> . .	100
Figure 43: Caractéristiques morphologiques représentatives de <i>Trichoderma harzianum</i> ...	101
Figure 44: Aspect macroscopique et microscopique de <i>Chaetomium globosum</i>	101
Figure 45: Pourcentage moyen d'inhibition de <i>Fusarium</i> spp. par les champignons antagonistes	103
Figure 46: Pourcentage moyen d'inhibition de <i>Fusarium</i> spp. par les rhizobactéries	103
Figure 47: Confrontation par contact directe entre les rhizobactéries et F10	104
Figure 48: Confrontation par contact directe entre F4 et les neuf souches bactériennes	104
Figure 49: Confrontation par contact direct entre <i>T. gamsii</i> et <i>Fusarium</i> spp.....	105
Figure 50: Confrontation par contact direct entre <i>T. longibrachiatum</i> et <i>Fusarium</i> spp.....	105
Figure 51: Le gonflement et la dénaturation du mycélium fongique par l'action de la rhizobactérie P58.	106
Figure 52: Mycoparasitisme par l'enroulement du mycélium de <i>Trichoderma</i> sur l'agent pathogène	107
Figure 53: La lyse (A) et la vacuolisation (B) du mycélium du pathogène	107
Figure 54: Pourcentage moyen d'inhibition de <i>Fusarium</i> spp. par les rhizobactéries en confrontation directe	109
Figure 55: Pourcentage moyen d'inhibition de <i>Fusarium</i> spp. par les champignons en confrontation à distance	109
Figure 56: Production de l'enzyme chitinase par les antagonistes fongiques	110
Figure 57: Production d'amylase par les antagonistes fongiques	110
Figure 58: Production de l'enzyme protéase.....	111
Figure 59: Production de la lipase.....	111
Figure 60: La capacité des champignons à solubiliser le phosphate.....	112
Figure 61: Production d'acide indole acétique par les champignons sur milieu liquide.....	112
Figure 62: Production de chitinase	113
Figure 63: Production d'amylase.....	113
Figure 64: Production de protéase	113
Figure 65: Production de lipase	113
Figure 66: Production de l'AIA (µg/ml) sur le milieu liquide additionné de tryptophane. ...	113
Figure 67: Répartition des champignons selon leurs activités enzymatiques.....	115
Figure 68: Production de chitinase par les rhizobactéries.....	115
Figure 69: Production de protéase par les rhizobactéries.....	116
Figure 70: Production d'amylase par les rhizobactéries.....	116
Figure 71: Solubilisation de phosphate par les rhizobactéries	117
Figure 72: Production d'AIA par les rhizobactéries.....	118
Figure 73: Production de l'acide cyane-hydrique (HCN) par les rhizobactéries.....	118
Figure 74: Production d'amylase sur milieu à base d'amidon.....	119
Figure 75: Production de protéase sur milieu à base de lait écrémé	119
Figure 76: Production des sidérophores sur milieu SSM.....	119
Figure 77: Répartition des rhizobactéries selon les paramètres étudiés.....	121
Figure 78: Test de compatibilité des souches.	121

Figure 79: Efficacité des agents antagonistes in vivo.	123
Figure 80: Effet synergique de T2+P58 sur la réduction de la pourriture du collet.....	124
Figure 81: Réactions de criblage phytochimique de l'extrait des feuilles de bigaradier	133
Figure 82 : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle des feuilles de <i>Citrus aurantium</i> L.	135
Figure 83: Activité antioxydante de l'HE de <i>Citrus aurantium</i> à différentes concentrations.	135
Figure 84: Réduction de la croissance radiale de <i>F. graminearum</i> après traitement.....	137
Figure 85: Réduction de la croissance radiale de <i>F. pseudograminearum</i> après traitement .	137
Figure 86: Dégradation de la membrane mycélienne et la vacuolisation due au traitement par l'huile essentielle.....	138
Figure 87: Effet de l'HE sur le développement de coléoptile et de coléorhize.....	139
Figure 88: Effet inhibiteur de l'HE sur le développement de la maladie (cas de <i>F. graminearum</i> .).....	140
Figure 89: Effet inhibiteur de l'HE sur le développement de la maladie (cas de <i>F. pseudograminearum</i>)	140
Figure 90: Effet de l'huile essentielle sur le développement de la maladie in vivo.	141
Figure 91: Effet de l'HE sur la croissance des plantules infectées par F4 et F10..	142

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition nutritionnelle moyenne du grain entier de blé (Fredot, 2005).....	6
Tableau 2: Les maladies fongiques les plus communes sur le blé :	12
Tableau 3: Champignons phytopathogènes telluriques du blé (Boulif, 2006)	19
Tableau 4: Les agents antagonistes présentant des effets de biocontrôle vis-à-vis des champignons phytopathogènes telluriques du blé.....	30
Tableau 5: Les rhizobactéries antagonistes utilisées dans cette étude	57
Tableau 6: Les champignons potentiellement antagonistes utilisés dans cette étude	57
Tableau 7: Fréquence d'isolement (%) de la flore fongique à partir des différents prélèvements.....	73
Tableau 8: Description morphologique des champignons saprophytes	76
Tableau 9: Origine géographique et caractéristiques culturales des isolats de <i>Fusarium</i> spp.	82
Tableau 10: Diversité et fréquence de différentes espèces de <i>Fusarium</i>	89
Tableau 11: Sévérité des isolats de <i>Fusarium</i> inoculés aux plantules de blé en serre	91
Tableau 12: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> spp. par les agents antagonistes en confrontation directe	103
Tableau 13: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> spp. par les agents antagonistes en confrontation à distance	108
Tableau 14: Effet des différents traitements sur le développement de la maladie en pots....	122
Tableau 15: Effet des différents traitements sur les paramètres de croissance de la plante..	126
Tableau 16: Screening phytochimiques de <i>Citrus aurantium</i>	133
Tableau 17: Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Citrus aurantium</i> .	134
Tableau 18: Effet inhibiteur (%) de l'huile essentielle, l'extrait aqueux et le difénoconazole sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium</i> spp.	136
Tableau 19: Effet de HE sur l'émergence et le développement de coléoptile et coléorhize .	138
Tableau 20: L'influence de l'HE de <i>Citrus aurantium</i> sur les paramètres de croissance des plantes.....	142

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribose Nucléique
AIA	Acide indole acétique
ANOVA	Analyse de la variance
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BYDV	Barley yellow dwarf virus
CCLS	Coopérative des Céréales et Légumes Secs
Cv	cultivar
DSA	Direction des Services Agricoles
Do	densité optique
DPPH	2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl
EA	Extrait aqueux
FAO	Food and Agriculture Organization
FCR	Fusarium Crown Rot
Fe Cl ₃	Chlorure de fer
FHB	Fusarium Head Blight
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HCL	Chlorure d'hydrogène
HCN	Acide cyanhydrique
HE	Huile Essentielle
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MS	matière sèche
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria
Rpm	rotation par minute
SBCMV	Soil-borne cereal mosaic virus
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
WSSMV	Wheat Spindle Streak Mosaic Virus
µL	Microlitre
Ø	Diamètre

Introduction générale

Introduction Générale

Le blé est l'une des cultures prédominantes dans de nombreux pays du monde en raison de son importance agronomique, socioéconomique et nutritionnelle, fournissant une part importante de l'approvisionnement alimentaire mondial (Ali et *al.*, 2017).

En Algérie, le blé occupe une place privilégiée dans l'alimentation de l'homme, en fournissant plus de 60% de l'apport calorique (Djermoun, 2009). Il est considéré parmi les principales cultures agricoles, avec plus de 4 millions d'hectares de terres dédiées à cette culture. Cependant, la production nationale de blé reste encore faible (3.95 millions de tonnes en 2020), elle occupe moins de 35% des besoins de pays (FAO, 2019) mettant ainsi en péril la sécurité alimentaire. De ce fait, l'Algérie est l'un des plus grands importateurs de blé au monde. Il est important de signaler que la faible productivité du blé due à des contraintes abiotiques tels que la sécheresse, et biotiques comme les maladies, les ravageurs et les adventices (Derbal et *al.*, 2015).

Parmi les maladies cryptogamiques, les champignons d'origine telluriques constituent un des principaux facteurs limitant le développement du blé, en provoquant la pourriture des racines et du collet durant la phase végétative. Cette maladie engendre des graves problèmes pour la production de blé dans de nombreuses régions du monde, en particulier dans les zones arides et semi-arides (Xu et *al.*, 2008 ; Kazan et Gardiner, 2018). Les agents responsables de cette pathologie sont formés d'un complexe très polymorphe, présentant de multiples espèces, y compris *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *F. equiseti*, *F. pseudograminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (Poole et *al.*, 2013 ; Abdallah-Nekache et *al.*, 2019 ; Bencheikh et *al.*, 2020).

La connaissance approfondie de la répartition de ces maladies dans les parcelles du blé, et l'étude de la distribution du complexe parasitaire dans l'ouest Algérien sont nécessaires pour une bonne gestion phytosanitaire.

La protection des cultures céréalières vis-à-vis des champignons pathogènes d'origine telluriques peut être envisagée par l'application de fongicides de synthèse chimique (Smiley et *al.*, 2002). Cependant, leurs effets néfastes sur la santé humaine et les influences négatives sur l'environnement sont considérés comme des sérieux inconvénients (Chambers et *al.*, 2014 ; Kim et *al.*, 2017). À cet effet, des efforts sont déployés pour développer des méthodes de lutte alternative aux produits chimiques.

Introduction générale

Le contrôle biologique basé sur le concept de la préservation de l'environnement et la lutte contre les bioagresseurs offre une alternative puissante à l'utilisation de produits chimiques synthétiques. Cette méthode consiste à l'utilisation d'organismes bénéfiques ou leurs métabolites pour limiter ou réduire les pertes et les dommages causés par les agents nuisibles (Eilenberg et *al.*, 2001).

Parmi les agents de biocontrôle, plusieurs champignons rhizosphériques et des rhizobactéries ont été décrits comme des potentiels agents de lutte pour contrôler les maladies des plantes. Chaque espèce vivante a un ou plusieurs ennemis ou compétiteurs naturels ce qui rend le milieu en équilibre. L'augmentation de l'abondance des microorganismes antagonistes à proximité d'une plante peut supprimer la maladie sans produire d'effets néfastes sur le reste de la communauté microbienne ou d'autres organismes de l'écosystème (Eilenberg et *al.*, 2001).

D'autre stratégie de lutte déployée par les chercheurs s'orientent vers l'utilisation des plantes médicinales et leurs extraits dans le domaine de protection des végétaux. Ces sources inépuisables de substances bioactives ont l'avantage d'être potentiellement antimicrobiens, biodégradables, respectueuses de l'environnement et peu ou pas néfastes pour la santé humaine. Plusieurs études ont été initiées afin de produire de nouveaux biopesticides à la fois actifs et viables d'un point de vue économique.

Dans ce contexte, notre travail de recherche a fixé comme objectifs :

L'étude de la biodiversité des champignons rhizosphériques associés à la culture du blé dans le nord-ouest Algérien, et détermination des populations des parasites.

Isolement et caractérisation de quelques champignons antagonistes à partir de la rhizosphère du blé, et évaluation de leur effet antifongique vis-à-vis de *Fusarium* spp. agents des pourritures des racines et du collet de blé.

Détermination du pouvoir antagoniste des rhizobactéries (*Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp.) contre *Fusarium* spp. *in vitro* et l'évaluation de leurs efficacités sur l'incidence et la sévérité de la maladie de la pourriture du collet *in vivo*.

Réalisation d'une analyse phytochimique et l'évaluation des activités biologiques (antioxydante et antifongique) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* en vue de son utilisation dans la protection des plantules de blé contre la pourriture du collet.

Généralités sur la plante

hôte

I. Généralités sur la plante hôte

I.1- Historique et origine

Depuis le néolithique, les céréales sont l'aliment de base des humains dans la plupart des régions du monde. Tout au long de l'histoire de la civilisation, le développement des cultures céréalières est étroitement lié à l'augmentation de la densité de populations (Bonjean et Picard, 1990).

L'histoire de l'évolution du blé tétraploïde cultivé a commencé avec le développement de l'agriculture il y a environ 10000 ans, en croissant fertile avec la domestication de l'emmer sauvage *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebn.) Aarons., 1910 ($2n = 4x = 28$, génome AABB). C'est une espèce allotétraploïde qui a apparu il y a environ un million d'années à la suite de l'hybridation naturelle du blé sauvage diploïde *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan, 1972 ($2n = 2x = 14$, génome AA) (Dvořák et al., 1993). La mutation de cette espèce a conduit à la formation de la première forme de l'emmer domestique (*Triticum dicoccum* (Schrank) Schübl., $2n=4x=28$, génome AABB) (Nesbitt, 2001). La principale différence entre le sauvage et le domestique est que les épis de graines matures de la plante sauvage se brisent et dispersent les graines sur le sol, tandis que dans l'emmer domestique, l'épis reste intacte, ce qui facilite la récolte pour l'homme (Luo et al., 2007). Au fur et à mesure de domestication une transition s'est produite, qui se caractérise par l'apparition des grains nus permettant un battage plus facile (Figure 01). Ces événements ont permis l'émergence de nouveaux types cultivés, comme le blé dur *Triticum durum* Desfs, ($2n = 4x = 28$, génome AABB), qui a progressivement remplacé le blé amidonnier à partir de la période hellénistique, le blé dur est devenu une culture majeure autour du méditerranée (Zohary et al., 2012).

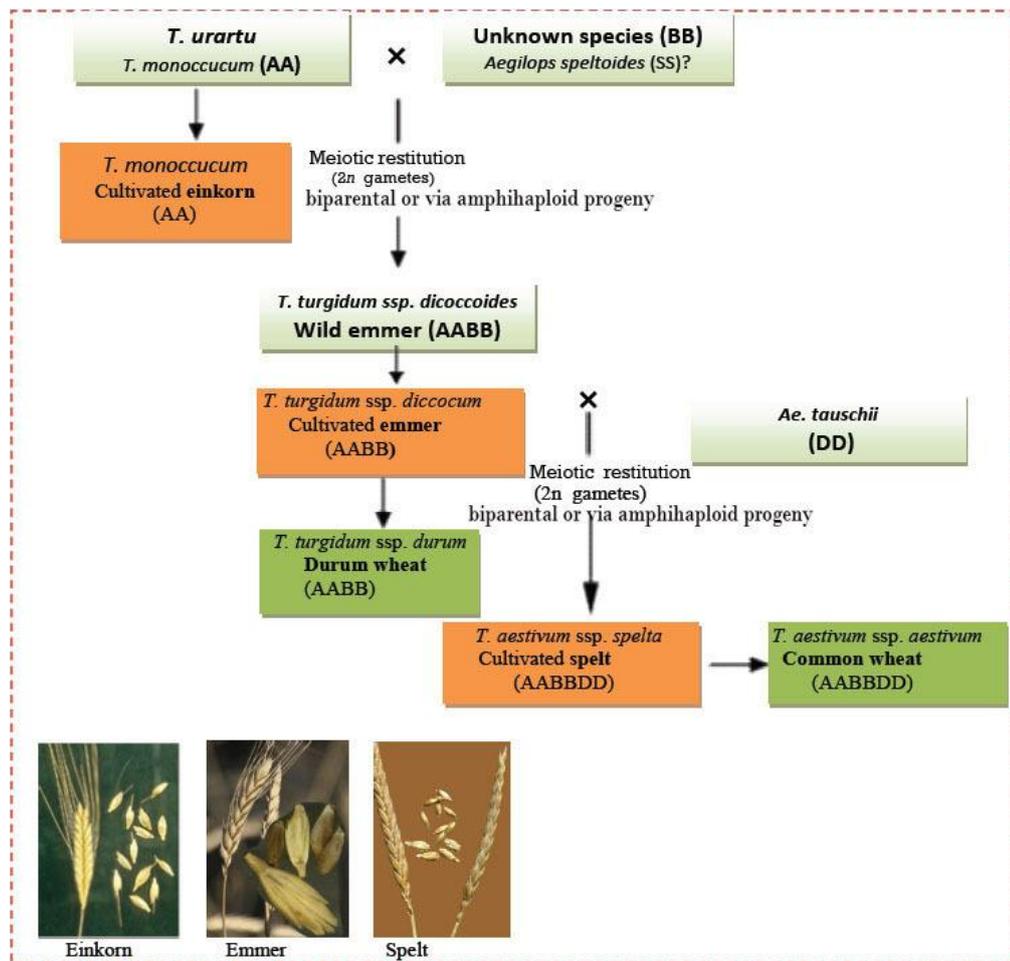


Figure 1 : La phylogénie des espèces domestiquées de *Triticum* spp. (Arzani et Ashraf, 2017).

I.2- Valeur nutritionnelle et énergétique

Le blé est la principale source alimentaire pour la population mondiale car il fournit l'essentiel des apports énergétiques et protéiques (Tableau 01). Les grains de blé contiennent la plupart des nutriments, y compris les glucides (60 à 80% en particulier l'amidon), une portion de (8 à 17%) de protéines et d'acides aminés à l'exception de la lysine, du tryptophane et de la méthionine, une quantité minimale de lipides (1.5 à 2%), des éléments minéraux (1.5 à 2%) et des fibres et vitamines (Curtis et *al.*, 2002). Le blé dur *Triticum durum*, riche en amidon et en gluten, cultivé dans les zones les plus chaudes et sèches, et le blé tendre *Triticum aestivum*, riche en amidon, cultivé presque partout dans les régions tempérées (Bednarek, 2012).

Tableau 1: Composition nutritionnelle moyenne du grain entier de blé (Fredot, 2005).

Composition nutritionnelle	Pourcentage de MS (%)
Protéines	12
Lipides	2
Glucides	61
Composition en vitamines	Poids (mg) pour100g
Vitamine E	2,5
Vitamine B1	0,41
Vitamine B2	0,1
Vitamine B3	4,7
Vitamine B6	0,5
Vitamine D	0
Minéraux	
Calcium	35
Cuivre	0,6
Fer	5
Magnésium	140
Sodium	3
Potassium	435
Phosphore	400
Zinc	4,1

I.3- caractères taxonomiques

Le blé est un terme générique qui désigne plusieurs céréales appartenant au genre *Triticum*. Ce sont des monocotylédones annuelles de la famille des Poacées ou Graminées (Gustafson et al., 2009). Il fait partie des trois grandes céréales avec le riz et le maïs. Le blé tendre (*Triticum aestivum* var. *aestivum*) et le blé dur (*Triticum turgidum* var. *durum*), sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde.

Selon (Feillet, 2000), la classification botanique du blé est donnée comme suite :

Règne végétal *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

L'embranchement : *Magnoliophyta*

Classe : *Liliopsida*

Sous-classe : *comelinidae*

Ordre : *Cyperales*

Famille : *Poaceae (Gramineae)*

Sous-famille : *Pooideae*

Tribu : *Triticeae*

Genre : *Triticum*

Espèces : *Triticum aestivum L.* (Blé Tendre)

Espèces : *Triticum durum Desf* (Blé dur)

I.4- Caractères morphologiques

Le blé est une plante herbacée annuelle, appartenant au groupe des céréales à paille. Selon Clarke et *al.* (2002), le blé possède une tige cylindrique, creuse et subdivisée en entrenœuds, chaque nœud est le point d'attache d'une feuille. La tige principale appelée le maître brin et des tiges secondaires appelées le chaume (talles) qui se forment à partir de bourgeons auxiliaires aux nœuds à la base de la tige principale (Figure 02).

Les feuilles de blé se composent en deux parties : La partie inférieure qui entoure la jeune pousse ou la tige (la gaine) et la partie supérieure en forme de lame (le limbe) qui s'attache avec les nervures parallèles (Belaid, 1996). Les feuilles portent à leur jonction avec la gaine des oreillettes vêtues et une ligule.

D'après Clement et Prats (1970), le système racinaire du blé est de type fasciculé, qui se forme en deux systèmes : Le système racinaire séminal (primaire) ; fonctionne de la germination au tallage et le système racinaire coronaire (secondaire) ; apparait au stade tallage (Belaid, 1996).

L'appareil reproducteur se caractérise par des fleurs groupées en inflorescences de type épi, ce dernier est composé d'épillets (Bonjean et Picard, 1990). Chaque fleur donne naissance à un fruit sec indéhiscent, constitué d'une graine et de téguments appelé caryopse, c'est-à-dire un akène dont l'enveloppe est soudée avec le tégument (Bozzini, 1988 ; Feillet, 2000).

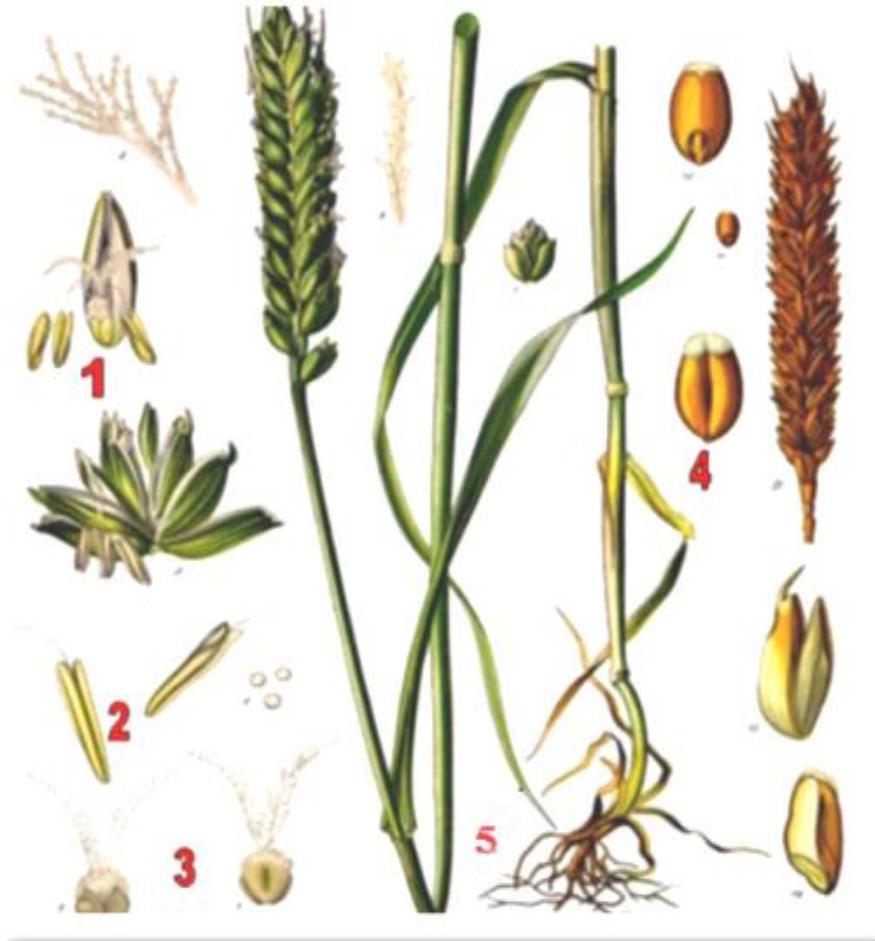


Figure 2: Morphologie d'un plant de blé (Anonyme 1, 2022).

1-Fleur de blé ; 2-Etamine ; 3-Pistils ; 4-grain de blé ; 5- Racines du blé

I.5- Cycle phénologique

Selon Soltner (2005), le cycle de développement de blé est composé d'une série d'étapes (Figure 03) :

a. Germination – levée

La première phase de développement de blé commence par la germination de grain après le semis et lorsque la température est supérieure à 3°C, donnant naissance à un coléorhize résultant l'émergence des racine séminales, et une coléoptile qui assure la sortie de la première feuille fonctionnelle.

b. Tallage

D'après Moule (1971), la phase du tallage commence lorsque la plante possède 3 à 4 feuilles, une touffe herbacée sera constituée à la base de la plante et en même niveau de la tige principale. La densité de talles produites dépend de la variété, des conditions climatiques, l'alimentation minérale et hydrique et de la densité de semis (Belaid, 1996).

c. Montaison- gonflement

Au cours de cette phase, les besoins en éléments nutritifs notamment en azote sont accrus, la montaison est caractérisée par l'élongation des entre-nœuds et par l'évolution de certaines talles vers des tiges couronnées (Clement et Prats, 1970). Cette phase s'achève une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la dernière feuille (Boulal et *al.*, 2007).

d. Epiaison-floraison

Cette phase ne débutera que lorsque la température dépassera les 14°C. elle est distinguée par l'éclatement de la gaine avec l'émergence de l'épi. Après 4 à 8 jours, les épis commencent à fleurir, une fois la fécondation est terminée le nombre de grains est fixé (Gate, 1995).

e. Maturation du grain

Durant cette phase, le fonctionnement de la plante sera orienté vers le remplissage des graines. On observe donc une croissance du calibre des graines, accompagné avec une diminution du poids des tiges et des feuilles. La période de maturation des graines se fait en plusieurs étapes, la maturité laiteuse (le grain contient encode plus de 50% d'humidité), la maturité jaune (la formation de l'amidon) et la maturité complète (l'humidité atteint 20%) (Soltner, 2005).

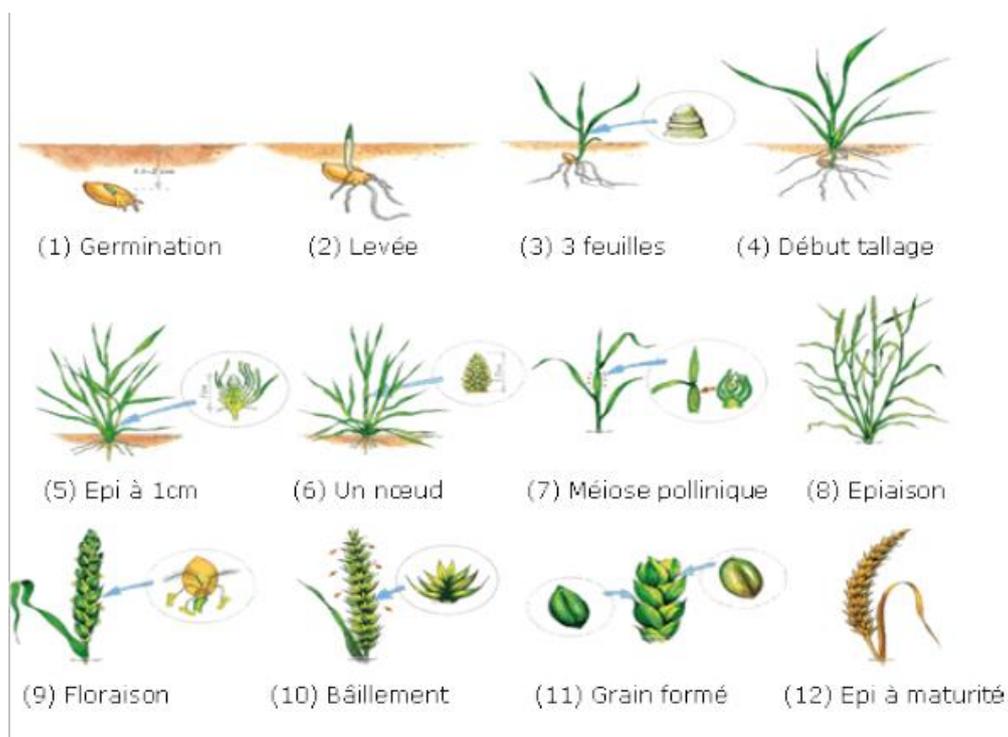


Figure 3: Cycle phénologique du blé (Soltner, 2005).

I.6- Production et importance économique**I.6.1- Dans le monde**

Le blé est l'une des productions agricoles les plus importantes à l'échelle mondiale, selon FAO (2021), La production mondiale du blé a été plus de 765 millions de tonnes. L'importation du blé au niveau mondial occupe le deuxième rang après le maïs, plus de 179 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs de blé sont l'Union Européen, la Chine, l'Inde, la Russie et les Etats Unis (Mottaleb et *al.*, 2022).

I.6.2- En Algérie

En Algérie, la céréaliculture constitue une des principales filières de la production agricole, notamment dans les zones arides et semi-arides du pays, avec une superficie varie entre 3 et 3.5 millions d'hectares. Le blé dur est majoritaire suite à son utilisation dans l'alimentation quotidienne (plus de 65% de la superficie céréalière) (DSA, 2017).

La production nationale du blé connaît des fluctuations interannuelles importantes (Figure 04). Cette dernière reste encore faible 3.87 millions de tonnes en 2019. Selon Bekkis et *al.* (2022), ces dernières années, l'Algérie ne couvre qu'environ 25% de ses besoins en blés, Cette situation fragilise d'avantage le pays en raison de l'instabilité du marché international mettant ainsi en péril sa sécurité alimentaire.

Afin de combler le déficit en produits céréaliers, l'Algérie recours à des importations, C'est le sixième pays importateur du blé dans le monde après l'Indonésie, l'Egypte, l'Italie, le Phillipine et la Turquie (FAO, 2021).

La faiblesse de la production céréalière due essentiellement à des contraintes abiotiques tels que le déficit hydrique, et des contraintes biotiques comme les maladies cryptogamiques, les adventices et les ravageurs (Hamadache et *al.*, 2002 ; Derbal et *al.*, 2015).

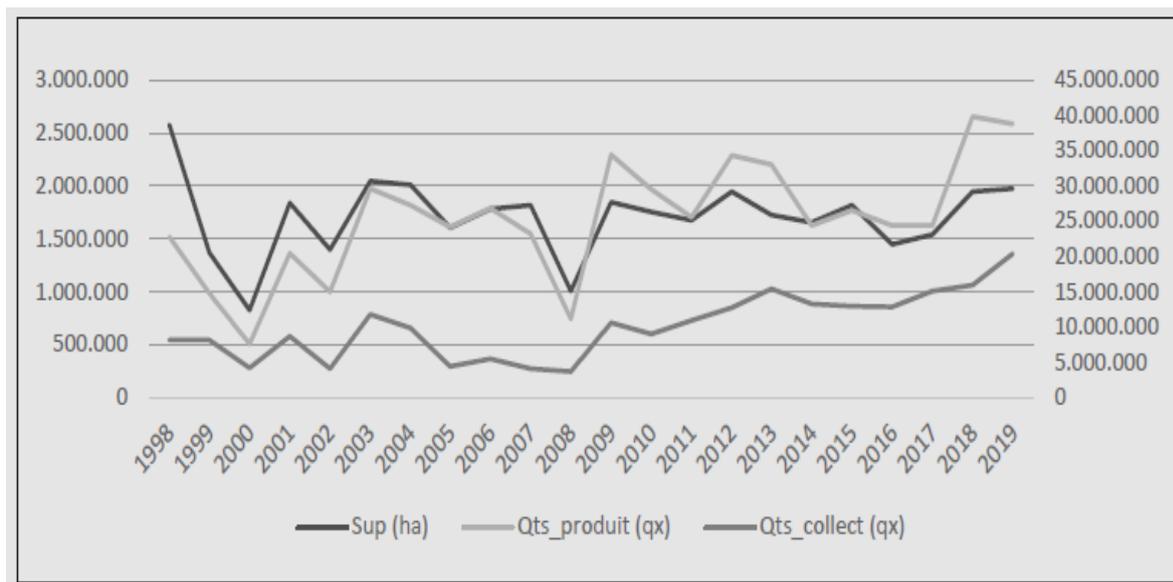


Figure 4: Évolution de superficie, production et collecte des blés durant les années 1998-2019 (Bekkis *et al.*, 2022).

I.7- Les principales contraintes associées à la culture du blé

I.7.1- Les contraintes abiotiques

La filière de la céréaliculture en Algérie continue à heurter des aléas climatiques importants, une faible pluviométrie durant le cycle végétatif de la culture, gelées tardives et siroccos précoces qui affectent la culture aux stades critiques de son développement (floraison et formation du grain) (Feliachi, 2000). D'autres contraintes conduisant à une baisse de productivité sont également notées, tels que l'acidité du sol entraînant une toxicité par l'aluminium ou le manganèse et la mauvaise gestion des itinéraires techniques (Krstic *et al.*, 2012).

I.7.2- Les contraintes biotiques

Le blé est une culture vivrière majeur, cette culture est exposée à différents ennemis qui l'attaquent à tous les stades de développement, causant des pertes considérables de rendement (Ezzahiri, 2001). Parmi les stressés biotiques qui limitent la rentabilité, les maladies cryptogamiques, les bactéries, les virus, les ravageurs, les nématodes, et les adventices.

I.7.2.1- Les maladies cryptogamiques

La culture de blé est fréquemment attaquée par de nombreux champignons phytopathogènes à différents stades de son développement, du semis jusqu'à la récolte. Les principales maladies cryptogamiques répandues dans le monde et en Algérie sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 02).

Tableau 2: Les maladies fongiques les plus communes sur le blé :

Nom de la maladie	Agents responsables	Symptômes	Références
La Rouille noire	<i>Puccinia graminis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • La maladie apparait sous forme des pustules noirâtres sur les feuilles et les tiges. • Cette maladie se manifeste vers la fin du cycle végétatif. 	(Sharma et <i>al.</i> , 2022).
La rouille brune	<i>Puccinia recondita</i>	<ul style="list-style-type: none"> • La maladie se caractérise par des petites pustules circulaires de couleur orange ou brune. 	(Aouali et Douici-Khalfi, 2009).
La rouille jaune	<i>Puccinia striiformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • La maladie se présente sous forme de stries jaune orangé sur les nervures. 	(Chen, 2020).
Oidium	<i>Erysiphe graminis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Présence d'un duvet blanchâtre sur le limbe foliaire 	(Ezzahiri, 2001).
Septoriose	<i>Septoria nodurum</i> <i>Septoria tritici</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Des taches foliaires de forme ovale d'une couleur jaunâtre à brun. 	(Abramova et <i>al.</i> , 2008).
Le charbon	<i>Ustilago nuda</i> <i>Ustilago tritici</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Les symptômes se manifestent après la floraison, avec un noircissement de l'épi et contenu de l'enveloppe est remplacé par une masse noirâtre, constituée de spores. 	(Kumar et <i>al.</i> , 2022).
La carie	<i>Tilletia caries</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Les symptômes apparaissent au moment du remplissage des grains, le contenu de la graine est transformé en une masse poudreuse noirâtre. 	(Mourad et <i>al.</i> , 2018).
Piétin-échaudage	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Noircissement des racines et de la tige ce qui conduit à une interruption de l'eau et des nutriments ce qui résulte des épis blancs et vides. 	(Hernandez-Restrepo et <i>al.</i> , 2016).

I.7.2.2- Les maladies bactériennes et virales

Certains microorganismes peuvent causer des dégâts dommageables sur la culture de blé, parmi lesquels on a les bactéries phytopathogènes. Sur céréales, plusieurs espèces bactériennes sont considérées comme agents phytopathogènes, selon Duveiller (1997), les espèces les plus ubiquitaires appartient au genres *pseudomonas* et *xanthomonas*, parmi elles : la nécrose bactérienne causée par *pseudomonas syringae* pv. *syringae* transmis par les semences, la bactériose des glumes causée par *P. syringae* pv. *atrofaciens* et la rayure bactérienne ou glume noir causée par *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* sont les plus fréquentes.

Les maladies virales des céréales les plus répandues à travers le monde sont causées par le virus de la mosaïque des céréales (BSMV) et le virus de la mosaïque des stries en fuseaux (WSMV). Ces deux virus sont transmis par le champignon unicellulaire *Polymyxa graminis* qui appartient à la classe des *Plasmodiophoromycetes* (Carroll et al., 2002 ; Ratti et al., 2004).

Les investigations effectuées au cours de ces dernières années dans plusieurs régions céréalières ont indiqué que les maladies virales telles que la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) est en train de prendre de plus en plus d'ampleur en Algérie (Ouffroukh et al., 2011 ; Khaldia et al., 2022).

I.7.2.3- Les ravageurs et les nématodes

Les pucerons

Les espèces les plus importantes sont, *Sitobion avenae* et *Rhopalosiphum padi*. Ce sont des insectes piqueurs suceurs, qui peuvent transmettre des virus comme le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (Aqueel et Leather, 2011).

La cécidomyie de blé

La cécidomyie orange du blé *Sitodiplosis mosellana*, une espèce appartient aux diptères. C'est au stade larvaire que cet insecte cause les dégâts, les larves occasionnent des malformations des grains et diminue leur poids sec (Doane et Olfert, 2008).

Le vers blanc

Le hanneton européen (*Geotrogus deserticola*), est un coléoptère dont le stade larvaire L3 est le stade dévastateur. Cet insecte se nourrit des racines des différentes céréales, provoquant des grandes plages dépourvues de végétation (Mesbah et al., 2002).

La punaise des céréales

L'espèce la plus répandue en Algérie est *Aelia germari* qui ravage les céréales (le blé surtout), cet insecte attribué à l'ordre des hétéroptères. Les nymphes et les adultes piquent tous

les organes de la plante, causant des taches jaunes de forme irrégulière qui s'agrandissent au cours de l'été (Salis et *al.*, 2013).

Les nématodes

Les nématodes sont très répons dans les sols céréaliers, deux espèces sont les plus associés au blé, le nématode à kystes *Heterodera avenae* et le nématode a galles *Meloidogyne naasi* (Barloy et *al.*, 2007). Les résultats des analyses nématologiques effectuées en Algérie sur 1787 échantillons de sol ont révélé que 53 % des parcelles prospectées sont infestées par le complexe *Heterodera* spp. La fréquence des infestations varie entre 48 et 51 % en fonction des régions (Assia et *al.*, 2019)

I.7.2.4- Les adventices

Les plantes adventices constituent une contrainte biotique majeure, qui cause des pertes importantes au rendement, gêne à la moisson et sont considérées comme des foyers de contaminations.

Parmi les adventices les plus fréquentes en Algérie, les monocotylédones parmi lesquelles le brome (*Bromus rigidum*), la folle avoine (*Avena sterilis*) et le ray gras (*Lolium multiflorum*). Les dicotylédones les plus dominants sont, le coquelicot (*Papaver rhoeas*), la moutarde du champ (*Sinapis arvensis*) et le souci de champ (*calendula arvensis*) (Belaid, 1996).

La mycoflore tellurique
du blé

II- La biodiversité rhizosphérique du blé**II.1- Introduction**

Au niveau de l'agroécosystème, les populations ne sont pas simplement juxtaposées, mais chacune exerce des interactions avec les autres communautés. Le sol agraire est un milieu vivant composé de nombreux microorganismes (Kuyper et Giller, 2011). La partie rhizosphérique est certainement l'habitat le plus dynamique connu, car elle héberge et nourrit la plus grande diversité d'organismes procaryotes et eucaryotes, elle est composée de trois zones, l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface racinaire) et l'ectorhizosphère (sol rhizosphérique) (Lynch, 1983). Ce dernier est le lieu de diverses interactions entre les racines des plantes et les microorganismes du sol.

Les microorganismes rhizosphériques (les bactéries et les champignons en particulier) se divisent en trois catégories, les microorganismes symbiotiques, les microorganismes saprophytes et les microorganismes parasitaires. Ces espèces interfèrent dans plusieurs activités du sol, telles que la décomposition de la matière organique, la participation dans le cycle biogéochimique d'éléments majeurs (azote, phosphore et carbone), la sécrétion des molécules nécessaires pour le développement des plantes et la réduction des taux des espèces néfastes (Van Veen et Kuikman, 1990 ; Davet, 1996). D'autres part, les espèces nuisibles qui affectent les plantes cultivées, sont généralement infectieux, qui causent des maladies et des pertes de rendement (Rouxel, 2001).

Le système racinaire de la plante est l'organe souterrain qui assure la nutrition, l'hydratation et la fixation de la plante. Il est également le siège de diverses interactions avec les racines des plantes voisines et les microorganismes du sol. Les composés racinaires libérés sont issus de phénomènes de sécrétion de cellules vivantes de la coiffe (métabolites secondaires, enzymes, protéines), d'exsudats diffusées passivement du cytosol vers la solution du sol tels que (sucres, acides carboxyliques et acides aminés) et des produits provient de la lyse cellulaire ou de la sénescence tissulaire (Bais et *al.*, 2006). Ces rhizodépôts étant un des facteurs majeurs affectant les communautés microbiennes telluriques.

II.2- Diversité de la flore fongique tellurique du blé

Selon Newton et *al.* (2010), les interactions entre les plantes et les microorganismes, au sein de la rhizosphère, sont déterminées selon le mode trophique des microorganismes qui les établissent (mutualisme, neutralisme et parasitisme). Ces interactions sont à la base d'un dialogue chimique entre les deux partenaires, de ce fait la composition métabolique du blé est récemment étudiée. Selon Monreal et Schnitzer (2013), Plusieurs familles de composés connues dans le règne végétal peuvent être présents dans les racines tels que les dérivés de composés phénoliques, les terpènes ou les dérivés d'acides gras, ainsi que d'autres métabolites tels que les benzoxazinoïdes qui sont plus spécifiques à la famille des Poaceae (Neal et *al.*, 2012 ; Adhikari et *al.*, 2015).

II.2.1- Les champignons symbiotiques

La symbiose est le synonyme du mutualisme, ce qui signifie un avantage réciproque entre la plante et les microorganismes qui interfèrent avec elle (nutrition, protection ou induction de la résistance). Grâce aux symbioses fongiques, 90 % des espèces végétales sont mycorhizées ce qui leur permet de mieux se développer et leur assurent une protection contre d'autres micro-organismes pathogènes. Il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes tels que, l'Ectomycorhize, l'Ecto-endomycorize et l'Endomycorhize à arbuscule. Ce dernier est le plus répandu chez la famille des Poaceae. Cette association peut contribuer à l'amélioration de la productivité de la culture de blé par l'augmentation de l'absorption des macroéléments (Azote, phosphate et Potassium) et même les oligoéléments par la plante (Ellouze et *al.*, 2016).

Les champignons Endomycorhizes à arbuscules sont des biotrophes obligatoires, cosmopolites et ne présentent pas une spécificité d'hôte. Ils appartiennent aux Glomeromycètes (anciennement classés dans les Zygomycètes) (Schwarzott et *al.*, 2001), l'espèce la plus répandue est *Rhizophagus irregularis*. Ces champignons sont conservés dans le sol sous forme de mycélium ou de spores (Phase a-symbiotique) (Gianinazzi-Pearson et Brechenmacher, 2004). Lors d'une présence de la plante et les conditions édaphiques favorables, les spores reçoivent des signaux chimiques d'origine végétale (Strigolactones) qui stimulent leurs germinations, puis le champignon développe un hyphopode sur la surface de la racine et également secrète des molécules composées de la chitine (Facteur Myc) captées par les racines de plante (Phase pré-symbiotique) (Figure 05). Une fois le contact s'effectue entre les deux symbiotes, le champignon pénètre à l'intérieur de la racine, formant ensuite une structure complexe et ramifiée appelée arbuscules dans les cellules corticales (Delaux et

al., 2013). Ces arbuscules représentent une plate-forme d'échanges de nutriments, d'une part la plante fournit au champignon une source d'énergie sous forme de carbone, et d'autre part le champignon favorise l'assimilation des éléments nutritifs comme le phosphate à la plante (Phase symbiotique).

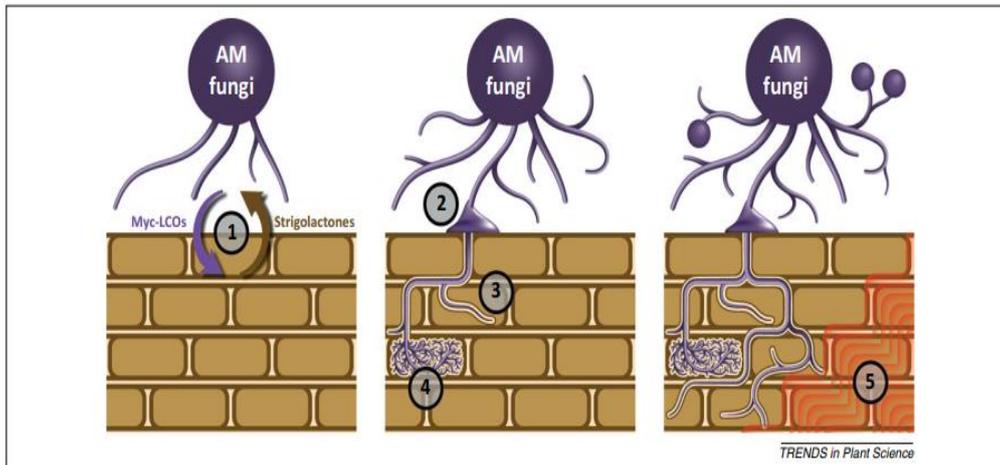


Figure 5: les étapes de l'endomycorhization à arbuscule (Delaux et *al.*, 2013).

II.2.2- Les champignons saprophytes

Selon Tedersoo et *al.* (2014), les champignons saprophytes sont généralement des espèces nécrotrophes, qui se nourrissent de la matière organique morte ou des plantes sénescents sans leur causer des lésions. Ces derniers sont les principaux acteurs de la décomposition de la matière organique en milieu naturel. Ce sont des acteurs essentiels dans le fonctionnement et l'équilibre des écosystèmes (Brussaard et *al.*, 2007). Certaines espèces peuvent contribuer à la fertilisation des sols, et la formation de l'humus.

Le rôle prépondérant de la flore fongique tellurique dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques résulte de l'aptitude de ces microorganismes à produire un ensemble d'enzymes extracellulaires (Sinsabaugh, 2005). Leur richesse en enzymes leur permet de dégrader la cellulose et même la lignine et d'éviter l'accumulation des déchets végétaux.

D'un autre côté, Plusieurs champignons saprophytes exercent une bioprotection contre les agents phytopathogènes, ou d'autres parasites animaux intervenant ainsi dans la lutte biologique tels que *Trichoderma sp.* (Bouanaka et *al.*, 2021 ; Dugassa et *al.*, 2021).

II.2.3- Les champignons parasites

La rhizosphère du blé contient une diversité d'agents fongiques dont certains sont des parasites, tels que *Fusarium*, *Microdochium*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris* et *Pythium* (tableau 03). Ces parasites telluriques peuvent attaquer le blé depuis le semis causant des pourritures racinaires et des fontes de semis (Boulif, 2006).

Les champignons parasites s'associent pour attaquer le blé en conditions de faible pluviométrie (sécheresse) et de hautes températures. Pour cette raison, les pourritures des racines et des collets sont fréquentes dans les zones arides et semi-arides. Il est important de noter que les populations de ces agents pathogènes dans le sol augmentent avec la monoculture du blé (Beccari et al., 2018).

Tableau 3: champignons phytopathogènes telluriques du blé (Boulif, 2006)

Maladie	Agents causaux	Conditions favorables
Fontes de semis	<i>Pythium</i> spp, <i>Bipolaris sorokiniana</i> <i>Fusarium</i> spp	Monoculture + sols trempés
Pourriture des racines et des collets	<i>Fusarium roseum</i> var. <i>Culmorum</i> <i>Bipolaris sorokiniana</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt)	Monoculture + Stress hydrique (Excès d'humidité en début de saison ou sécheresse en cours de saison)

II.2.3.1- *Bipolaris sorokiniana*

Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker, dont le teleomorphe est *Cochliobolus sativus* (Ito et Kuribayashi) Drechs. ex Dastur, c'est un champignon qui appartient au phylum des Ascomycètes de la famille des Pleosporaceae. C'est l'un des agents pathogènes telluriques qui peut attaquer tous les organes de blé, y compris les racines, les tiges, les feuilles et les graines (Tunali et al., 2008). La pourriture des racines et du collet et la tache helminthosporienne sont les principales maladies causées par *B. sorokiniana* chez les céréales (Acharya et al., 2011).

Selon Barnett et Hunter (1972), ce champignon est caractérisé par un simple conidiophore de couleur brune, produisant des conidies elliptiques, brunes et pluricellulaires (phragmospores). Anciennement inclus dans le genre *Helminthosporium*.

II.2.3.2- *Rhizoctonia solani*

Le champignon *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorphe *Thanatephorus cucumeris* [Frank] Donk) est parmi divers agents pathogènes provoquant la pourriture racinaire chez les Poaceae (González et al., 2006). La forme teleomorphe fait partie de la classe des Basidiomycètes, l'ordre des Ceratobasidiales et la famille des Ceratobasidiaceae, les hyphes de cette espèce sont larges, de couleur foncée et verticalement ramifiés, les fructifications asexuées et les conidies sont absentes. Ce champignon est connu par sa capacité de survie pendant plusieurs années dans le sol sous forme de sclérotés (Barnett et Hunter, 1972 ; González et al., 2006).

II.2.3.3- *Pythium* spp.

Deux espèces sont les plus dominants dans les cultures de blé, *Pythium ultimum* et *Pythium graminicola*. Ce genre appartient à la classe des Oomycètes, ordre des Pythiales et à la famille des Pythiaceae (Stiles et al., 2007). Les Oomycètes sont considérés comme des pseudo-champignons, ils sont caractérisés par leur paroi cellulosique (dépourvus de la chitine) et par la production des zoospores asexuées et biflagellées qui envahissent les racines du blé en se déplaçant dans l'eau pelliculaire du sol. Ce genre est caractérisé par un thalle filamenteux coenocytique et par une reproduction sexuée hétérogamétangique (la fécondation de l'oogone par l'anthéridie aboutie à la formation de l'oospore (organe de conservation) qui porte une paroi épaisse (Binagwa et al., 2016).

II.2.3.4- *Fusarium* spp.

Le genre *Fusarium* comporte plusieurs espèces qui causent des dégâts importants en céréaliculture, à savoir *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* et *F. pseudogrameniarum* (Figure 06). Ces espèces font partie du complexe fongique responsables aux maladies de fonte de semis, des pourritures des racines et du collet, et la fusariose de l'épi (Smiley et al., 2005 ; Abdallah-Nekache et al., 2019). Le genre *Fusarium* est connu par sa grande diversité morphologique. Il appartient au phylum des Deutéromycètes, la sous-classe des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariacées. La forme sexuée de certaines espèces a été observé et classée dans le phylum des Ascomycètes, l'ordre des Hypocreales et à la famille des Nectriaceae. Plusieurs espèces appartiennent au genre *Gibberella* et d'autres espèces au genre

Nectria. Le stade parfait de *Fusarium culmorum* (téléomorphe) est inconnu et le stade parfait de *F. graminearum* est *Gibberella zeae* (Nelson et al., 1983 ; Leslie et Summerll, 2008).

Ces espèces font partie de la section Discolor (Booth, 1975). Les membres de la section Discolor sont souvent appelés fusaria des céréales. Ils ne forment pas de microconidies, sauf dans certaines conditions de culture, et sont généralement distingués selon la morphologie des macroconidies qui sont relativement à paroi épaisse, distinctement cloisonnée, fusiforme à falciforme avec une cellule apicale à bec ou fusoïde. Les chlamydospores sont généralement présentes et peuvent se former à partir des hyphes ou des cellules des macroconidies (Nelson et al., 1983 ; Leslie et Summerll, 2008).

Selon Cumagun et al. (2004), le genre *Fusarium* est parmi les champignons majeurs producteurs des mycotoxines de la famille des Trichothécènes, ces métabolites secondaires toxiques sont capables d'inhiber la synthèse des protéines des cellules eucaryotes. En raison des problèmes de sécurité alimentaire causés par les trichothécènes aux animaux et aux humains, le US Food et Drug Administration et Union Européen ont fixé des niveaux consultatifs pour leur présence dans les céréales destinées à la consommation humaine et à l'alimentation animale (Van Egmond et al., 2007 ; US Food and Drug Administration, 2010).

Ces champignons sont également capables de produire d'autres fusariotoxines tels que les fumonisines (FB) et la zéaralénone (ZEA), ces derniers présentent des effets cancérigène, mutagène, hépatotoxique et immunomodulateur. En plus de leurs effets sur la santé, les mycotoxines altèrent la qualité physique et technologique des produits résultants de grains contaminés (Touati-Hattab et al., 2016 ; Chtioui et al., 2022).

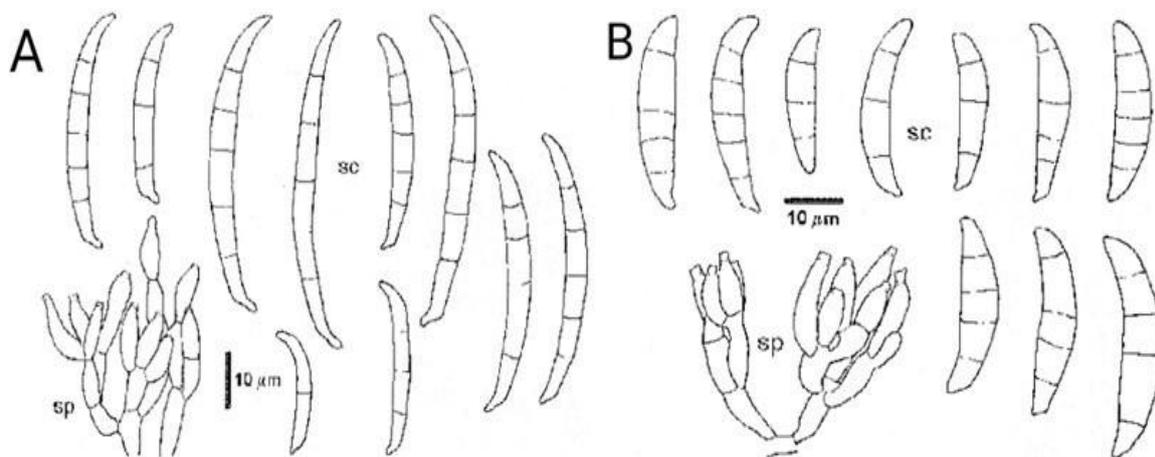


Figure 6: A. *Fusarium graminearum* et B. *Fusarium culmorum* (Seifert, 1996).

II.2.3.5- *Microdochium* sp.

Le genre *Microdochium* appartient à la famille des Tuberculariaceae. Ce dernier regroupe deux espèces, *M. nivale* et *M. majus* (Glynn et al., 2005), provoquant les mêmes symptômes que les *Fusarium*. Ces deux espèces ne produisent pas de mycotoxines. *Microdochium nivale* (*Microdochium nivale* var *majus* et *Microdochium nivale* var *nivale*) sont décrits dans la littérature comme agent de pourriture des racines et du collet chez les céréales, et agents de la fusariose des épis (Parry et al., 1995 ; Smiley et al., 2005).

Auparavant, ce genre était classé comme *Fusarium* en raison de son implication avec le complexe parasitaire responsable de la maladie de la fusariose des Poacées, et en se basant sur la morphologie de ces conidies en forme de croisant (fuseau). En 1983, après avoir observé leur forme téléomorphe (*Monographella*), Samuel et Halett les avaient reclassés en un genre différent, *Microdochium* (Valade, 2014).

II.3- La Fusariose du blé

Les fusarioses sont parmi les maladies les plus dangereuses du blé. Elles présentent un effet direct sur le rendement provoquant une baisse de la faculté germinative des semences, une diminution du nombre de grains par épi et du poids de mille grains (Gärtner et al., 2008). Les principales maladies causées par le genre *Fusarium* et *Microdochium* sont la pourriture des racines et du collet, la fonte de semis et la fusariose de l'épi (Smiley et al., 2005).

II.3.1- La maladie de la pourriture des racines et du collet

La pourriture des racines et du collet, est une importante maladie du blé qui engendre des graves problèmes pour la production de blé dans de nombreuses régions du monde, en particulier dans les zones arides et semi-arides. Selon le moment de l'infection et le stade phénologique de l'hôte, elle provoque la fonte de semis dans le cas d'une infection précoce ou la pourriture du système racinaire au cours de la croissance végétative. D'après Poole et al. (2013), des réductions de 35% du rendement du blé ont été signalés dans le nord-ouest du Pacifique des Etats unis. D'autres études de Daniel et Simpfendorfer (2008) dans l'Ouest de l'Australie ont montré une réduction de 25% de rendement sur le blé tendre et 58% de pertes sur blé dur. En Tunisie, les pertes en rendement étaient de l'ordre de 15% sous conditions humide et de 25% sous conditions de sécheresse (Chekali et al., 2013)

Selon Abdallah-Nekache et al. (2019) et Bencheikh et al. (2020), la pourriture du collet causé par le genre *Fusarium* (*Fusarium* Crown Rot) est la maladie majeure du blé en Algérie

qui cause des dégâts importants dans la plupart des régions céréalières. Cette maladie est causée par un complexe d'agents telluriques y compris, *F. pseudograminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. cerealis* et *Microdochium nivale* (Abdallah-Nekache et al., 2019 ; Bencheikh et al., 2020 ; Bouanaka et al., 2022).

Le complexe fongique responsable des pourritures racinaires inclut également *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (Lucas et al., 1993 ; Tunali et al., 2008 ; Acharya et al., 2011 ; Poole et al., 2013).

II.3.1.1- Symptomatologie

A Selon Scherm et al. (2013) et Touhami et Douira (2019), les symptômes s'expriment d'abord au niveau des semences qui pourrissent ou les plantules meurent avant leur levée (figure 07). Les plantules qui lèvent sont jaunes et rabougries, une pourriture brune et des lésions nécrotiques sont présents dans leurs racines, leurs collets et à la base de leurs tiges. Un flétrissement accompagné avec un jaunissement apparaitre comme un symptôme secondaire. Au niveau du champ des foyers nécrotiques et des plages de manque de levé sont visibles.



Figure 7: A- fonte de semis et B- la pourriture du collet. (Anonyme 2, 2015).

II.3.1.2- Epidémiologie

✚ Inoculum primaire

En absence de la plante hôte *Fusarium* spp. vivent en état de saprophytisme sur les débris des végétaux ou dans le sol sous forme de chlamydospores. Les résidus des plantes infectées et les semences infectées sont à l'origine des sources d'inoculum primaire. Une fois la plante hôte s'installe dans le sol à proximité de l'inoculum primaire, ses exsudats racinaires

stimulent la croissance des champignons qui s'approchent à la surface des racines (Figure 08). Lors d'une attaque précoce, les agents pathogènes interagissent à la germination de la radicule provoquant des fontes de semis où les plantules se nécrosent et meurent juste après la germination des semences ou à la levée. (Scherf *et al.*, 2013). Alternativement, quand la plantule dépasse cette étape et développe un système racinaire, les agents pathogènes forment des hyphes rampants qui envahissent la surface des racines, pénètrent à l'intérieur, et colonisent les cellules en puisant leurs contenus, suivi de l'apparition des lésions nécrotiques autour des racines (Huisman, 1982 ; Chakraborty *et al.*, 2006).

✚ Infection secondaire

La migration de l'agent pathogène à l'intérieur des racines infectées au sein d'une même plante provoque l'auto-infection, cette propagation entraîne une augmentation significative de la biomasse fongique, ce qui conduit à la production de l'inoculum secondaire (Stack, 1980 ; Sutton *et al.*, 2006). L'inoculum secondaire assure l'allo-infection (contamination de plante à plante) à travers le sol, ceci se traduit par l'apparition des plages nécrotiques au sein des parcelles contaminées (Gilligan, 1994).

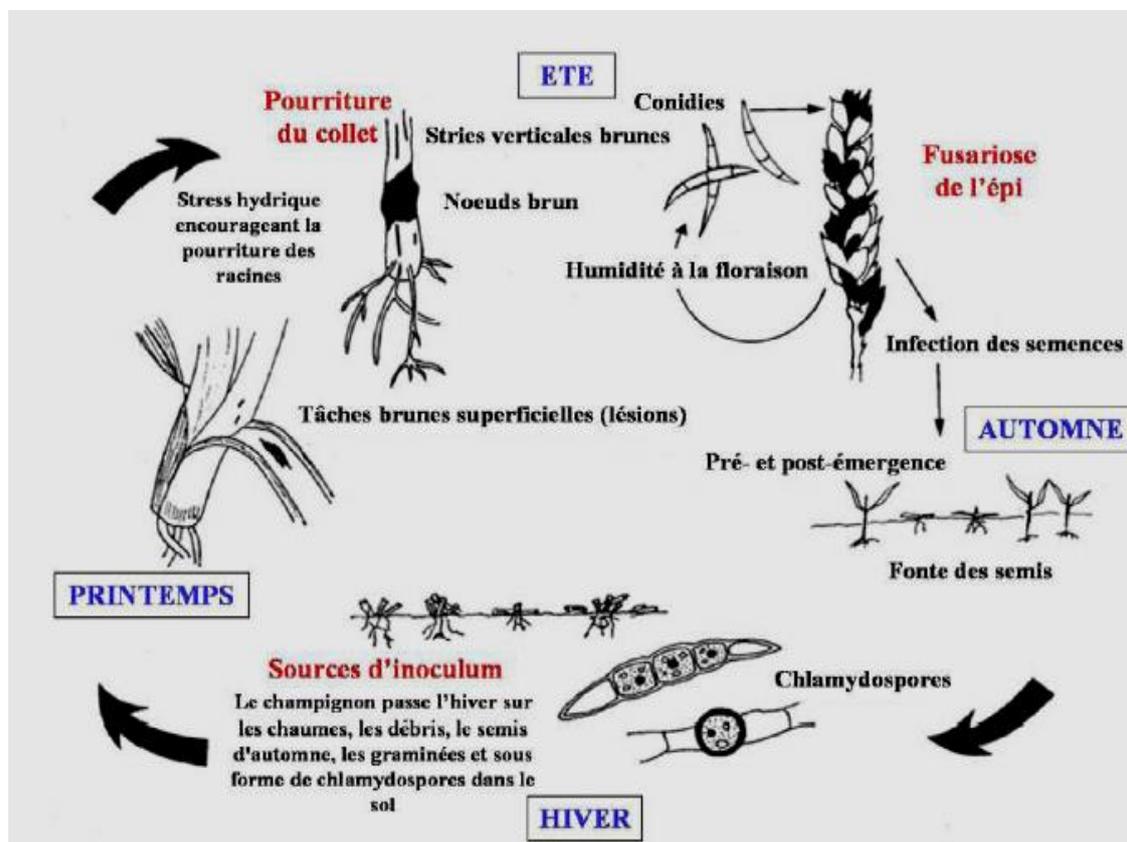


Figure 8: Cycle de développement de la fusariose du blé (Parry *et al.*, 1995).

II.3.2- La maladie de la fusariose de l'épi

La fusariose de l'épi ou Fusarium Head Blight (FHB) est une maladie dévastatrice d'importance mondiale, affectant le blé dur et le blé tendre dans la plupart des régions céréalières. Elle a été décrite pour la première fois par W.G Smith en 1884 (Goswami et Kistler, 2004). Selon Wilson et *al.* (2018), l'estimation des pertes de rendement pour le blé aux États-Unis s'élevait à 1,176 milliards de dollars en 2016. La particularité de cette maladie provient de la grande diversité d'agents pathogènes qui peuvent cohabiter sur un même épi de blé sous forme d'un complexe fusarien, ces agents englobent plus de 20 espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium*. Les agents les plus prédominants sont *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *Microdochium nivale* (Xu et Nicholson, 2009).

Selon Jennings et *al.* (2004), le champignon *F. graminearum* semble le plus dominant et montre un haut niveau de pathogénicité, ce champignon a aussi la capacité d'attaquer toutes les parties de la plante depuis les racines jusqu'aux épis.

Le blé est particulièrement sensible à la fusariose de l'épi au moment de la floraison. L'infection peut avoir lieu tout au long du stade de développement du grain jusqu'au stade pâteux (Figure 09). Chetouhi et *al.* (2016) suggèrent l'existence d'une phase de latence durant laquelle, après pénétration des tissus végétaux, le champignon attend que la formation du grain débute pour initier son développement. Ceci est illustré en particulier par le fait que l'évolution de la biomasse fongique n'est pas linéaire au cours de l'infection du grain, avec une forte multiplication de *F. graminearum* débutant uniquement lors de la phase de remplissage du grain.

La maladie est favorisée par des températures chaudes associées à une humidité élevée au moment de la floraison (Agrios, 2005), et lorsque l'inoculum primaire du champignon est abondant, il hiverne dans des fructifications sexuées appelées périthèces au niveau du sol, sur le chaume et les débris des végétaux. Les macroconidies et les ascospores produites par le pathogène sont dispersées par le vent et des éclaboussures de pluie jusqu'à ce qu'ils atterrissent sur les épis de blé (Osborne et Stein, 2007). L'infection débute lors de la germination des spores sur les épis du blé, par la suite le champignon colonise les anthères et les glumes. Ces infections provoquent des graves dommages tels que la stérilité florale et la réduction du nombre des graines produites (Walter et *al.*, 2010), en plus elle affecte directement la qualité nutritionnelle des grains et provoque de graves problèmes sanitaires via la contamination des grains par des mycotoxines trichothécènes, notamment le déoxynivalénol (DON) qui résiste aux procédés de transformation. Cette mycotoxine est la plus fréquemment trouvée dans les produits de

consommation, elle agit comme facteur de virulence contribuant aux dommages cellulaires (O'Mara et *al.*, 2020).

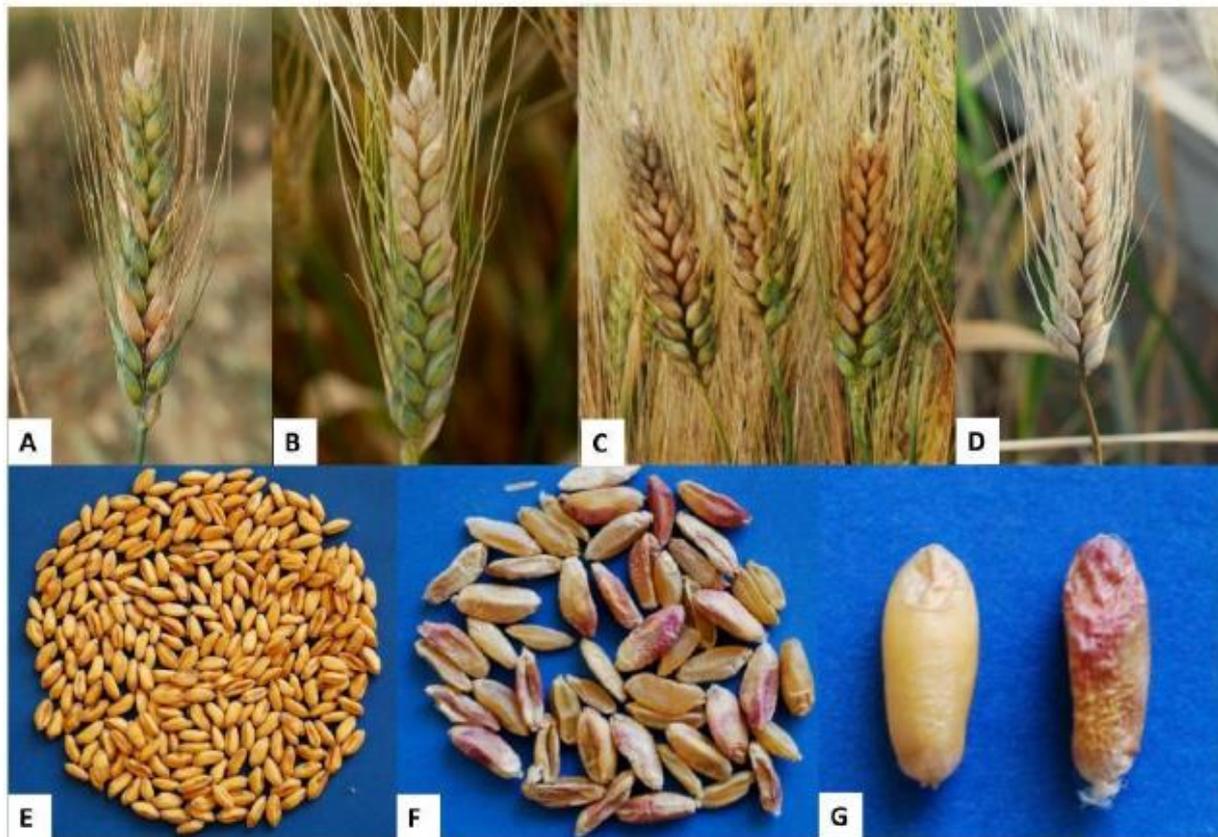


Figure 9: Symptômes de la fusariose de l'épi sur le blé dur (A-D) et sur les semences affectées (F-G) comparées par les semences saines (E) (Chtioui et *al.*, 2022).

II.4- Gestion des risques de la fusariose de blé

La gestion des risques de la fusariose du blé est difficile en raison de la diversité des agents responsables de la maladie, et leurs capacités de persister de longues périodes même en absence de la plante hôte.

Plusieurs moyens de lutte sont disponibles pour réduire l'influence de ces agents pathogènes, cependant la prophylaxie reste la meilleure méthode pour combattre ces parasites telluriques, car une fois l'agent pathogène s'installe dans le sol, l'application des autres méthodes de lutte sera plus difficile.

Les pratiques culturales consistent à utiliser des semences saines et certifiées, des variétés tolérantes ou résistantes, retarder le semis jusqu'à ce que les conditions soient favorables à une levée rapide et uniforme, et éliminer les débris végétaux de l'année précédente pour réduire le taux d'inoculum dans le sol. La solarisation du sol et l'emploi des rotations de

culture minimise également le développement des maladies. Des rotations avec des dicotylédones, comme les légumineuses réduisent efficacement le risque de développement des pourritures racinaires (Chakraborty et *al.*, 2006 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009 ; Pouleur et Comeau, 2011).

La lutte chimique demeure un moyen de contrôle efficace contre les pourritures racinaires. Le traitement des semences de blé avec des fongicides à large spectre d'action protège les racines du blé des attaques des champignons telluriques. Parmi les fongicides utilisés contre la fusariose du blé on peut citer : le fludioxonil le benomyl, le tubuconazole, l'azoxystrobine, difénoconazole et le mancozeb (Almasudy et *al.*, 2015 ; Glinushkin et *al.*, 2019). Les études de Willyerd et *al.* (2012) ont montré que l'utilisation des fongicides de classe des inhibiteurs de déméthylation contre la fusariose du blé diminue la gravité de la maladie et la contamination par le DON, en particulier lorsqu'ils sont appliqués sur des cultivars montrent un certain niveau de résistance.

En raison de l'influence néfaste des intrants chimiques qui sont toxiques pour les utilisateurs et pour l'environnement, les recherches actuellement menées dans ce domaine, tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte biologique, impliquant des organismes vivants. Plusieurs études ont montré le potentiel antagoniste de quelques champignons et des bactéries contre les agents phytopathogènes telluriques, parmi lesquelles on a les champignons du genre *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Clonostachys* et *Rhodotorula* (Sreenivasaprasad et Sreenivasaprasad, 1993 ; Roberti et *al.*, 2008). De plus une large gamme de bactéries qui ont été utilisés pour empêcher la propagation de la maladie, parmi lesquelles on a les rhizobactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* (Gull et Hafeez, 2012 ; Mavrodi et *al.*, 2012)

En générale, la protection raisonnée de la culture du blé vis-à-vis des maladies telluriques est basée essentiellement sur l'utilisation combinée de moyens préventifs et curatifs, et la recherche des alternatives efficaces, durables et moins nocifs pour l'Homme et l'environnement.

*Biocontrôle des champignons
telluriques*

III- Biocontrôle des champignons telluriques

III.1- Introduction

Actuellement, la gestion des bioagresseurs repose largement sur l'utilisation des produits phytosanitaires. L'usage abusif des intrants chimiques est responsable d'un ensemble des soucis environnementaux, tel que la pollution des sols, le déséquilibre de l'agroécosystème et encore l'apparition des maladies et des ravageurs résistants aux traitements phytosanitaires. Steinberg et Gurr (2020) ont indiqué que cette résistance due par le fait que la majorité des fongicides agissent sur un seul site d'un métabolisme spécifique, conduisant à une mutation à cause d'une succession de générations. Un autre mécanisme de résistance a été développé chez les agents phytopathogènes, c'est la détoxification des substances chimiques par le cytochrome 450 (un système complexe d'enzymes qui interviennent dans les réactions d'oxydoréduction d'un grand nombre de molécules) (Dekker, 2018). Par exemple dans le cas de *Fusarium graminearum*, la production d'une famille de cytochrome P450 (sterol 14 α -demethylase) a permis d'assurer la transformation du fongicide tébuconazole en produit non toxique (Qian et al., 2018), de ce fait il est nécessaire de trouver des alternatives efficaces et durables, tels que le contrôle biologique des stress biotiques.

Le contrôle biologique est basé sur le concept de service écosystémique, dans la nature, chaque espèce vivante a un ou plusieurs ennemis ou compétiteurs naturels ce qui rend le milieu en équilibre. En effet le biocontrôle signifie l'utilisation d'organismes bénéfiques ou leurs métabolites pour minimiser les effets néfastes des agents phytopathogènes (Eilenberg et al., 2001).

La lutte biologique est une discipline scientifique basée sur la connaissance et l'observation de la biologie de chacun des organismes impliqués mais aussi sur la prise en considération des interactions complexes qui s'instaurent entre eux. Elle présente un rôle important dans le contrôle des maladies. L'augmentation de l'abondance d'une souche particulière à proximité d'une plante peut supprimer la maladie sans produire d'effets néfastes sur le reste de la communauté microbienne ou d'autres organismes de l'écosystème. De plus, les études de Bernhoft et al. (2010) ont montré que les céréales produites biologiquement présentaient des taux de contamination plus faible par les *Fusarium* et leurs mycotoxines en comparaison avec les céréales produites en agriculture conventionnelle.

III.2- Biocontrôle par les agents antagonistes

Etant donné que les bienfaits apportés par l'utilisation des agents de lutte biologique, ces dernières années plusieurs travaux ont permis de caractériser les antagonistes des champignons phytopathogènes associés à la culture de blé (tableau 04).

Tableau 4: Les agents antagonistes présentant des effets de biocontrôle vis-à-vis des champignons phytopathogènes telluriques du blé

Antagonistes	Pathogènes	Références
<i>Trichoderma gamsii</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	(Sarrocco et al., 2013).
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>F. culmorum/ Bipolaris sorokiniana</i>	(Abdel-Fattah et al., 2007 ; Sempere Ferre et Santamarina, 2010).
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>F. culmorum/ Rhizoctonia cerealis</i>	(Jensen et al., 2000 ; Innocenti et al., 2003).
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>F. graminearum/ Pythium spp./ Rhizoctonia solani</i>	(Kim et al., 1997 ; Moussa et al., 2013).
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium spp./ Bipolaris sorokiniana</i>	(Dal Bello et al., 2003 ; Khan et al., 2006).
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Rhizoctonia solani/ Fusarium spp.</i>	(Elad et Baker, 1985; Freitas et Gemida, 1991).
<i>Streptomyces spp.</i>	<i>Fusarium spp./ Pythium sp.</i>	(Bubici, 2018 ; Araujo et al., 2020).

En Europe, il existe deux agents de control biologique commercialisés contre *F. graminearum*, Polyversum® de DeSangoss à base de *Pythium oligandrum* et Cerall® de Belchim crop protection à base de *Pseudomonas chlororaphis* (Pellan et al., 2021).

III.2.1- Les rhizobactéries PGPR comme agents de lutte biologique

Les rhizobactéries sont cosmopolites, se trouvent dans tous les écosystèmes, notamment dans le sol rhizosphérique, qui bénéficient des rhizodépôts sécrétés par la plante (Lugtenberg et Kamilova, 2009). Deux catégories de microorganismes sont présentes : les épiphytes qui vivent généralement dans le rhizoplan (à la surface des racines) tels que les PGPR, de nombreux genres sont recensés, Azotobacter, Bacillus, Pseudomonas, Burkholderia D'autres, les endophytes qui pénètrent à l'intérieur des racines et colonisent les cellules végétales tels que les Actinomycètes, ce sont des bactéries filamenteuses portant des hyphes ramifiés, le genre Streptomyces est le plus connu (Ventura et al., 2007 ; Pavlova et al., 2017 ; Haskett et al., 2021).

Ces microorganismes peuvent stimuler la croissance des plantes (biofertilisation et la synthèse des phytohormones) (Figure 10). Ainsi que la protection contre les différents stress biotiques en agissant soit directement sur la plante par l'induction de la résistance, soit indirectement par l'élimination des agents pathogènes (parasitisme, antibiose et compétition) (Chet *et al.*, 1990 ; Moenne-Loccoz *et al.*, 2019).

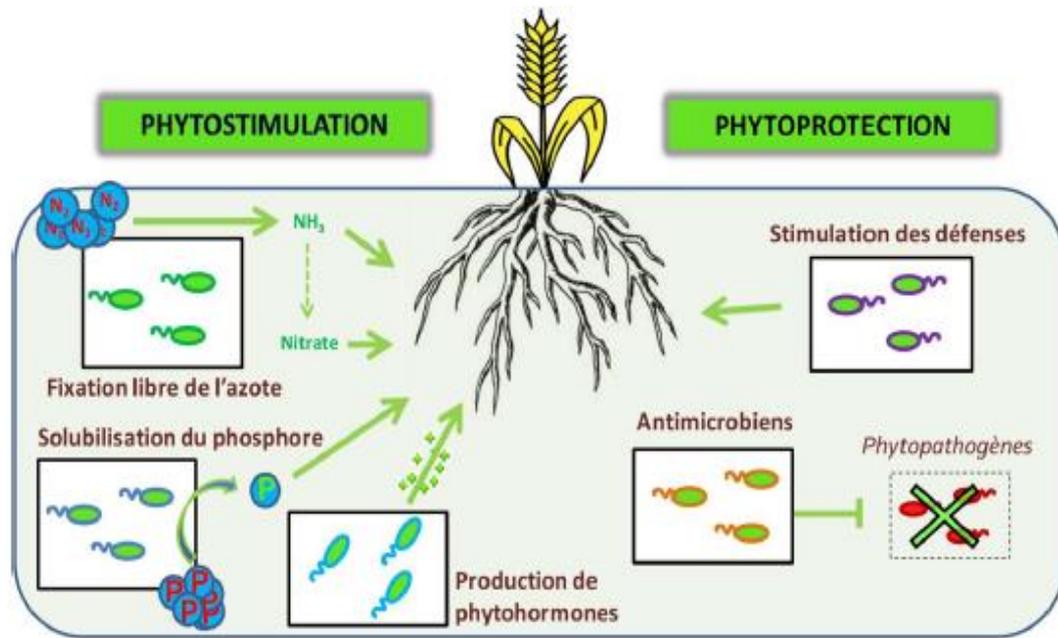


Figure 10: Modes d'action des rhizobactéries bénéfiques, effets de phytostimulation ou de phytoprotection du blé (Moenne-Loccoz *et al.*, 2019).

III.2.1.1- *Pseudomonas sp.*

Les *Pseudomonas* appartiennent à la classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonadales et à la famille des Pseudomonadaceae. Ces bactéries sont mobiles (un ou plusieurs flagelles polaires), bâtonnets, non sporulants à Gram négatif et teneur en GC de 58 à 69%. Ils sont catalase positif et chimioorganotrophes, à métabolisme strictement respiratoire (Peix *et al.*, 2009).

Le genre *Pseudomonas* regroupe plus de 140 espèces, un faible nombre d'espèces sont reconnus comme des phytopathogènes parmi celles-ci *Pseudomonas syringae*, d'autres sont souvent utilisées comme des PGPR tels que, *P. putida*, *P. fluorescens* (Peix *et al.*, 2009). Ce genre est facilement distinctif grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique (O'Sullivan *et al.*, 1992).

Les *Pseudomonas* sont très abondantes dans la rhizosphère de nombreuses plantes (Mokrani *et al.*, 2019), et connus par une large gamme de fonctions bénéfiques sur les végétaux avec multiples modes d'actions.

Selon Emmert et Handelsman (1999), Les premières rhizobactéries commercialisées en tant que produit biologique pour lutter contre des champignons phytopathogènes appartenait au genre *Pseudomonas*. Ces derniers sont connus par un ensemble de mécanismes directs et indirects envers les pathogènes. Connaître les différents mécanismes d'actions est essentielle au succès du biocontrôle.

Promotion de la croissance des plantes

Les rhizobactéries du genre *Pseudomonas* sont capable d'adhérer aux racines des plantes d'une façon intense, et exercent une action bénéfique sur l'amélioration de la croissance et la productivité des végétaux (Pavlova *et al.*, 2017). Ces mécanismes reposent principalement sur la solubilisation des macro et oligoéléments nécessaire pour le développement de la plante.

L'azote est l'élément le plus indispensable pour le développement des plantes car il occupe une place importante dans les différents métabolismes. Chan *et al.* (1994) ont rapporté que certaines espèces appartenant au genre *Pseudomonas* possèdent des mécanismes pour accueillir et exprimer les gènes *nif* qui sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique, et retrouvés également chez les bactéries symbiotiques (*Rhizobium*).

Le second élément majeur est le phosphore, il agit comme un transporteur d'énergie et favorise notamment le développement du système racinaire des plantes. Le phosphore dans le sol se trouve généralement sous forme insoluble en forte interaction avec d'autres composés minéraux (Ca et Fe). Ces PGPR sont connues par leurs grandes capacités de transformer le phosphore insoluble en des formes assimilables pour la plante, la forme monobasique H_2PO_4^- et dibasique HPO_4^{2-} . Miller *et al.* (2010) ont indiqué que les *Pseudomonas* ont la capacité de produire l'acide gluconique et 2-ketogluconique, qui sont capable de solubiliser le phosphore inorganique. D'autres travaux de Macleod *et al.* (2015) et Georgieva *et al.* (2018) ont montré que ces espèces peut minéraliser le phosphore organique par la production de phosphatase.

Le fer est un oligoélément vital pour la plante, il intervient dans la respiration et la photosynthèse. Il se trouve sous forme insoluble (Fe^{3+}). Les *Pseudomonas* sont capables de chélater le fer par la production des sidérophores pour faciliter l'assimilation du fer par les

plantes (Gull et Hafeez, 2012). Cornu et *al.* (2014) ont démontré que la pyoverdine était le sidérophore le plus susceptible d'affecter la mobilité et la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles calcaires.

Production des phytohormones

L'Acide Indole Acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus abondante, impliquée dans la régulation de la croissance et du développement des plantes (Szkop et Bielawski, 2013). Cette hormone est synthétisée par les bactéries rhizosphériques notamment les *Pseudomonas*, à partir du tryptophane situé dans les exsudats racinaires (Karnwal, 2009). Les études de Karnwel et Kaushik (2011) ont montré que certaines espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire la cytokinine, une phytohormone stimule la division cellulaire.

Stimulation de la défense naturelle des plantes

C'est l'induction de la résistance de l'hôte est l'amélioration de sa capacité d'autodéfense en raison de son interaction avec un micro-organisme (Bakker et *al.*, 2007). La défense actives des plantes implique des changements dans le fonctionnement membranaire, des stress oxydatifs, le renforcement de la paroi cellulaire et la réponse hypersensible (HR), qui entraîne la mort programmée des cellules (Verhagen et *al.*, 2010). Il existe deux voies principales de résistance chez les plantes. La première, nommée la résistance systémique acquise (RSA), est assurée par l'acide salicylique (AS), qui est souvent produit par les plantes sous infections, il conduit généralement à l'expression des protéines de résistance (PR). Ces protéines (PR) sont constituées d'une variété d'enzymes, qui peuvent agir directement par la lyse des cellules du pathogène, renforcer les bordures de la paroi cellulaire ou induire la mort cellulaire localisée. La seconde, appelée la résistance systémique induite (RSI), est méditée par l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (ET) (Jourdan et *al.*, 2008). Ces rhizobactéries ont la capacité de déclencher ce phénomène par la production de certains molécules chimiques (éliciteurs) reconnus par la plante, entraînant des modifications physiologiques et métaboliques se traduisent par l'épaississement des parois cellulaires des plantes et l'altération de leurs réponses métaboliques, ce qui conduit à une augmentation des produits de défense des plantes (Jankiewicz et Koltonowicz, 2012).

Antagonisme et suppression des ennemis des plantes

Certaines PGPR utilisées pour le contrôle biologique ont la capacité de produire des métabolites secondaires présentant des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Looper et

Gross, 2007). L'antibiose est souvent considérée comme le mode d'action le plus puissant. Dans la rhizosphère, les *Pseudomonas* ont la capacité de limiter l'invasion des agents phytopathogènes ce qui rend les sols suppressifs (Chandrashekhara et al., 2012). Certaines souches de *Pseudomonas* sont connues par la production des enzymes lytiques qui dégradent les parois cellulaires et les tissus des agents pathogènes comme la chitinase, protéase, β -1,3-glucanase (Nagarajkumar et al., 2004). D'autres substances biologiquement actives sont connues par leur activité antifongique, l'acide cyanhydrique, pyrrolnitrine et les nanoparticules d'argent (Calderón et al., 2015).

III.2.1.2- *Bacillus* sp.

Bacillus spp. sont un groupe diversifié de bactéries Gram-positives de forme bâtonnet que l'on trouve couramment dans le sol, l'eau et d'autres environnements. Ils sont connus pour leur capacité à former des endospores, qui sont des structures résistantes qui permettent aux bactéries de survivre dans des conditions défavorables (Keijser et al., 2007). Ces endospores peuvent rester dormantes pendant de longues périodes jusqu'à ce que des conditions favorables à la croissance soient présentes (Nicholson, 2002).

Le genre *Bacillus* fait partie du phylum des Firmicutes, de la famille des Bacillaceae, qui comprend également les genres *Listeria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Dunlap, 2019). Actuellement, il existe plus de 200 espèces de *Bacillus*, dont plusieurs espèces pathogènes. Cependant, certaines espèces sont particulièrement efficaces en tant que PGPR en raison de leur capacité de produire des hormones de croissance des plantes, telles que l'acide indole-3-acétique (AIA), et en solubilisant le phosphate et d'autres nutriments dans le sol. *Bacillus* spp. peuvent également produire des composés antimicrobiens qui ont la capacité de protéger les plantes contre les agents pathogènes et promouvoir la santé des plantes (Bhattacharyya et Jha, 2012).

III.2.2- Les champignons antagonistes

Les champignons telluriques antagonistes sont des organismes qui ont la capacité d'inhiber les agents nuisibles, par le mycoparasitisme, l'antibiose ou la compétition.

Plusieurs champignons antagonistes existent dans la nature et exercent une bioprotection contre les agents phytopathogènes. Le genre *Trichoderma* est anciennement utilisé dans la protection des plantes. Il a été commercialisé sous forme d'un biopesticide dès les années 90 (Rodgers, 1993). Un autre agent antagoniste connu, *Clonostachys rosea*, c'est un mycoparasite ubiquiste fait partie de la famille des Ascomycètes (Xue, 2003).

III.2.2.1- *Trichoderma* sp.

Trichoderma est un champignon ubiquiste appartient au Ascomycètes, la famille des *Hypoceaceae*. Ce genre inclus 375 noms validés d'espèces (Cai et Druzhiniana, 2021), agrégées dans cinq sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Bissett, 1991). La caractérisation de nouvelles espèces de *Trichoderma* continue d'augmenter, rendant la taxonomie de ce genre plus complexe, de ce fait l'identification morphologique basée sur les critères des conidiophores et les phialides n'est plus efficace. C'est pourquoi l'analyse de leurs ADN ribosomiaux (ITS1, ITS2, gène 5.8S) sont nécessaire pour avoir une confirmation d'espèce.

Les *Trichoderma* sont fréquemment retrouvés dans les sols, les racines, le bois décomposé, et même sur d'autres champignons (Druzhinina et *al.*, 2011). Ils sont connus par leur croissance rapide, une production abondante des conidies, et une grande adaptabilité dans différents écosystèmes (Gams et Bissett, 1998). D'un point de vue morphologique, les espèces du genre *Trichoderma* sont caractérisés par un mycélium cloisonné, des conidies ellipsoïdes de couleur verdâtre, sauf pour quelques espèces hyalines comme *Trichoderma gamsi*, les conidies sont portées par le conidiophore et les phialides (Blaszczyk et *al.*, 2014). Certaines espèces sont connues par la production des pigments allant du jaune au rouge. La production des chlamydospores est connue chez certaines espèces, ces derniers sont généralement de forme globuleuse unicellulaires et de positionnement terminal ou intercalaire (Kumar et *al.*, 2012).

Un certain nombre d'isolats de *Trichoderma* sont avérés efficaces pour la lutte biologique vis-à-vis de divers champignons phytopathogènes telluriques sous serre et en plein champ (Verma et *al.*, 2007). La connaissance des mécanismes d'interaction de *Trichoderma* spp. avec les champignons phytopathogènes et la plante hôte est primordial pour améliorer la pratique d'application de ces micro-organismes bénéfiques. Ils peuvent agir soit directement contre les champignons phytopathogènes par le mycoparasitisme, la compétition pour les nutriments et l'espace et l'antibiose, ou indirectement par l'amélioration de la croissance des plantes et la stimulation de leurs mécanismes de défense.

III.2.2.2- Mécanismes directs impliquant dans la bioprotection

✚ Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est l'un des mécanismes les plus observés chez différentes espèces de *Trichoderma*, certaines souches présentent l'aptitude à parasiter une très large gamme d'agents phytopathogènes. Lors de ce processus plusieurs phases séquentielles se déroulent (Figure 11). D'abord, la perception des deux protagonistes s'effectue par une reconnaissance non spécifique par l'intermédiaire des petites molécules peptidiques qui jouent un rôle des stimulus chimiques. Ensuite, l'attachement entre le *Trichoderma* et l'agent pathogène est facilité par la présence des lectines dans la paroi du pathogène qui font une liaison avec les glucides présents dans la paroi de l'antagoniste (Sharon et Lis, 2004), suivi d'un enroulement des hyphes du *Trichoderma* autour du pathogène. Par la suite, la pénétration s'effectue par une voie mécanique représentée par la formation des appressoria, adhérent d'une cascade des signaux impliquant dans la synthèse de diverse enzymes lytiques comme les chitinases, les glucanases et les protéases qui hydrolysent la chaîne polysaccharidique de la paroi cellulaire des champignons. Finissant par une dissolution du cytoplasme par l'intermédiaire des enzymes digestives tels que les protéases et les lipases. Les nutriments sont récupérés et absorbés à l'aide des haustoria (Haran et al., 1996 ; Zeilinger et Omann, 2007).

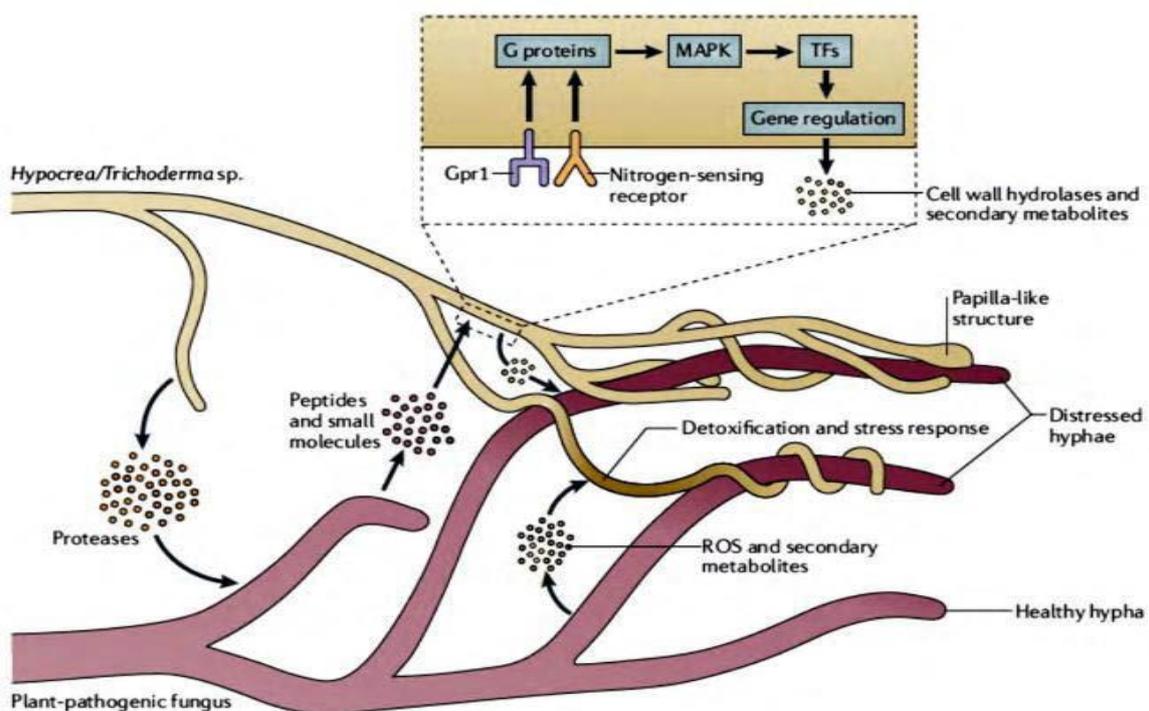


Figure 11: Mécanismes de mycoparasitisme exercés par *Trichoderma* sp. (Druzhinina et al., 2011).

Antibiose

Chez les espèces de *Trichoderma*, l'antagonisme par antibiose est largement utilisé, il repose sur la production des métabolites secondaires à faible poids moléculaire, inhibant la croissance des autres microorganismes. Ces métabolites peuvent être divisés en 3 groupes : les composés volatiles, les composés diffusibles et les péptaiboles (Vinale et *al.*, 2008).

Les composés volatiles produites par certaines espèces de *Trichoderma* tels que l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone est connu par de multiples actions telles que l'inhibition de la croissance du mycélium fongique et la germination des spores (Salwan et *al.*, 2019).

Les composés diffusibles y compris les enzymes lytiques chitinase, protéase, cellulase et lipase, impliqués dans les deux mécanismes l'antibiose et le mycoparasitisme. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans le pouvoir antagoniste des *Trichoderma* (Qualhato et *al.*, 2013).

Les péptaiboles sont de courts peptides d'origine non ribosomique et se caractérisent par la présence de niveaux élevés des acides aminés non standards (α -aminoisobutyrique). Plus de 700 séquences de peptaibol sont connues à ce jour, la plupart sont produites par *Trichoderma* (Degenkolb et *al.*, 2008). Meyer et Reusser (1967) ont découvert le premier péptaibole l'alaméthicine F30 isolé de *Trichoderma viride*. Les trichorzianines de *T. harzianum* sont connus par leur pouvoir antifongique (El Hajji et *al.*, 1989). D'autres péptaiboles isolés de *T. koningii* et *T. pseudokoningii* appelés les trichokonines, ont montré un effet inhibiteur contre une large gamme de champignons phytopathogènes (Xiao-Yan et *al.*, 2006 ; Zhao et *al.*, 2018).

Compétition

Les *Trichoderma* se développent très rapidement et occupent l'espace libre et colonisent les substrats afin d'utiliser les nutriments libres (azote, carbone, phosphore, fer) ce qui est important dans leur activité suppressive contre la croissance des agents pathogènes du sol (Howell, 2003). Ils possèdent aussi la capacité de produire des substances qui chélatent le fer qui est un élément essentiel à la viabilité chez la plupart des champignons filamenteux (Segarra et *al.*, 2010). Le rôle de la compétition pour l'azote dans les interactions de certaines espèces de *Trichoderma* et des *Fusarium* spp. a montré que les antagonistes ont la capacité d'épuiser l'azote plus rapidement que les *Fusarium* (Celar, 2003).

III.2.2.3- Mécanismes indirects de la bioprotection

En parallèle de son activité directe dans le biocontrôle en inhibant les agents pathogènes, les champignons du genre *Trichoderma* améliorent la croissance des plantes et le développement des racines (Figure 12). Les *Trichoderma* se trouvent dans de nombreux écosystèmes racinaires. Comme dans le cas des mycorhizes, les polysaccharides hautement hydratés de la couche de mucigel sécrétée par les racines et les mono- et disaccharides excrétés par les racines des plantes dans la rhizosphère favorisent la croissance des champignons (Vargas et al., 2009). En revanche, La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et l'assimilation des minéraux (phosphore, magnésium, fer, etc.) ainsi que la production des auxines tels que AIA qui stimule l'élongation des racines (Sood et al., 2020).

De plus certaines espèces sont connues par leur pouvoir de stimuler la défense naturelle des plantes, comme dans le cas des PGPR. Vinale et al. (2006) ont montré que l'association endophytique des *Trichoderma* avec les racines des plantes active le propre mécanisme de défense de la plante contre toute attaque potentielle, y compris les champignons, les bactéries et les virus.

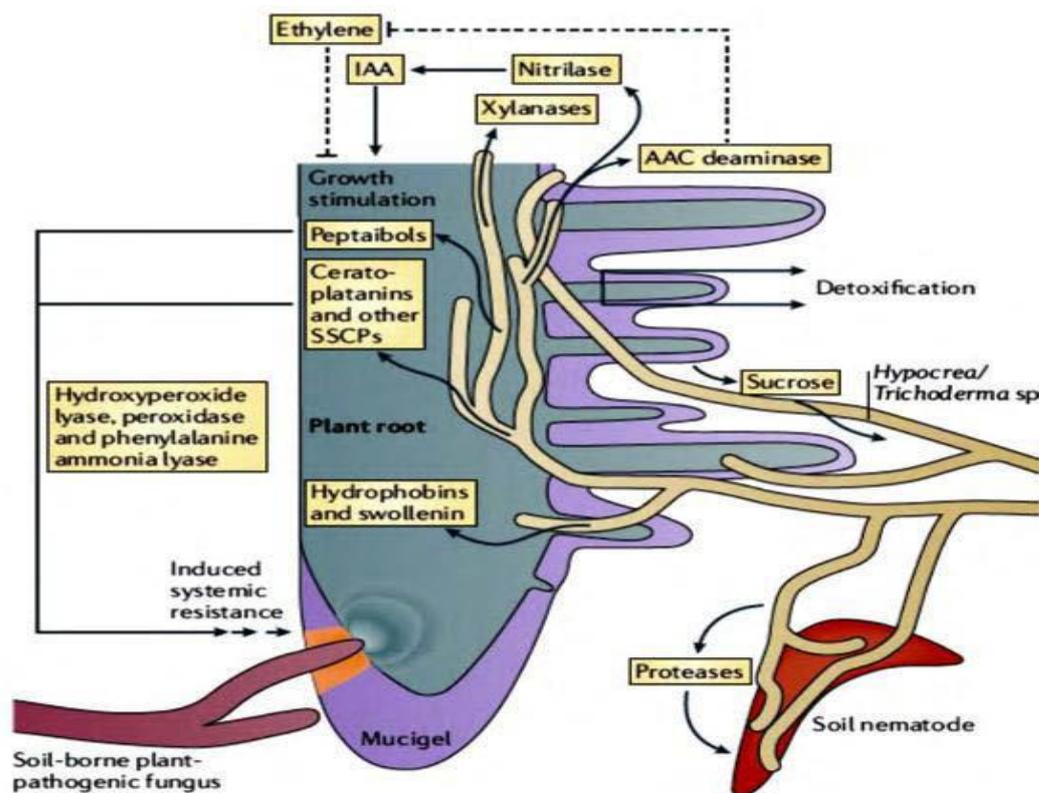


Figure 12: Mécanismes d'induction de la résistance systémique par *Trichoderma* sp. au niveau du système racinaire (Druzhinina et al., 2011).

III.2.2.4- Combinaison des agents de lutte biologique

Les rhizobactéries et les champignons antagonistes sont de plus en plus étudiés. Cependant, ces microorganismes ne sont souvent pas considérés comme des alternatives acceptables aux pesticides. Pour des raisons non négligeables, les limites d'actions à large spectre, les performances incohérentes et plus lentes et les facteurs abiotiques qui affectent l'efficacité de ces agents de lutte biologique tels que le climat et les propriétés physiques et chimiques du sol (Meyer et Roberts, 2002). Par conséquent, la construction de différentes combinaisons en synergie de ces agents est une option prometteuse en vue d'améliorer leur efficacité. D'abord, il faut connaître que l'efficacité de la combinaison de plusieurs microorganismes dépend de leur compatibilité. Robinson-Boyer et *al.* (2009) ont trouvé que l'application de plusieurs produits à base des agents de lutte biologique est moins efficace que l'application individuelle des souches. Ces résultats peuvent être expliqués par l'incompatibilité entre les espèces. D'autres travaux ont mis en évidence les avantages de l'emploi de plusieurs agents antagonistes en même temps. Alamri et *al.* (2012) ont montré que l'emploi de *T. harzianum* et *B. subtilis* en combinaison est plus efficace contre *Alternaria alternata*, cela peut s'expliquer par le fait que ces deux organismes exercent des différentes méthodes contre le pathogène ; le mycoparasitisme et la compétition exercés par *Trichoderma* et l'antibiose par *Bacillus*. Guetsky et *al.* (2001) ont suggéré l'utilisation des combinaisons comme moyen de réduire la variabilité et d'augmenter la fiabilité des performances des agents de lutte biologique en raison de leurs avantages d'efficacité contre une large gamme de pathogènes et dans des conditions abiotiques différentes.

III.3- Biocontrôle par les extraits végétaux

Depuis plus d'une décennie, la recherche s'intéresse à l'évaluation des activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales et leurs extraits dans le domaine agricole. Ces sources inépuisables de substances actives ont l'avantage d'être biodégradables, respectueuses à l'environnement, et potentiellement peu ou pas néfastes pour la santé humaine. Ainsi, différentes stratégies d'études ont été initiées afin de trouver des extraits végétaux à la fois actifs et viables d'un point de vue économique.

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs.

L'Algérie dispose d'une flore très riche en plantes médicinales. Cela nécessite une connaissance approfondie de ces plantes. Cette connaissance ne pourrait se faire sans l'évaluation de leur composition chimique par l'identification structurale des principes actifs responsables ou non des activités biologiques.

III.3.1- *Citrus aurantium* L.

III.3.1.1- Généralités

Les agrumes sont à l'origine des pays de Sud-Est de l'Asie dans les grandes zones à climat tempéré. A cause de leur importance majeure, les agrumes ont voyagé grâce aux grandes conquêtes du monde (Ramon-Laca, 2003). Selon Vand et Abdullah (2012), les agrumes ont été introduits en Espagne par les Arabes de l'empire d'Almohades, qui ont par la suite importé le bigaradier en Algérie.

Le Bigaradier ou l'oranger amère, est une espèce d'agrumes qui appartient à l'ordre des *Sapindales*, la famille des *Rutaceae*, et le genre *Citrus*. C'est un arbre de 5 à 10 mètres de hauteur très similaire de l'oranger (Figure 13). Ses feuilles sont ovales de couleur verte, les fleurs sont blanches d'une odeur très agréable. Le fruit est connu sous le nom de Bigarade non comestible, caractérisé par une écorce dure et un goût très amer (Ferhat et *al.*, 2010 ; Escartin, 2011).

A cause de sa résistance au froid, à l'excès d'eau et à quelques maladies, l'oranger amère est communément utilisé comme un porte greffe pour les agrumes comestibles. De plus, Cette plante est utilisée en médecine populaire pour ses propriétés officinales en tant qu'antimicrobien ou antiseptique. Les extraits du bigaradier sont également utilisés dans le domaine cosmétique et de la parfumerie (Zhang et *al.*, 2015 ; Dosoky et Setzer, 2018).



Figure 13: Fruits, feuilles et fleurs de Bigaradier (Anonyme 3, 2011).

III.3.1.2- Composition chimique des feuilles de *Citrus aurantium*

Les études phytochimiques sur le genre *Citrus* ont révélé sa richesse en métabolites secondaires : huiles essentielles, alcaloïdes et composés phénoliques (flavonoïdes et coumarines) (Figure 14). Il a été rapporté que les jeunes feuilles du bigaradier contiennent : Flavone- Neodiosmin, Rhoifolin, Flavanone- Neohesperidin et Naringin (Del Rio et *al.*, 1992 ; Maksoud et *al.*, 2021). Un criblage phytochimique réalisé par Periyamayagam et *al.* (2013) a montré la présence de stérols, flavonoïdes, terpénoïdes, saponines, huile volatile, protéines et acides aminés, sucres réducteurs, glucides et absence des alcaloïdes, huiles non-volatiles, mucilage et glycosides.

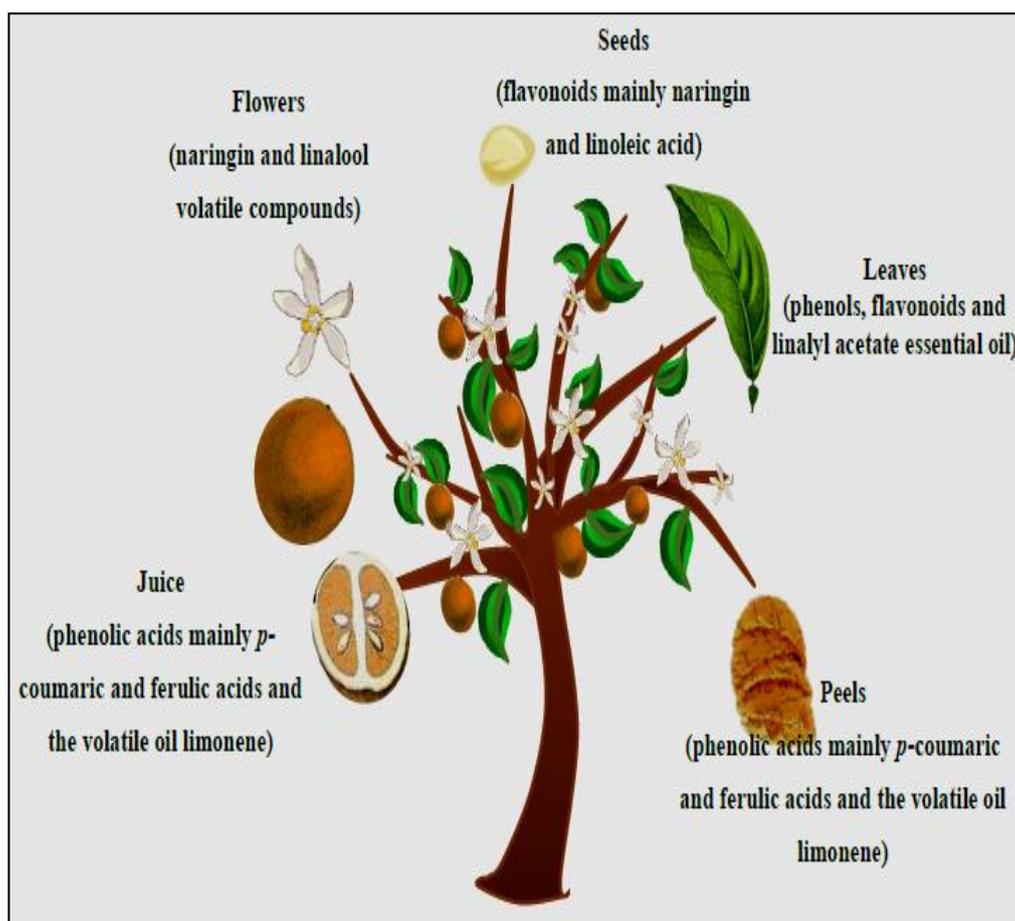


Figure 14: Les différentes parties du Bigaradier avec leurs substances bioactives les plus abondantes (Maksoud et *al.*, 2021).

III.3. 2- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides volatils, naturels et hydrophobes contenant des composés aromatiques extraient à partir des plantes, caractérisées par une forte odeur et

généralement obtenu par hydrodistillation ou distillation à la vapeur. Elles sont également connues sous le nom d'huiles volatiles. Les constituants chimiques des huiles essentielles sont très complexes. Ces composés pourraient être divisés en plusieurs catégories : les hydrocarbures terpéniques (par exemple, les hydrocarbures monoterpéniques, les hydrocarbures sesquiterpéniques et les hydrocarbures diterpéniques), terpènes oxygénés et les composés aromatiques et composés aliphatiques. Ces composés pourraient être des esters, des alcools, des phénols, des acides et des alcènes etc... (Stephane et Jules, 2020).

Les huiles essentielles sont obtenues à partir d'une matière première végétale en tant que métabolites secondaires. Le rendement et la composition chimique des huiles sont influencés par de nombreux facteurs différents, notamment variations physiologiques, conditions environnementales, variations géographiques et le patrimoine génétique (Figueiredo et *al.*, 2008).

III.3.3- Méthodes d'extraction

III.3.3.1- Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Dans cette méthode, la matière végétale est complètement immergée dans de l'eau, qui est bouillie par chauffage. La vapeur d'eau conduit avec elle les HE. Le mélange est condensé à l'aide d'un réfrigérant, l'HE est récupérée après sa séparation de la fraction aqueuse. Cette méthode permet la protection des HE extraites du fait que les gouttelettes d'huile sont englobées dans l'eau servant de barrière contre le surchauffage.

III.3.3.2- Distillation à la vapeur

La distillation à la vapeur est le processus de distillation de la matière végétale avec de la vapeur générée à l'extérieur du séparateur d'huile essentielle. C'est la méthode la plus favorable pour la production à grande échelle des huiles essentielles. Un avantage de la distillation à la vapeur est que la quantité de vapeur peut être facilement contrôlée. Comme c'est la vapeur qui traverse les matières végétales, un contact prolongé avec l'eau et la surchauffe pourraient être évitées, minimisant ainsi efficacement l'hydrolyse et la chaleur de dégradation des composés dans les huiles essentielles. Cependant, les appareils de distillation à la vapeur commerciaux est plus cher que les appareils d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

III.3.3.3- Extraction par les solvants

Pour extraire les huiles de sources végétales, des solvants organiques, en particulier des solvants à faible polarité comme l'hexane, sont fréquemment utilisés. Ces extraits ne sont pas des huiles essentielles pures. Les extraits sont un mélange d'huiles essentielles, de cires, de résines et d'autres substances lipophiles extraites de l'hexane et d'autres solvants hydrophobes. Ils sont souvent transformés en un concentré volatil soluble dans l'alcool appelé absolu, c'est-à-dire qu'ils seront extraits avec de l'alcool (Handa, 2008).

III.3.4- Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse

La GC-MS est une méthode largement utilisée pour l'identification des composés chimiques dans les huiles essentielles, c'est une technique basée sur une combinaison de séparation et d'identification. La chromatographie gazeuse sépare les composés chimiques des huiles essentielles et la spectrométrie de masse joue le rôle d'identification de ces composants. D'autres techniques complémentaires à l'identification, c'est la chromatographie en phase gazeuse avec ionisation de flamme détecteur est souvent utilisé. Les huiles essentielles sont soumises à une analyse GC. Parallèlement, une série d'alcanes normaux seront analysés dans les mêmes conditions. L'indice de rétention sera calculé à partir des temps de rétention des alcanes normaux et de ceux de chaque composant huiles essentielles. La comparaison de l'indice de rétention calculé avec les données publiées peut aider l'identification (Marriott et *al.*, 2001 ; Adams, 2007).

III.3.5- Composition chimique de l'HE

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés chimiques qui appartiennent principalement à deux classes chimiques distinctes : les terpènes et les phénylpropanoïdes. Bien que les terpènes et leurs dérivés oxygénés (terpénoïdes) sont plus fréquents et abondants dans les HEs, certaines espèces contiennent de grandes quantités de phénylpropanoïdes, et lorsque ces composés sont présents, ils procurent une odeur et une saveur spécifiques à la plante (Moghaddam et Mehdizadeh, 2017).

III.3.6- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques, telles que l'activité bactéricide, fongicide, antiparasitaire, virucide, insecticide, antioxydantes et anti-inflammatoire (Bakkali et *al.*, 2008).

D'après Da Cruz *et al.* (2013), les activités biologiques des huiles essentielles dépendent des principes actifs tels que les terpènes, les phenylpropanes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les tannins, les glycosides et les acides organiques.

III.3.6.1- Activité antioxydante

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit de diverses réductions conduisant à la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) y compris $O^{\cdot -}$, HO, HO_2 et H_2O_2 (Krumova et Cosa, 2016). La formation de ces molécules peut être d'origine endogène (métabolisation de l'oxygène au niveau mitochondriale, plasmiques et nucléaires) ou exogène (suite à l'exposition des intrants chimiques, drogues et l'irradiations) (Turrens, 2003). La présence raisonnable des ERO dans la cellule joue un rôle dans un grand nombre de fonctions physiologiques et dans l'activation et la régulation des voies de signalisation (Sundaresan *et al.*, 1996 ; Dröge, 2002). En contrepartie, la production excessive et non contrôlée des ERO contribue également à la pathogenèse d'un grand nombre de maladies telles que le vieillissement, le cancer, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson et le diabète (Lushchak, 2014). Les espèces réactives de l'oxygène sont contrôlées par les défenses enzymatiques et non enzymatiques dans les cellules et par les molécules antioxydantes tel que la vitamine C, E et les flavonoïdes.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de Bigaradier est liée à la présence des flavonoïdes, terpenoïdes et composés phénoliques. Selon Ruberto et Baratta (2000) et Badawy *et al.* (2019), la forte activité antioxydante peut être due aux monoterpènes oxygénés (acétate de citronellyle, acétate de géranyle et aux hydrocarbures monoterpènes (α -terpinène, β -myrcène, limonène et β -ocimène).

III.3.6.2- Activité antibactérienne

Plusieurs études attribuent les propriétés antibactériennes des HE à leur caractère lipophile ce qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries et d'altérer sa structure et de la rendre plus perméable. Ces changements peuvent provoquer une fuite d'ions et d'autres molécules qui inhibent les propriétés fonctionnelles des cellules (Dhifi *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont évalué le pouvoir antibactérien de l'HE de bigaradier. Azhdarzadeh et Hojjati (2016) ont montré que l'HE des feuilles de bigaradier inhibe la croissance des bactéries Gram + tels que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus ceruse* et *Streptococcus faecium*.

Cette activité pourrait être attribuée à la présence de haute quantité de monoterpènes oxygénés comme le linalol, alpha terpinéol et linalyle acétate. D'autres travaux ont montré que les bactéries G- se sont révélées plus résistantes que les bactéries G+, car la plupart des parois cellulaires des bactéries G+ sont riches en peptidoglycane ce qui facilite la pénétration des composés hydrophobes de l'HE (Owlia et al., 2009).

III.3.6.3- Activité antifongique

Les propriétés antifongiques de l'HE de l'oranger amère sont liées à la présence des terpènes (limonène), des groupes acétate (l'acétate de géranyle) et le groupe hydroxyle (Kocić-Tanackov et Dimić, 2013). Ces composés ont la capacité de pénétrer à l'intérieur de la paroi fongique et inhibent la synthèse de la chitine et β -glucanes. Ils peuvent aussi altérer la synthèse de l'ergostérol qui est un composant majeur de la membrane cytoplasmique fongique, ce qui entraîne un déséquilibre des transporteurs membranaires. Les huiles essentielles peuvent aussi provoquer un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale ce qui affecte la formation de l'ATP, ainsi que l'inhibition de la prolifération cellulaire, et la synthèse d'ARN, et de protéines, ce qui induit finalement à la mort cellulaire (Lagrouh et al., 2017).

Quelques travaux ont évalué l'activité antifongique de l'huile essentielle du bigaradier vis-à-vis des espèces d'*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium culmorum* et *Candida albicans* (Ellouze et al., 2012 ; Haj Ammar et al., 2012 ; Anwar et al., 2016).

III.4- Production d'un biopesticide

A cause des effets délétères des pesticides, plusieurs pays du monde ont adopté la politique de recherche des alternatives biologiques (Biopesticides) pour limiter les dégâts causés par les produits synthétiques.

Selon Copping et Menn (2000), Les biopesticides sont des préparations contenant des micro-organismes vivants tels que des bactéries, des virus, champignons, protozoaires et nématodes et/ou composés bioactifs (tels que des métabolites) produits directement par ces microbes, qui sont utilisés pour réduire les populations des agents néfastes, y compris les insectes, les agents pathogènes et les adventices. Les biopesticides peuvent également être des extraits de plantes et d'autres produits d'origine naturelle comme les composés végétaux, les huiles essentielles et les produits sémi-chimiques (par exemple les phéromones).

Ces dernières années les biopesticides apparaissent de plus en plus comme des produits compétitifs (Figure 15) (Glare et *al.*, 2012) (Figure 15). La principale raison soutenant leur émergence est qu'ils sont censés d'être de nature relativement moins persistante et moins nocifs pour la santé et l'environnement (Robin et Marchand, 2019).

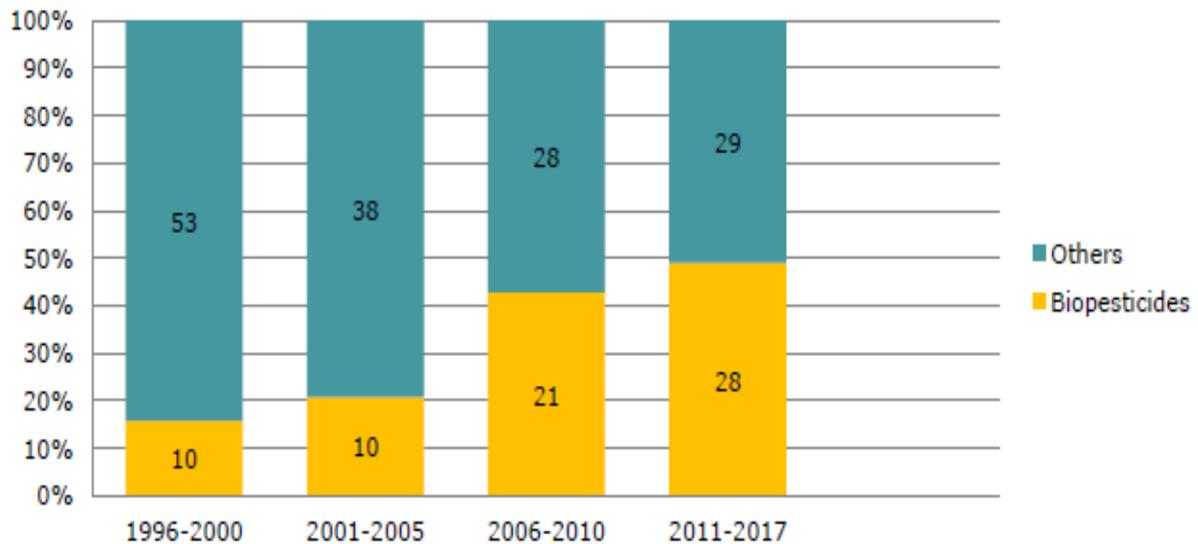


Figure 15: L'évolution du nombre d'applications de nouveaux biopesticides (substances actives), par rapport à pesticides synthétiques, dans l'Union Européen (source : commission européenne Avril 2018).

Dans l'Union Européen, l'homologation d'un biopesticide est la même de celle d'un pesticide chimique. Elle est organisée par des procédures qui permettent l'obtention d'une autorisation de la mise sur le marché pour un produit phytopharmaceutique. Les principales étapes de la production d'un biopesticide d'origine microbienne sont présentées dans la figure ci-dessous (Figure 16).

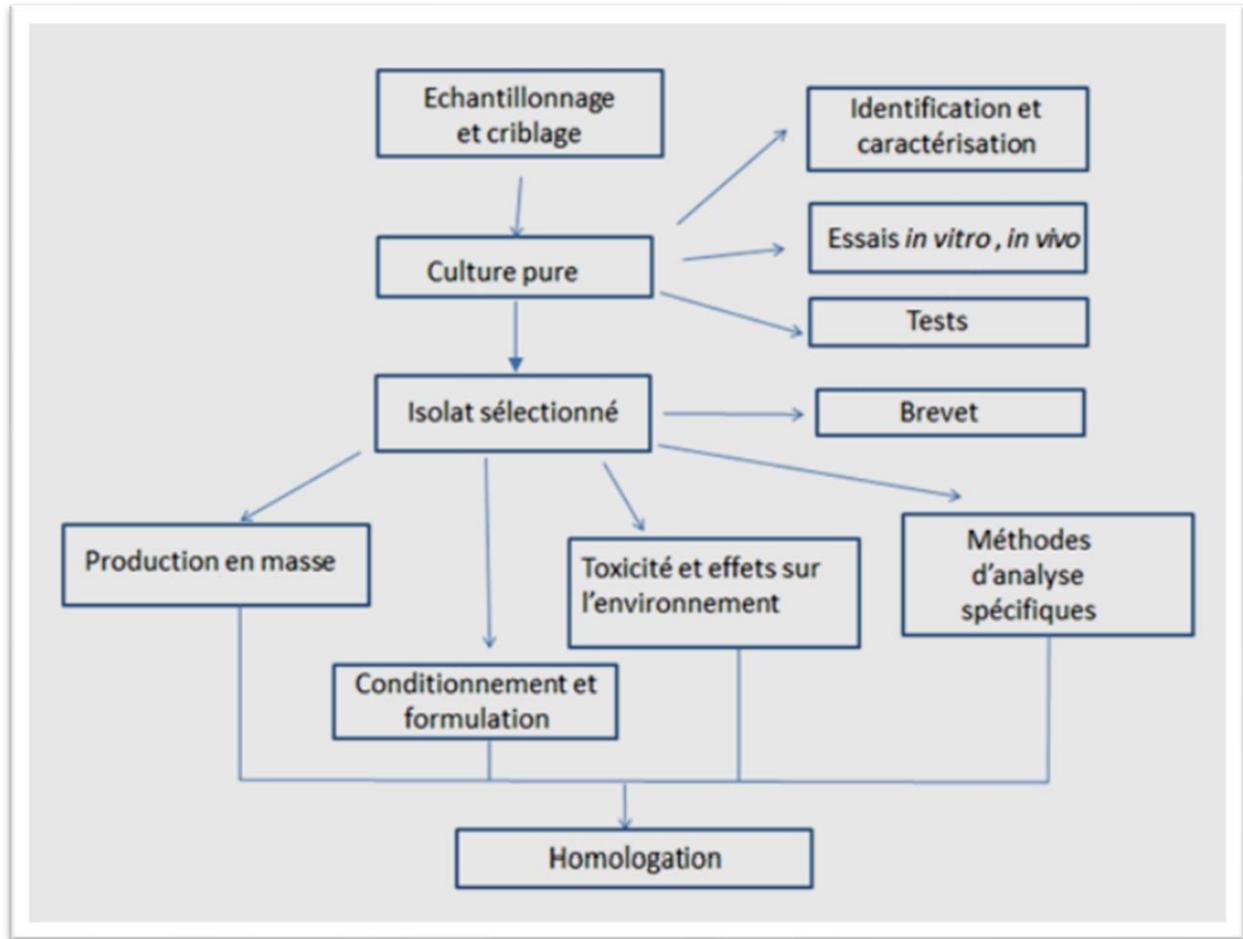


Figure 16: Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage d'une collection d'organismes (Montesinos, 2003)



Matériel et méthodes



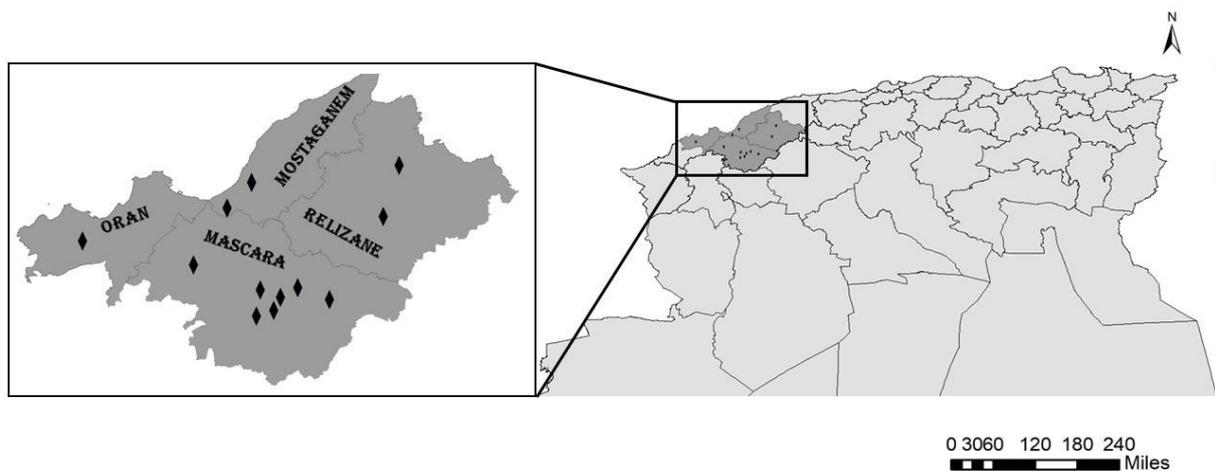
1- Prospection et échantillonnage

Les prospections ont été réalisées au niveau de trois régions localisées dans l'ouest algérien, (Mascara, Mostaganem et Relizane) (figure 17) durant les campagnes agricoles 2018-2019 et 2019-2020. En générale, 27 champs de blé ont été prospectés, vingt-deux champs à Mascara, trois champs à Relizane et deux champs à Mostaganem (Les prospections dans les régions Relizane et Mostaganem ont été limitées à quelques champs seulement à cause du confinement du à la pandémie COVID-19. Ces prospections ont été effectuées durant la période végétative du blé, au stade levé et tallage. Elles avaient pour objectifs de :

- Localiser les foyers des maladies telluriques du blé
- Evaluer l'importance de ces maladies et identifier les espèces responsables
- Confirmer l'identité des agents pathogènes responsable de la fusariose du blé
- Isoler et identifier la flore saprophyte associée aux maladies telluriques.

Le diagnostic des maladies d'origine tellurique sur les plantules de blé est basé essentiellement sur l'observation des symptômes visibles (fonte de semis, jaunissement des feuilles et des tiges, brunissement du collet et pourriture racinaire). La détermination de l'incidence des maladies au champ est exprimée par le pourcentage de plantes malades par rapport au nombre total des plantes prospectées.

Au niveau de chaque champ prospecté, des plantes prises au hasard, sont prélevées entièrement à la main et introduites séparément dans des sachets en papier portant des renseignements concernant le stade végétatif de la plante, et le site du prélèvement. Des prélèvements des échantillons du sol rhizosphérique ont été également réalisés.



2- Isolement des champignons telluriques

2.1- Isolement à partir des racines et du collet

Les plantules présentant les symptômes des maladies telluriques (racines et collet) ont été découpées en petits fragments (environ 5 mm), puis désinfectées à l'hypochlorite de sodium 2% pendant 3 min, soigneusement rincées 3 fois à l'eau distillée stérile et séchées avec du papier filtre stérile. Ces derniers sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (annexe 1) à raison de 5 fragments par boîte. L'incubation a été réalisée à une température de 25°C pendant 7 jours (Rapilly, 1968).

2.2- Isolement à partir du sol rhizosphérique

L'isolement de la flore fongique tellurique à partir du sol rhizosphérique a été effectué selon la méthode des suspensions-dilutions décrite par Davet et Rouxel (1997). Cette technique consiste à mélanger 10g de sol dans 90 ml d'eau distillée stérile, suivi d'une agitation pendant 3 min ce qui constitue la solution mère. Un prélèvement de 1 ml de solution mère est mis aseptiquement dans 9 ml d'eau distillée stérile suivi d'une agitation ce qui signifie la concentration 10^{-1} , ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-7} . Ensuite on ensemence 0.1ml de chaque suspension choisie dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Figure 18). Les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 7 jours à 25°C.

Après incubation, la fréquence d'isolement de chaque genre fongique a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Fréquence d'isolement (\%)} = \frac{\text{Nombre de colonies du genre apparus}}{\text{Nombre totale des colonies}} \times 100$$

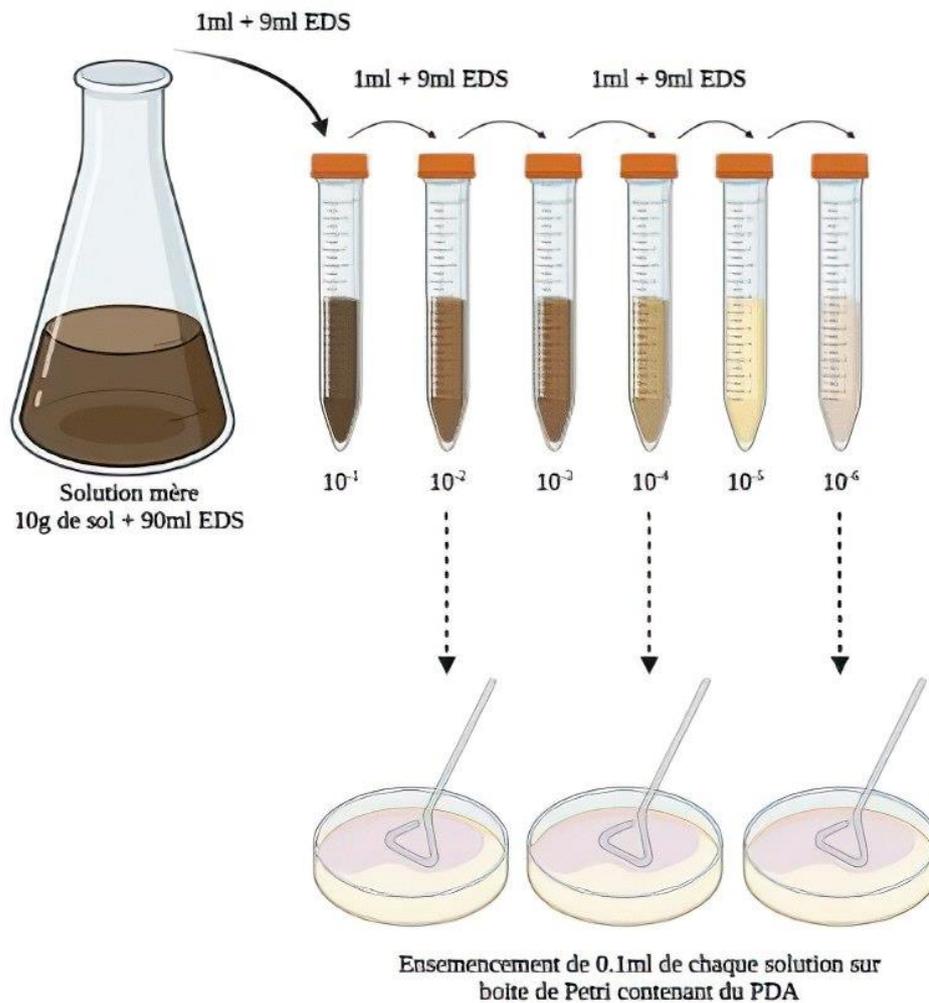


Figure 18: Méthode de préparation d'une suspension dilution du sol

3- Purification des isolats fongiques

La purification a été réalisée après 7 jours d'incubation. Des repiquages successifs des filaments mycéliennes de la culture précédente ont été effectués sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Une autre méthode plus précise concernant la culture monospore. A partir d'une culture âgée de 7 jour, une suspension sporale a été préparée dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée stérile, puis on ensemence une goutte de la suspension dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Après 48h d'incubation à une température de 25°C, un prélèvement de spores en état de germination a été effectué à l'aide d'une loupe binoculaire, et repiqué dans des boîtes de Pétri contenant le PDA (Botton et *al.*, 1990). L'incubation a été réalisée à 25°C pendant 7 jours.

4- Identification des agents fongiques

4.1- Identification morphologique

L'identification morphologique des champignons est basée, dans un premier lieu sur les critères macroscopiques. Les milieux de culture SNA et Czapek (annexe 1) ont été utilisés pour la production des macroconidies et des sporodochies pour *Fusarium* spp.

L'observation macroscopique des colonies concerne essentiellement les caractères culturels tels que l'aspect du mycélium (aérien, dense, ras, poudreux...), la couleur des colonies, la sporulation, la présence ou non des pigments diffusibles sur gélose.

Dans une seconde étape, une étude microscopique a été 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, leurs formes et leurs tailles. La présence ou l'absence des formes de résistance (microsclérotés, chlamydo-spores).

L'identification des champignons du genre *Fusarium* spp. est effectuée en utilisant les clés d'identification établies par (Booth, 1971 ; Nelson et al., 1983 ; Leslie et Summerell, 2008). Les principaux critères sont : l'aspect et la couleur du mycélium et des conidiophores, la forme et la taille des macroconidies, la présence ou l'absence des microconidies, la présence ou l'absence des chlamydo-spores.

4.2- Identification moléculaire

4.2.1- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des cultures fongiques âgées de 7 jours. Le mycélium a été récupéré dans des tubes de micro-centrifugation de 2 ml et lyophilisé pendant 24 h puis broyé en une poudre fine (Figure 19). L'extraction de l'ADN des isolats du genre *Fusarium* a été effectuée par l'utilisation d'un kit commercial NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany). Une quantité de 1 ml de la solution de lyse a été ajoutée à chaque tube puis une homogénéisation au broyeur vibrant a été réalisée deux fois pendant 30 secondes à 30 Hz. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes. Le maximum du surnageant a été transféré dans des tubes Eppendorf de 2 ml puis une quantité de Binding Matrix équivalente du surnageant a été ajoutée. Après incubation des tubes pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante, une centrifugation d'une minute à 14000 g a été effectuée, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 500 µl de tampon SEWS-M. La suspension a été transférée dans des tubes avec colonne et centrifugée d'une minute à 14000 g.

Matériel et méthodes

La colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube et l'ADN a été élué en remettant en suspension la Binding Matrix dans 70 µl de DES. Après une incubation de 15 minutes des tubes, une centrifugation d'une minute à 14000 g a été effectuée et l'ADN a été récupéré.

Après extraction, la qualité et la concentration d'ADN ont été vérifiées en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. Tous les extraits de l'ADN ont ensuite été conservés à -20°C.

4.2.2- Amplification des fragments de l'ADN

Afin de confirmer l'identification morphologique, une PCR conventionnelle a été réalisée en testant les isolats avec des amorces spécifiques à l'espèce TS1/ITS4 (ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ; ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Les régions ITS1 et ITS4 de l'ADNr ont été amplifiées pour les isolats appartenant au genre *Fusarium* (Brygoo et Gautier, 2007).

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume réactionnel de la PCR de 25µl contenant 0.5 µl de chaque amorce spécifique à l'espèce (50 µM), 5 µl de tampon PCR, 0.2 µl de dNTP (25 mM), 1.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 17.5 µl d'H₂O, 0.2 µl (5u / µl) de Taq polymérase Solis Biodyn et 2 µl d'ADN génomique.

4.2.3- Révélation des produits PCR

Les produits d'amplification ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% d'un dépôt de 10µl de produits de PCR. La migration est suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0.5µg/ml). L'ADN a été visualisé et photographié sous UV par l'utilisation du Gel doc système de Biorad (USA).

4.2.4- Purification et séquençage

La purification des produits d'amplification dans les deux sens (forward et reverse) a été effectuée en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey- Nagel (Germany). Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger et *al.* (1977) en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces PCR utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt. Les séquences obtenues sont analysées et nettoyées par l'utilisation du logiciel CHROMAS PRO. Les séquences finales sont alors comparées avec celles de la banque de données GenBank par l'utilisation du Programme BLAST de NCBI pour l'identification des Isolats étudiés en se basant sur le % de similarité avec les souches de références.

4.3- Etude phylogénétique

Un alignement individuel des séquences a été réalisé à l'aide d'un logiciel d'alignement et de construction des arbres phylogénétiques Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA version X (Kumar *et al.*, 2018), en utilisant la méthode de test neighbor-joining tree. La robustesse des nœuds a été évaluée à l'aide d'une analyse bootstrap de 1000 réplicats. Cette étape consiste à évaluer la position taxonomique des souches et leur affiliation aux espèces homologues.

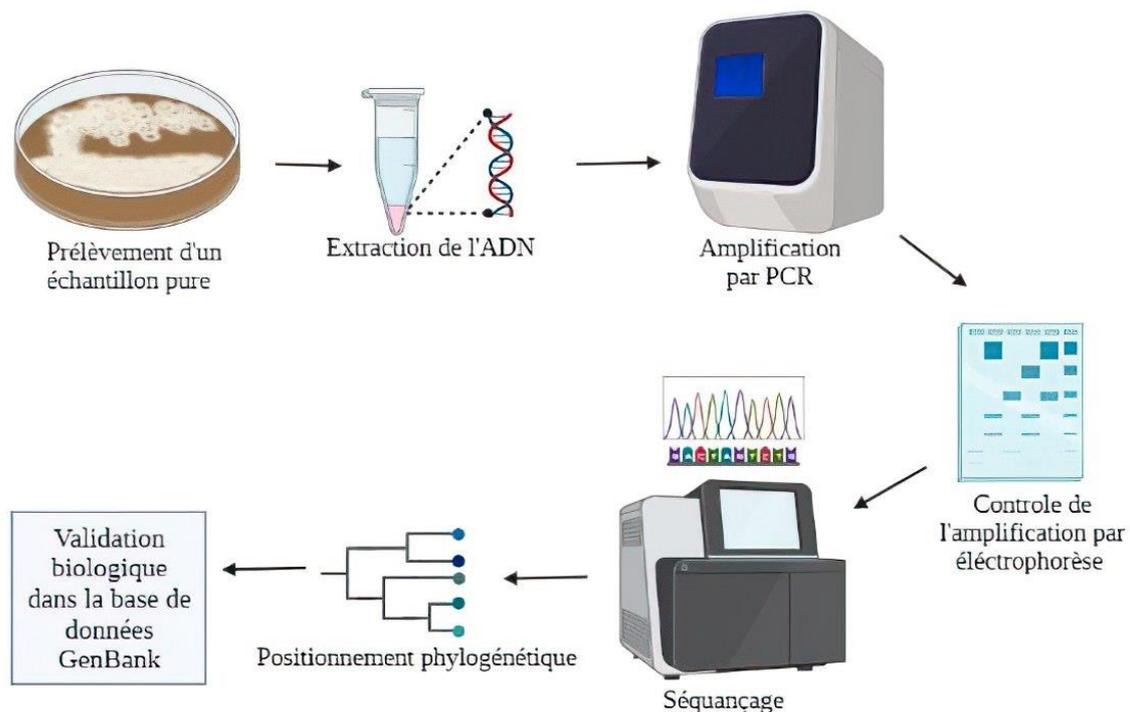


Figure 19: Etapes de l'identification moléculaire des espèces fongiques

5- Conservation des isolats

Après purification, les isolats sont repiqués dans des tubes inclinés contenant le milieu PDA. Les tubes sont incubés pendant 72h à une température de 25°C, puis stockés au froid à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variation (Rapilly, 1968).

6- Evaluation du pouvoir pathogène des isolats

Des tests de pathogénicité ont été réalisés, à travers l'application des postulats de Koch, dans le but vérifier la virulence de différents isolats de *Fusarium* envers les plantules du blé.

6.1- Matériel fongique

Des isolats du genre *Fusarium* spp. isolés à partir du sol, des racines et du collet des plantules de blé présentant des symptômes de pourriture des racines et du collet ont été utilisés pour tester leur pouvoir pathogène vis-à-vis du blé.

6.2- Matériel végétal

Les semences de blé dur, variété Vitron sont utilisées pour effectuer des inoculations artificielles. Cette variété est connue par sa sensibilité vis-à-vis de la fusariose du blé. Les semences de cette variété ont été fournies par la coopérative des céréales et légumes secs (CCLS) de Mascara.

6.3- Technique d'inoculation

Le substrat de culture utilisé pour ce test est composé de 2/3 de tourbe et 1/3 de sable. Ce dernier a été stérilisé à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C : l'autoclavage a été répété 3 fois à 24 d'heures d'intervalle. Pour tester la pathogénicité des différents isolats de *Fusarium* isolées lors de notre étude, une prise d'agar (1 cm de diamètre) avec le mycélium coupé de la périphérie des cultures de champignon âgées de 7 jours est placée dans des trous de 4 cm de profondeur préparés précédemment dans le sol stérilisé réparties dans les pots.

Des semences désinfectées par l'hypochlorite de sodium et rincées deux fois par l'eau distillée stérile, ont ensuite été placées sur l'agar et recouvert de sol, à raison de 4 semences par pot. Une prise d'agar sans champignon, a été utilisée pour le contrôle (Fernandez et Chen, 2005 ; Abdallah-Nekache et *al.*, 2019). Les pots sont arrosés quotidiennement avec de l'eau distillée stérile. Le test comprend trois répétitions pour chaque isolat.

6.4- Evaluation de la maladie

Quatre semaines après l'inoculation, la sévérité de la maladie (DS) a été notée à l'aide d'une échelle de notation de 0 à 3 (Grey et Mathre, 1984), (0 = aucun symptôme, 1 = 1 à 25 % de brunissement du collet, 2 = 25 à 50 % de brunissement du collet, 3 = supérieur à 50 % de brunissement du collet).

Matériel et méthodes

Le pourcentage de sévérité de la maladie (DS) a été calculé selon la formule :
$$DS = \left[\frac{\sum(c \times f)}{n \times N} \right] \times 100$$

Où c = classe de la maladie, f = fréquence, n = nombre d'observations et N = la valeur d'échelle la plus élevée (classe 3) (Abdallah-Nekache et al., 2019).

6.5- Ré-isolément des agents initiaux

Afin de confirmer l'implication de l'agent pathogène dans l'infection des plantes de blé inoculées celui-ci est réisolé selon les techniques décrites précédemment (2.1. Isolement des champignons telluriques). Les cultures des champignons obtenues sont comparées avec les cultures mères.

7- Evaluation de l'activité antifongique des agents antagonistes vis-à-vis de *Fusarium* spp.

7.1- Agents phytopathogènes

Trois souches fongiques identifiées par des analyses moléculaires ont été utilisées dans cette étude. *Fusarium pseudograminearum* (ON687723), *F. graminearum* (ON685926) et *F. equiseti* (MK361175). Le choix de ces souches est basé sur leur virulence élevée vis-à-vis des plantules de blé inoculées artificiellement. Les deux souches *Fusarium pseudograminearum* et *F. graminearum* originaires de la région de Mascara ont été isolées à partir des racines de blé montrant des symptômes de pourritures. Par contre la souche *F. equiseti* originaire de la région d'Oran a été fournie par Docteur Chamekh Rajaa (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mascara).

7.2- Présentation des agents antagonistes

7.2.1- Les rhizobactéries

Neuf souches rhizobactériennes appartenant aux genres de *Pseudomonas* et *Bacillus* obtenues du Laboratoire de Recherche des Systèmes Biologiques et Géomatiques (collection de Dr. Mokrani), Université de Mascara ont été utilisées dans cette étude (tableau 05). Les souches ont été conservées à -80° C dans le milieu TSB supplémenté avec 20% de glycérol.

Matériel et méthodes

Tableau 5: les rhizobactéries antagonistes utilisées dans cette étude

Souches	Espèces	Coordonnées GPS	Numéro d'accension	Similarité %
P4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	35°24' N 0°19' E	NR_117946	99
P8	<i>Bacillus subtilis</i>	35°24' N 0°19' E	NR_112116.2	99
P15	<i>Bacillus subtilis</i>	35°18'N 0°04'E	NR_113265	99
P25	<i>Pseudomonas agarici</i>	35°13'N 0°37'W	NR_036998	99
P56	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	35°42'N 0°31' E	NR_025881	94
P57	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	35°42'N 0°31' E	NR_114226	99
P58	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	35°42'N 0°31' E	NR_113600	99
P64	<i>Pseudomonas monteilii</i>	35°27'N 0°14' E	NR_114224	99
P71	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	35°35'N 0°03'E	NR_114225	99

7.2.2- Champignons antagonistes

Les champignons antagonistes testés ont été isolés à partir de la rhizosphère du blé (tableau 06). Les cultures fongiques utilisées ont été incubées à 25°C pendant une semaine avant leur utilisation.

Tableau 6: Les champignons potentiellement antagonistes utilisés dans cette étude

Isolats	Espèces	Site de prélèvement	Numéro d'accension
T1	<i>Chaetomium globosum</i>	Mascara (Matemore)	-
T2	<i>Trichoderma gamsii</i>	Oran (Sebkha)	MK361138
T3	<i>Trichoderma asperellum</i>	Mascara (Matemore)	-
T4	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Mascara (Tighennif)	ITS: OQ976976 EF: OQ982567
T5	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mascara (Rmaikia)	-

7.3- Etude de l'activité antifongique *in vitro*

7.3.1- Confrontation par contact direct

L'effet antagoniste des souches rhizobactériennes a été évalué sur la croissance fongique en utilisant une culture de 24 h maintenue dans du milieu TSB. Le bio-essai antifongique a été réalisé avec la technique de double culture utilisée par Pineda-Mendoza et *al.* (2018). Chaque isolat bactérien a été ensemencé en stries sur du milieu PDA. Après 24 h, un disque de gélose

Matériel et méthodes

d'une culture âgée de sept jours de *Fusarium* spp. a été inoculé à 5 cm de la culture bactérienne. D'autre part, des confrontations entre les agents de lutte biologique (*Trichoderma* spp. et *Chaetomium globosum*) et les agents pathogènes fongiques ont été réalisées selon Bouanaka et al. (2021). La technique consiste à repiquer dans une même boîte de Pétri, contenant le milieu PDA, un disque d'agar de 6 mm de diamètre colonisé par le pathogène (*Fusarium* spp.), et un autre colonisé par l'agent antagoniste à tester en gardant une distance de trois centimètres entre les deux champignons. Les boîtes sans antagonistes servent de contrôle négatif. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Après une semaine d'incubation à 28°C. Le pourcentage (%) d'inhibition de la croissance mycélienne radiale a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (R-r) / R \times 100,$$

Où R est la croissance radiale de l'agent pathogène dans la boîte témoin, r est la croissance radiale de la colonie fongique en présence de l'antagoniste.

7.3.2- Confrontation à distance

L'effet des composés antifongiques volatils des isolats antagonistes (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* et *Chaetomium*) sur la croissance mycélienne de *Fusarium*. a été testé par la technique de Islam et al. (2018) ; Bencheikh et al. (2022). Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées. Par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et l'agent pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. Une boîte contenant du PDA avec le pathogène et sans antagoniste est utilisée comme témoin. Les conditions de culture et l'évaluation du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

7.4- Caractérisation des isolats antagonistes

7.4.1- Etude de l'activité enzymatique

Production de chitinase

La production de chitinase par les isolats de *Trichoderma* a été déterminée en utilisant le milieu optimisé pour la production de chitinase additionné de chitine colloïdale et de l'indicateur de pH le pourpre de bromocrésol (annexe 1). Le pH a été ajusté à 4.7.

Matériel et méthodes

Après 3 jours d'incubation à 25 °C, la production de chitinase est confirmée par le changement de couleur du jaune au violet dans la région de dégradation de la chitine autour des colonies de *Trichoderma* suite à l'augmentation du pH (Kamala et Indira, 2011).

La production de chitinase par les isolats bactériens a été déterminée en utilisant le milieu M9 additionné de chitine colloïdale. La formation d'une zone de clairance autour des colonies indiquant la production d'enzyme chitinase (Naik et Sakthivel, 2006).

✚ Production d'amylase

La production d'amylase a été étudiée sur milieu gélosé additionnée de 2 g/L d'amidon soluble (annexe 1). Après incubation à 28°C pendant 72 heures, les cultures ont été inondées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0.5% I2 (v/v)) pendant 15 minutes. La production d'amylases a été confirmée par la présence d'un halo jaune clair autour des colonies (Abe et al., 2015).

✚ Production de Protéase

L'activité protéolytique des espèces de *Trichoderma* a été mesurée à l'aide d'un milieu gélosé au lait écrémé. Des cultures de *Trichoderma* âgées de 6 jours ont été inoculées sur un milieu de gélose au lait écrémé et incubées à 28°C pendant 72 h. les isolats avec une activité protéasique ont donnés une zone de clairance autour des colonies indiquant la production d'enzyme protéase (Kamala et Indira, 2011).

✚ Production de lipase

L'activité lipolytique a été déterminée selon la méthode de (Hankin et Anagnostakis, 1975). Cette méthode consiste à utiliser un milieu de culture contenant le tween 20 comme substrat lipidique (Annexe 1). Le tween 20 est stérilisé séparément et ajouté au milieu stérile juste avant son utilisation. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes ont été incubées à 4°C pendant 12 h. La production de lipase a été évaluée par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies.

7.4.2- Solubilisation de phosphate

La solubilisation du phosphate par les agents antagonistes a été testée en utilisant le milieu solide de Pikovskaya (PVK) contenant de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. La méthode consiste a placé un disque de 6 mm de culture de *Trichoderma* âgée de 7 jours au centre de la boîte de Pétri contenant du milieu PVK additionné de bleu de bromophénol. Après 7 jours d'incubation à 28 °C, l'activité positive de solubilisation de phosphate donne une zone de clairance autour de

la colonie. Cette activité a été estimée par le rapport du diamètre total (halo + colonie) sur le diamètre de la colonie (Vyas *et al.*, 2007).

7.4.3- Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

Les isolats de *Trichoderma* ont été cultivés sur le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) additionné de tryptophane (5%) pour l'évaluation de la production de l'AIA. L'incubation a été réalisée sous agitation modérée pendant 4 jours à 28 °C. L'évaluation quantitative a été déterminée selon la méthode décrite par Loper et Schroth (1986), Après centrifugation à 5000 rpm/20min. 1 ml du surnageant est additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (50 ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl₃ à 0.5 M). La densité optique est mesurée à 535 nm après 20 mn d'incubation à l'obscurité (Bric *et al.*, 1991).

La production d'acide-indole acétique (AIA) a été testée qualitativement sur milieu Luria-Bertani additionné de Tryptophane (5 g l⁻¹) (annexe 1). Le milieu a étéensemencé avec des cultures bactériennes fraîches. Un papier filtre stérile (9 cm Ø) a été placé directement au-dessus du milieu et incubé à 30 °C pendant 96 h. après incubation le papier filtre a été imprégné de 2 ml de réactif de Salkowski (50 ml d'acide perchlorique 35% et 1 ml de FeCl₃ à 0.5 M) et incubé pendant 20 min à l'obscurité. La concentration de l'AIA a été déterminée par le changement de la couleur observé sur le papier filtre (rose-rouge) (Bric *et al.*, 1991).

7.4.4- Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La production d'acide cyanhydrique (HCN) par les souches bactériennes a été évaluée selon la méthode de Tribedi *et al.* (2008). Les différentes souches ont étéensemencées individuellement à l'aide d'une anse de platine sur des boites de Pétri contenant du milieu Trypticase de soja additionné de 4.4 g l⁻¹ de glycine. Un papier filtre stérile (9 cm Ø) a été placé dans le couvercle de la boite de Pétri en position inverse. Le papier a ensuite été imprégné d'une solution jaune contenant de l'acide picrique et du carbonate de sodium. La boite de Pétri a été scellée avec du parafilm et maintenue en position inversée dans un incubateur à 28°C pendant 5 jours. La production d'HCN a été évaluée par le changement de couleur observé sur le papier filtre du jaune au brun ou au brun rougeâtre. La réaction a été marquée comme faible (marron clair), modérée (marron foncé) et forte (marron rougeâtre).

7.4.5- Production des sidérophores

La production des sidérophores par les souches bactériennes a été testée sur le milieu succinate de sodium (SSM) (annexe 1), selon le protocole mentionné par Sah et *al.* (2017). Des flacons stériles contenant le SSM additionné de 20 μM de Fe ont été inoculés avec des cultures fraîches des souches bactériennes et incubés pendant 24h à 28 °C dans un incubateur rotatif. Après incubation les échantillons ont été centrifugés à 8000 tour/min pendant 8 min. l'absorbance des surnageants (Do) ont été mesurées à 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Biochrom Libra S80.

Concentration de sidérophore = $\text{DO} \times 1500 \times 1000 / 16500$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

7.5- Sélection des souches compatibles

Un test de compatibilité a été réalisé entre les souches microbiennes les plus performants *in vitro* en utilisant un essai de double culture mentionné par Dugassa et *al.* (2021). Des cultures bactériennes âgées de vingt-quatre heures ont été striées sur un côté des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA. Après 24 h de croissance à 26 ± 2 °C. Un disque de 6 mm de diamètre provenant d'une culture de *Trichoderma sp.* a été placé dans la direction opposée de la strie (à environ 40 mm de distance). Des triplicatas ont été maintenus pour chaque traitement. Après 7 jours d'incubation à 26 ± 2 °C. La croissance des isolats de *Trichoderma* dans les boîtes à double inoculation a été mesurée pour évaluer la compatibilité.

7.6- Effet synergétique des souches sélectionnées sur le développement de la maladie *in vivo*

7.6.1- Préparation de l'inoculum microbien

Les souches fortement antagonistes *Pseudomonas azotoformans* et *Trichoderma gamsii* (P58 et T2), sur la base de leur efficacité *in vitro*, et leur compatibilité ont été choisies pour évaluer leurs efficacités antagonistes sur les plantules de blé. Pour la préparation de l'inoculum bactérien, la souche sélectionnée a été cultivée dans du milieu liquide TSB et incubée à 28 °C dans un agitateur rotatif à 200 tr/min. Après 24 h d'incubation, la suspension bactérienne a été centrifugée à 5000 rpm pendant 15 min, et après élimination du surnageant, les cellules bactériennes récoltées ont été remises en suspension dans de l'eau distillée stérile, puis, l'inoculum bactérien a été ajusté à la concentration finale de 10^8 cellules/ml (Minchev et *al.*, 2021). Dans le cas de l'inoculum fongique, la souche de *Trichoderma gamsii* a été inoculée sur un milieu PDA. Après 7 jours d'incubation, les conidies ont été grattées dans de l'eau distillée

Matériel et méthodes

stérile, et la concentration de la suspension de conidies a été ajustée à 10^6 conidies/ml à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

7.6.2- Traitement des semences

Pour les essais biologiques sous serre, les graines de blé dur (vitron) ont été désinfectées superficiellement avec l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 3 min, puis rincées dans de l'eau distillée stérile et séchées. Les graines de blé ont été trempées séparément dans les suspensions microbiennes (*Pseudomonas azotoformans* NR_113600 à 10^8 UFC ml⁻¹) ou (*Trichoderma gamsii* MK361138 à 10^6 conidies/ml), ou traitées avec les deux agents antagonistes (*Pseudomonas* et *Trichoderma*) et ont été séchées à la température ambiante pendant 30 min. Les graines ont ensuite été semées dans des pots contenant un sol stérilisé préalablement inoculé avec des explants de différentes souches de *Fusarium* (Abdallah-Nekache et al., 2019 ; Bencheikh et al., 2022). Les semences non traitées (ni *Fusarium* spp. ni agents antagonistes) ont servi de contrôle négatif et les semences inoculées uniquement avec *Fusarium* spp. ont servi de contrôle positif. Après ensemencement, les pots ont été placés en serre, (photopériode de 12/12 h jour/nuit), une température de 25°C, et $60 \pm 2\%$ d'humidité relative). L'expérience a été réalisée dans des blocs complètement randomisés avec trois répétitions pour chaque traitement. À la fin des expériences (30 jours après l'inoculation), les plantes de chaque traitement ont été soigneusement déracinées, lavées à l'eau courante du robinet pour éliminer les traces de tourbe et séchées à l'air. Les paramètres notés étaient la hauteur de la plante (cm) et le poids frais et sec des parties végétatives et du système racinaire (g).

7.6.3- Evaluation de la maladie

L'évaluation de la maladie a été réalisée selon la méthode décrite précédemment (6.4 Evaluation de la maladie).

L'efficacité de l'application des agents biologiques a été évaluée par le pourcentage de réduction de la maladie (DR), qui a été calculé comme suit : $DR \% = [(A - B) / A] \times 100$

A : sévérité la maladie chez le témoin, B : sévérité de maladie avec l'application d'agents antagonistes.

8- Evaluation de l'effet antifongique des extraits de *Citrus aurantium* à l'égard de *Fusarium* spp.

8.1- Matériel végétal

Dans le but d'une recherche des méthodes de lutte alternatives aux produits chimiques vis-à-vis des bioagresseurs telluriques, notre choix est porté sur le Bigaradier (*Citrus aurantium*), connu par son nom vernaculaire arabe narange (Figure 20). Les feuilles de cette plante ont été récoltées de leur habitat naturel dans la région de Mascara (Nord-Ouest d'Algérie). Le matériel végétal a été séché à température ambiante pendant 7 jours.



Figure 20: Le bigaradier (*Citrus aurantium* L) (Originale, 2023)

8.2- Screening phytochimique des extraits des feuilles

Pour évaluer qualitativement la présence de composés organiques dans la plante médicinale, tels que les protéines, les huiles fixes, les tanins, les saponines, les flavonoïdes et les stéroïdes. Un criblage a été effectué en utilisant les méthodes standard décrites par Yadav et *al.* (2011) en utilisant l'extrait aqueux des feuilles de Bigaradier.

Les flavonoïdes

A 5 ml de l'extrait, on ajoute quelques gouttes de HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium, la présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

Les tanins

Un volume de 2 ml de l'extrait, est additionné à 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 1%. Après quelques minutes d'incubation, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre qui indique la présence des tanins.

Les alcaloïdes

On ajoute 5 ml d'HCl 1% à 1ml de l'extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise l'extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer. L'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes

Saponosides

Dans un tube à essai, nous avons introduit 10 ml de l'extrait aqueux avec 15 secondes d'agitation, puis on laisse le tube au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

Les quinones libres

Sur un volume de l'extrait, quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire en jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

Les terpénoïdes

A 5 ml de l'extrait, on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de H₂SO concentré. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marronne en interphase.

✚ Les anthraquinones

A 10 ml de l'extrait, on ajoute 5 ml de NaOH à 10% avec agitation. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

✚ Les sucres réducteurs

On ajoute 1 ml de liqueur de Fehling à 5ml de de l'extrait. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique.

8.3- Préparation des extraits des feuilles de Bigaradier

L'huile essentielle a été extraite à partir des feuilles séchées par le procédé d'hydrodistillation pendant 3 h à l'aide d'un appareil de type Clevenger. L'HE obtenue a été stockée dans des flacons en verre ombré à 4° C.

L'extrait aqueux (EA) a été préparé en utilisant le protocole décrit par Chen *et al.* (2007). Après broyage des feuilles séchées de Bigaradier, 20 g de poudre de plante ont été mélangés à 200 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 min. Après agitation et refroidissement du mélange à température ambiante, l'extrait a été filtré à travers un papier filtre Wattman n° 1, et le filtrat a été lyophilisé.

8.4- Calcul du rendement

Le rendement est le rapport entre le poids de l'HE extraite et le poids de la biomasse de la matière végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$R = (Ph / Pv) \times 100$$

R : Rendement, Ph : poids de l'huile essentielle en gramme, Pv : poids de la biomasse de la matière végétale en gramme

8.5- Activité antioxydante de l'huile essentielle

L'activité antioxydante de l'huile essentielle a été déterminée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux DPPH telle que décrite par Brand-Williams *et al.* (1995). La solution de DPPH a été fraîchement préparée en mélangeant 4 mg de DPPH avec 100 ml de méthanol à 95%. Cinq concentrations d'huile essentielle ont été testées en ajoutant 1.5 ml de solution méthanolique de DPPH à 250 µl de chaque concentration, puis incubées dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 min. L'absorbance a été mesurée en triple à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre JENWAY 6400. La solution méthanolique de DPPH et l'acide

Matériel et méthodes

ascorbique ont été utilisés respectivement comme contrôle négatif et positif. L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité de piégeage des radicaux (I\%)} = [(\text{Contrôle Abs} - \text{Test Abs}) / \text{Contrôle Abs}] \times 100$$

Contrôle abs : absorbance du contrôle (solution DPPH), Test ABS : absorbance après ajout de l'huile essentielle.

8.6- Analyse chimique par GC-MS

Le Shimadzu GCMS TQ8030 a été utilisé pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. La chromatographie en phase gazeuse capillaire a été directement couplée au système de spectromètre de masse type GC-2010 plus, GCMS-TQ8030 de Shimadzu. Une colonne capillaire (30 mx 0.25 mm, 0.25 µm d'épaisseur de film) a été utilisée dans les conditions suivantes : Température du four à colonne : 50.0 °C ; Température d'injection : 220 °C ; Mode d'injection : Split ; Pression : 100 kPa ; Débit total : 50.0 ml/min ; Débit de la colonne : 4.55 ml/min ; Vitesse linéaire : 77.4 cm/s ; Débit de purge : 3.0 ml/min et rapport de division : 50.0. La température de la colonne a été programmée de 50.0 °C à 220.0 °C avec une vitesse de 5.00 °C/min. Les conditions du spectromètre de masse (SM) étaient les suivantes : température de la source d'ions : 200.00 °C ; température d'interface : 220.0 °C ; Temps de coupure du solvant : 3.00 min et gain du détecteur : 0.98 kV. Le temps de fonctionnement total était de 31 minutes (Scan Start : 45.00 m/z et Scan End : 500.00 m/z) et Scan Speed : 1666. Les composants chimiques authentiques sont identifiés par la base de données PubChem.

8.7- Activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux sur *Fusarium spp. in vitro*

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux a été évalué en mesurant la croissance radiale des trois champignons phytopathogènes (*F. graminearum*, *F. pseudograminearum* et *F. equiseti*) *in vitro* en utilisant la méthode d'empoisonnement décrite par Soyly et *al.* (2006). Pour chaque traitement six concentrations ont été testées. Différents volumes des extraits testés ont été ajoutés séparément dans des flacons contenant 100 ml de milieu PDA stérile avant sa solidification pour obtenir les concentrations 50, 100, 200, 250, 500 et 1000 µl L⁻¹. Quelques gouttes de l'émulsifiant Tween 80 (3% du volume d'eau) ont été ajoutées pour obtenir une émulsion aqueuse caractéristique. De plus, le fongicide systémique Score (250 g/L Difénoconazole) de la société de protection des cultures Syngenta obtenu auprès

du marché de Mascara a été utilisé comme traitement comparatif. Les témoins consistaient uniquement en milieu PDA additionné de Tween 80. Environ 18 ml du milieu préparé ont été versés dans chaque boîte de Pétri. Des disques mycéliens (6 mm Ø) prélevés à la périphérie d'une culture PDA en croissance active des champignons testés ont été placés au centre des boîtes de Pétri préparées. Toutes les boîtes ont été incubées à 25°C jusqu'à ce que les champignons testés atteignent leur pleine croissance dans le traitement de contrôle (environ 7 jours). Trois répétitions ont été utilisées pour chaque traitement.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculé selon la formule suivante : $IC (\%) = (Dt - DT/Dt) \times 100$ Où, IC = inhibition de la croissance mycélienne (%); Dt = les diamètres moyens de la colonie fongique de contrôle, DT = les diamètres moyens de la colonie fongique de traitement.

8.8- Effet de l'HE sur l'émergence et le développement de coléoptile et de coléorhize

Pour déterminer l'efficacité de l'HE contre la pathogénicité des trois souches fusariennes, sur le pourcentage d'émergence, la croissance des coléoptiles et des coléorhizes. La méthode mentionnée par Abdallah-Nekache et *al.* (2019) a été adoptée. Des flacons coniques contenant 50 ml de Potato Dextrose Broth (PDB) ont été inoculés par quatre disques mycéliens (6 mm Ø) prélevés à la périphérie d'une culture PDA en croissance âgée de 7 jours des champignons testés. Les flacons ont été incubés pendant 7 jours à 25°C dans un incubateur rotatif. Le mycélium a été extrait par centrifugation (5000 g pendant 10 min), dilué à 13 mg/ml et homogénéisé par l'ajout de gouttes de l'émulsifiant Tween 80 (3%). Du papier filtre stérile a été déposé sur des boîtes de Pétri stériles, puis 8 ml de l'inoculum préalablement préparé ont été ajoutés au papier filtre et un deuxième papier filtre a été placé au-dessus de l'inoculum. La formulation d'huile essentielle a été préparée en mélangeant 500 µl d'HE avec 1 L d'eau distillée stérile en ajoutant quelques gouttes de l'émulsifiant Tween 80 (3% du volume d'eau) (Moutassem et *al.*, 2019). Pour l'inoculation des semences variété (vitron). Les graines de blé dur, ont été désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium à 2 %, puis rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile, et séchées entre deux couches stériles de papier filtre. Les graines désinfectées ont été trempées dans la formulation d'huile essentielle homogénéisée et ont été séchées à une température ambiante pendant 30 min (Boungab et *al.*, 2015). Ensuite, les graines ont été placées sur chaque boîte de Pétri, à raison de 10 graines par boîte, et quatre répétitions pour chaque test. L'incubation des boîtes a été réalisée à 22°C pendant 7 jours. L'épreuve comprenait :

Matériel et méthodes

Graines trempées dans la formulation d'huile essentielle homogénéisée puis inoculées par les agents pathogènes.

Graines trempées dans de l'eau distillée avec inoculation d'agents pathogènes

Graines trempées dans la formulation d'huile essentielle homogénéisée seulement

Graines trempées dans de l'eau distillée uniquement.

Le pourcentage d'émergence (%), la croissance des coléoptiles (mm) et la longueur des coléorhizes (mm) ont été mesurés à la fin de l'expérience

8.9- Effet de l'HE sur le développement de la maladie *in vivo*

Pour examiner l'efficacité *in vivo* de l'huile essentielle testée contre la pourriture du collet du blé. Le test a été réalisé en trempant les graines désinfectées (cv. Vitron) dans la formulation d'huile essentielle homogénéisée, et séchées à une température ambiante pendant 30 min. Ensuite, les graines ont été semées dans des pots en plastique de 8 cm de diamètre, sur un substrat stérilisé formé de 2/3 de tourbe et 1/3 de sable, et inoculé avec des explants de 6 mm de diamètre prélevés des différentes souches des cultures d'agents pathogènes testés (Demirci et Dane, 2003). L'expérience comprenait deux traitements témoins, des graines traitées avec de l'eau distillée stérile et inoculées avec les champignons seulement ont été utilisées comme contrôle positif, tandis que des graines traitées avec de l'eau distillée stérile et non inoculées (plants sains sans champignons) ont été utilisées comme contrôle négatif. Les pots ont été placés dans une serre et gardés sous observation pendant 30 jours après le semis. Tous les tests ont été réalisés en trois répétition. À la fin de l'expérience, les plantes ont été soigneusement retirées et lavées pour évaluer la hauteur des plantes, la longueur des racines, le poids frais et sèche des racines et des tiges. L'évaluation de la maladie a été réalisée selon la méthode décrite précédemment.

9- Analyses statistiques

Le test de normalité des données obtenues a été effectué en utilisant la normalité de Shapiro-Wilk. Les résultats ont été évalués statistiquement à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à l'aide de SPSS version 26. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes en pourcentage \pm écart type, et les moyennes des traitements ont été comparées à un niveau de signification de 5 % avec Tukey HSDt (différence honnêtement significative). Chaque test a été réalisé en triple exemplaire.

Résultats et discussion

I- Diversité de la mycoflore tellurique du blé**I.1- Description des maladies fongiques telluriques dans les régions prospectées**

Les prospections effectuées dans les trois régions du nord-ouest Algérien comprenant un total de 27 champs de blé, trois parcelles à Rélizane, deux parcelles à Mostaganem et vingt-deux parcelles à Mascara. Les enquêtes menées au stade plantule nous ont permis de détecter la présence des symptômes de la fonte de semis et la pourriture des racines et du collet de blé avec une fréquence moyenne de 32.75 %.

Les symptômes de ces maladies se manifestent par des manques à la levée et des fontes de semis. Les symptômes les plus apparents sont présentés par des taches brunes apparaissant sur le collet des plantes infectées (Figure 21). Le système racinaire des plantes malades présente une réduction des ramifications secondaires suivi d'une pourriture sèche. Parfois, ces taches sont accompagnées par le jaunissement, et le dessèchement des jeunes plants.

Au stade épiaison, la fusariose du blé se manifeste par un dessèchement précoce de certains épillets et un blanchiment prématuré d'une partie ou de la totalité de l'épi (Figure 22). Cette décoloration passe généralement du centre de l'épi vers les extrémités. En plein champ, les symptômes apparaissent souvent sous forme de plages blanchâtres à aspect de maturité précoce. Les épis contaminés présentent un important échaudage des grains. Ces derniers apparaissent chétifs, légers et déformés avec une coloration blanchâtre ou rosâtre.



Figure 21: Symptômes de la pourriture des racines et du collet au champ



Figure 22: Symptômes de la fusariose de l'épi du blé

I.2- Résultats d'isolement de la flore fongique

Les isolements ont été effectués à partir du sol rhizosphérique, des racines et du collet des plantules de blé présentant des symptômes des maladies d'origine tellurique.

En générale, un total de 15 genres fongiques a été obtenu au cours de notre expérimentation, avec différentes espèces. Ces résultats nous ont permis d'obtenir une collection d'isolats parasites, saprophytes et même antagonistes.

Les résultats figurant dans le tableau 07 montrent que la biodiversité fongique dépend essentiellement de la source d'isolement (sol, racine et collet). En effet, 12 genres ont été isolés à partir des racines, 10 genres isolés à partir du collet, et 10 genres ont été obtenu à partir du sol.

I.3- Evaluation de la fréquence d'isolement

Au cours de notre étude, nous avons rencontré des espèces appartenant au genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Trichotecium*, *Trichoderma*, *Chaetomium* et *Cladosporium*. Les résultats de cette analyse ont été représentés dans la figure 23.

Le genre *Fusarium* a été isolé à partir de tous les échantillons analysés avec une fréquence d'isolement variable d'un prélèvement à l'autre. C'était le genre le plus abondant avec une fréquence moyenne de 17.01%.

Le deuxième genre abondant était *Penicillium*. C'est un champignon filamenteux, cosmopolite et polyphage pouvant dégrader plusieurs substrats. Sa fréquence au niveau du sol était plus élevée (12.10 %) par rapport aux racines et au collet.

D'autres champignons saprophytes tels que *Alternaria*, *Mucor* et *Rhizopus* ont été obtenu à partir de tous les échantillons analysés (sol, racines et collet) avec une fréquence d'isolement qui ne dépasse pas 11%.

Concernant les champignons parasites responsables des maladies telluriques (*Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana* et le pseudo-champignon *Pythium sp.*) ont été obtenu à faible fréquence à partir de quelques isolements seulement.

Nous notons également la présence des genres *Trichoderma* et *Chaetomium* qui sont considérés comme des agents de lutte biologique vis-à-vis de quelques bioagresseurs.

Pour les genres *Trichotecium*, *Ulocladium* et *Stemphylium* faiblement présents. Ils ont été recensés uniquement au niveau des racines et du collet.

Tableau 7: Fréquence d'isolement (%) de la flore fongique à partir des différents prélèvements

Champignons	Racine	Collet	Sol
<i>Fusarium sp.</i>	12.67	21.33	17.05
<i>Alternaria sp.</i>	9.42	11.00	7.00
<i>Penicillium sp.</i>	10.00	9.50	12.10
<i>Aspergillus sp.</i>	8.45	7.54	6.27
<i>Rhizoctonia sp.</i>	00	00	7.34
<i>Trichotecium sp.</i>	00	7.22	00
<i>Ulocladium sp.</i>	7.12	4.33	00
<i>Stemphylium sp.</i>	6.19	00	00
<i>Mucor sp.</i>	9.40	8.87	10.58
<i>Rhizopus sp.</i>	7.00	10.22	5.41
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	08.24	5.66	00
<i>Pythium sp.</i>	5.00	00	15.10
<i>Trichoderma sp.</i>	7.03	00	12.25
<i>Chaetomium globosum</i>	00	00	6.90
<i>Cladosporium sp.</i>	9.66	14.33	00

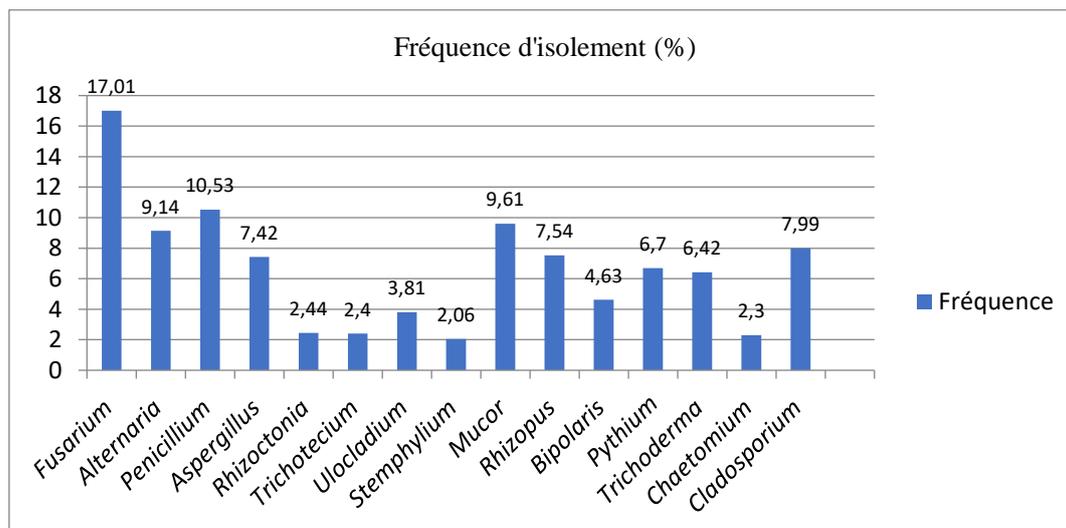


Figure 23: Fréquence d'isolement moyenne de la mycoflore rhizosphérique

La répartition des différents genres isolés selon les phylums (Figure 24) montre que la plupart des champignons isolés à partir des racines, du collet et du sol rhizosphérique appartiennent au phylum des *Ascomycota* (73.33%), Le phylum des *Zygomycota* vient en deuxième position avec une fréquence de 13.33%. Par contre les *Basidiomycota* et les *Oomycota* représentent 6.67% seulement des champignons isolés.

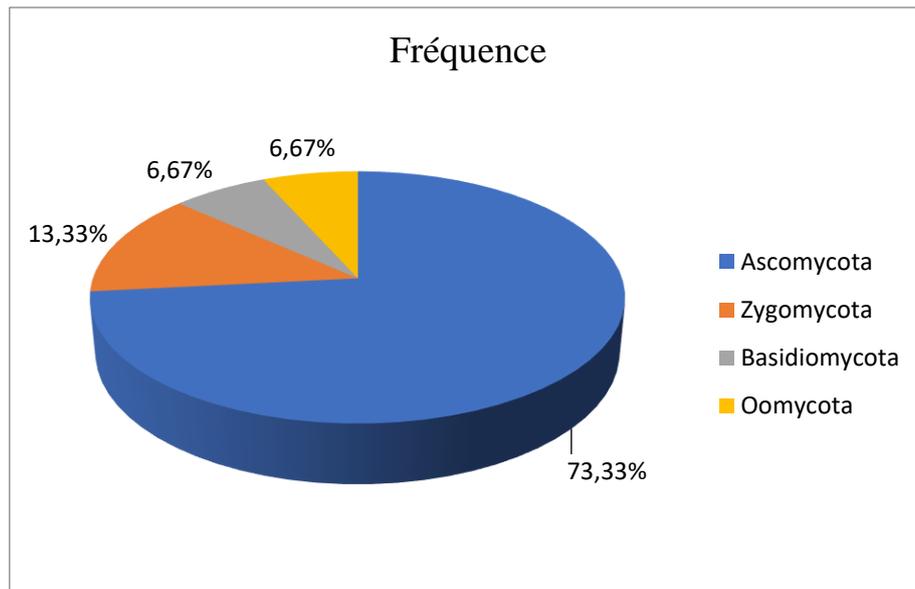


Figure 24: Fréquence de différents genres fongiques selon les phylums

I.4- Caractérisation morphologique de la flore parasite

I.4.1- Genre *Fusarium*

C'est le genre le plus dominant qui a fait l'objet d'une étude morphologique portée sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du mycélium) ainsi que les caractéristiques biométriques des spores (macro et microconidies) et la présence ou l'absence des chlamydospores en utilisant trois milieux de cultures, PDA pour la croissance des colonies, SNA qui stimule la sporulation et le milieu Czapek (annexe 1) qui favorise la formation des sporodochie.

I.4.2- *Bipolaris sorokiniana*

Les colonies sont caractérisées par un aspect duveteux lisse, de couleur noir sombre à l'intérieur et devenant généralement plus claires vers la périphérie. Le revers de la boîte présente une pigmentation plus intense.

Sous microscope, les conidies sont droites ou courbées, elliptiques avec une base effilée, de couleur brun foncé, possédant 5 à 9 cloisons transversales, elles naissent de la partie terminale du conidiophore. Ce dernier est de couleur brunâtre claire (Figure 25).

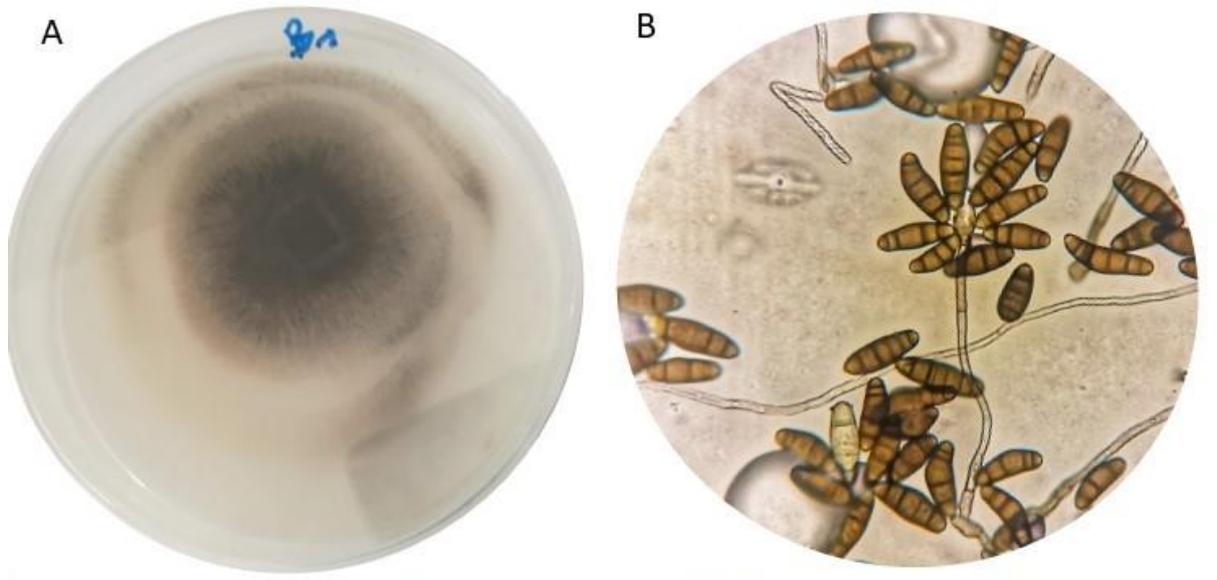


Figure 25: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Bipolaris sorokiniana*

I.4.3- *Pythium* sp.

Ce pseudo-champignon est caractérisé par une croissance lente sur milieu PDA. Les colonies ont un aspect ras d'une couleur blanche. Sous microscope le mycélium est hyalin et bien ramifié. Les oospores sont de forme sphérique à paroi mince et lisse (Figure 26).

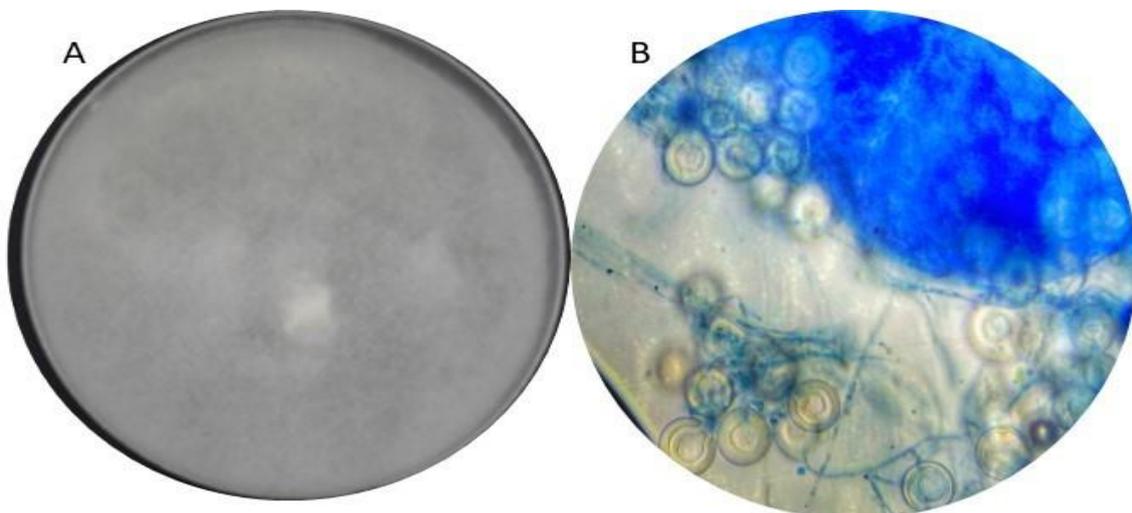


Figure 26: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Pythium* sp.

I.4.4- *Rhizoctonia sp.*

Ce champignon est caractérisé par une croissance rapide sur milieu PDA. La colonie présente un aspect rayonnant d'une couleur foncée avec formation des sclérotés. L'observation microscopique montre un mycélium long et cloisonné qui présente une légère constriction au niveau des cloisons (Figure 27). Ce champignon est dépourvu de spores.

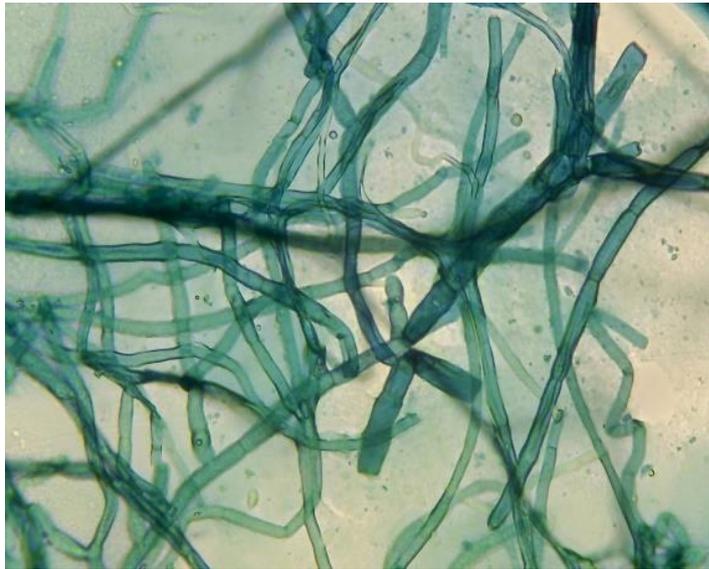


Figure 27: observation microscopique de *Rhizoctonia sp.*

I.5- Caractérisation de la flore saprophyte

Dans notre étude, en se basant sur des caractéristiques macroscopiques et microscopiques, nous avons pu identifier différents genres fongiques saprophytes au niveau de la rhizosphère du blé, et aussi estimer leur fréquence. Le Tableau 8 résume l'aspect morphologiques de ces champignons.

Tableau 8: Description morphologique des champignons saprophytes

Champignons	Aspect de la colonie	Aspect microscopique
<i>Alternaria sp.</i>	Thalle cotonneux de couleur vert grisâtre à marron (selon l'espèce).	Conidiophores sombres, simples ou régulièrement ramifiés. Conidies sombres, réticulées, piriformes ou ovoïdes, plus ou moins allongées.
<i>Cladosporium sp.</i>	Colonie vert foncé, d'aspect velouté.	Conidiophores cylindriques, tortueux à leur sommet. Spores légèrement colorées, ovoïdes à cylindriques, mono ou bicellulaires.
<i>Stemphylium sp.</i>	Colonie veloutée, d'une couleur verdâtre à noirâtre.	Conidiophore dressé, renflé au sommet. Spores brunes olivâtre, sub-rectangulaires, cloisonnées transversalement et longitudinalement.
<i>Ulocladium sp.</i>	Aspect veloutée de couleur noire ou noir verdâtre.	Conidiospores foncés, portant des conidies brun foncé, de formes ovoïdes à cylindriques, et divisées en plusieurs cellules par des cloisons transversales et longitudinales.
<i>Trichothecium sp.</i>	Colonie d'aspect poudreux, d'une couleur rose clair.	Mycélium hyalin et cloisonné. Conidiophores simples, dressés portant des grappes de conidies à leur extrémité. Les conidies sont lisses ellipsoïdes, bicellulaires, disposées solitaires ou en groupes.
<i>Aspergillus sp.</i>	Colonie mycélienne poudreuse de couleur qui se diffère selon l'espèce (noir, vert, jaune).	Conidiophore hyalin, droit, terminé par une tête renflée. Spores unicellulaires, globuleuses, lisses, de coloration claire, formées en chaîne.
<i>Penicillium sp.</i>	Colonie verte ou bleutée.	Mycélium septé, conidiophore hyalin, ramifié à la partie supérieure en article. Spores en chainettes, unicellulaires, hyalines, lisses, globuleuses à ovoïdes.
<i>Mucor sp.</i>	Thalle siphonné, velouté ou floconneux, d'une couleur marronne à noir.	Sporangiophore droit ou courbé, simple ou branchus, donne naissance à un sporange. Spores lisses, sphériques ou elliptiques de teinte claire.
<i>Rhizopus sp.</i>	Colonie aérienne très développée de couleur grisâtre.	Mycélium non cloisonné, de gros diamètre formant des rhizoïdes. Spores lisses, ovales.

I.6- Discussion

La majorité des parcelles prospectées dans les trois régions du nord-ouest Algérien (Mascara, Relizane et Mostaganem), nous ont permis de détecter la présence des symptômes typiques de la pourriture racinaire et du collet. Cette maladie infecte la base de la tige du blé en provoquant des nécroses et des pourritures accompagnées avec un brunissement du collet, s'étendant souvent jusqu'à 2-4 nœuds. Ces symptômes sont similaires à ceux rapportés par Matny, (2015).

Selon Tunali et *al.* (2008), cette maladie est un grave problème pour la production du blé dans de nombreuses régions du monde, en particulier dans les zones à climat sec. D'ailleurs, 35 % de réduction du rendement du blé ont été signalés dans le nord-ouest du Pacifique des États-Unis sous l'épidémies de la pourriture de collet de blé (FCR) (Smiley et *al.*, 2005). De plus, Daniel et *al.* (2008), ont montré que l'effet de cette maladie sur le blé dur et supérieur que sur le blé tendre, des pertes de rendement de 58 % et 25 %, respectivement, ont été enregistrées dans l'ouest de l'Australie.

L'inventaire des champignons tellurique réalisé a mis en évidence la présence d'une collection d'espèces pathogènes, saprophytes et même antagonistes, appartenant à plusieurs genres avec la dominance du genre *Fusarium*. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Nakkach-Abdellah, (2013).

Après la caractérisation morphologique, nous avons pu identifier 15 genres fongiques dont 73.33% appartiennent au phylum des *Ascomycota*, par contre les *Basidiomycota* et les *Oomycota* sont représentés par 6.67% seulement des champignons détectés. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Mouchacca (2005) qui confirme que les *Ascomycota* sont considérer comme les champignons les plus fréquents dans les sols des régions arides et semi arides, contrairement aux autres phylums qui nécessitent plus d'humidité pour la croissance et la germination des spores, surtout pour les *Oomycota*.

Au niveau de la rhizosphère, les racines des plantes exsudent des substances nutritives, composés d'une large gamme de sucres, acides aminés, acides organiques des acides gras, des hormones, des vitamines et composés phénoliques (Bertin et *al.*, 2003), qui peuvent influencer directement sur les communautés microbiennes telluriques. La quantité et la nature de ces substances varient avec de nombreux facteurs tels que la température, l'humidité du sol, l'aération, le pH, l'éclairement et la disponibilité de la matière organique dans le sol. Cette

rhizodéposition, détermine largement la diversité et l'abondance de la flore fongique dans l'environnement racinaire.

Les interactions qui déroulent peuvent avoir des conséquences multiples. D'une part, les plantes peuvent bénéficier de ces interactions en termes de croissance et de santé. En parallèle, les microorganismes peuvent également en tirer profit en utilisant les substrats présents dans les exsudats. Cependant, ces interactions peuvent aussi être délétères pour la plante lorsqu'il s'agit d'un microorganisme phytopathogène (Raaijmakers et *al.*, 2009 ; Badri et Vivanco, 2009).

Lors de nos isolements, plusieurs champignons phytopathogènes ont été détectés, ces derniers sont responsables des maladies vasculaires, et des pourritures au niveau des racines et du collet, surtout au stade plantule. Dans le sol, en conditions défavorables, ou en absence de la plante hôte, la plupart de ces champignons phytopathogènes ne persistent généralement pas sous forme mycélienne active, mais à l'état passif sous forme d'organes adaptés à la conservation tels que des sclérotés (*Rhizoctonia sp.*), des chlamydospores (*Fusarium sp.*) ou des oospores (*Pythium sp.*).

Selon Brussaard et *al.* (2007), les champignons telluriques apparaissent comme des acteurs majeurs des agrosystèmes, par leur contribution dans la dynamique des éléments nutritifs et la stimulation de la croissance et le développement des plantes. Ces microorganismes participent également dans la décomposition des matières organiques complexes telles que les lignines et les celluloses par la production d'enzymes lytiques extracellulaires (Sinsabaugh, 2005).

Quelques espèces jouent un rôle important dans la bioremédiation et la dépollution des sols en dégradant plusieurs produits chimiques par l'intermédiaire de leurs enzymes secrétées (Kurniati et *al.*, 2014)

Certains champignons, détectés au cours de nos analyses (*Trichoderma sp.* et *Chaetomium globosum*) peuvent avoir une activité antagoniste intéressante vis à vis de champignons phytopathogènes, ou d'autres parasites animaux (Bouanaka et *al.*, 2021 ; Feng et *al.*, 2023). Ces champignons présentent un intérêt dans la lutte biologique contre les bioagresseurs.

I.7- Conclusion

La synthèse des divers résultats obtenus, nous révèle l'importante diversité des champignons pathogènes et saprophytes au niveau de la rhizosphère du blé. Quelques espèces peuvent affecter l'état sanitaire des plantules et par conséquent le rendement. D'autres agents peuvent jouer un rôle bénéfique dans la bioprotection des plantules vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques, et dans la stimulation de leur croissance.

Pour conserver notre patrimoine biologique et sauvegarder la diversité de la flore fongique, la lutte biologique, intégrée aux systèmes de protection semble être une solution à la fois efficace et respectueuse de l'environnement.

II- Caractérisation morphologique et pathogénique de *Fusarium* spp.

Au sein de cette étude, un large éventail de micro-organismes qui exercent une influence significative sur la santé et la productivité des plantes a été inventorié. Parmi eux, le genre *Fusarium* qui a été le plus dominant au niveau de la rhizosphère du blé.

Le *Fusarium* est un genre vaste et diversifié de champignons filamenteux, comprenant de nombreuses espèces qui possèdent divers degrés de pathogénicité envers les plantes. Ces champignons ont une distribution étendue et peuvent être trouvés dans diverses niches écologiques.

Comprendre sa diversité et ces mécanismes de pathogénicité est donc crucial pour concevoir des stratégies de gestion efficaces pour atténuer ces impacts négatifs.

II.1- Caractérisation morphologique du genre *Fusarium*

Les isollements effectués à partir du sol rhizosphérique, et à partir des racines et du collet des plantules de blé présentant des symptômes typiques de maladies telluriques ont permis d'obtenir des isolats qui appartiennent au genre *Fusarium* et *Microdochium*. Plusieurs isolats ont été obtenus à partir des différents prélèvements. La caractérisation morphologique et pathogénique a été limitée aux isolats responsables des symptômes de la pourriture du collet (tableau 9).

Tableau 9: Origine géographique et caractéristiques culturelles des isolats de *Fusarium* spp.

Code isolat	Wilayas	Site de prélèvement	Origine d'isolement	Morphotype	Pigmentation
F1	Mascara	Matemore	Racine	Duveteux	Blanche
F2	Mascara	Tighennif	Sol	Aérien	Rose claire
F3	Mascara	Mohamadia	Collet	Aérien	Rose saumon
F4	Mascara	Mohamadia	Racine	Aérien	Rouge brique
F5	Mascara	Maoussa	Collet	Duveteux	Rouge brique
F6	Relizane	Jediouia	Collet	Aérien	Rouge brique
F7	Mascara	Matemore	Collet	Cotonneux	Rouge brique
F8	Mascara	Sig	Racine	Duveteux	Blanche
F9	Relizane	Jediouia	Sol	Duveteux	Rose
F10	Mostaganem	Haci mamache	Racine	Aérien en mèche	Rouge brique
F11	Oran	Sebkha	Sol	Ras	Blanche
F12	Mascara	Tighennif	Collet	Cotonneux	Rouge brique
F13	Mascara	Mohamadia	Sol	Duveteux	Rose saumon
F14	Mascara	Mohamadia	Sol	Aérien en mèche	Rose saumon
F15	Mascara	Mohamadia	Collet	Duveteux	Rose
F16	Mascara	Maoussa	Collet	Cotonneux	Rouge brique
F17	Mascara	Maoussa	Racine	Cotonneux	Rose saumon
F18	Mascara	Maoussa	Racine	Duveteux	blanche
F19	Mascara	Maoussa	Sol	Duveteux	Rose
F20	Mascara	Maoussa	Sol	Aérien	Blanche à marron
F21	Mascara	Maoussa	Sol	Aérien	Rouge brique
F22	Mascara	Tighennif	Racine	Aérien	Rose
F23	Mascara	Tighennif	Sol	Duveteux	Rouge brique
F24	Mascara	Tighennif	Collet	Aérien en mèche	Rouge brique
F25	Mascara	Tighennif	Racine	Duveteux	Rouge brique
F26	Mascara	Frouha	Collet	Aérien	Rouge brique
F27	Mascara	Frouha	Collet	Aérien	Rose saumon
F28	Mascara	Frouha	Collet	Cotonneux	Rose saumon
F29	Mascara	Frouha	Sol	aérien	Blanche
F30	Mascara	Matemore	Racine	Aérien en mèche	Rouge brique
F31	Mascara	Mohamadia	Sol	Cotonneux	Rouge brique
F32	Mascara	Mohamadia	Collet	Aérien	Rouge brique
F33	Mascara	Sig	Racine	Cotonneux	Rose saumon
F34	Mascara	Sig	Sol	Duveteux	rose
F35	Mascara	Sig	Collet	Cotonneux	Rouge brique
F36	Mascara	Maoussa	Collet	Aérien	Blanche

II.1.1- *Fusarium graminearum*

Ce champignon est caractérisé par une croissance mycélienne très rapide avec une absence de sporulation sur milieu PDA. Le mycélium est aérien, floconneux d'une couleur rouge brique avec des reflets plus au moins jaune-orangé dans sa partie aérienne. Sur les milieux SNA et Czapek on observe une production des macroconidies et des sporodochies avec une absence des microconidies et même des chlamydospores. Sous microscope, les macroconidies sont hyalines, droites ou légèrement arquées. La cellule apicale est fortement courbée à l'extrémité, par contre la cellule basale est allongée et effilée (Figure 28). Elles mesurent en moyenne $41.5 \mu\text{m} \times 3.75 \mu\text{m}$, avec la présence de 5 à 6 cellules.

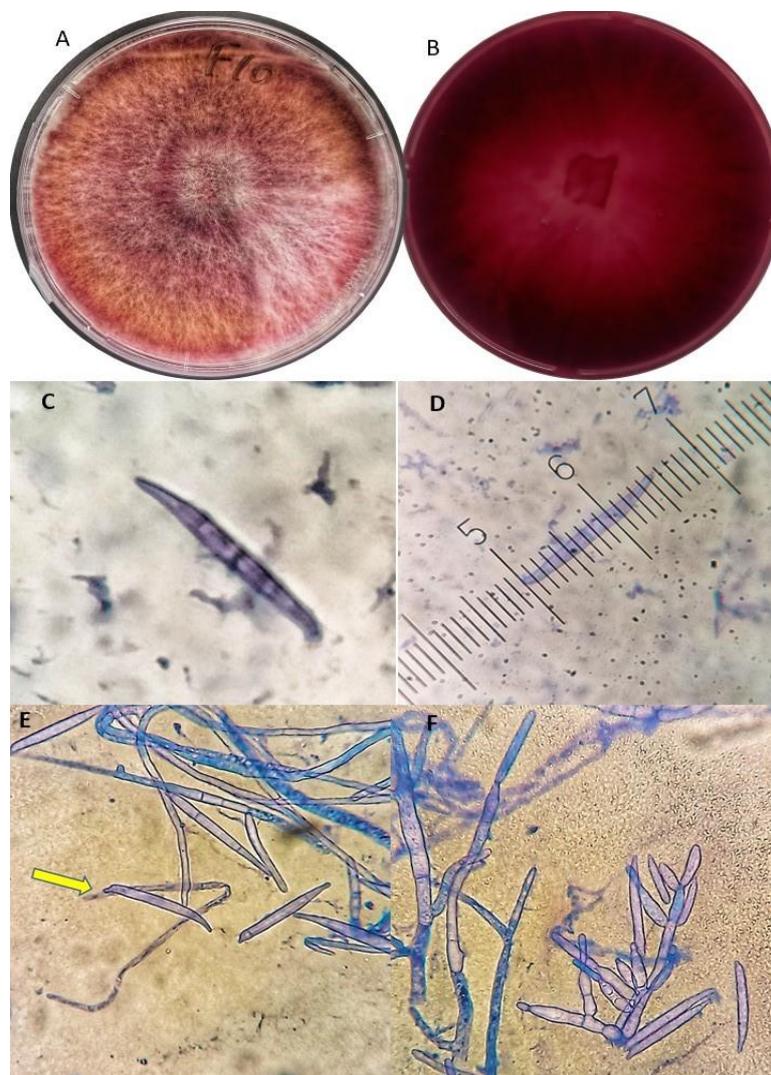


Figure 28: Aspect macroscopique et microscopique de *Fusarium graminearum*, A-B : avers et revers de la colonie. C, D : macroconidie. E : cellules apicale et basale. F : sporodochie

II.1.2- *Fusarium pseudograminearum*

Le mycélium de cette espèce est aérien généralement abondant et intensément rouge. Les chlamydospores sont généralement absentes. La sporulation sur gélose SNA est lente et peu abondante dans l'obscurité, presque précoce et abondante sous lumière UV. La formation des conidiophores agrégés en sporodochies a été observée sur milieu Czapek. Les phialides sont généralement subcylindriques. Les macroconidies sont hyalines et légèrement courbées et mesurent en moyenne $30.25 \mu\text{m} \times 4.25 \mu\text{m}$, elles comportent généralement 4 à 6 cloisons. La cellule apicale est courte et pointue (Figure 29).

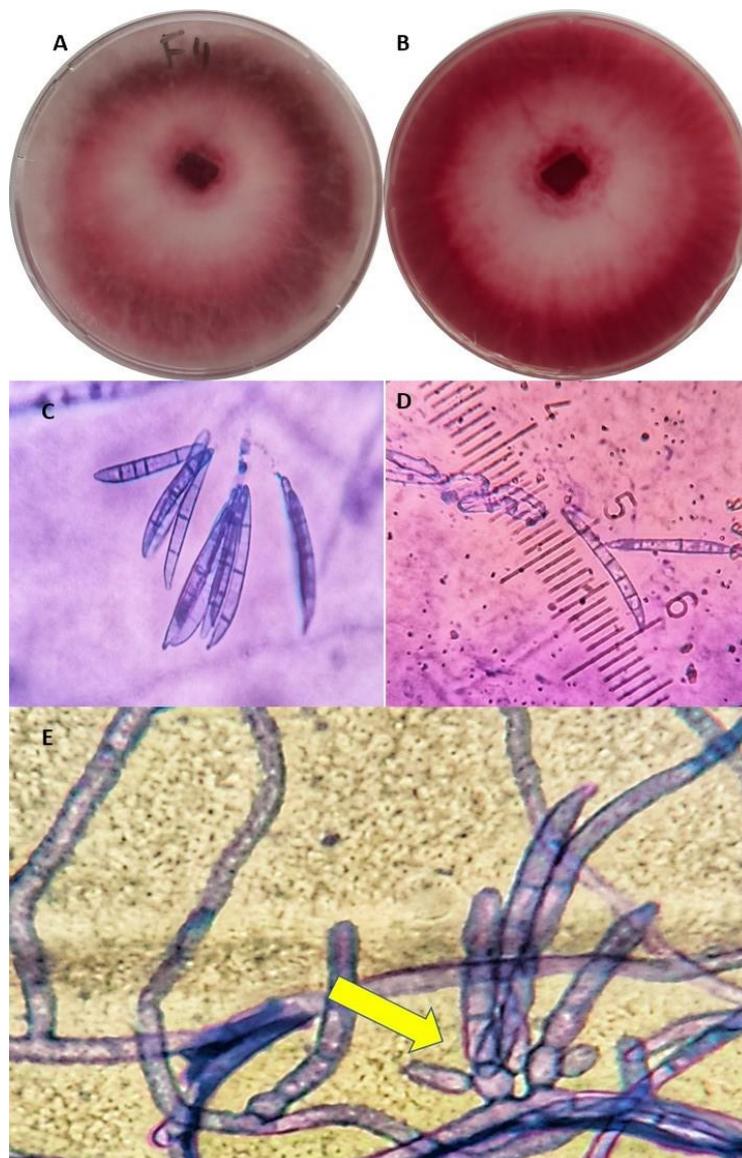


Figure 29: Aspect macroscopique et microscopique de *F. pseudograminearum*, A,B : avers et revers de la colonie. C, D : macroconidie. E : sporodochie.

II.1.3- *Fusarium culmorum*

Ce champignon présente une croissance rapide sur milieu PDA. Le mycélium est cotonneux, aérien, abondant, épais et dense, d'une couleur blanche au départ puis rose. Le revers de la colonie présente une pigmentation rouge intense (Figure 30).

Sur le milieu SNA l'aspect microscopique montre des macroconidies épaisses, fusiformes et légèrement courbés. Elles comportent généralement 3 à 5 cloisons et mesurent en moyenne $32.91\mu\text{m} \times 4,6\mu\text{m}$. La cellule apicale est courte et peu arrondie. Les microconidies sont absentes. Les phialides sont courtes et larges formées sur le mycélium aérien ou groupées en sporodochies. Les chlamydospores sont produites à partir du mycélium, ou à partir des spores elles-mêmes (Figure 30, D).

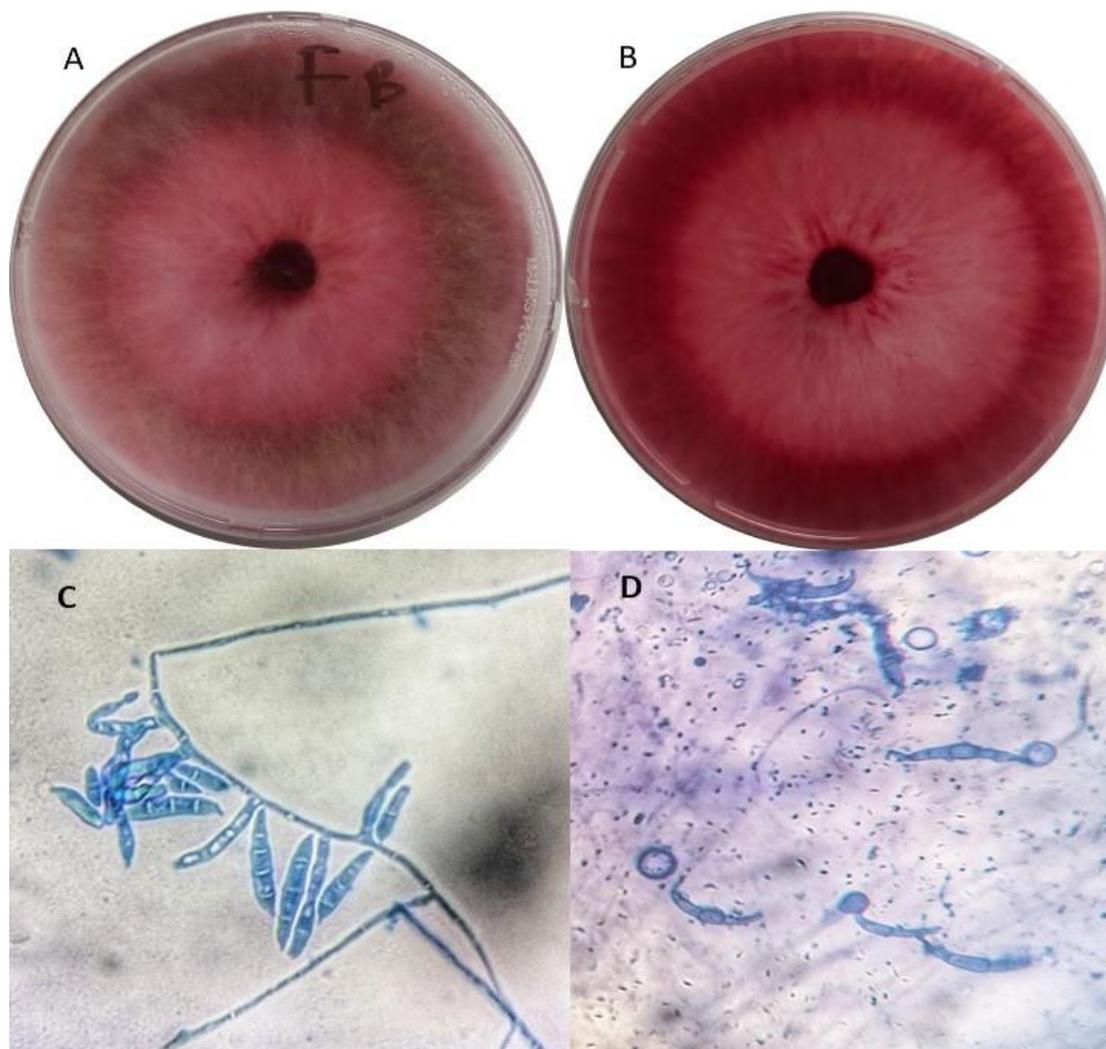


Figure 30: Aspect macroscopique et microscopique de *F. culmorum*, A-B : avers et revers de la colonie. C : macroconidie. D : chlamydospores et macroconidies après exposition à l'UV.

II.1.4- *Fusarium equiseti*

Les colonies sont duveteuses de couleur blanche à crème avec un revers pale. *Fusarium equiseti* est caractérisé par la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées mesurant en moyenne $21.75 \mu\text{m} \times 4.75 \mu\text{m}$. La morphologie des cellules apicales est effilée et allongée, et les cellules basales sont de forme de pied bien développée (Figure 31). Les cloisons des macroconidies sont très rapprochées avec un nombre de 5 à 7 cloisons.

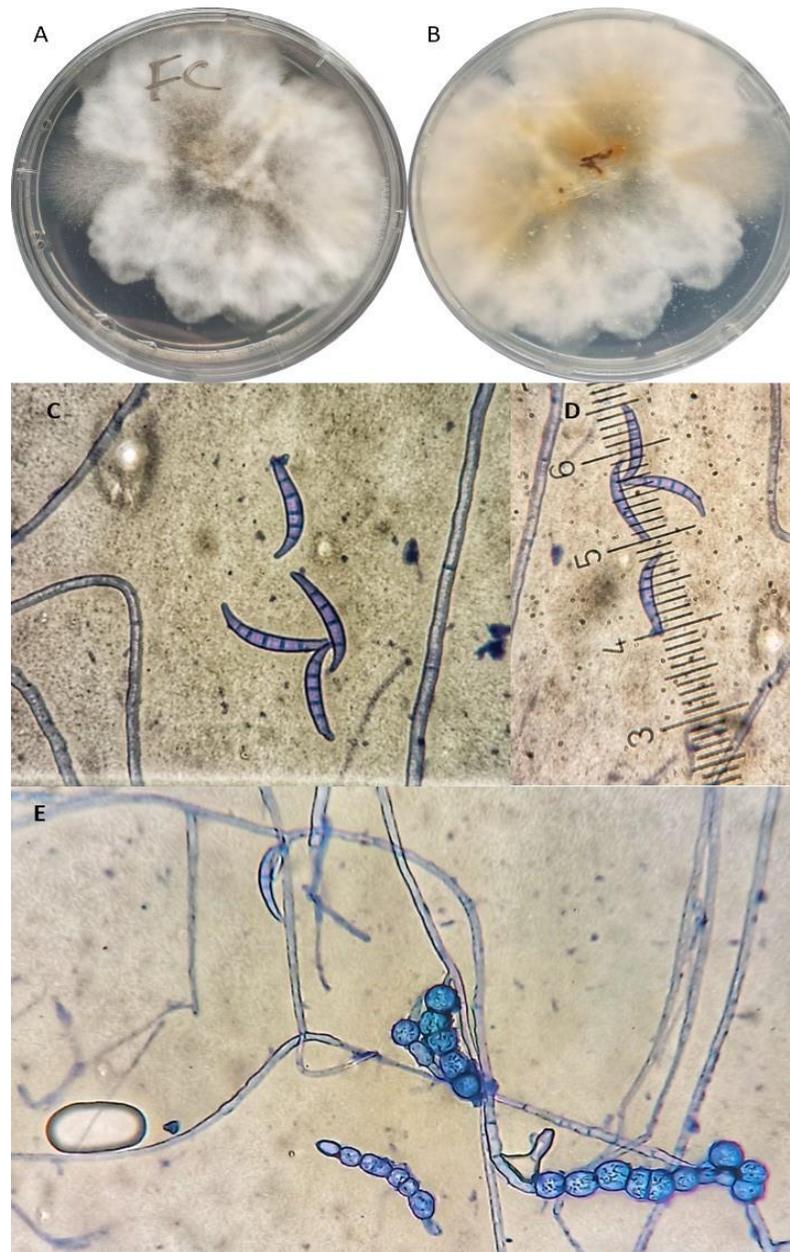


Figure 31: Aspect macroscopique et microscopique de *F. equiseti*, A-B : avers et revers de la colonie. C, D : macroconidie. E : chlamydospores en chaînette.

II.1.5- *Fusarium cerealis* (Synonyme *F. crookwellense*)

Les colonies poussent assez rapidement avec un mycélium aérien dense et clairsemé caractérisé par une pigmentation rouge dans la gélose. La plupart des isolats produisent des sporodochies abondantes sur milieu Czapek, qui s'agrègent en une masse de spores bien visible. La morphologie générale des macroconidies est robuste à parois épaisses et un peu plus larges au milieu (Figure 32). Généralement, les macroconidies sont de longueur intermédiaire avec une courbure prononcée sur la face dorsale tandis que la face ventrale est presque droite et mesurent en moyenne $27.25 \mu\text{m} \times 3.50 \mu\text{m}$.

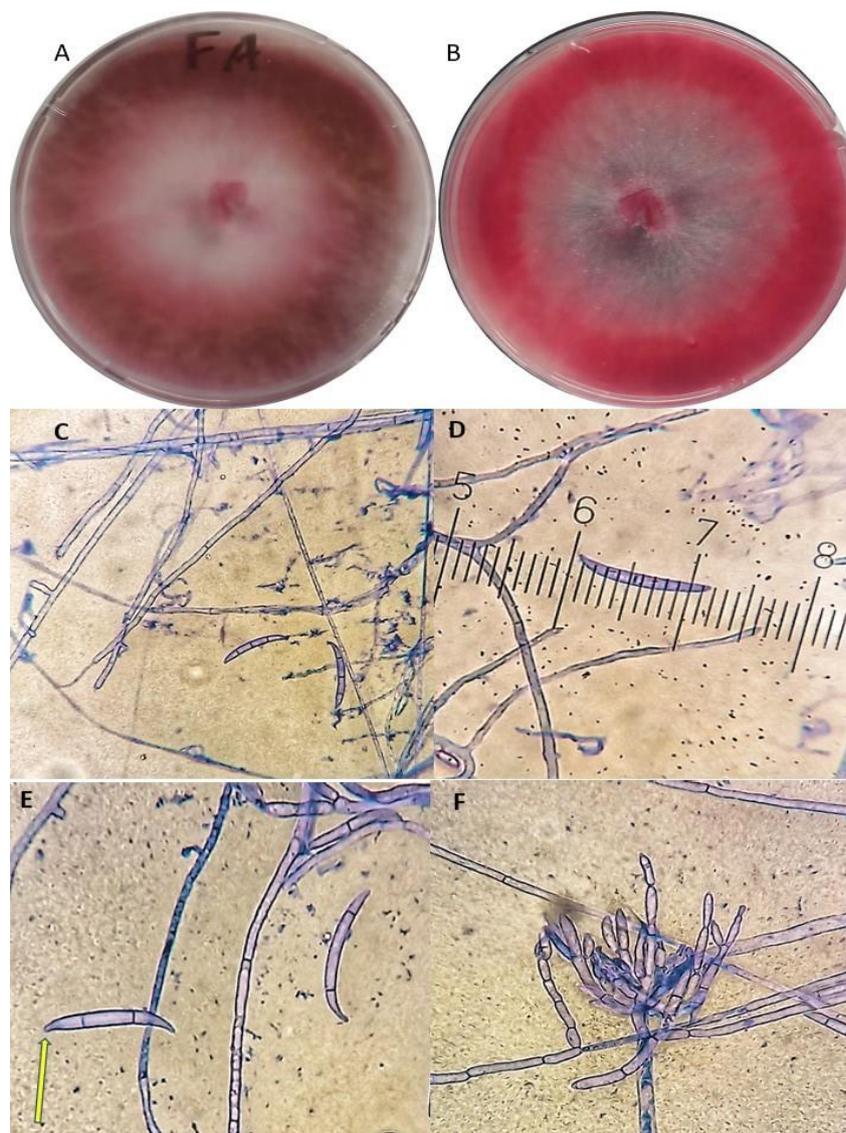


Figure 32: Aspect macroscopique et microscopique de *F. cerealis*, A-B : avers et revers de la colonie. C-D : macroconidie. E : cellule apicale. F : sporodochie

II.1.6- *Fusarium verticillioides*

Ce champignon a une croissance rapide sur milieu PDA. La couleur des colonies vire du blanc au rose clair avec un revers violet. Elle présente un mycélium aérien. Les conidiophores sont peu ramifiés et produisent des conidies en chaînes fines et très longues. Les macroconidies sont effilées, longues, droites ou légèrement incurvées dont la cellule basale est nettement pédicellée. Elles présentent 3-7 cloisons et mesurent $42 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$. Cette espèce produit des microconidies unicellulaires et abondantes, par contre, elle ne forme pas de chlamydozoospores.

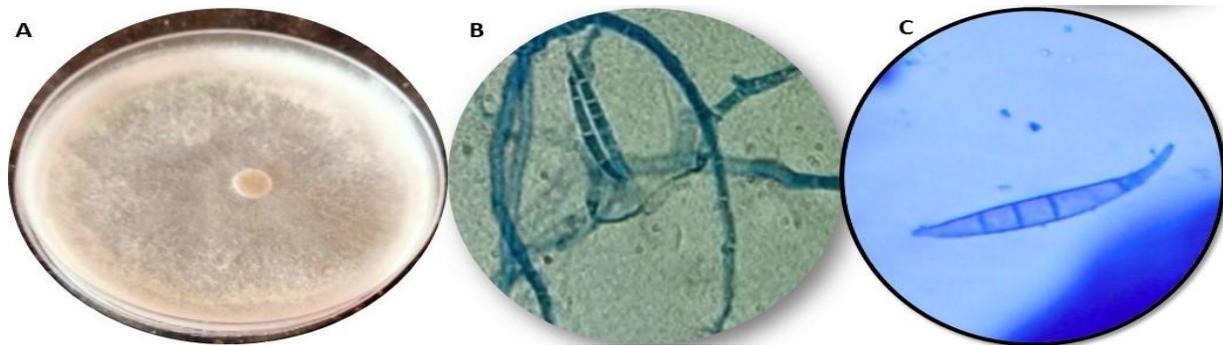


Figure 33: Aspect macroscopique et microscopique de *F. verticillioides*, A : aspect de la colonie. B-C : macroconidie.

II.1.7- *Fusarium avenaceum*

Les colonies de cette espèce sont d'une couleur blanche qui vire au marron clair. Le mycélium est aérien et abondant. Les macroconidies sont très longues ($60 \mu\text{m} \times 3.15 \mu\text{m}$), effilées, étroites et arquées, pourvues de 4 à 7 cloisons. Les microconidies sont absentes.

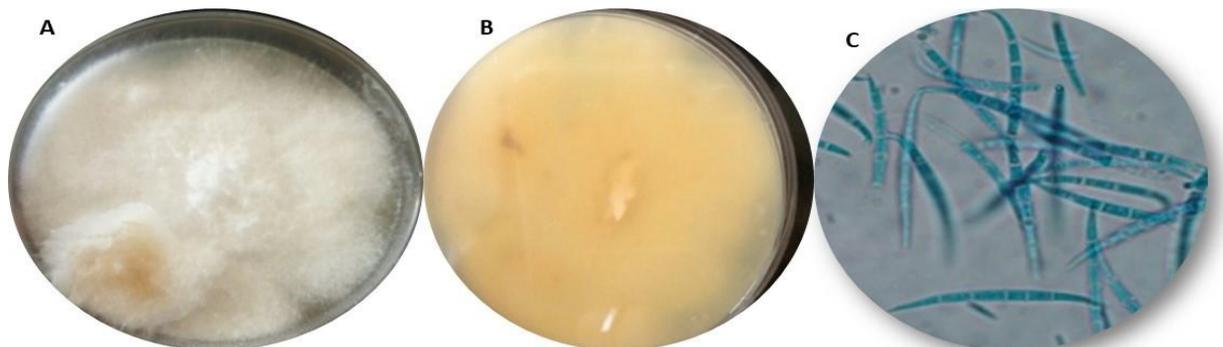


Figure 34: Aspect macroscopique et microscopique de *F. avenaceum*, A-B : avers et revers de la colonie. C : macroconidie.

II.2- Fréquence des espèces phytopathogènes

Selon les résultats obtenus, les isolats phytopathogènes du genre *Fusarium* responsable des symptômes de pourriture du collet sont par ordre d'importance, *Fusarium pseudograminearum* (30.55 %), *Fusarium culmorum* (25.00 %), *Fusarium graminearum*

(19.44 %), *Fusarium equiseti* (11.11 %), *Fusarium cerealis* et *Fusarium verticillioides* (5.56 %) et *Fusarium avenaceum* (2.78 %) (tableau 10).

Tableau 10: Diversité et fréquence de différentes espèces de *Fusarium*

<i>Fusarium</i> spp.	Nombre d'isolats	Fréquence (%)
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	11 (F4 - F32 - F12- F5 - F16 - F23- F24- F26 - F30- F31- F35)	30.55 %
<i>Fusarium culmorum</i>	9 (F6 - F17- F2- F3- F9- F15 - F22- F27 - F34)	25.00 %
<i>Fusarium graminearum</i>	7 (F10 - F13- F14- F19- F25 -F28 - F33)	19.44 %
<i>Fusarium equiseti</i>	4 (F1 - F8 - F11 - F18)	11.11 %
<i>Fusarium verticillioides</i>	2 (F29 - F 36)	5.56 %
<i>Fusarium cerealis</i>	2 (F7 - F21)	5.56 %
<i>Fusarium avenaceum</i>	1 (F20)	2.78 %

II.3- Caractérisation pathogénique des isolats

Les résultats du test de pathogénicité réalisé pour les 36 isolats de *Fusarium* (tableau 9) sur la variété du blé sensible à la fusariose ont montré que les isolats testés ont présenté des symptômes typiques de la pourriture des racines et du collet et même certains de ces isolats ont exprimé une fonte de semis (Figure 35). Ces symptômes sont identiques à ceux observés en plein champs, qui se manifeste par un manque de levée des plantules de blé, des pourritures sèches au niveau des racines accompagné par un brunissement du collet. Le ré-isolément des isolats testés à partir des organes de plantes inoculées artificiellement a permis de confirmer l'implication de ces agents pathogènes dans l'induction de la maladie (Figure 36).



Figure 35: symptômes de la fonte de semis provoqués par *F. pseudograminearum*

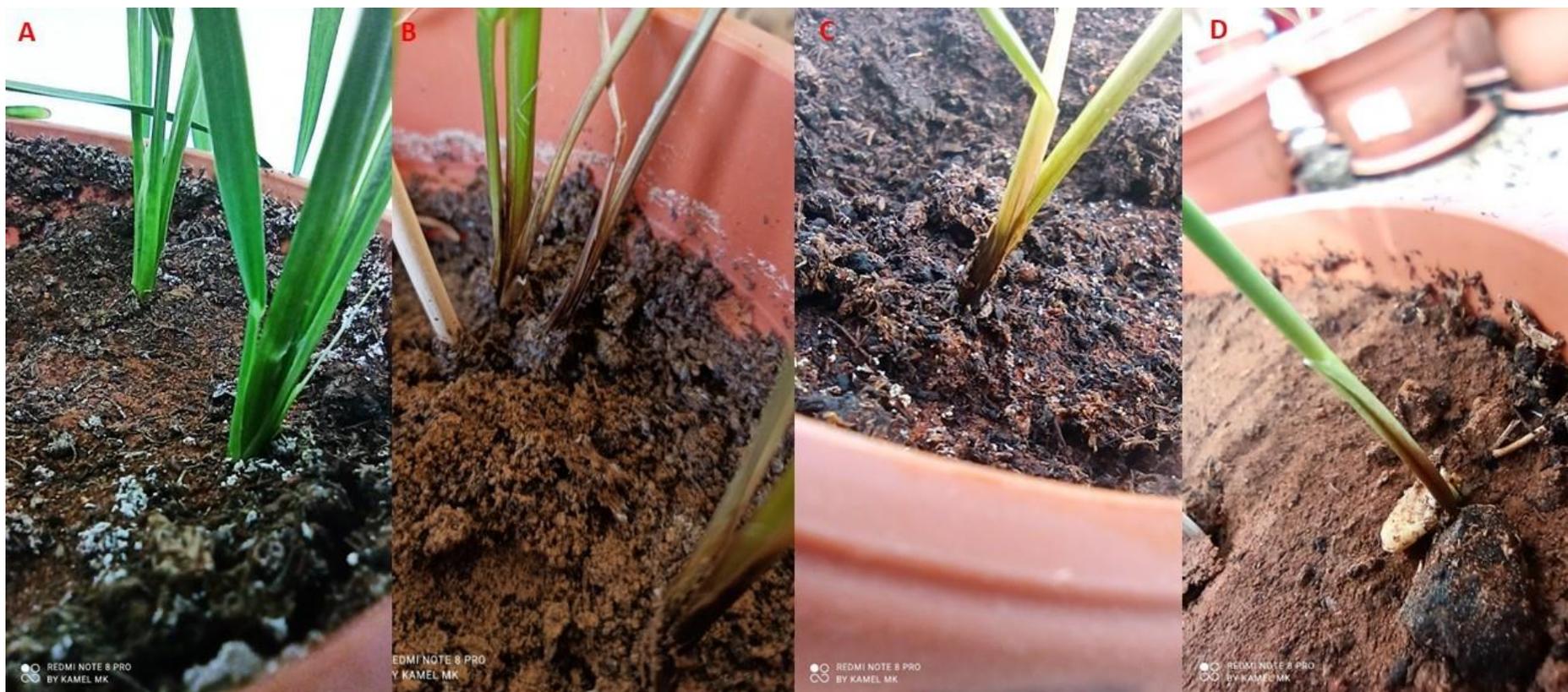


Figure 36: Symptômes causée par différentes espèces de *Fusarium* après 15 j d'inoculation. (A) témoin négatif, (B) *F. pseudograminearum*, (C) *F. culmorum*, (D) *F. graminearum*

II.3.1- Evaluation de la sévérité de la maladie

Les résultats d'inoculation artificielle de la variété du blé sensible à la fusariose avec différents isolats testés, montrent que la maladie s'est exprimée avec des degrés variables. L'analyse de la variance des résultats obtenus après 30 jours d'inoculation a montré des différences significatives entre les isolats (tableau 11). Les isolats testés ont enregistré des pourcentages de sévérité qui varient entre 17,66% et 86.83%. En revanche, les plantes témoins maintenues dans les mêmes conditions que les plantes inoculées n'avaient manifesté aucun symptôme.

D'après les notations réalisées, Les taux de sévérité les plus importants ont été enregistrés chez *Fusarium pseudograminearum*, l'isolat F4 était le plus virulent avec un pourcentage de sévérité de 86.83%. Les isolats de *Fusarium culmorum* viennent en deuxième position avec une sévérité moyenne de 46,69 %, suivi par *F. graminearum* et *F. equiseti* avec des moyennes de sévérité de 41,64% et 34,22% respectivement. Les isolats de *F. verticillioides*, *F. cerealis* et *F. avenaceum* étaient moins virulents avec une sévérité moyenne qui ne dépasse pas 30% (Figure 37).

Tableau 11: Sévérité des isolats de *Fusarium* inoculés aux plantules de blé en serre

Isolats	Sévérité (%)	Isolats	Sévérité (%)	Isolats	Sévérité (%)
F1	18±4,35 _r	F13	19±3,6 _r	F25	50±3,46 _{ijkl}
F2	54.16±5,1 _{ghijk}	F14	52.16±3,32 _{hijkl}	F26	59.33±2,51 _{ghi}
F3	32.66±4,04 _{nopq}	F15	24±5,29 _{pqr}	F27	37.16±2,92 _{mno}
F4	86.83±2,02 _a	F16	43.66±4,72 _{klmn}	F28	40.5±4,09 _{lmn}
F5	76.5±3,04 _{abcd}	F17	62.66±2,51 _{efgh}	F29	31.66±2,88 _{nopq}
F6	74.58±3,44 _{bcd}	F18	21±4,58 _{qr}	F30	81.83±2,02 _{abc}
F7	53.33±3,4 _{hijk}	F19	27.33±4,04 _{opqr}	F31	65.83±4,19 _{defg}
F8	46.41±2,55 _{jklm}	F20	24.16±5,1 _{pqr}	F32	34.66±2,51 _{mno}
F9	41±3,6 _{lmn}	F21	17.66±2,51 _r	F33	45.16±4,25 _{klm}
F10	57.33±2,51 _{ghij}	F22	71.66±2,88 _{cdef}	F34	22.33±5,85 _{qr}
F11	51.5±2,17 _{hijkl}	F23	84.33±4,5 _{ab}	F35	78.83±3,25 _{abc}
F12	62±3,46 _{fghi}	F24	35±5 _{mno}	F36	25.16±2,56 _{opqr}

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± écart type (Test de Tukey)

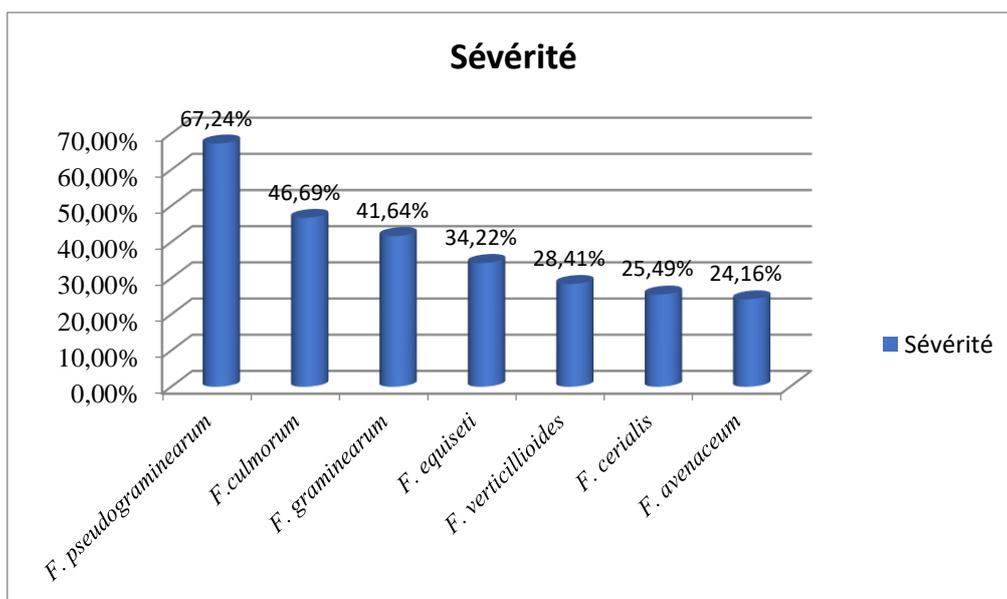


Figure 37: Sévérité moyenne des différentes espèces de *Fusarium*

II.3.2- Identification moléculaire et phylogénétique des isolats virulents

L'identification moléculaire de *Fusarium sp.* a été réalisée en utilisant la région ITS (Internal Transcribed Spacer), qui est une région hautement conservée. Ce qui en fait des cibles appropriées pour l'identification au niveau des espèces et l'analyse phylogénétique. Les bandes des séquences obtenues ont été déposées dans la base de données NCBI GenBank sous les numéros d'accès : ON687723 pour F4 et ON685926 pour F10.

La comparaison de la séquence de F4 obtenues avec les séquences de référence celles de la banque de données NCBI par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) a montré un degré de similarité de 100% avec la séquence de la souche *Fusarium pseudograminearum* B3 (MT465500). Alors que la séquence de F10 était similaire avec celle de la souche *Fusarium graminearum* BSBD (ON527490).

De plus, l'arbre phylogénétique a été construit en utilisant les séquences ITS de nos espèces ainsi que des taxons apparentés (Figure 38-39). L'arbre est généré à l'aide d'un logiciel MEGA (version x), en utilisant la méthode de calcul Neighbor-joining. Les résultats ont fourni une représentation visuelle des relations évolutives entre les espèces. Les arbres phylogénétiques peuvent aider à comprendre la diversité génétique, l'histoire de l'évolution et les relations au sein du genre *Fusarium*, ce qui facilite la classification taxonomique et une étude plus approfondie des espèces de *Fusarium*.

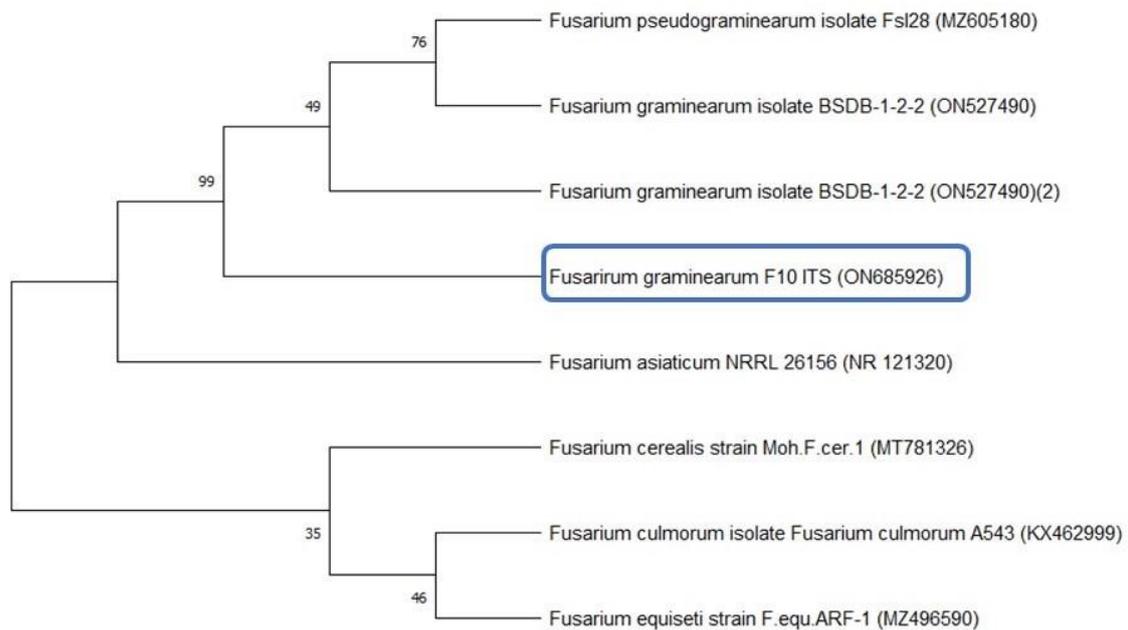


Figure 38: Arbre phylogénétique réalisé à partir d’une séquence de la région (ITS) de la souche F10 à l’aide de la méthode de Neighbor-joining. Les valeurs bootstraps (pourcentage de 1000 répétitions) indiquent la robustesse des points de branchement.

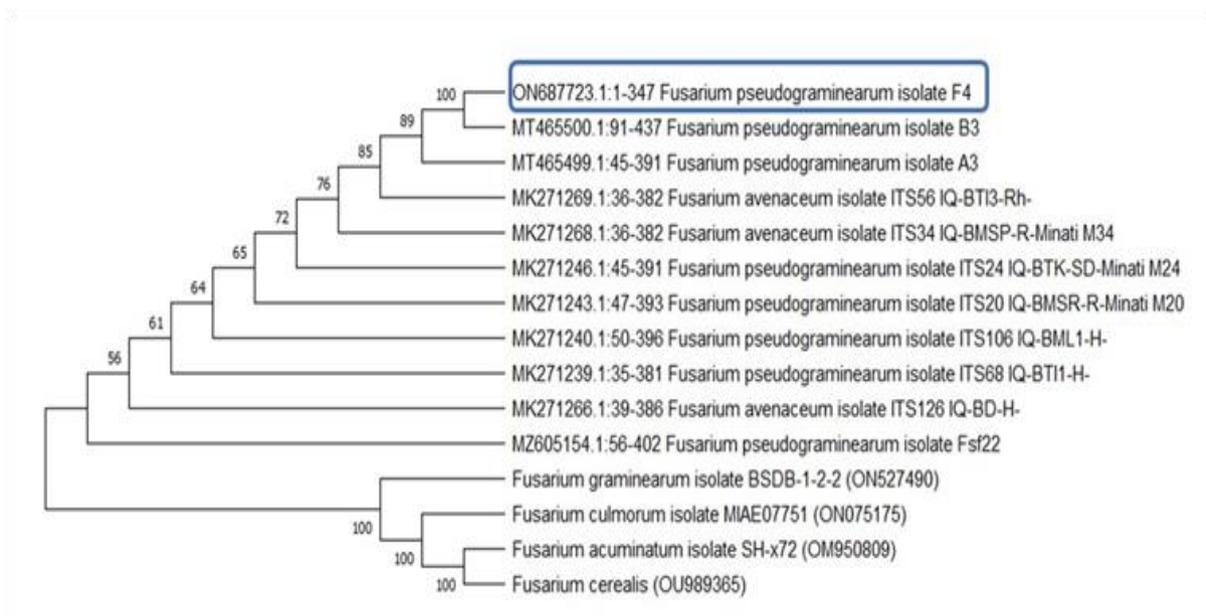


Figure 39: Arbre phylogénétique réalisé à partir d’une séquence de la région (ITS) de la souche F4 à l’aide de la méthode de Neighbor-joining. Les valeurs bootstraps (pourcentage de 1000 répétitions) indiquent la robustesse des points de branchement.

II.4- Discussion

Ce travail a porté sur l'étude des espèces de *Fusarium* spp. agents de la pourriture du collet chez le blé. La caractérisation morphologique des différentes espèces basée sur l'aspect des colonies, la forme et la mensuration des macroconidies, la présence ou l'absence des microconidies et des chlamydospores nous a permis d'identifier 7 espèces responsables de la maladie. Il s'agit de *Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. verticillioides* et *F. avenaceum*. D'autres espèces ont été également détectées au cours de notre étude tels que *F. acuminatum* et *Microdochium nivale* responsables des maladies de fontes de semis du blé. En plus des espèces phytopathogène, l'analyse nous a permis de détecter un nombre important d'isolats saprophytes isolés à partir de la rhizosphère et des racines tels que *Fusarium oxysporum* et *Fusarium sp.*

Selon Champion (1997), l'identification des *Fusarium* est un peu difficile en raison, d'une part de la variabilité naturelle de la morphologie des espèces, et d'autre part de l'influence sur cette morphologie de la nature du substrat nutritif sur lequel le champignon s'est développé. C'est pour cette raison, la caractérisation morphologique de quelques isolats reste insuffisante. Il est important de la compléter par une étude moléculaire afin de confirmer les résultats. Deux isolats virulents de notre collection ont fait l'objet d'une analyse moléculaire basée sur le séquençage de la région ITS de l'ADN. Après comparaison des séquences, les deux isolats ont présentés des degrés de similarité élevée avec les souches *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium graminearum*.

Parmi les espèces identifiées au cours de notre étude, *Fusarium pseudograminearum* était le plus abondant parmi toutes les espèces recensées, suivi par *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* et *Fusarium equiseti*. Les isolats appartenant à *Fusarium cerealis* et *Fusarium verticillioides* ont présentés des fréquences identiques. En revanche la plus faible fréquence a été enregistrée chez *Fusarium avenaceum*.

Nos résultats sont concordants avec ceux de Dyer et al. (2009) et Shikur Gebremariam et al. (2018) où *F. pseudograminearum* fut classé en première position parmi les espèces fongiques responsables de la maladie de la pourriture du collet du blé. Contrairement aux travaux d'Abdallah-Nekache et al. (2019), qui le signale en deuxième position après *Fusarium culmorum*.

La distribution et la prédominance des agents pathogènes sont déterminées par les régions, et les facteurs climatiques, notamment la température et l'humidité. Dans les régions les plus chaudes de Europe, *F. graminearum* prédomine, alors que dans les régions maritimes plus fraîches, les espèces de *Microdochium* sont favorisées (Parry et al., 1995). Kazan et Gardiner (2018) rapportent que *F. pseudograminearum* est considérée parmi les espèces principales qui causent la pourriture du collet de blé dans les régions arides et semi-arides. Cependant, d'autres recherches ont indiqué que *Fusarium poae* était associé à un climat semi-aride, alors que *F. graminearum* était associé avec des conditions plus chaudes et humides. *F. avenaceum* et *F. culmorum* étaient tous deux associés à des conditions plus fraîches et humides (Xu et al., 2008).

Les espèces de *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *F. verticillioides* identifiés au cours de cette étude sont également considérés par plusieurs auteurs comme les principales espèces associées à la fusariose de l'épi (Jurado et al., 2005 ; Miedaner et Voss, 2008). En culture, le passage des espèces de *Fusarium* spp. du collet vers l'épi est très fréquent, d'où on peut facilement observer les deux maladies sur un même plant. Selon Agrios (2005), la fusariose de l'épi est soit accompagnée, soit précédée par des attaques sur le collet et les racines.

Malgré l'importance de la pourriture du collet des céréales dans le monde et en Algérie, peu de travaux sont consacrés à l'étude de cette maladie en Algérie, et l'identification des agents causals. Abdallah-Nekache et al. (2019), ont été les premiers à identifier *F. pseudograminearum*, *F. verticillioides* et *F. avenaceum* comme agents de pourriture du collet sur le blé en Algérie. Le Premier rapport de l'identification de *F. equiseti* comme agent de pourriture du collet chez le blé en Algérie a été établie par Bencheikh et al. (2020). En revanche, l'implication de *Fusarium cerealis* dans l'étiologie de la maladie en Algérie a été confirmé par Bouanaka et al. (2022) suite à leur premier rapport sur l'identification moléculaire, et l'évaluation de la virulence de l'agent pathogène.

L'étude de pathogénicité des isolats de *Fusarium* spp. sur le développement de la maladie de la pourriture du collet (FCR) montre l'existence d'une certaine variabilité dans la sévérité de ces espèces qui varie entre 17,66% et 86.83 %. Nos résultats montrent que les espèces les plus virulents sont *F. pseudograminearum* et *F. culmorum*, suivi de *F. graminearum* et *F. equiseti*. Alors que l'espèce *F. avenaceum* était la moins virulente.

Nos résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Smiley et al. (2005) et Kammoun et al. (2009), qui ont rapporté que les espèces *F. culmorum* et *F. pseudograminearum*

étaient les plus pathogènes par rapport aux *F. avenaceum* et *Microdochium nivale*. D'autres études récentes notamment celle de Bozoğlu et al. (2022) ont rapporté que les isolats de *F. pseudograminearum* étaient les plus virulents dans l'expression de la pourriture du collet sur les plantules de blé inoculées artificiellement. Ces derniers ont enregistré les indices de sévérité les plus élevés dans le test de pathogénicité.

Dyer et al. (2009) ont comparé les effets de FCR causés par trois espèces de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* et *F. graminearum*) dans des essais en plein champ. Leurs résultats suggèrent que *F. culmorum* est l'agent le plus agressif en causant des pertes importantes chez les semis de blé, tandis que *F. graminearum* et *pseudograminearum* ont provoqué la plus forte gravité de la pourriture du collet chez les plantes adultes.

II.5- Conclusion

L'étude morphologique, moléculaire et pathologique des différentes espèces de *Fusarium* spp. responsables des symptômes de la pourriture du collet du blé, peut contribuer à la connaissance de l'étiologie de la maladie dans les régions prospectées, pour une meilleure prise en charge de cette pathologie qui prend de plus en plus d'ampleur en Algérie et dans le monde entier. Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent également d'orienter les travaux de recherches vers l'étude des différentes interactions entre le complexe fusarien incriminé dans cette pathologie, et l'élaboration des stratégies de lutte adéquates contre les maladies telluriques en céréaliculture.

III- La lutte biologique par l'utilisation des microorganismes telluriques

III.1- Caractérisation morphologique des antagonistes fongiques

Dans le but d'avoir des agents potentiellement antagonistes au cours de nos isollements dans la région de Mascara, Les résultats des prélèvements effectués à partir des sols rhizosphériques des parcelles de blé nous ont permis d'identifier quatre espèces fongiques potentiellement antagonistes. Trois isolats appartenant au *Trichoderma* et un isolat du genre *Chaetomium*.

Les caractéristiques microscopiques, telles que la morphologie des spores, leur arrangement, la forme des conidiophores, des conidies, des phialides et des chlamydospores, jouent un rôle crucial dans la classification des espèces de *Trichoderma*. De plus, les caractéristiques des colonies de *Trichoderma*, telles que le taux de croissance, la pigmentation et la formation des anneaux concentriques, sont également des paramètres clés pour l'identification.

Les caractéristiques des colonies des différentes espèces de *Trichoderma* (T2, T3, T4 et T5) présentent une grande diversité sur le milieu PDA. La croissance de ces champignons est rapide, bien que variable d'une espèce à l'autre. En comparaison avec l'espèce T2, les isolats T4 et T3 ont manifesté une croissance plus rapide, atteignant respectivement 7,1 cm et 6,4 cm après 48 heures d'incubation, sans toutefois montrer de sporulation, mais uniquement une croissance mycélienne. La formation de phialides et de conidies a été observée chez ces deux isolats après 72 heures d'incubation. Par ailleurs, la production de chlamydospores a été détectée dès le 5ème jour d'incubation.

III.1.1- *Trichoderma longibrachiatum* (T4)

Sur milieu gélosé, les colonies de *Trichoderma longibrachiatum* sont initialement blanches et lisses, mais virent ensuite au vert en raison de la production de conidies. Les spores ont généralement une croissance rapide et peuvent recouvrir toute la surface de la gélose en quelques jours. Le revers de la colonie est jaune verdâtre pâle en culture jeune (Figure 40).

Sous microscope, ce champignon présente des hyphes septés et ramifiés. Les conidiophores sont typiquement longs et les phialides sont souvent courbées à l'apex en forme de bouteille, avec une longueur moyenne autour de 5–8 μm . Les conidies ont des parois lisses de forme ellipsoïdale à cylindrique avec une moyenne longueur de 2 à 5 μm . Les chlamydospores sont subglobuleuse à paroi lisse.

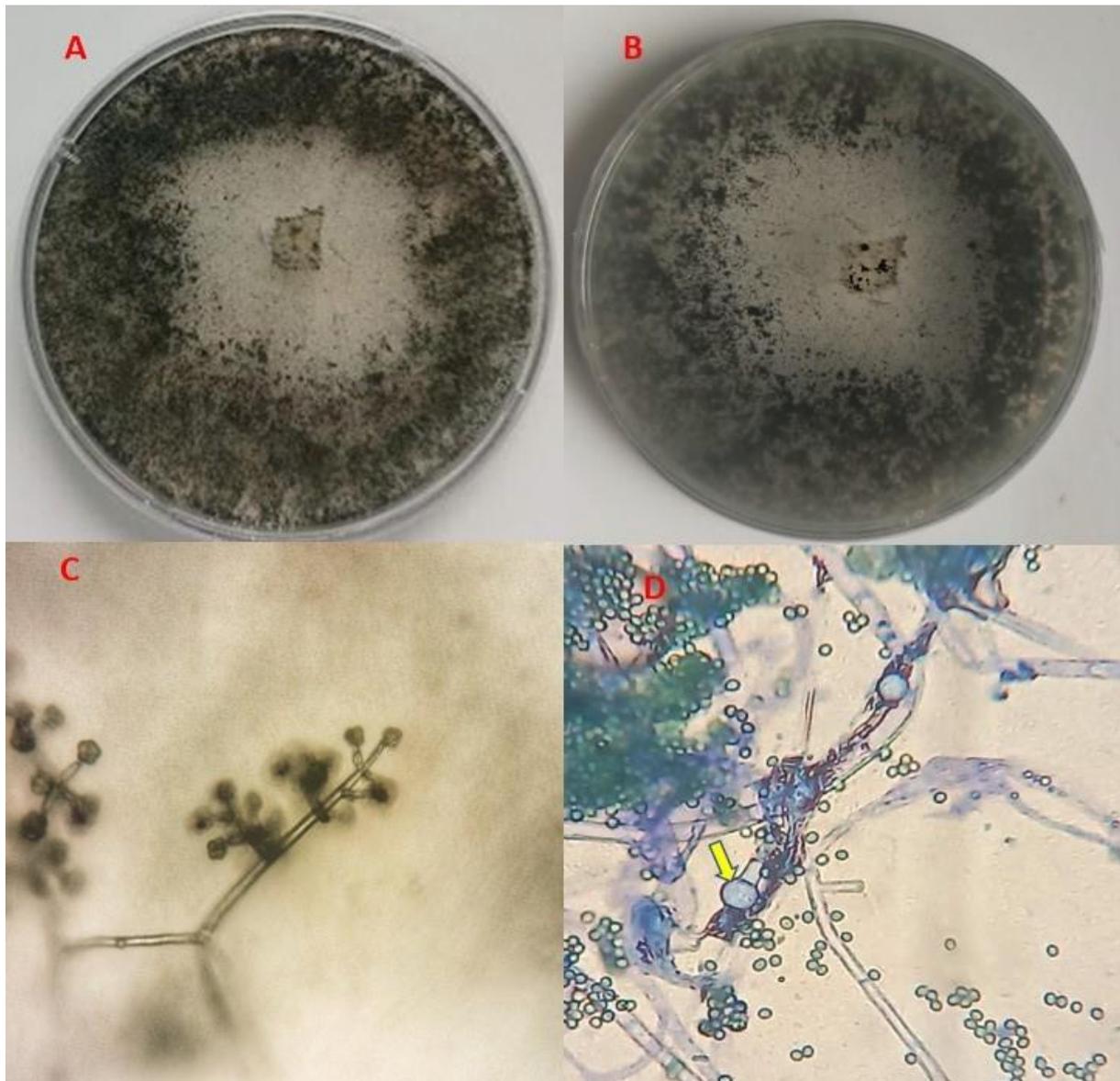


Figure 40: Caractéristiques morphologiques de *Trichoderma longibrachiatum*. (A) revers de la colonie, (B) avers, (C-D) agrégation des conidies, (D) chlamydo-spore intercalaire.

III.1.2- *Trichoderma gamsii* (T2)

Après 72 h d'incubation sur PDA à 25°C, le diamètre de la colonie s'étend à 50 mm. La formation des conidies commence après une semaine d'incubation. Les colonies de cette espèce sont blanches et dense couvrant la boîte de Pétri de 9 cm de diamètre après 5 à 6 jours, le revers est incolore devient plus tard pâle à brun (Figure 41). L'aspect microscopique montre des conidies lisses et ellipsoïdales portées par des phialides. Les chlamydo-spores formées en abondance sont hyalines à parois épaisses, globuleuses à subglobuleuses.

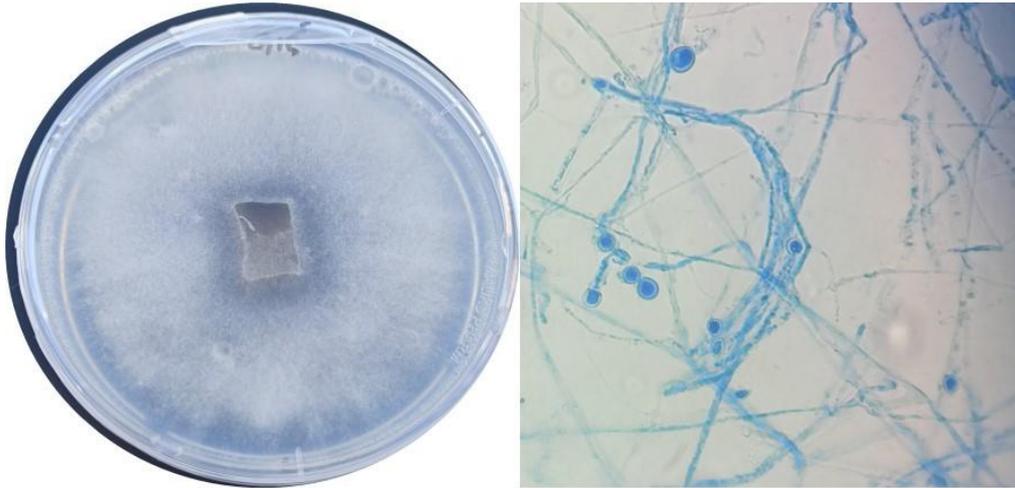


Figure 41: aspects macroscopique et microscopique de *T. gamsii*

III.1.3- *Trichoderma asperellum* (T3)

Les colonies de cet isolat sont d'une couleur blanche au centre et verte sur les bordures avec un aspect poudreux. Elles forment un anneau concentrique près de l'inoculum initial avec une production abondante des conidies (Figure 42). Le revers de la colonie, est d'une couleur crème, sans aucune diffusion de pigment sur la gélose.

Les conidiophores sont fortement ramifiés et disposés en ordre symétrique. Les phialides légèrement agrandies au milieu, (généralement 2–4 phialides). Les conidies d'une couleur vert foncé sont globuleuses à subglobuleuses ou ovoïdes, regroupées en amas sur les phialides. Les chlamydozoospores subglobuleuses à ovoïdes et lisses se forment soit en phase terminale soit fréquemment intercalaires.

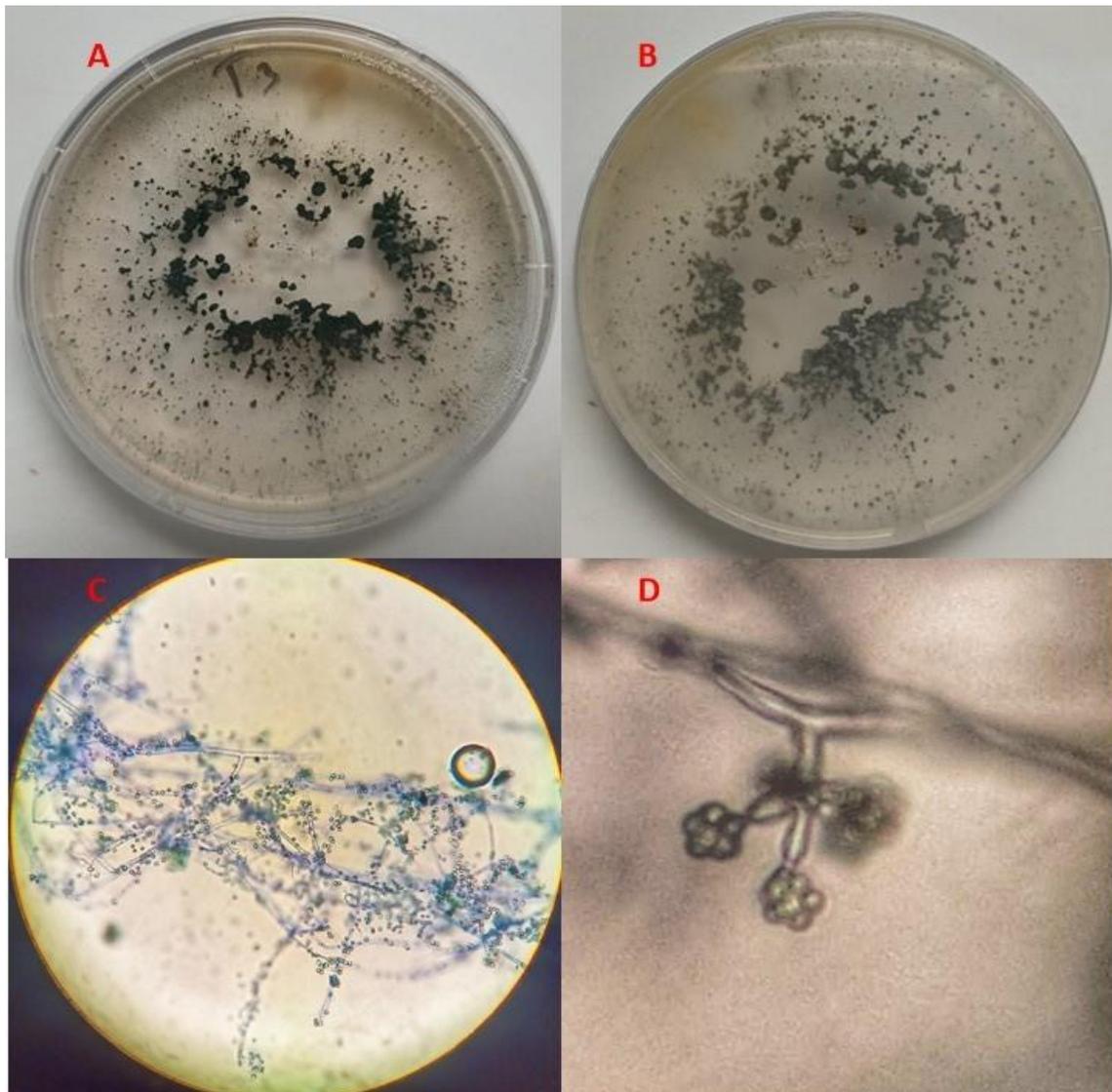


Figure 42: Caractéristiques morphologiques représentatives de *Trichoderma asperellum* (T3). (A) revers de la colonie, (B) avers, (C-D) phialides et conidies.

III.1.4- *Trichoderma harzianum* (T5)

Les colonies de *T. harzianum* forment généralement 1 à 2 anneaux concentriques avec production de conidies vertes. Le mycélium est initialement lisse, de couleur blanc aqueux et clairsemé, jusqu'au devenir un mycélium aérien floconneux (Figure 43).

Les conidiophores sont répartis vers le haut de façon pyramidale. Les branches sont principalement groupées de trois ou quatre. Les phialides sont en forme de flacon et généralement courtes et larges au milieu avec une longueur moyenne de 4 à 6 μm . Les conidies sont de forme globuleuse à subglobuleuse avec le diamètre moyen de 2–3 μm et de couleur vert pâle.

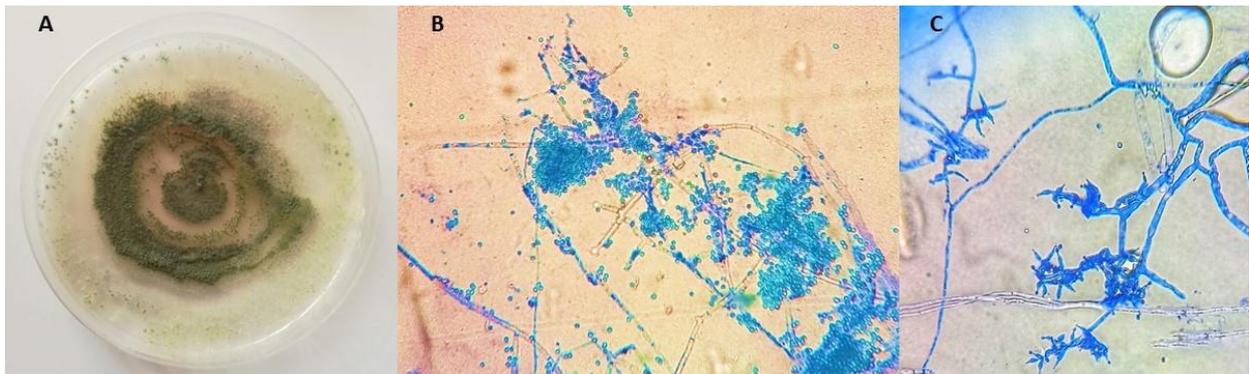


Figure 43: Caractéristiques morphologiques de *Trichoderma harzianum* (T2). (A) aspect de la colonie, (B) conidies, (C) phialides.

III.1.5- *Chaetomium globosum* (T1)

Les colonies de *Chaetomium* sont caractérisées par une croissance relativement lente, avec un aspect duveteux blanchâtre au début, et virent au vert d'olive après 7 jours d'incubation (formation de fructifications). L'observation microscopique de ce champignon montre la présence des périthèces sphérique avec des trichomes sombres et verruqueux. Les spores sont globuleuses, ellipsoïdes et de couleur brune (Figure 44).

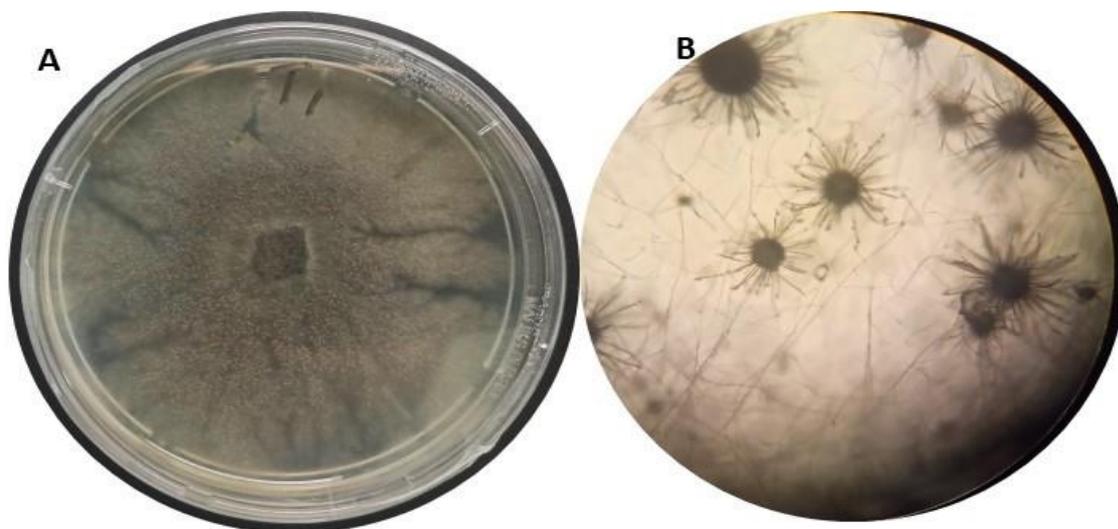


Figure 44: Aspect macroscopique et microscopique de *Chaetomium globosum*

III.2- Rhizobactéries antagonistes

Neuf souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* ont été utilisées dans cette expérimentation. L'identification moléculaire de ces souches a été réalisée par Dr MOKRANI (Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et la Géomatique, Université de Mascara) par le séquençage du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S.

III.3- Evaluation de l'activité antagoniste des agents étudiés *in vitro*

III.3.1- Confrontation directe

Afin de déterminer le potentiel antagoniste des agents biologiques, un screening de 14 isolats microbiens par confrontation directe vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes (F4, F10 et F11) est présenté par l'inhibition de la croissance mycélienne sur milieu PDA après 7 jours d'incubation (tableau 13).

Les figures 47 et 48 montrent que les espèces antagonistes testées ont inhibé la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. par rapport aux témoins non traités. Les résultats obtenus ont révélé une différence significative du pouvoir antagoniste de ces agents, qui se diffère en fonction des souches confrontés. La croissance mycélienne enregistrée par *Fusarium* spp. dans le test de double culture varie entre 11 mm et 68.8 mm en présence des agents antagonistes, ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne de 76.82% et 14.25% respectivement.

L'évaluation du potentiel antagoniste des rhizobactéries a montré que la souche P58 était la plus performante contre toutes les souches fongiques testées avec des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de 68,73%, 69,00% et 72,27% contre *F. pseudograminearum*, *F. graminearum* et *F. equiseti* respectivement (tableau 12), suivi des souches P57, P64 et P8 avec des pourcentages d'inhibition de 64,14%, 55,06% et 50,49% respectivement. En revanche, les taux d'inhibition des trois espèces de *Fusarium* par les autres souches bactériennes étaient inférieurs à 50%. L'isolat P56 a marqué le plus faible pourcentage d'inhibition avec un taux de 18,52% (Figure 46).

En ce qui concerne les isolats fongiques, *Trichoderma gamsii* (T2) et *T. longibrachiatum* (T4) ont inhibé la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. par une moyenne supérieur à 65% (Figure 45). Cependant, le pourcentage d'inhibition enregistré avec T3 est d'environ 60,22%, tandis que celui induit par *T. harzianum* (T5) et *Chaetomium globosum* (T1) a varié entre 59.43% et 27.08%.

Tableau 12: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. par les agents antagonistes en confrontation directe

Isolat microbien	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equiseti</i>
P4	36,66±0.770 _e	32,31±1.213 _e	43,40±1.121 _e
P8	50,34±2.596 _d	45,54±1.032 _d	55,59±0.430 _d
P15	26,23±0.594 _f	27,56±1.305 _f	36,61±1.140 _f
P25	19,38±1.142 _g	23,75±1.420 _g	30,76±1.214 _g
P56	14,25±0.865 _h	16,69±0.846 _h	24,63±1.202 _h
P57	56,03±2.078 _b	72,93±0.612 _b	63,46±0.810 _b
P58	68,73±0.432 _a	69,00±1.004 _a	72,27±1.033 _a
P64	52,54±2.798 _c	47,37±1.953 _c	65,27±1.645 _b
P71	17,30±1.123 _h	18,88±0.910 _h	26,11±0.832 _h
T2	62,31±1.241 _{ab}	61,87±0.992 _b	71,64±0.786 _a
T3	49,68±1.72 _d	63,13±1.72 _b	67,87±1.22 _{ab}
T4	58,44±1.45 _b	68,75±1.84 _a	76,82±1.6 _a
T5	51,23±2.21 _c	59,6±2.13 _b	67,48±0.97 _{ab}
T1	22,5±2.41 _g	27,5±1.82 _f	31,25±1.57 _g

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± l'écart type. Les lettres représentent le niveau de signification au seul 5% (Test de Tukey).

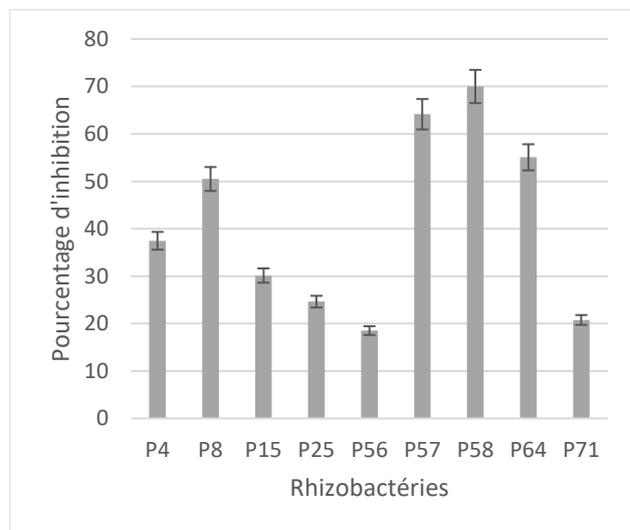


Figure 46: Pourcentage moyen d'inhibition de *Fusarium* spp. par les rhizobactéries

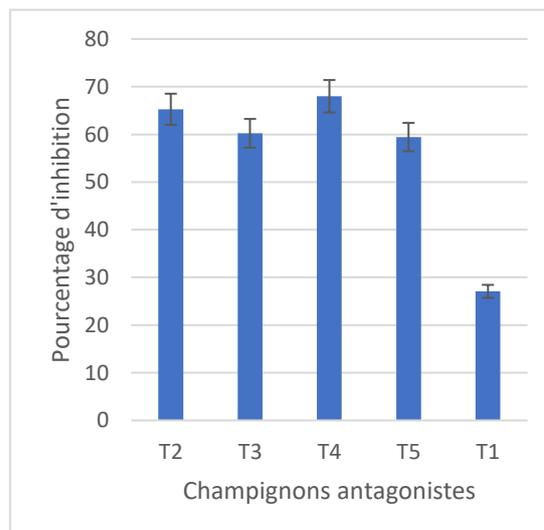


Figure 45: Pourcentage moyen d'inhibition de *Fusarium* spp. par les champignons antagonistes

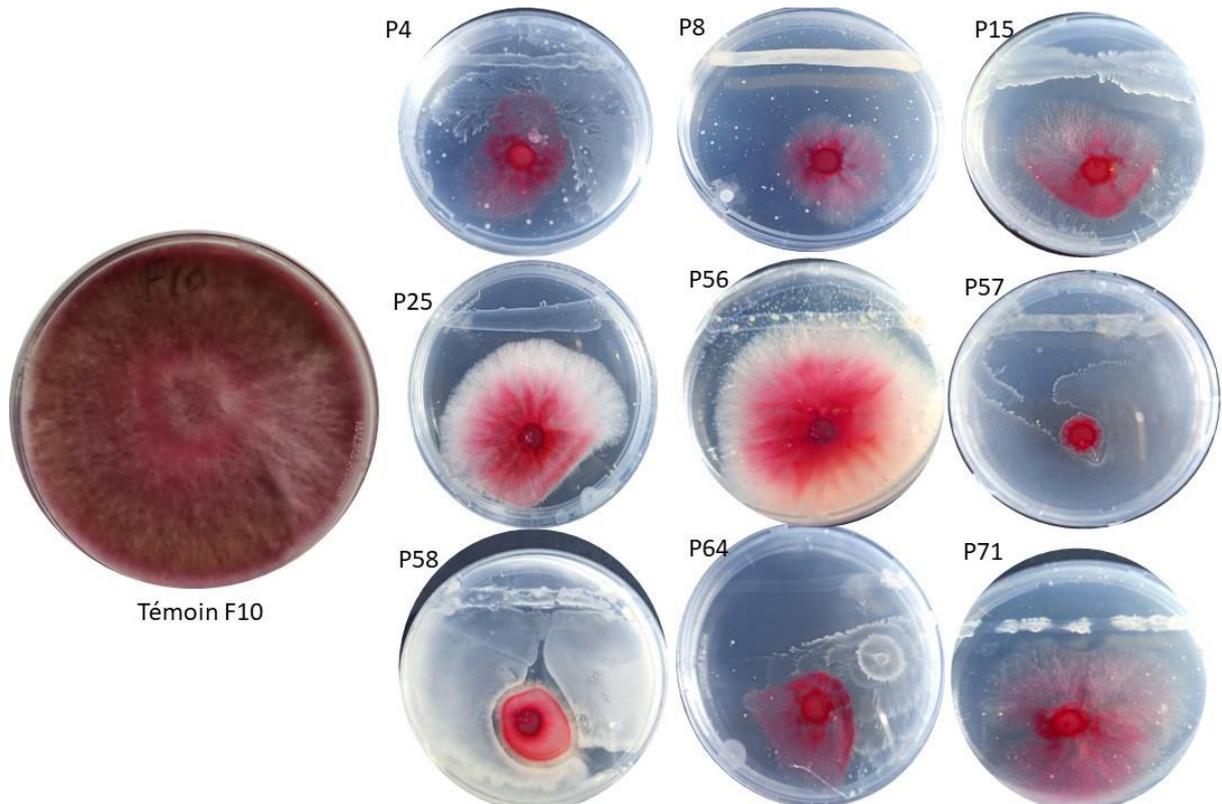


Figure 47: confrontation par contact directe entre les rhizobactéries et F10

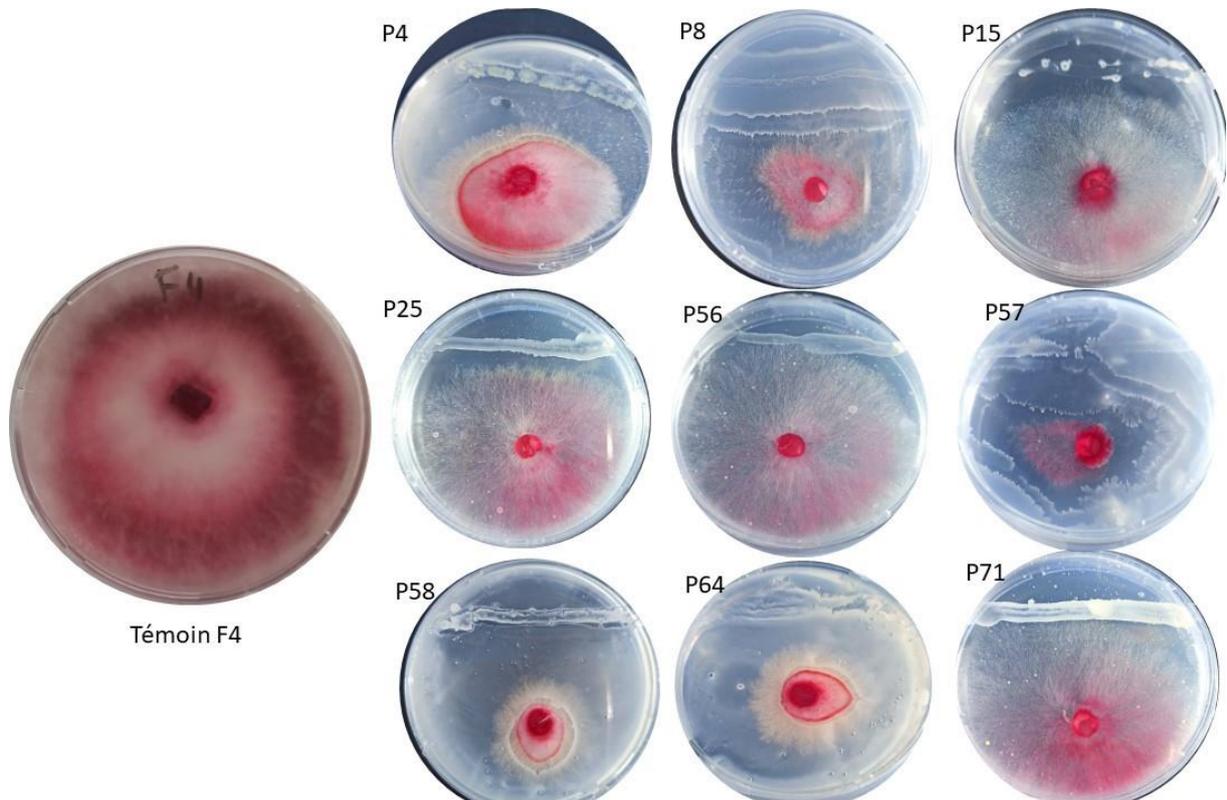


Figure 48: confrontation par contact directe entre F4 et les neuf souches bactériennes

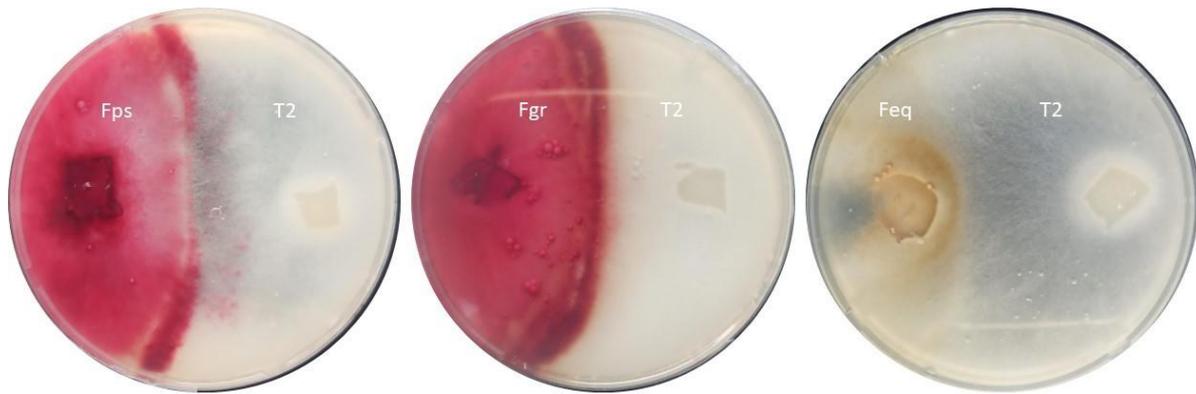


Figure 49: confrontation par contact direct entre *T. gamsii* et *Fusarium* spp.

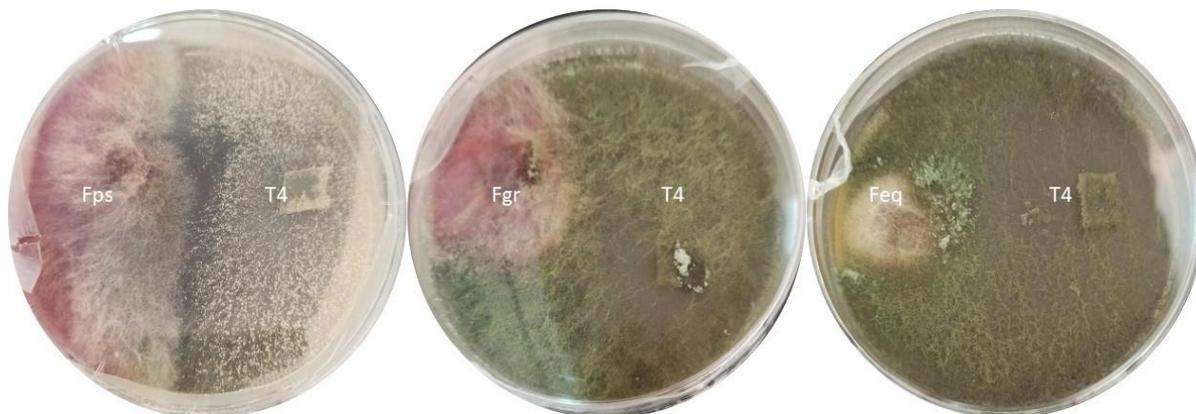


Figure 50: confrontation par contact direct entre *T. longibrachiatum* et *Fusarium* spp.

Pour élucider le mode d'action de ces antagonistes, des observations microscopiques du mycélium de *Fusarium* spp. collecté au niveau des zones de confrontations avec les rhizobactéries et des *Trichoderma* les plus performants ont démontré l'implication de ces agents dans de lutte biologique.

En cas de traitement par la rhizobactérie, l'examen microscopique a révélé des altérations cytologiques du mycélium du pathogène traduit par un gonflement et d'une dénaturation de quelques fragments mycéliens (Figure 51). Ces altérations étaient associées à l'affaiblissement des parois conduisant à l'expulsion du contenu cytoplasmique. Ces modifications morphologiques pourraient être expliquée par la présence des composants permettant d'inhiber efficacement le développement des pathogènes tels que l'antibiose et la synthèse d'enzymes lytiques.



Figure 51: Le gonflement et la dénaturation du mycélium fongique sous l'action de la rhizobactérie P58.

En ce qui concerne *Trichoderma*, ce champignon présente une dynamique de croissance plus rapide que *Fusarium* avec une sporulation abondante, lui permettant d'être a priori plus compétitif spatialement notamment pour l'appropriation des nutriments du milieu. En plus, *Trichoderma* a exprimé un comportement mycoparasitaire envers l'agent pathogène, qui se traduit par la formation des filaments qui s'imbriquent entre les hyphes de *Fusarium* avec de nombreux événements d'attachement et d'enroulement (Figure 52). De même, des extensions hyphales de l'antagoniste se terminant par des appressoriums qui assurent la pénétration physique.

Les observations ont également révélé des altérations au niveau du mycélium du pathogène se manifestant par une lyse de la membrane mycélienne suivi d'une fuite du contenu cytoplasmique, et une vacuolisation comme une réponse du pathogène au stress biotique (Figure 53).



Figure 52: Mycoparasitisme par l'enroulement du mycélium de *Trichoderma* sur l'agent pathogène

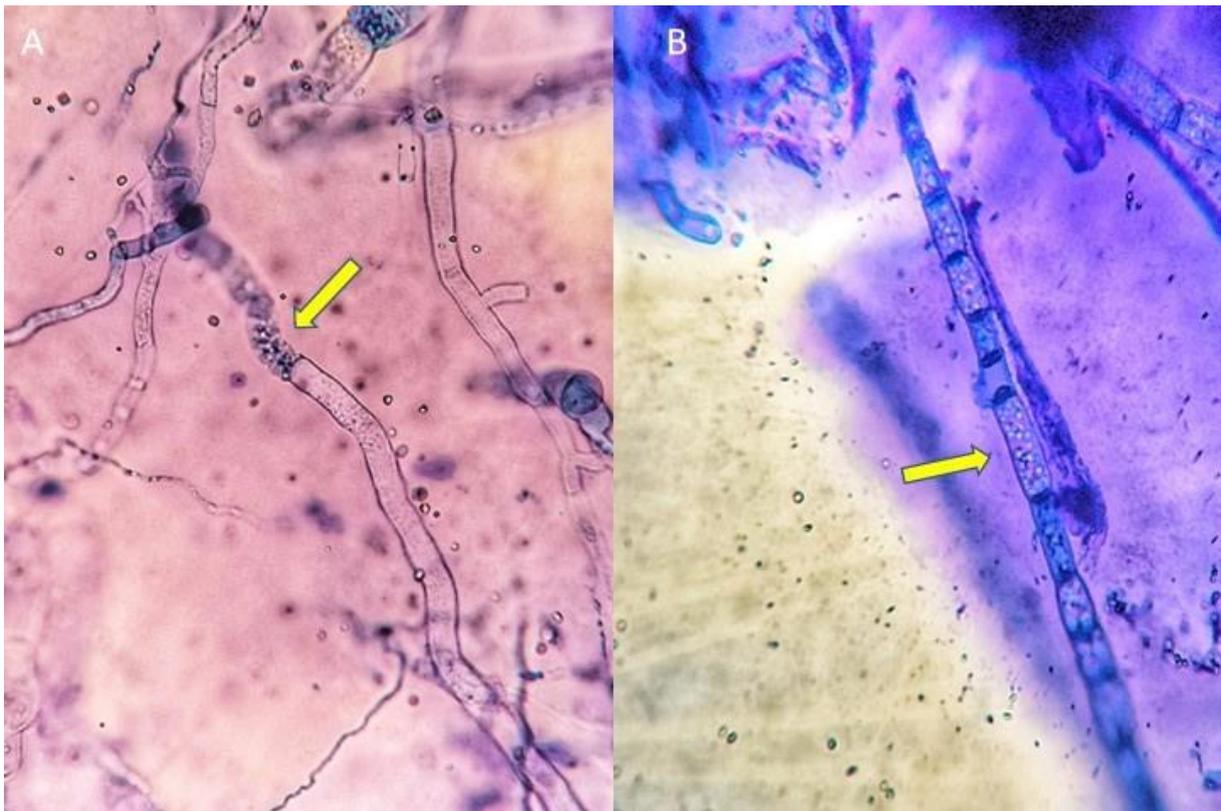


Figure 53: La lyse (A) et la vacuolisation (B) du mycélium du pathogène

III.3.2- Confrontation à distance

Le comportement des champignons phytopathogènes en technique de confrontation à distance avec les agents de lutte biologique a été investigué afin de déterminer l'activité des composés volatils de ces derniers, en mesurant le diamètre des colonies fongiques après 7 jours d'incubation. Les résultats obtenus ont révélé des effets variables des agents microbiens sur la croissance du *Fusarium* (tableau 13).

Le maximum d'inhibition de la croissance des pathogènes a été obtenu par les isolats T2 et T4 avec un pourcentage moyen d'inhibition supérieur à 50% (figure 55). Les espèces T3, P58 et P64 ont également réduit significativement la croissance *in vitro* des agents pathogènes avec une meilleure efficacité enregistrée à l'égard de *F. equiseti* (tableau 13). Tandis que les autres isolats ont été moins puissants, avec un pourcentage d'inhibition inférieurs à 40%.

Les résultats ont montré que l'isolat de *F. equiseti* était plus sensible aux composés volatils microbiens que *F. pseudograminearum* et *F. graminearum*.

Tableau 13: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. par les agents antagonistes en confrontation à distance

Isolat microbien	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equiseti</i>
P4	30,16±1.166 _e	31,87±1.049 _e	32,70±1.404 _e
P8	31,59±0.553 _d	33,69±0.771 _d	43,59±1.408 _d
P15	17,57±0.951 _f	23,50±1.173 _f	31,96±1.322 _f
P25	3,46±0.961 _h	6,21±0.861 _h	15,85±0.612 _h
P56	12,02±1.459 _{gh}	7,19±0.918 _{gh}	8,05±1.001 _{gh}
P57	12,56±0.992 _g	7,07±0.880 _g	15,91±0.660 _g
P58	37,53±0.960 _b	46,19±1.352 _b	54,45±2.075 _b
P64	34,12±0.630 _c	40,55±1.190 _c	46,97±1.379 _c
P71	10,79±0.767 _{gh}	7,89±0.664 _{gh}	14,59±1.206 _{gh}
T2	43,62±0.750 _a	50,77±0.750 _a	56,61±0.777 _a
T3	35,91±0.84 _b	43,74±1.2 _b	51,85±1.25 _b
T4	41,25±1.18 _a	53,34±1.74 _a	58,12±0.92 _a
T5	39,73±1.30 _{ab}	41,24±1.62 _{bc}	49,71±1.75 _{bc}
T1	5,6±0.461 _h	7,44±0.71 _h	9,5±0.87 _h

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± l'écart type. Les lettres représentent le niveau de signification au seul 5% (Test de Tukey).

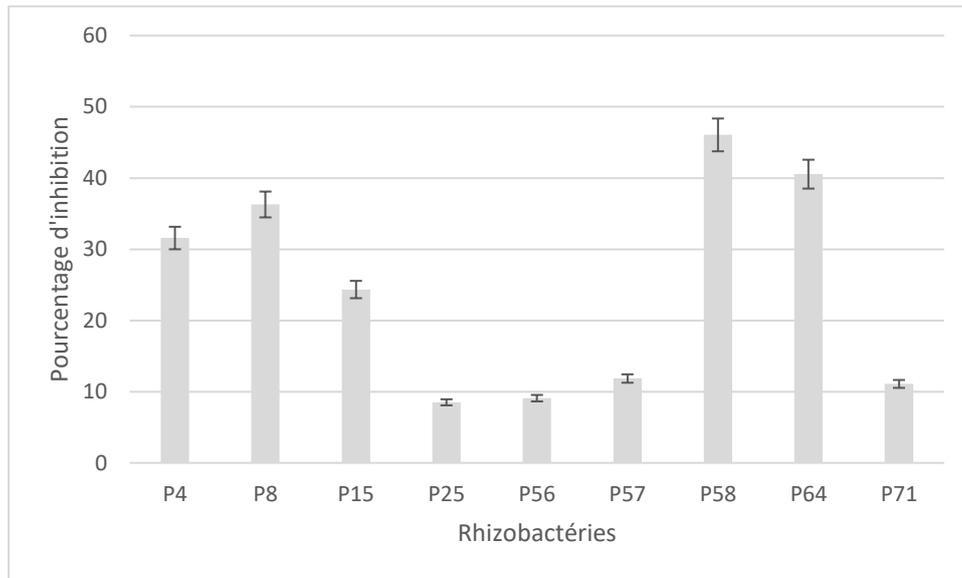


Figure 54: Pourcentage moyen d’inhibition de *Fusarium* spp. par les rhizobactéries en confrontation à distance

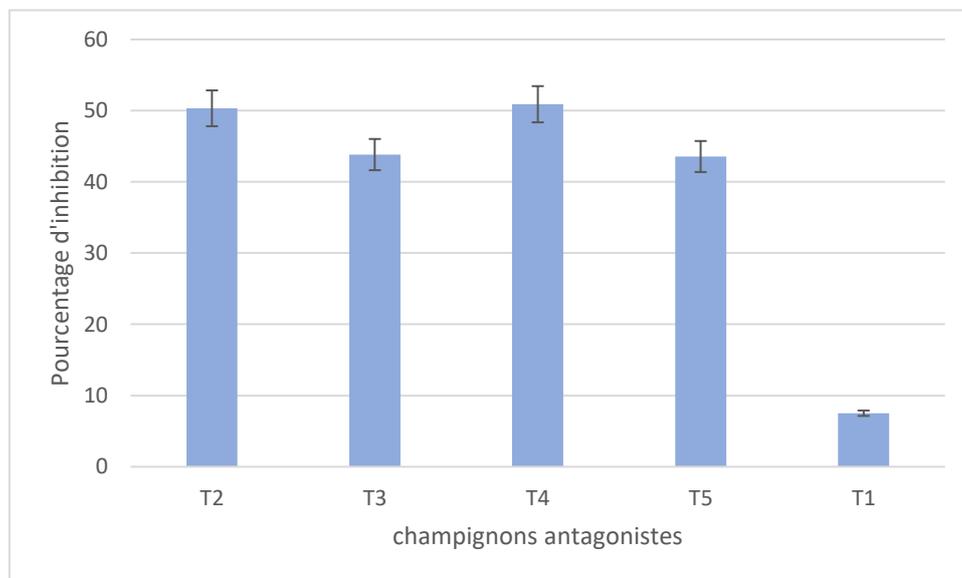


Figure 55: Pourcentage moyen d’inhibition de *Fusarium* spp. par les champignons en confrontation à distance

III.4- Caractérisation des champignons antagonistes

Dans l’objectif de sélectionner les agents de lutte biologique les plus performants, une étude enzymatique et biochimique a été réalisé pour 4 isolats fongiques. (*Trichoderma gamsii*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* et *Chaetomium globosum*).

III.3.1- Production de chitinase

La production de chitinase par les isolats fongiques a été réalisée en utilisant un milieu de culture contenant du carbone uniquement sous forme de la chitine colloïdale. Après 72h d'incubation à 24° C, les isolats producteurs de la chitinase ont formé une zone de couleur violet pourpre autour des colonies.

Les résultats ont montré que les isolats T2 et T4 ont une capacité trop élevée à dégrader la chitine colloïdale avec un halo de 79.6 mm et 76.6 mm, respectivement. Suivi de l'isolat T3 avec 71.7 mm de diamètre. Cependant, *Chaetomium globosum* (T1) été le moins performant avec un diamètre inférieur à 30 mm (Figure 56).

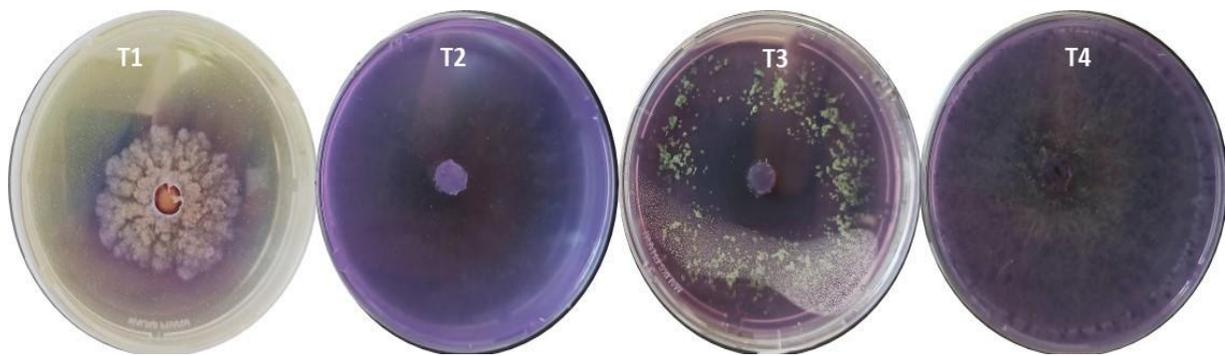


Figure 56: Production de l'enzyme chitinase par les antagonistes fongiques

III.4.2- Production d'amylase

La capacité des isolats fongiques de dégrader l'amidon par la sécrétion de l'amylase a été déterminé par la présence d'un halo jaune bien visible autour des colonies (Figure 57). Les résultats ont indiqué que T4, T3 et T2 montrent une importante production d'enzyme amylase avec un halo de 60.3 mm, 51.3 mm et 42.6 mm, consécutivement. En revanche, T1 été le plus faible avec un diamètre de 29.7 mm.

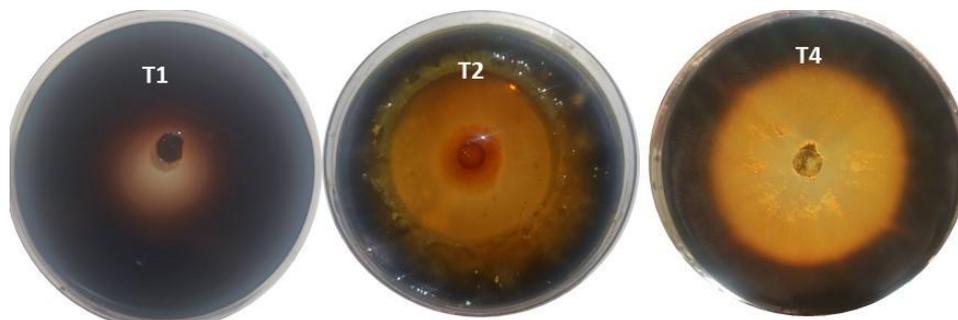


Figure 57: Production d'amylase par les antagonistes fongiques

III.4.3- Production de protéase

La production de protéase a été détectée chez tous les isolats testés sur la gélose de lait écrémé. Ils ont démontré leur capacité d'hydrolyser la protéine par la présence des zones claires atours les colonies (Figure 58). Les résultats ont montré que les isolats T4 et T3 étaient les plus producteurs de cette enzyme avec un diamètre de 58 mm et 55 mm, respectivement. Alors que l'isolat T1 a montré une faible production avec un diamètre de 31 mm.



Figure 58: Production de l'enzyme protéase

III.4.4- Production de lipase

La production de cette enzyme est positive pour tous les isolats testés avec des diamètres de zones hydrolysées variables. La capacité de dégrader le tween 20 a été confirmée par la présence d'un halo blanc autour des colonies (Figure 59). Le test a montré que les isolats T4 et T3 étaient les plus puissants avec un diamètre de 68 mm et 57 mm, respectivement. Suivi de T2 et T1 avec un diamètre de la zone hydrolysée de 29.3 mm et 23.3 mm, consécutivement.



Figure 59: production de la lipase

III.4.5- Solubilisation de phosphate

La capacité des isolats testés de solubiliser le phosphate inorganique a été étudié en utilisant le milieu solide de Pikovasky (PVK) additionné de phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate (P). Après avoir calculer l'indice de la solubilisation (IS) par la formule $[(\varnothing \text{ halo} + \varnothing \text{ colonie}) / \varnothing \text{ colonie}]$, les résultats ont montré que les trois isolats de *Trichoderma* (T2, T4 et T3) étaient capables de solubiliser le P avec un IS de 2.95, 2 et 1.75, respectivement (Figure 60). Alors que l'isolat T1 n'a montré aucune capacité à solubiliser le P.



Figure 60: La capacité des champignons à solubiliser le phosphate.

III.4.6- Production d'AIA sur milieu liquide

La production de l'AIA par les isolats fongiques a été testé quantitativement sur le milieu liquide additionné de tryptophane (5g/l). Après avoir convertir la $\text{DO}_{535\text{nm}}$ des surnageants en unité $\mu\text{g. mL}^{-1}$ Les résultats ont montré que l'isolat T4 été le plus performant avec une production d'AIA supérieur à $85 \mu\text{g. mL}^{-1}$ suivi de T2 et T3 avec une production de $72 \mu\text{g. mL}^{-1}$ et $47.2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivement. Nous avons également noté une absence totale de production d'AIA chez l'isolat T1 (Figure 61).

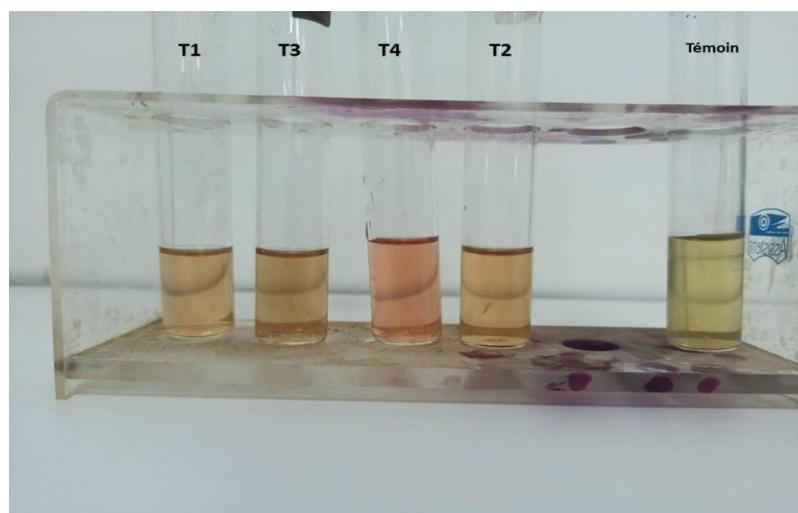


Figure 61: Production d'acide indole acétique par les champignons sur milieu liquide.

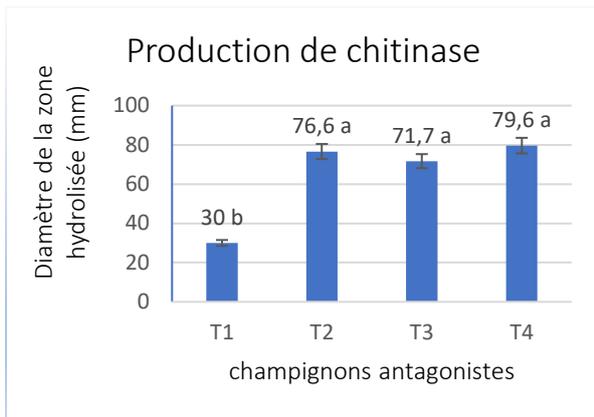


Figure 62: Production de chitinase sur milieu contenant la chitine colloïdale

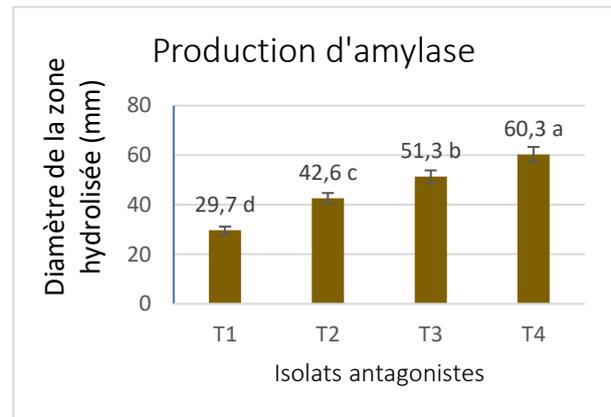


Figure 63: Production d'amylase.

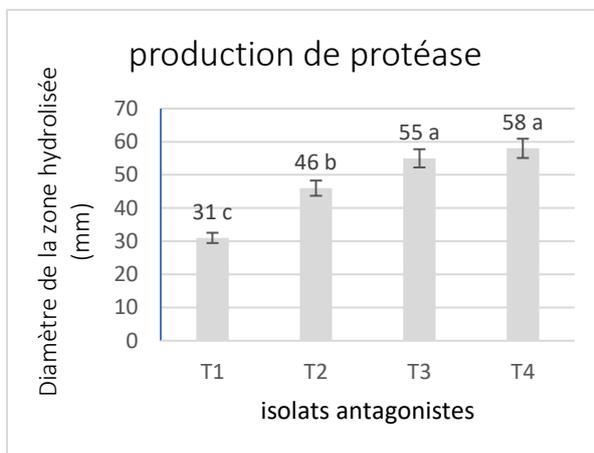


Figure 64: Production de protéase sur milieu à base de lait écrémé.

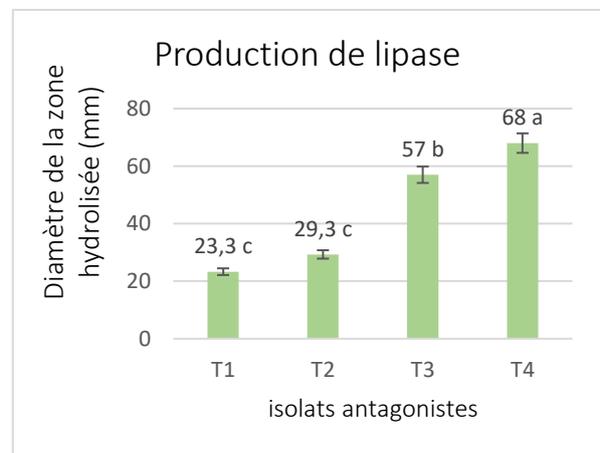


Figure 65: Production de lipase sur milieu contenant du Tween 20.

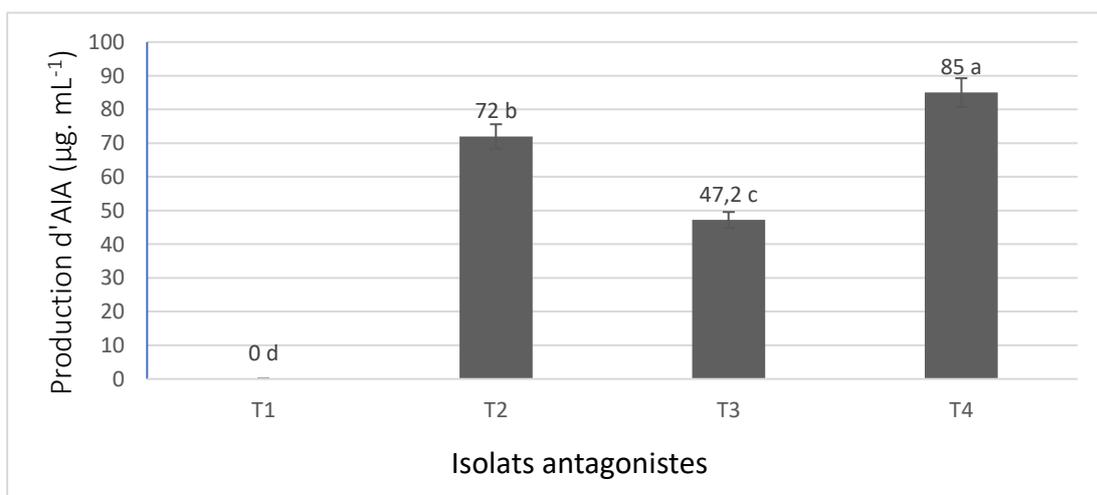


Figure 66: Production de l'AIA (µg/ml) sur le milieu liquide additionné de tryptophane.

III.4.7- Interaction entre les différentes activités enzymatiques étudiées

Dans le but de mettre en évidence l'activité enzymatique de différentes isolats fongiques (T1, T2, T3 et T4). Nous avons réalisé une analyse en composantes principales (A.C.P).

La contribution des espèces à l'inertie totale est de 86.65 % pour l'axe 1 et de 13.17 % pour l'axe 2, la somme de leurs contributions est égale à 99.82 %. Le plan formé par les axes 1 et 2 renferme le maximum d'informations.

Les résultats ont montré des assemblages distincts des champignons potentiellement antagonistes. Les groupes 1 et 2 renferme les isolats (T3, T4 et T2) dont la répartition par rapport à l'axe 1 se faite selon un ordre croissant de leur activité antagoniste et la production enzymatique. Alors que le groupe 3 comporte l'isolats T1 qui représente l'ordre décroissant de leur activité antagoniste et la production enzymatique.

L'analyse des composantes principales (ACP) qui a mis en évidence la corrélation entre les différents enzymes secrétées par les rhizobactéries (Chitinase, Protéase, amylase et lipase).

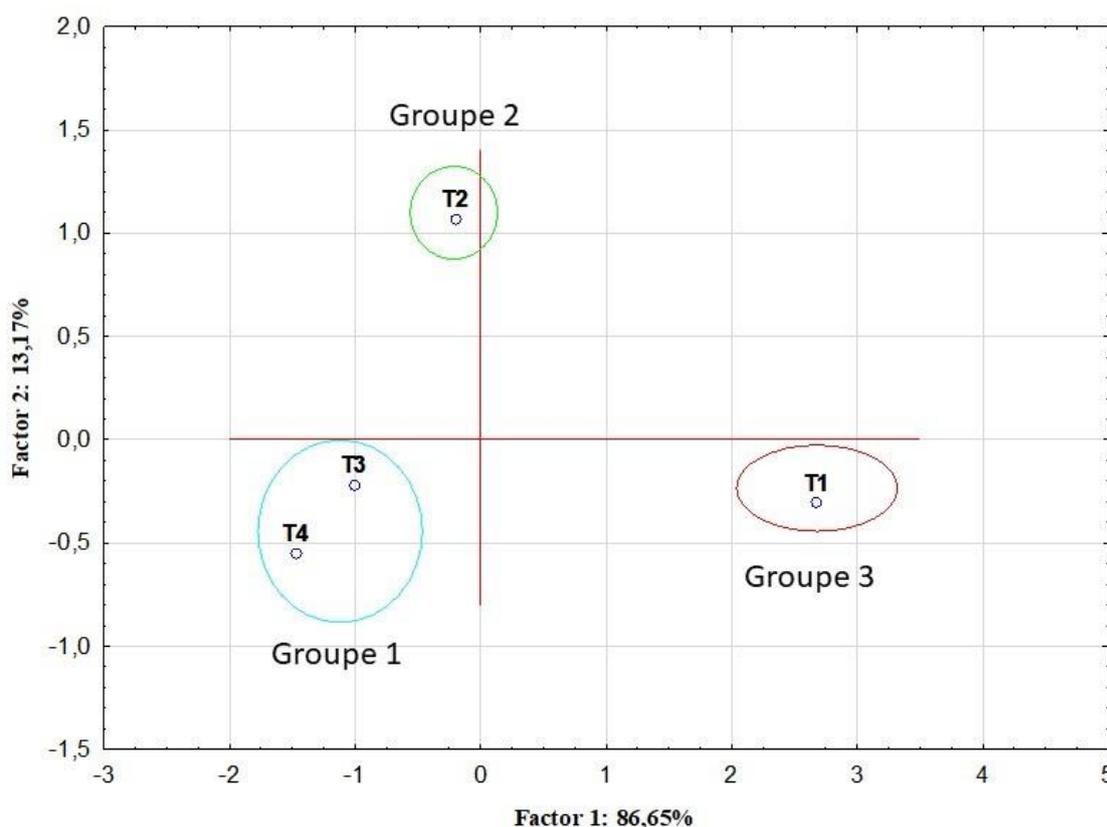


Figure 67: Répartition des champignons selon les paramètres étudiés

III.5- Caractérisation des rhizobactéries

Pour mieux comprendre les différents modes d'actions exercés par les rhizobactéries pour inhiber efficacement la croissance des agents pathogènes et même de promouvoir la croissance des plantes, une étude a été réalisée pour quelques paramètres liés à la bioprotection, la biofertilisation et la phytostimulation.

III.5.1- Production enzymatique

L'activité enzymatique des rhizobactéries a été étudiée qualitativement par l'évaluation de la production de la chitinase, d'amylase et de la protéase. Concernant la production de la chitinase, les résultats ont montré que deux souches seulement en ont eu la capacité de dégrader la chitine colloïdale à savoir *Pseudomonas plecoglossicida* (P57) et *P. azotoformans* (P58) avec un diamètre de 81.3 mm et 78.3 mm, respectivement (Figure 67). Par contre, les souches P4, P8, P15, P25, P56, et P64 ont montré aucun changement de couleur du milieu ce qui signifie l'absence totale de la sécrétion de chitinase.

A propos de la dégradation de l'amidon, on a noté que l'ensemble des souches bactériennes ont la capacité de produire l'enzyme amylase par la formation d'un halo clair au centre de la boîte de Pétri. Les souches P58, P57, P64 et P8 ont démontrées une bonne activité enzymatique à hydrolyser l'amidon avec un halo varie entre 51.3 mm et 73 mm (Figure 68). Tandis que la souche P4 a marqué le diamètre le plus faible de 20.6 mm.

En ce qui concerne la production de protéase, les résultats ont montré que toutes les souches ont capable de produire la protéase avec un diamètre varie entre 34.3 mm et 63.3 mm (Figure 69).

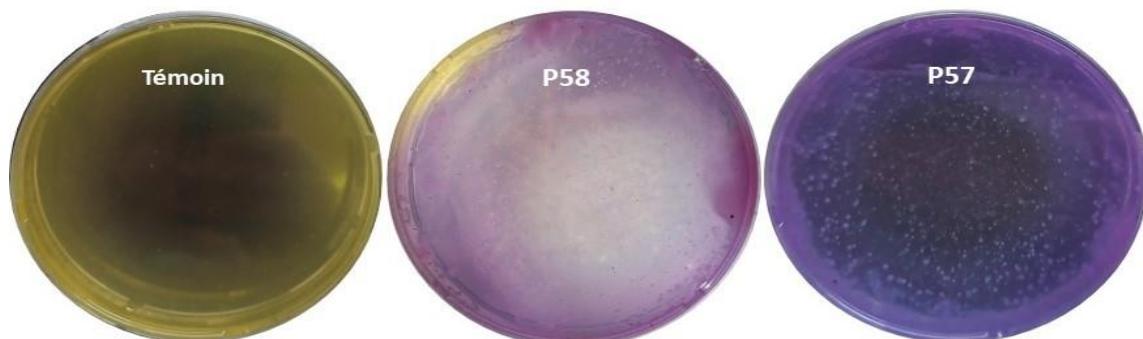


Figure 68: Production de chitinase par les rhizobactéries.

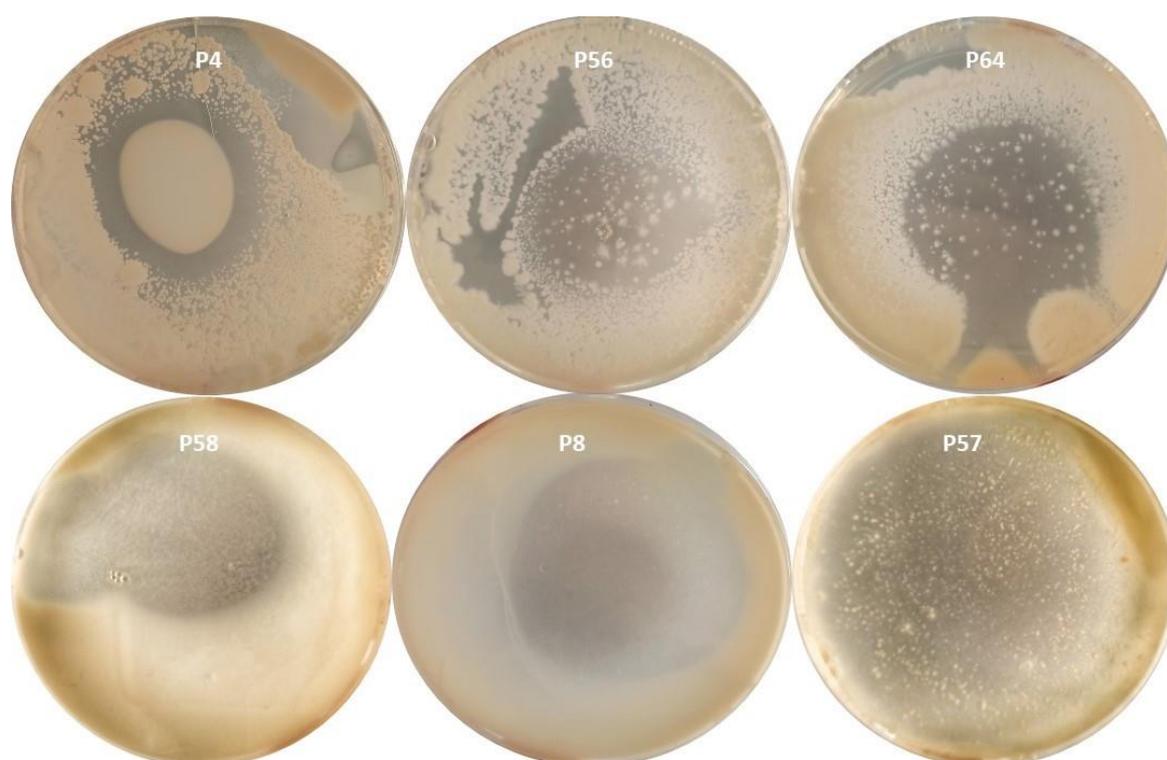


Figure 69: Production de protéase par les rhizobactéries.

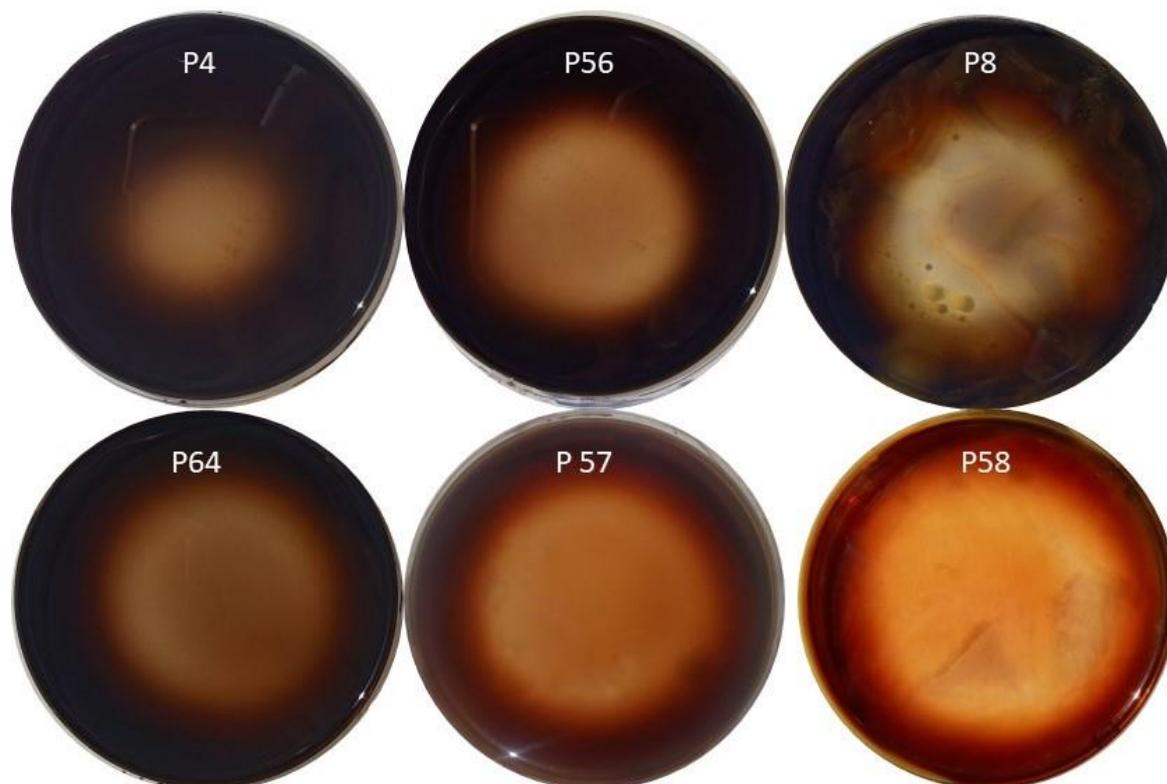


Figure 70: Production d'amylase par les rhizobactérie

III.5.2- Solubilisation de phosphate

La solubilisation du phosphate (P) inorganique par les rhizobactéries a été réalisée sur un milieu solide Pikovasky (PVK) additionné de bleu de bromophénol et contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de P.

Le test a montré que les souches testées possèdent la faculté à solubiliser le P après 7 jours d'incubation à 28° C avec des indices de solubilisation variables d'un isolat à un autre. Les rhizobactéries P57, P58, P8 et P4 ont produit une zone claire autour de la colonie avec un diamètre de 41.4 mm, 37.7 mm, 35.4 mm et 29.8 mm, respectivement (Figure 70). Alors que la souche P56 a enregistré le diamètre le plus faible de 10.3 mm.

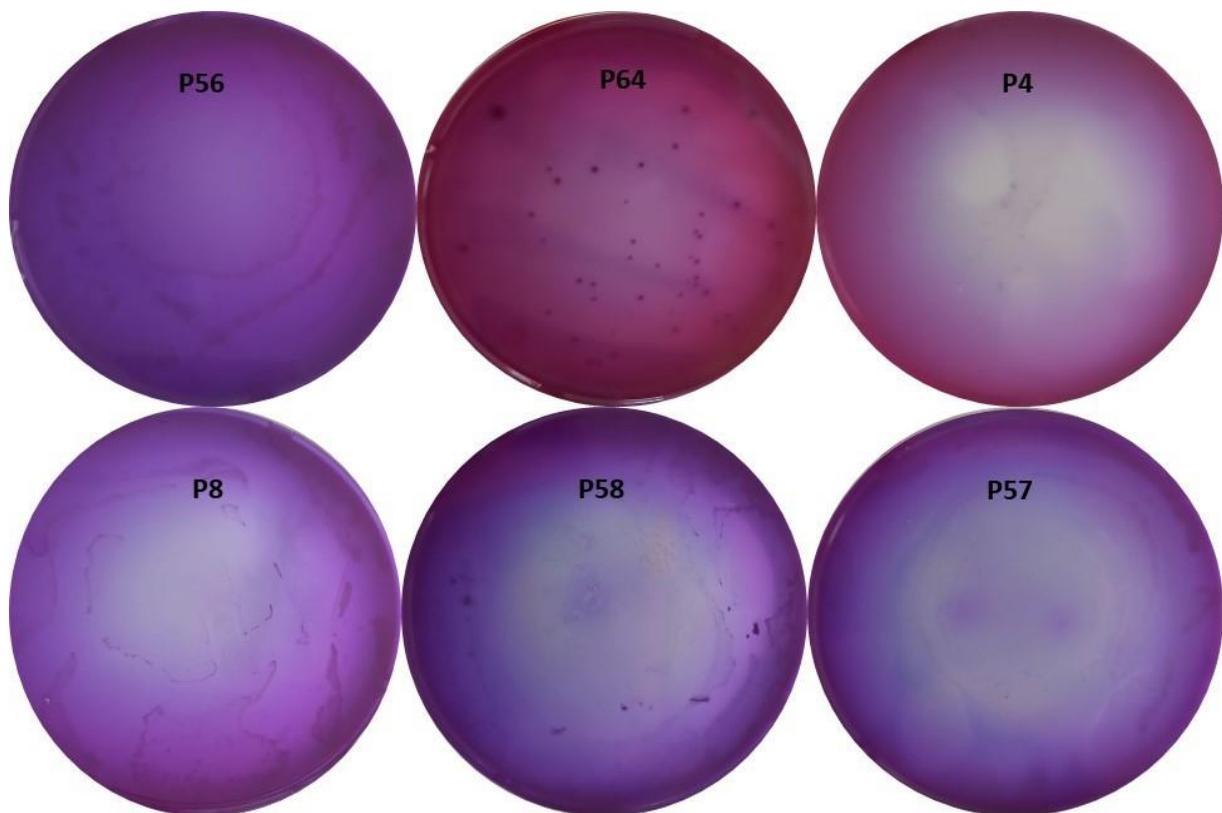


Figure 71: Solubilisation de phosphate par les rhizobactéries

III.5.3- Production d'AIA sur milieu solide

La production d'acide indole acétique (AIA) par les rhizobactérie a été étudié sur le milieu Luria-Bertani solide additionné de tryptophane. La synthèse de l'AIA est relative avec la coloration rose-rouge à la suite de l'addition du réactif révélateur (Salkowski) après 20mn d'incubation (Figure 71). Les résultats ont montré que les souches P58, P8, P57 et P56 étaient

les plus producteurs de ces métabolites Par contre, les souches P4, P15 et P25 n'ont montré aucune coloration.



Figure 72: Production d'AIA par les rhizobactéries.

III.5.4- Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La capacité des rhizobactéries de synthétiser l'acide cyanhydrique a été testé qualitativement sur le milieu Trypticase de soja additionné de glycine. Les résultats ont montré que la souche P58 a marqué la production la plus élevée d'HCN. Tandis que les souches P64, P8 et P56 ont donné une production modérée de cette composée volatile. Alors que les souches P57 et P4 ont montré aucune capacité de produire l'HCN. (Figure 72).



Figure 73: Production de l'acide cyane-hydrique (HCN) par les rhizobactéries

III.5.5- Production de sidérophores

La production de sidérophores pour les rhizobactéries a été quantifiée avec l'ajout de Fe (20 μM) au milieu de succinate de sodium (SSM). Après 24 h d'inoculation les surnageants du milieu SSM ont été balayé par spectrophotométrie, Après avoir convertir la $\text{DO}_{400\text{nm}}$ des surnageants en unité $\mu\text{g. mL}^{-1}$, les résultats ont indiqué que la production de sidérophores comprise entre 5.81 et 8.72 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Les trois isolats ayant un maximum de production sont dans l'ordre P4 (8.72 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), P8 (8.23 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) et P57 (8.14 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

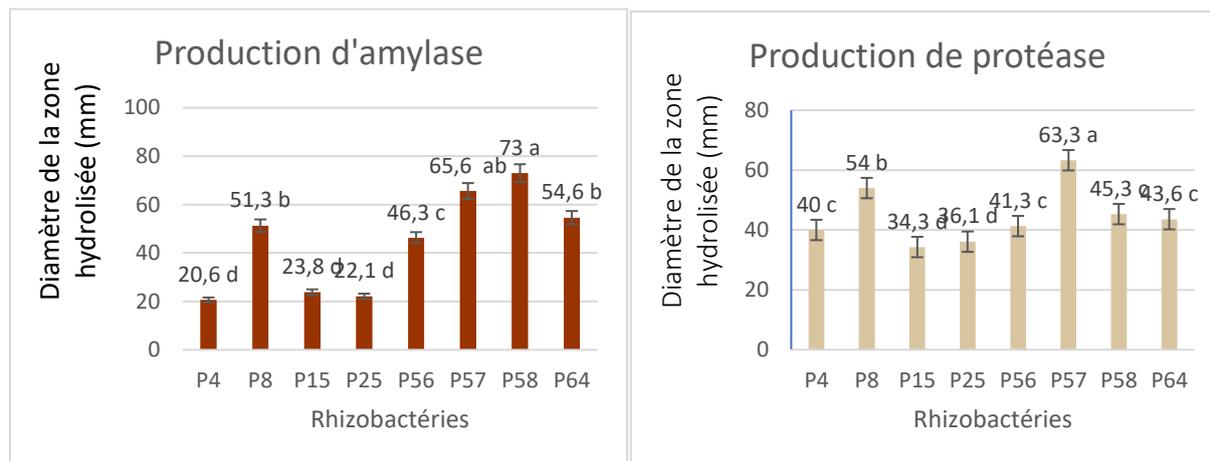


Figure 74: Production d'amylase sur milieu à base d'amidon

Figure 75: Production de protéase sur milieu à base de lait écrémé

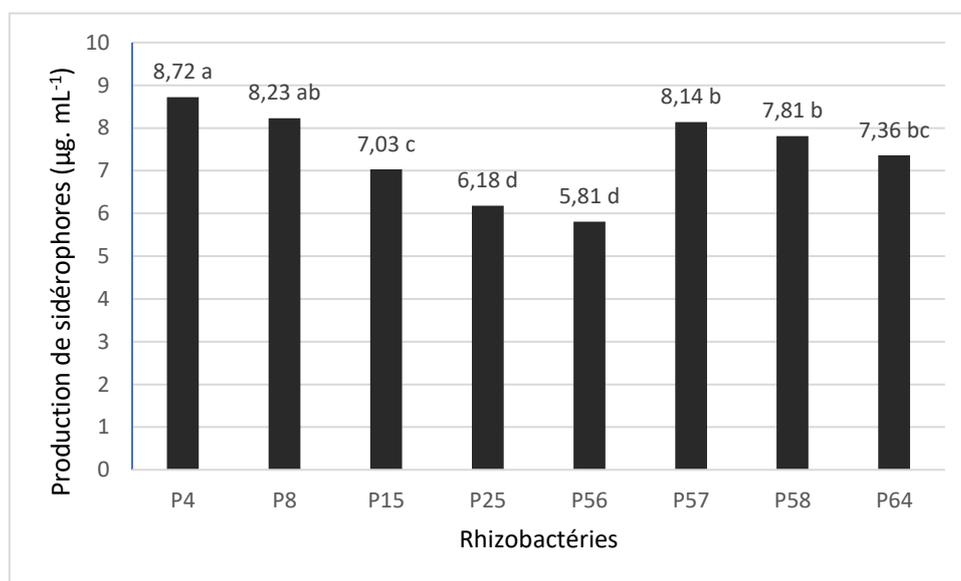


Figure 76: Production des sidérophores sur milieu SSM

III.5.6- Interaction entre les différentes activités enzymatiques étudiées

Dans le but de mettre en évidence l'activité enzymatique de différentes souches rhizobactériennes (P4, P8, P15, P25, P56, P57, P58 et P64). Nous avons réalisé une analyse en composantes principales (A.C.P).

La contribution des espèces à l'inertie totale est de 69.32 % pour l'axe 1 et de 18.76 % pour l'axe 2, la somme de leurs contributions est égale à 88.08 %. Le plan formé par les axes 1 et 2 renferme le maximum d'informations.

Les résultats ont montré des assemblages distincts de bactéries de lutte biologique. Le groupe 1 renferme les isolats (P57 et P58) dont la répartition par rapport à l'axe 1 se fait selon un ordre croissant de leur activité antagoniste et la production enzymatique. Alors que le groupe 3 comporte trois rhizobactéries (P15, P25 et P56) qui représente l'ordre décroissant de leur activité antagoniste et la production enzymatique.

L'analyse des composantes principales (ACP) qui a mis en évidence la corrélation entre les différents enzymes secrétées par les rhizobactéries (Chitinase, Protéase, amylase et sidérophores)

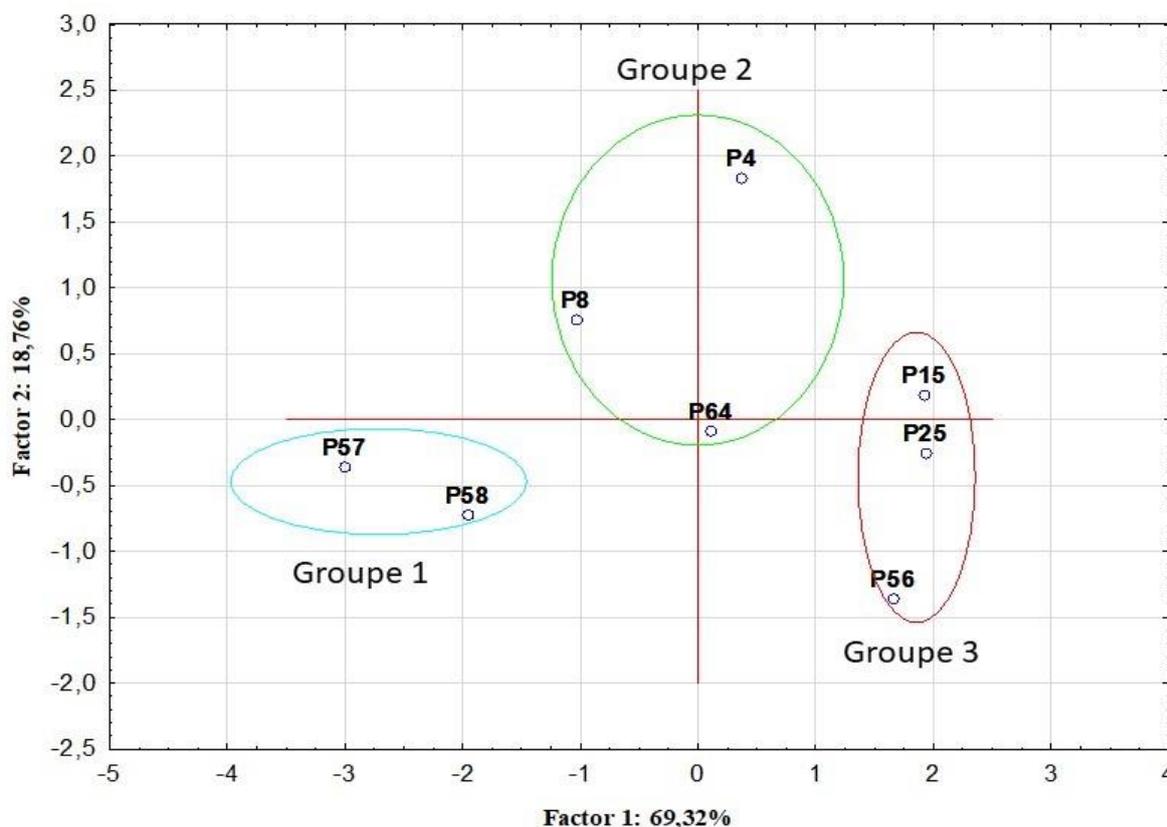


Figure 77: Répartition des rhizobactéries selon les paramètres étudiés

III.6- Sélection des souches compatibles

Le test de compatibilité des souches a été réalisé entre *Trichoderma gamsii* (T2) et les rhizobactéries qui ont données un effet inhibiteur trop élevé à savoir, *Bacillus subtilis* (P8), *Pseudomonas plecoglossicida* (P57), *Pseudomonas azotoformans* (P58) et *Pseudomonas monteilii* (P64) (figure 76).

Après 6 jours d'incubation, *Trichoderma gamsii* a montré une compatibilité avec *Pseudomonas azotoformans* et *P. plecoglossicida*. Par contre, aucune compatibilité n'est enregistrée avec *Pseudomonas monteilii* et *Bacillus subtilis*. C'est pour cette raison, les deux isolats compatibles *Trichoderma gamsii* et *P. azotoformans* ont été sélectionnés pour des essais *in vivo*.

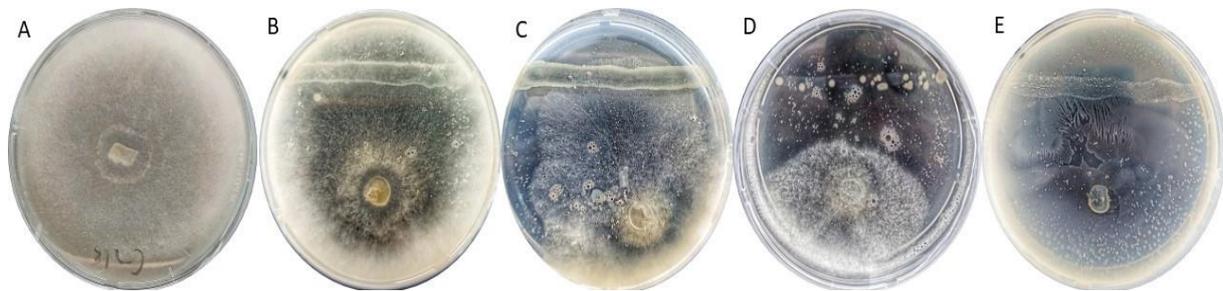


Figure 78: Test de compatibilité des souches, (A) *T. gamsii*, (B) compatibilité totale entre *T. gamsii* et *P. azotoformans*, (C) compatibilité entre *T. gamsii* et *P. plecoglossicida*, (D) présence d'une zone d'inhibition entre *T. gamsii* et *P. monteilii*, (E) l'incompatibilité entre *T. gamsii* et *Bacillus subtilis*.

III.7- Effet synergétique des deux souches sur le développement de la maladie *in vivo*

III.7.1- Effet sur la sévérité de la maladie

Durant cette expérience, nous avons examiné l'effet de *Pseudomonas azotoformans* et *Trichoderma gamsii* dans la gestion de la pourriture du collet de blé causée par *Fusarium* spp. *in vivo*. L'impact de ces souches microbiennes a été évalué en pots sur la gravité de la maladie après 30 jours d'application.

Les observations régulières, enregistrées durant cet essai, ont montré une variation du degré de pathogénicité des souches de *Fusarium* spp. testées. Les symptômes de la maladie sont représentés par une pourriture du collet chez les plantules de blé accompagné par un jaunissement suivi d'un flétrissement des feuilles. Par contre, les plantules témoins (non inoculées par *Fusarium*) sont restées asymptomatiques tout au long de l'expérience. La sévérité de la maladie a été évaluée à l'aide d'une échelle de notation (0-3). Les trois espèces de

Fusarium (*Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum* et *F. equiseti*) ont enregistrées une sévérité de la pourriture du collet avec 86,83 %, 57,33 % et 51,50 %, respectivement.

Afin d'évaluer l'efficacité des agents antagonistes dans la lutte contre la maladie via le traitement des semences, les deux souches microbiennes compatibles, *Pseudomonas azotoformans* (P58) et *Trichoderma gamsii* (T2), ont été testées in vivo. En cas de traitement avec chaque agent antagoniste séparément, Les valeurs moyennes de réductions de la sévérité de la maladie varient entre 48,38 à 77,36%. Par contre, L'application combinée des deux agents antagonistes demeurent plus efficaces, avec des pourcentages de réductions de la sévérité de la maladie entre 79,10 à 90,40% (tableau 14).

Tableau 14: Effet des différents traitements sur le développement de la maladie *in vivo*.

Traitement biologique	Sévérité de la maladie (%)	Réduction de la maladie (%)
Control positif F4	86,83±1.166 _d	00±0.0 _d
Control positif F10	57,33±1.452 _c	00±0.0 _d
Control positif F11	51,50±1.258 _d	00±0.0 _d
F4 + P58	32,03±1.265 _b	63,11±1.250 _b
F4 + T2	44,81±2.240 _c	48,38±2.587 _c
F4 + P58 +T2	18,15±1.059_a	79,10±1.060_a
F10 + P58	24,14±1.250 _b	57,89±1.755 _b
F10 + T2	29,47±1.778 _b	48,60±2.783 _c
F10 + P58 +T2	11,01±1.043_a	80,69±2.196_a
F11 + P58	18,34±1.549 _c	64,49±2.191 _c
F11 + T2	11,60±0.756 _b	77,36±2.053 _b
F11+ P58 +T2	4,95±0.602_a	90,40±1.063_a



Figure 79: Efficacité des agents antagonistes in vivo, A, A1 : plantule inoculée par T4 seulement. B : plantule inoculée par T4 et traitée par P58+ T2. C : plante traitée par P58+G15 seulement.



Figure 80: Effet synergique de T2+P58 sur la réduction de la pourriture du collet

A : plantule traitée par T2+P58 et inoculée avec F11, A1 : plantule inoculée avec F11 seulement. B : plantule traitée par T2+P58 et inoculée avec F10, B1 : plantule inoculée avec F10. C : plantule traitée par T2+P58 et inoculée avec F4, C1 : plantule inoculée par F4.

III.7.2- Effet sur les paramètres de croissance

Afin d'obtenir une vue plus complète sur l'efficacité de ces antagonistes sur les plantules de blé, les paramètres de croissance ont été également mesurés à la fin de l'expérimentation.

Toutes les plantules de blé infectés par les souches de *Fusarium* et traités avec des agents de lutte biologique appliqués séparément ou en combinaison présentent un développement végétatif plus important comparativement aux plantules inoculées par les agents pathogènes seulement (tableau 15).

La présente étude a démontré que l'inoculation des semences de blé avec des souches de *Fusarium* affectait les paramètres de croissance à des degrés divers selon l'isolat fongique utilisé. Le traitement des semences de blé avec *Pseudomonas azotoformans* et *Trichoderma gamsii* séparément a amélioré significativement la croissance de la partie aérienne et des racines en présence des trois champignons pathogènes (*F. pseudograminearum*, *F. graminearum* et *F. equiseti*). La plus forte augmentation a été observée pour les semis infectés par *F. pseudograminearum* et traitée par *T. gamsii* (Fps + T2), la croissance des plantes a été améliorée de 13,8 cm à 33,33 cm et de 9,56 cm à 19,33 cm pour la longueur des parties aériennes et des racines, respectivement. Les poids frais et sec ont également été affectés positivement.

Par ailleurs, le traitement combiné en utilisant les deux agents biologiques (P58 + T2) en présence et en absence des agents pathogènes ont entraîné une augmentation significative des paramètres relativement aux autres traitements et même par rapport au témoin non infecté. Nos résultats ont révélé que l'utilisation de T2 en absence du pathogène a exercé une amélioration la plus élevée de la partie racinaire. Par contre l'application de P58 en absence du pathogène a entraîné le développement le plus élevé de la partie aérienne.

Tableau 15: Effet des différents traitements sur les paramètres de croissance de la plante.

Traitement biologique	Hauteur de plante (cm)	Longueur des racines (cm)	Poids frais (g)		Poids sec (g)	
			Tige	Racine	Tige	Racine
Control négatif	35.3±0.351 _{ab}	21.83±0.726 _{ab}	4.07±0.134 _{ab}	1.72±0.014 _{ab} c	0.97±0.81 _{ab}	0.33±0.01 _{abc}
P58	41.6±0.97 _a	24.6±0.85 _a	4.51±0.3 _a	2.74±0.39 _a	1.27±0.14 _a	0.44±0.077 _a
T2	39.4±1.13 _a	26.5±0.79 _a	4.33±0.28 _a	2.81±0.3 _a	1.19±0.11 _a	0.49±0.091 _a
Control Positif F4	13.8±1.357 _d	9.56±1.140 _e	1.32±0.125 _e	0.82±0.032 _c	0,14±0.003 _e	0,1±0.005 _e
Control Positif F10	23.7±0.808 _c	15.73±0.742 _d	1.69±0.043 _e	1,02±0.057 _{bc}	0,34±0.015 _d	0,16±0.01 _{de}
Control Positif F11	27.2±0.513 _c	17.16±0.202 _{cd}	1.83±0.026 _e	1,2±0.017 _{bc}	0,40±0.011 _d	0,2±0.003 _{cde}
F4 + P58	32.5±1.040 _c	18,50±0.5 _{bcd}	2,83±0.166 _d	1,56±0.296 _{bc}	0,44±0.009 _d	0,20±0.05 _{cde}
F4 + T2	33,33±0.881 _b	19,33±0.666 _{bc} d	3,16±0.44 _{bcd}	1,83±0.166 _{ab} c	0,71±0.06 _c	0,23±0.03 _{bcd}
F4 + P58 +T2	35,50±0.763 _a b	21,93±0.581 _{ab}	3,93±0.06 _{ab}	1,93±0.233 _{ab}	0,92±0.02 _{bc}	0,3±0.05 _{abcd}
F10 + P58	33,40±0.862 _b	20,00±1 _{abc}	2,93±0.066 _{cd}	1,76±0.23 _{abc}	0,72±0.05 _c	0,21±0.03 _{cde}
F10 + T2	34,10±0.781 _a b	20,66±0.726 _{ab} c	3,76±0.145 _{abc} d	2,10±0.30 _{ab}	0,88±0.03 _{bc}	0,25±0.028 _{bcd} e
F10 + P58 +T2	36,66±0.666 _a b	22,16±0.927 _{ab}	4,16±0.166 _a	2,66±0.33 _a	1,07±0.072 _a	0,39±0.01 _{ab}
F11 + P58	33,83±1.013 _a b	21,66±0.666 _{ab}	3,66±0.33 _{abcd}	1,76±0.233 _{ab} c	0,91±0.05 _{bc}	0,29±0.006 _{abc} d
F11 + T2	32,66±0.333 _b	19,33±0.666 _{bc} d	3,83±0.16 _{abc}	1,93±0.23 _{ab}	1,01±0.05 _{ab}	0,35±0.028 _{abc}
F11 + P58 +T2	38,16±1.092 _a	23,66±0.726 _a	4,28±0.10 _a	2,66±0.333 _a	1,14±0.04 _a	0,41±0.037 _a

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± l'écart type. Les lettres représentent le niveau de signification au seul 5% (Test de Tukey).

III.8- Discussion

Le sol rhizosphérique est connu par la diversité d'interactions entre les organismes et notamment les interactions microbiennes (Kour et *al.*, 2023). Le parasitisme, l'antagonisme et la coopération font partie de ces interactions conduites par la production et la détection des signaux chimiques. Etudier ces interactions est essentielle pour améliorer notre compréhension des écosystèmes microbiens et de leur impact sur la santé végétale et l'environnement.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence d'une part l'activité antagoniste de certains microorganismes vis-à-vis les champignons phytopathogènes *in vitro*, et la synthèse des métabolites secondaires chez les espèces étudiées, et d'autre part l'impact de ces agents sur la réduction de la maladie de pourriture du collet de blé *in vivo*.

La première partie de ce travail consiste à isoler des champignons potentiellement antagonistes à partir de la rhizosphère du blé dans la région de Mascara. En se basant sur la

caractérisation morphologique, Nous avons pu identifier quatre espèces appartenant aux genres *Trichoderma* et *Chaetomium* (*T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *C. globosum*). L'isolat de *Trichoderma* le plus antagoniste *in vitro* (T4) a fait l'objet d'une identification moléculaire par le séquençage de la région ITS et du facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF-1 α). Ce dernier a été identifié en tant que *T. longibrachiatum*.

Les tests de confrontation directe et indirecte réalisés entre les deux protagonistes ont montré une variabilité du pouvoir antagoniste de ces agents, qui se diffère en fonction des espèces confrontées. *Pseudomonas azotoformans* était l'agent le plus efficace pour réduire la croissance mycélienne des pathogènes testés dans la technique de culture double. Cependant, la souche *Trichoderma gamsii* a donné l'effet antagoniste le plus élevé dans l'essai de confrontation à distance. Nos résultats étaient concordants avec ceux de Chen et al. (2016), qui ont rapporté l'activité antifongique de *T. gamsii* YIM PH30019 contre les champignons pathogènes responsables de la pourriture des racines de *Panax notoginseng* via la production d'un composé organique volatil. Les résultats ont révélé que *T. gamsii*, évalué pour la première fois en Algérie comme agent de lutte biologique, pouvait être considéré comme un agent de lutte biologique prometteuse contre *Fusarium* spp. Selon Chamekh et al. (2019), la souche *Trichoderma gamsii* MK361138 utilisée dans notre expérimentation est une souche halotolérante, elle peut croître en présence ou en absence de NaCl et tolèrent une concentration en sel de 12.5%.

En ce qui concerne *P. azotoformans*, plusieurs études ont confirmé l'efficacité de cette espèce dans le contrôle des champignons pathogènes (Sang et al., 2014 ; Banerjee et al., 2020 ; Mokrani et Nabti, 2020). Selon Mokrani et Nabti (2020), certaines souches de *P. azotoformans* ont présenté un effet antifongique significatif contre les agents pathogènes des plantes notamment *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Stemphylium botryosum*.

Le mode d'action de *Trichoderma* contre *Fusarium* spp. implique plusieurs mécanismes, notamment la concurrence pour les ressources nutritives et l'espace et le parasitisme. Ce champignon peut directement parasiter *Fusarium* en se fixant à ses hyphes par l'enroulement et en pénétrant sa paroi cellulaire par la formation des appressoriums. Un autre mode d'action exercé par ce genre appelé l'antibiose, *Trichoderma* produit divers métabolites secondaires qui ont une activité antifongique, notamment des chitinases, des glucanases, des protéases et des enzymes qui neutralisent les mycotoxines. Ces métabolites peuvent inhiber la croissance et le développement de *Fusarium* (Salwan et al., 2019).

A propos des PGPR, Les rhizobactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* peuvent avoir une variété de mécanismes pour protéger les plantes contre le *Fusarium* et d'autres agents pathogènes des plantes. Y compris la production de composés antifongiques. Les PGPR peuvent produire une variété de composés antifongiques, tels que des antibiotiques, des composés organiques volatils et des enzymes lytiques, qui peuvent directement inhiber la croissance et l'activité des agents pathogènes (Quan et al., 2011). L'induction de la résistance systémique est un autre mode d'action de ces microorganismes, qui peuvent induire une réponse de résistance systémique chez les plantes, ce qui améliore leur capacité à se défendre contre les agents phytopathogènes. Cela peut impliquer l'activation des voies de signalisation et la production de composés liés à la défense tels que les phytohormones, les composés phénoliques et la lignine (Meena et al., 2020). De plus, ces rhizobactéries ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes. Cela peut impliquer la production de régulateurs de croissance des plantes tels que les auxines et les cytokinines, ainsi que la fourniture de nutriments comme l'azote et le phosphore (Sukul et al., 2021 ; Riaz et al., 2021).

Au cours de notre expérimentation, nous avons pu identifier quelques métabolites secondaires synthétisés par les microorganismes bénéfiques. En effet, cette étude enzymatique a démontré que les isolats de *Trichoderma* et les souches des PGPR ont la potentialité de synthétiser une collection de composés chimiques. Ces molécules peuvent assurer trois activités : la bioprotection, la bio-fertilisation et la phyto-stimulation.

La production des enzymes hydrolytiques tel que la chitinase et la protéase a été étudié pour le but de confirmer le mode d'action de ces agents antagonistes. La chitinase est une enzyme qui décompose la chitine qui est un composant majeur des parois cellulaires des champignons, des insectes et des crustacés. Les chitinases sont couramment produites par de nombreux micro-organismes, notamment des bactéries, des champignons et des actinomycètes. La production de la chitinase et de la protéase peut être considérée comme un mécanisme efficace pour contrôler les agents phytopathogènes en détruisant l'intégrité de leurs paroi cellulaire (Markovich et Kononova, 2003 ; Gajera et al., 2013).

D'autres enzymes ont été aussi étudiés, y compris la lipase et l'amylase. La production de ces enzymes peut favoriser la croissance des plantes en décomposant les molécules organiques complexes du sol et en protégeant les plantes contre les agents pathogènes (Rayhane et al., 2019).

L'activité antifongique des rhizobactéries a été également confirmée par d'autres tests dont la production de sidérophores. Nos résultats ont révélé que l'ensemble des bactéries testé peuvent produire des nanoparticules chélatrices de fer. Alors ces rhizobactéries présents en majorité dans la rhizosphère sont donc potentiellement capables de limiter la croissance saprophyte d'un phytopathogène en limitant la disponibilité de cet élément (Matthijs et *al.*, 2007). Naire et *al.* (2007) ont mentionné que *P. azotoformans* peut produire un type mixte de sidérophore à la fois de type catécholates et hydroxamate, de 5,3 mg/L. Selon Sulochana et *al.* (2014), les sidérophores peuvent également inhiber la germination des conidies. D'autres études menées par Cornu et *al.* (2014) ont démontré que la pyoverdine était le sidérophore le plus susceptible d'affecter la mobilité et la phyto-disponibilité du cuivre (Cu) dans les sols viticoles calcaires. Différentes études ont suggéré que les sidérophores peuvent jouer divers rôles dans l'environnement au-delà de la promotion de la solubilisation et de l'absorption de plusieurs éléments minéraux par les plantes.

Une autre molécule bioactive sécrétée par les rhizobactéries a été testée, l'acide cyanhydrique (HCN). La production de cyanure d'hydrogène (HCN) par les rhizobactéries est un phénomène moins fréquent. L'HCN est un composé toxique qui peut avoir des effets antimicrobiens. Des études ont montré que les rhizobactéries productrices de l'HCN peuvent protéger les plantes contre une large gamme d'agents pathogènes fongiques et bactériens, notamment *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*. Cette molécule peut inhiber la respiration et l'activité enzymatique des agents pathogènes cibles, entraînant une réduction de leur croissance et de leur virulence (Abuzar, 2013). De plus, Sehrawat et *al.* (2022) ont mentionné que l'HCN synthétisé par voie bactérienne influe sur la production d'acide indole acétique, d'antibiotiques et la solubilisation du phosphate ce qui peuvent entraîner la promotion de la croissance des plantes. En outre, la production de HCN a également été suggéré d'avoir un effet néfaste sur divers nématodes phytopathogènes (Gallagher et Manoil, 2001). L'HCN peut aussi provoquer une réponse de défense chez les plantes hôtes en induisant une résistance systémique (Meena et *al.*, 2020).

Une technique améliorée par Gupta et *al.* (1994) en utilisant le milieu additionné au bleu de bromophénol. Dans ce milieu, la diminution du pH suite à la production d'acides organiques crée un halo autour des colonies. Ces acides organiques sont responsables de la dissolution du phosphate. Les résultats de ce test ont démontré que l'ensemble des *Trichoderma* et les rhizobactéries ont la capacité de solubiliser le phosphate inorganique. Les études de Kapri et *al.* (2010) et Lei et *al.* (2015) ont montré une activité solubilisatrice de

phosphate chez plusieurs espèces de *Trichoderma*. D'autres études de Miller et al. (2010) ont signalé que la majorité des isolats de *Pseudomonas* testés ont la faculté de solubiliser le phosphate inorganique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

La production des auxines telle que l'acide indole acétique (AIA) par les agents antagonistes a été examinée en utilisant un milieu de culture additionné de L-Tryptophane qui est considéré comme un précurseur de l'AIA (Prasanna et al., 2010). Nos résultats ont montré que la majorité des microorganismes ont la capacité de synthétiser cette hormone végétale, avec une variation de concentration. L'acide indole-3-acétique (AIA) joue un rôle important dans la régulation de la croissance et du développement des plantes (Ashrafuzzaman et al., 2009). Certaines rhizobactéries, telles que celles appartenant au genre *Pseudomonas*, peuvent produire de l'AIA, qui peut favoriser la croissance des plantes de plusieurs manières. L'un des moyens est de stimuler la croissance des racines et d'augmenter le nombre et la longueur des poils absorbants, ce qui peut améliorer l'absorption de l'eau et des éléments minéraux (Cassán et al., 2014). Il a été suggéré que l'AIA peut également aider les plantes à affronter les stress abiotiques tels que la sécheresse et la salinité (Zhang et al., 2021).

Compte tenu de ces résultats, ceci confirme que le phénomène d'inhibition des champignons phytopathogènes par les agents antagonistes n'est pas lié au parasitisme seulement, mais aussi à une cascade de mécanismes directs et indirectes conduisant à la suppression de la croissance de *Fusarium* et à la protection des plantes contre les maladies.

La variabilité des résultats obtenus dans les essais d'identification des métabolites secondaires nous conduit à penser à l'utilisation d'une combinaison d'agents de lutte biologique. En effet, le criblage a donc mis en évidence une interaction de compatibilité totale entre les deux agents telluriques les plus performants (*Trichoderma gamsii* et *Pseudomonas azotoformans*).

Sur la base des résultats d'antagonisme *in vitro* et du test de compatibilité, les deux isolats compatibles ont été sélectionnés pour des essais *in vivo*. Des essais dans des conditions contrôlées sous serre ont été effectués pour évaluer l'efficacité des deux espèces microbiennes en tant qu'agents de lutte biologique et de promotion de la croissance des plantes.

L'enrobage des semences du blé par *P. azotoformans* et *T. gamsii* séparément a diminué de manière significative la pourriture du collet des plantules de blé. Cependant, l'application combinée des deux souches microbiennes (P58+T2) offre de meilleures performances que les traitements individuels dans l'efficacité de la suppression des agents pathogènes *in vivo*. Nos

résultats illustrent également une augmentation significative de la croissance des plantes (hauteur, poids frais et sec) lorsqu'un traitement combiné des deux agents biologiques a été utilisé par rapport au contrôle. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bencheikh et *al.* (2022), qui ont observé que la lutte biologique par traitement des semences est une technique prometteuse qui génère un effet protecteur contre les fusarioses du blé. De plus, Zaim et *al.* (2018), ont montré que le traitement des semences avec *Bacillus subtilis* et *Trichoderma harzianum* protégeait de manière significative les semis de pois chiche infectés par *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* par rapport aux plantes non traitées.

La capacité des microorganismes sélectionnés d'inhiber les champignons phytopathogènes et de favoriser la croissance des plantes dépend principalement de différents mécanismes principalement le mycoparasitisme, l'antibiose, la compétition et la production d'enzymes lytiques, de plus ils stimulent le système immunitaire des plantes, conduisant à une résistance systémique induite vis-à-vis divers agents pathogènes (Sang et *al.*, 2014 ; Islam et *al.*, 2018 ; Bencheikh et *al.*, 2022). Dans les essais sous serre, la lutte biologique par l'utilisation des deux agents antagonistes contre *Fusarium* spp. a fourni le meilleur effet contre *F. equiseti* par rapport aux souches F10 et F4. Cette variabilité peut être due à la différence de virulence entre trois agents pathogènes. En effet, des tests de pathogénicité ont montré que *F. pseudograminearum* était plus virulent que les souches de *F. graminearum* et *F. equiseti* sur les plantules de blé. Des résultats similaires ont également été trouvés par Abdallah-Nekache et *al.* (2019), dans laquelle les isolats de *F. pseudograminearum* étaient les plus agressifs sur la pourriture du collet de blé.

Ces dernières années, l'application combinée de deux ou plusieurs agents de lutte biologique a été utilisée dans le contrôle de divers bioagresseurs (Izquierdo-García et *al.*, 2020 ; Minchev et *al.*, 2021). Ces stratégies se sont révélées plus efficaces que l'utilisation de souches uniques. Cette méthode combine plusieurs modes d'action de micro-organismes bénéfiques avec différentes adaptations environnementales et élargit leur spectre d'action pour contrôler les agents phytopathogènes par effet synergique (Liu et *al.*, 2018 ; Izquierdo-García et *al.*, 2020 ; Ouhaibi-Ben Abdeljalil et *al.*, 2021). Dans l'ensemble, les résultats rapportés dans ce travail montrent que la combinaison de souches microbiennes peut protéger les semis de blé de la pourriture du collet, stimule la croissance des plantes et améliore la santé et la productivité des plantes.

III.9- Conclusion

Les microorganismes associés à la rhizosphère fournissent de multiples services écosystémiques parmi lesquels la bioprotection et la biofertilisation. L'exploitation et la valorisation de ces microorganismes pour améliorer la santé et la productivité des plantes est un levier majeur pour réduire notre dépendance aux pesticides chimiques.

Les souches microbiennes testées dans notre étude ont montré des activités antagonistes variables contre les *Fusarium* spp. dans les essais *in vitro*. Les isolats les plus efficaces (*Pseudomonas azotoformans* et *Trichoderma gamsii*) présentent un potentiel significatif en tant qu'agents de biocontrôle et de promotion de la croissance chez les jeunes plants de blé.

La détection et la caractérisation des agents biologiques indigènes sont très utiles pour la suppression des maladies et l'amélioration de la productivité des plantes. Ces stratégies peuvent être utilisées dans le cadre d'une gestion intégrée des populations des parasites.

IV- Control biologique par l'utilisation d'une plante aromatique issue de la flore Algérienne

IV.1- Introduction

Le présent travail a été réalisé pour évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Citrus aurantium* contre la pourriture des racines et du collet du blé causée par *Fusarium graminearum* et *F. pseudograminearum* à la fois *in vitro* et *in vivo*. Notre recherche a été exécutée comme une approche alternative au contrôle chimique, à cette fin, l'analyse GC-MS a été utilisée pour acquérir des données chromatographiques sur les composants chimiques.

IV.2- Screening phytochimique

Le criblage phytochimique des feuilles de bigaradier a été réalisé pour la mise en évidence de la présence des métabolites secondaires potentiellement bioactives (Figure 80). Le test qualitatif a montré la présence de divers métabolites tels que les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les terpénoïdes, les acides aminés, les glucides et l'absence d'alcaloïdes et d'antraquinones (tableau 16).



Figure 81: Réactions de criblage phytochimique de l'extrait des feuilles de bigaradier

Tableau 16: Screening phytochimiques de *Citrus aurantium*.

Composants	Abondance
Flavonoids	+++
Tanins	++
Terpénoïdes	+++
Alcaloïdes	-
Antraquinones	-
Glucides	++
Acides aminés	++
Saponines	+

IV.3- Rendement de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*

Le rendement moyen de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Citrus aurantium* L. par le procédé d'hydrodistillation, calculé sur la base de la matière sèche a été évalué à 0.50 %. Les caractères organoleptiques de cette huile sont déterminés par un aspect liquide, une couleur jaune pâle avec une odeur aromatique douce.

IV.4- Analyse chimique de HE par GC-MS

L'analyse chromatographique par GC-MS a montré l'existence de 133 composés dont les hydrocarbures monoterpéniques comme groupe majeur de composés volatils. Il s'agit du limonène (17.55%), de l'acétate de géranyle (11.84%), du gèranial (10.80%), du citral (10.31%), du linalol (9.90%), de l'acétate de linalyle (5.68%), du gèraniol (4.89%), du nérol (4.58%), acétate d' α -terpinéol (4.07 %), acétate de néryle (3.95 %), β -ocimène (2.62 %), citronellal (1.92 %), eucalyptol (1.55 %), citronellol (1.14 %) et autres composés mineurs (tableau 17).

Tableau 17: Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium*.

Composants	Hauteur %	Surface %	Temps de rétention
Limonène	17.55	14.72	3.07
Geranyl acetate	11.84	14.47	14.00
Geranial	10.80	6.68	14.04
Citral	10.31	14.61	12.85
Linalool	9.90	12.23	10.06
Linalyl acetate	5.68	5.70	10.15
Geraniol	4.89	4.51	16.68
Nerol	4.58	4.30	15.61
α - Terpineol acetate	4.07	3.99	13.23
Neryl acetate	3.95	3.95	14.64
β -Ocimene	2.62	1.60	3.85
Citronellal	1.92	1.94	8.30
Eucalyptol	1.55	0.92	3.13
Citronellol	1.14	1.06	14.92
α - Ocimene	0.77	0.47	3.59
γ -Caryophyllene	0.70	0.86	10.59
α - Terpineolene	0.68	0.43	4.27
Sulcatone	0.57	0.41	5.36
Other compounds	6.48		

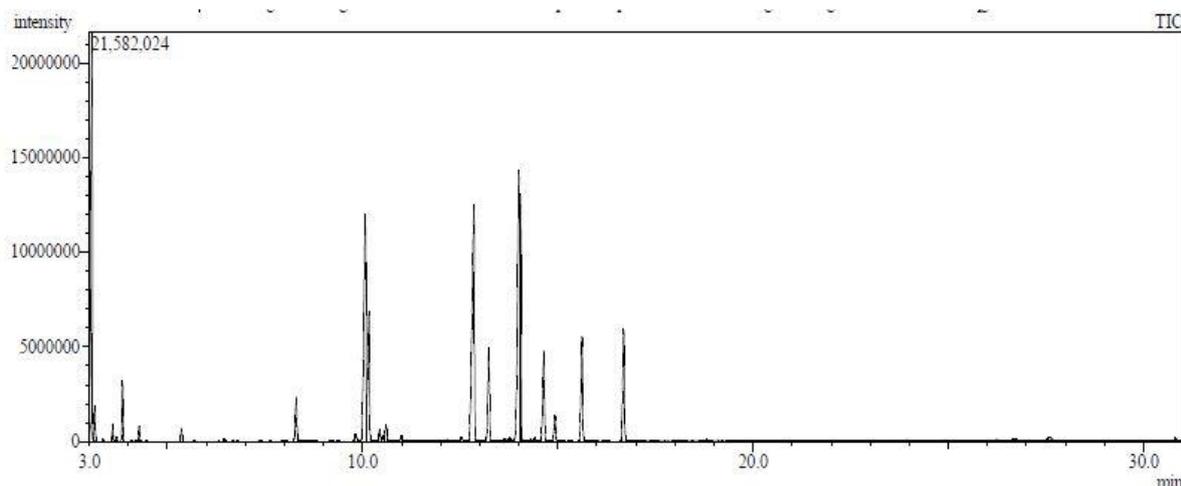


Figure 82 : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium L.*

IV.5- Activités biologiques de l'huile essentielle (HE)

IV.5.1- Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle a été évalué par spectrophotomètre.

L'activité de piégeage du DPPH a augmenté avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle. L'huile présentait une puissante activité antioxydante (80.76 %) mais inférieure à celle de l'acide ascorbique synthétique (98.01%). (Figure 82).

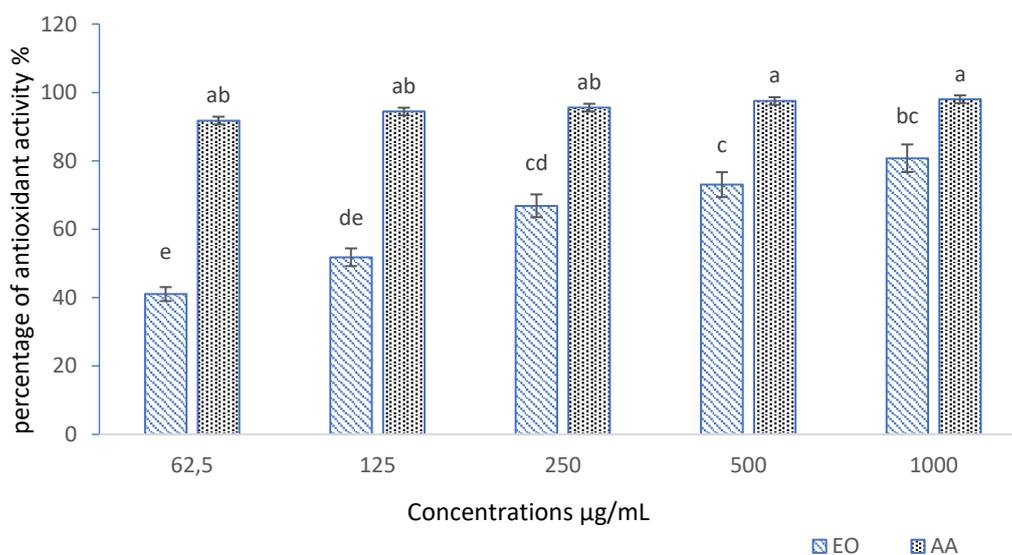


Figure 83: Activité antioxydante de l'HE de *Citrus aurantium* à différentes concentrations.

IV.5.2- Effet antifongique des extraits sur *Fusarium* spp. *in vitro*

L'effet de l'huile essentielle, de l'extrait aqueux et du difénoconazole sur *F. graminearum* et *F. pseudograminearum* a été évalué en mesurant l'inhibition de la croissance radiale *in vitro*. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

La croissance diamétrale des isolats F4 et F10 a été remarquablement inhibée sous l'action de la plus faible concentration de difénoconazole (50µl L⁻¹), avec des pourcentages d'inhibition qui dépassent 50%. Par contre, le taux d'inhibition des deux champignons par l'huile essentielle et l'extrait aqueux des feuilles de bigaradier est de 11.67 à 41.25 %. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'application de l'huile essentielle et le fongicide de synthèse à 250 µl L⁻¹ avec un pourcentage de réduction de 100 % de la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. Cependant, le traitement à l'extrait aqueux a montré une activité d'inhibition plus faible qui varie entre 53.96 et 66.46 % (Tableau 18). Ce traitement a montré une modification phénotypique représentée par une pigmentation jaune en cas de traitement des deux champignons (Figure 83-84).

L'observation microscopique des échantillons traités par l'huile essentielle à forte dose ont montré la présence des vacuolisations, et des dégradations au niveau de la membrane mycélienne (Figure 85).

Tableau 18: Effet inhibiteur (%) de l'huile essentielle, l'extrait aqueux et le difénoconazole sur la croissance mycélienne de *Fusarium* spp.

Dose (µl L ⁻¹)	Difénoconazole		Huile essentielle (HE)		Extrait aqueux (EA)	
	F10	F4	F10	F4	F10	F4
50	61.67±1.44c	59.91±1.04c	41.25±6.61d	37.9±1.44de	17.92±4.38e	11.67±1.9e
100	70.42±3.14bc	69±1.14bc	56.66±3.14c	53.33±1.9cd	40.42±1.9d	30.42±3.14de
200	82.92±3.81b	79.08±3.01b	69.58±4.01bc	66.67±1.44c	47.5±1.25d	39.58±2.6d
250	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	98.41±1.42a	66.46±3.08c	53.96±5.01cd
500	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	70±1.25bc	65.42±0.72c
1000	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	74.17±1.9bc	69.58±0.72bc

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± écart type

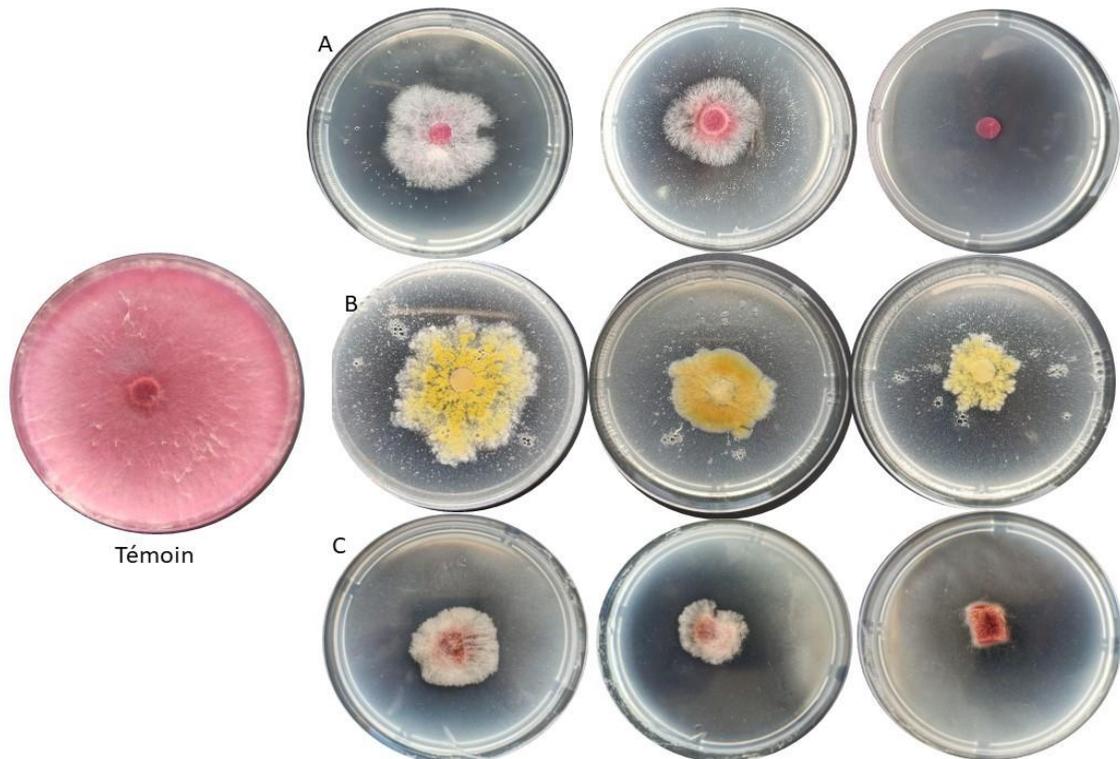


Figure 84: Réduction de la croissance radiale de *F. graminearum* après traitement par : A (Huile essentielle), B (Extrait aqueux), C (difénoconazole). Dose du traitement, de gauche à droite 100, 200 et 250 $\mu\text{l L}^{-1}$

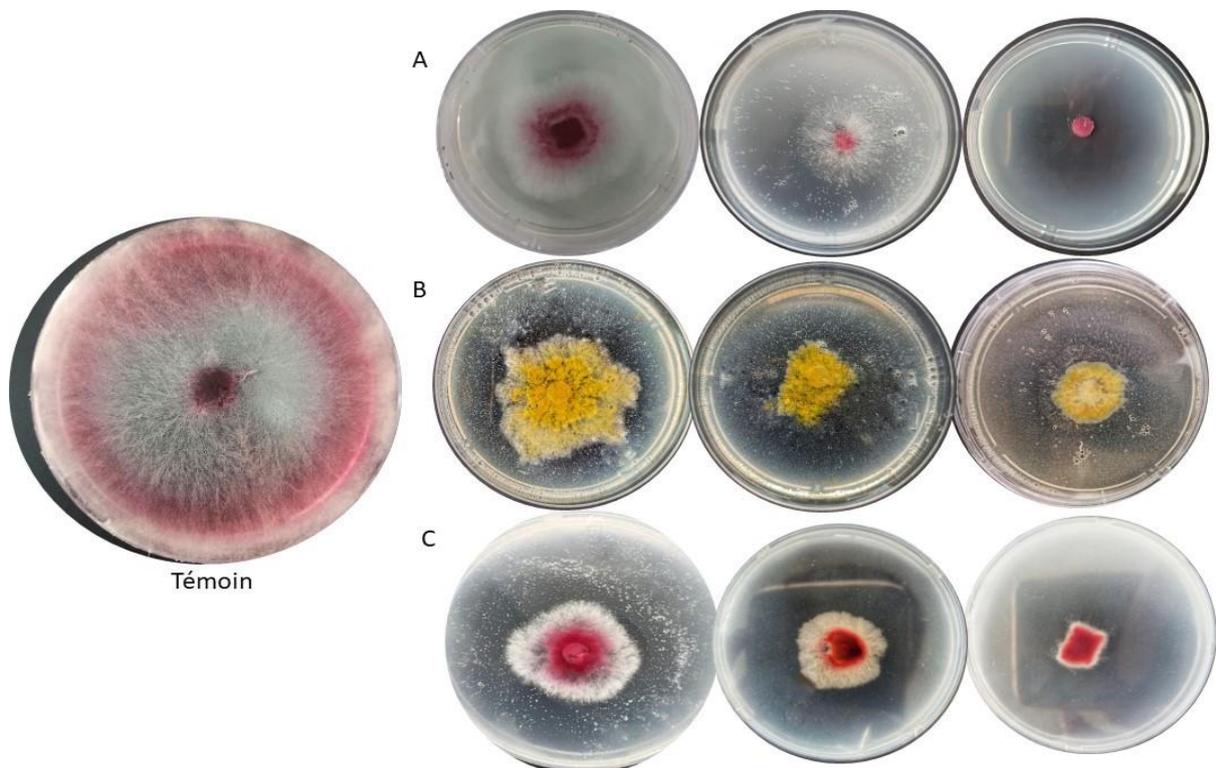


Figure 85: Réduction de la croissance radiale de *F. pseudograminearum* après traitement par : A (Huile essentielle), B (Extrait aqueux), C (difénoconazole). Dose du traitement, de gauche à droite 100, 200 et 250 $\mu\text{l L}^{-1}$



Figure 86: Dégradation de la membrane mycélienne et la vacuolisation due au traitement par l’huile essentielle

IV.5.3- Effet de l’HE sur l’émergence et le développement de coléoptile et de coléorhize

Dans ce test, l’effet de l’huile essentielle de *C. aurantium* L. a été testé *in vitro* sur le pourcentage d’émergence, la croissance des coléoptiles et des coléorhizes chez les plantules de blé infectées par *Fusarium* spp. (Figure 86).

Les résultats obtenus ont montré que les isolats F10 et F4 étaient responsables de l’inhibition de l’émergence par 33.33 % et 50 % respectivement. De plus, ils ont induit 62.1 % et 70.58 % de réduction de la longueur des coléoptiles, consécutivement. En outre, ces isolats ont également causé une diminution de la longueur du coléorhize par 68.31 % et 74.47 % respectivement (Tableau 19).

Le traitement préventif des semences de blé par l’huile essentielle, avant leur inoculation par les deux agents phytopathogènes testés (F10 et F4) a montré une augmentation du taux de germination par 13% et 25% respectivement. Parallèlement, il a augmenté la longueur de la coléoptile par 38.7 % et 47.6 %.

Tableau 19: Effet de HE sur l’émergence et le développement de coléoptile et coléorhize

	Emergence %	% de réduction de coléoptile	% de réduction de coléorhize
T	90±8.16 _a	00 _d	00 _e
T+H	85.5±5 _a	4.31±1.53 _d	3.26±1.13 _e
F10	60±8.16 _c	62.15±1.66 _b	67.91±2.55 _b
F10+H	69±4.08 _b	38.23±0.98 _c	35.09±3.73 _d
F4	45±4.08 _d	70.58±2.84 _a	74.47±2.27 _a
F4+H	60±4.08 _c	44.41±2.45 _c	42.57±1.91 _c



Figure 87: Effet de l'HE sur le développement de coléoptile et de coléorhize. A : Plantule de blé inoculée par F10. B : HE + F10. C : Plantule inoculée par F4. D : HE+ F4

IV.5.4- Effet de l'HE sur l'incidence et la sévérité de la maladie

Durant cette expérimentation, l'activité inhibitrice de l'huile essentielle vis-à-vis de la pourriture du collet causée par *F. graminearum* (F10) et *F. pseudograminearum* (F4) a été évalué sur l'incidence (IM) et la sévérité (SM) de la maladie (Figure 87-88).

En ce qui concerne les semences inoculées par (F4) et (F10) séparément, les résultats obtenus ont montré que la manifestation des premiers symptômes débute dès le 7^{em} et le 11^{em} jour de semis, respectivement. Ces symptômes s'expriment par un brunissement du collet accompagné avec un jaunissement des feuilles. Après l'arrachage de la plante on observe un développement très réduit des racines avec une pourriture sèche. L'observation régulière des plantes durant 30 jours nous a permis de calculer le taux de la réduction de l'incidence et la sévérité de la maladie (Figure 89). En effet, le traitement des semences infectées par *Fusarium* spp. avec l'HE a retardé l'apparition des premiers symptômes jusqu'à le 19^{em} et le 26^{em} jour de semis, consécutivement. Aussi, on a observé une diminution très significative de l'incidence de la maladie avec 64.09 % et 55.88 %, respectivement. A l'égard de la sévérité, nous avons noté aussi une réduction significative de 79.06 % pour *F. graminearum* (F10), et de 69.36 % pour le *F. pseudograminearum*.

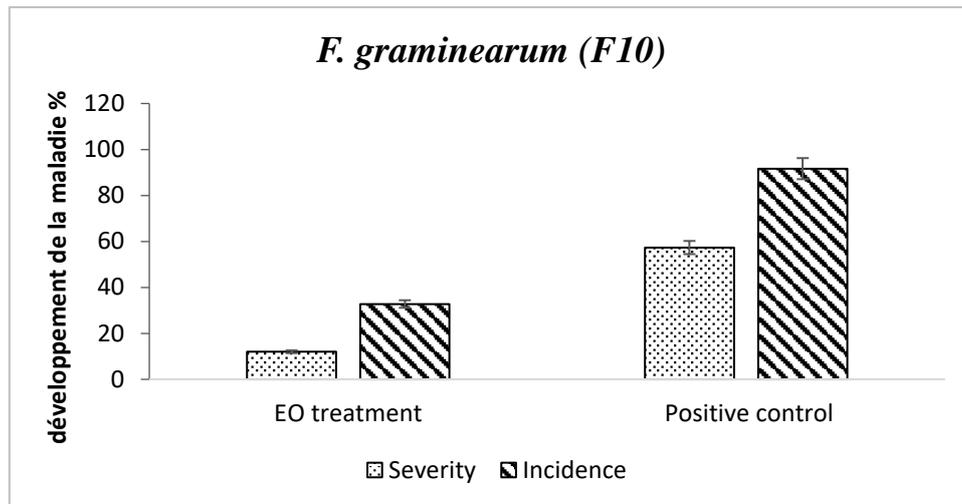


Figure 88: Effet inhibiteur de l'HE sur le développement de la maladie (cas de *F. graminearum*.)

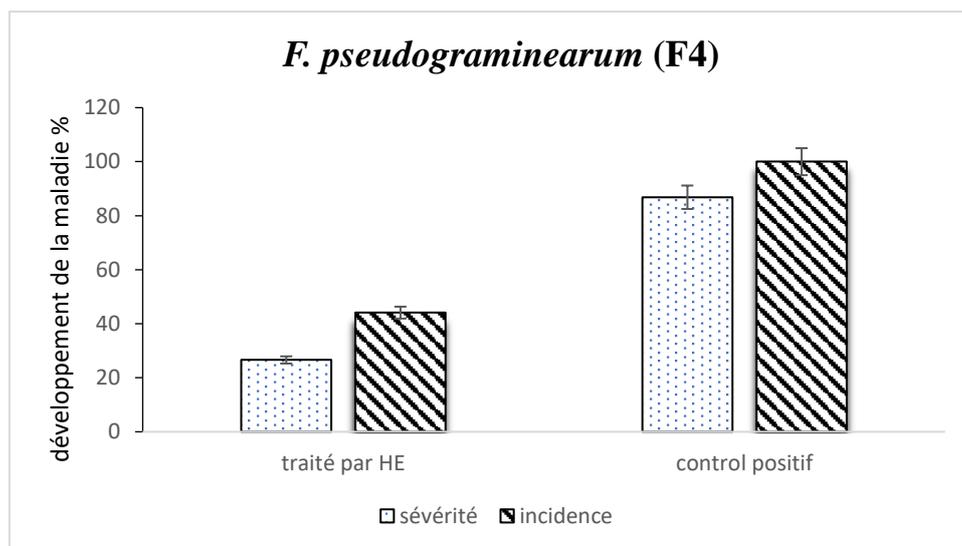


Figure 89: Effet inhibiteur de l'HE sur le développement de la maladie (cas de *F. pseudograminearum*)

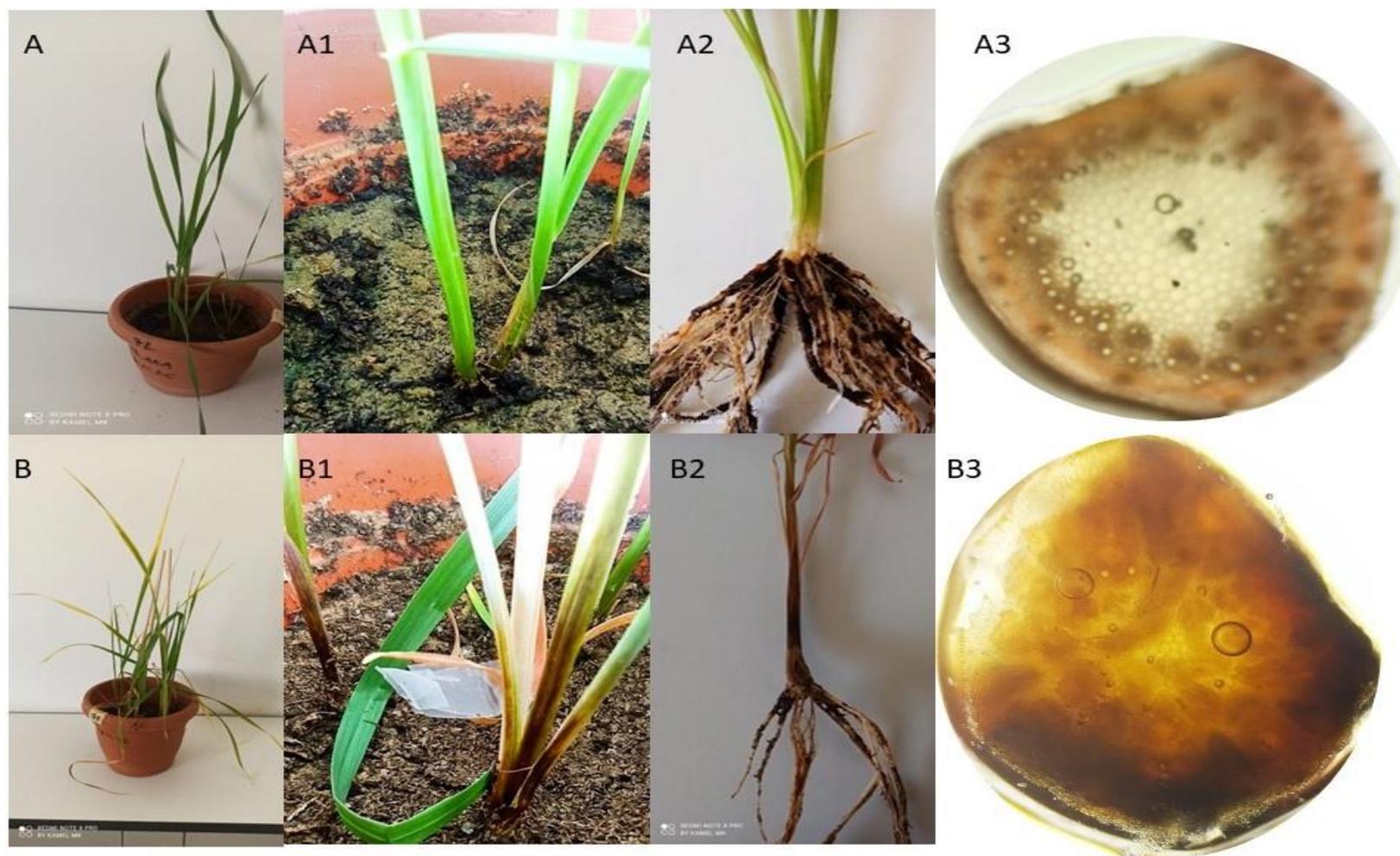


Figure 90: Effet de l'huile essentielle sur le développement de la maladie *in vivo*, A (plantule traitée avec une solution d'HE et inoculée avec l'agent pathogène) et B (plantule inoculée avec l'agent pathogène uniquement, contrôle positif), A1-A2 (absence de symptômes de pourriture des racines et du collet), B1-B2 (pourriture du collet et pourriture sèche des racines), A3-B3 (coupe transversale du collet).

IV.5.5- Effet du traitement sur les paramètres de croissance

L'application de l'HE a montré un effet positif sur la réduction la pourriture du collet chez les plantules de blé traitées. Cette réduction de la maladie s'est répercutée sur les paramètres de croissance. Les résultats sont représentés dans le (tableau 20). Les plantes inoculées par les agents pathogènes (F10) et (F4) et traitées par l'huile essentielle du bigaradier ont présenté un développement végétatif plus important comparativement à celles des plantes inoculées par le pathogène seulement (Figure 90).

Tableau 20: L'influence de l'HE de *Citrus aurantium* sur les paramètres de croissance des plantes.

Traitement biologique	Hauteur de plante (cm)	Longueur des racine (cm)	Poids frais (g)		Poids sec (g)	
			Tige	Racine	Tige	Racine
Control	41.03±1.76 ^a	30.50±0.65 ^a	4.07±0.23 ^a	1.72±0.02 ^a	0.97±0.06 ^a	0.32±0.01 ^a
<i>F. graminearum</i>	23.7±1.4 ^c	16.97±2.05 ^c	0.70±0.01 ^d	0.34±0.01 ^d	0.14±0.01 ^d	0.047±0.002 ^d
<i>F. graminearum</i> + HE	31.46±2 ^b	27.43±1.76 ^a	2.43±0.17 ^b	1.30±0.12 ^b	0.58±0.07 ^b	0.195±0.02 ^b
<i>F. pseudograminearum</i>	13.8±2.35 ^d	9.2±2.4 ^d	0.35±0.04 ^e	0.27±0.02 ^d	0.066±0.01 ^d	0.04±0.002 ^d
<i>F. pseudograminearum</i> +HE	29.46±1.2 ^b	22.3±0.6 ^b	1.97±0.1 ^c	0.78±0.04 ^c	0.35±0.02 ^c	0.131±0.02 ^c



Figure 91: Effet de l'HE sur la croissance des plantules infectées par F4 et F10. A : plante inoculée avec (F10) et traitée par l'HE, B : plante inoculée avec (F10) seulement.

IV.6- Discussion

Notre étude a pour objectif de trouver des substances naturelles biologiquement actives, qui peuvent contribuer au contrôle des maladies telluriques du blé sans conséquences néfastes pour l'homme et l'environnement.

La famille des Rutacées est connue par sa richesse en composants bioactifs qui agissent comme des substances antimicrobiennes (Jing et *al.*, 2014 ; Trabelsi et *al.*, 2016). Les huiles essentielles des agrumes sont largement utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques et antiseptiques, non seulement dans les produits pharmaceutiques, mais aussi comme des agents de conservation et additives dans plusieurs industries alimentaires. Ces substances aromatiques interviennent également dans la fabrication de quelques produits cosmétiques et des parfums (Moraes et *al.*, 2009 ; Yu et *al.*, 2020).

Ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont concentrés sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus aurantium* en tant que nouvelle approche pour contrôler les micro-organismes incriminés en pathologie humaine (Badawy et *al.*, 2019 ; Hajlaoui et *al.*, 2021). Cependant, leurs applications en protection des plantes contre les champignons phytopathogènes n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies. Par conséquent, cette étude a été menée pour évaluer l'HE de *C. aurantium* comme alternative aux pesticides synthétiques dans le contrôle de la pourriture fusarienne du collet chez les plantules de blé.

L'huile essentielle de feuilles de bigaradier a été obtenue par la méthode d'hydrodistillation. Le rendement en HE obtenu (0.5 %) est inférieur à celui trouvé par Ouedrhira et *al.* (2015) à partir de feuilles et de zeste de *C. aurantium* avec 0.8 et 1.9 %, respectivement. Cependant, cette valeur est supérieure à ceux obtenues en Grèce et en Tunisie, qui sont de 0.27 % et 0.40 % respectivement (Sarrou et *al.*, 2013 ; Bnina et *al.*, 2019). Ellouze et *al.* (2012) ont rapporté l'impact de la saison de récolte sur les rendements en HE des feuilles de *C. aurantium*, qui variaient de 0.31 % à 0.56 %. Généralement, le rendement d'une HE dépend de nombreux facteurs tels que la technique d'extraction, le stade de croissance des plantes utilisées, les différences génétiques, les conditions environnementales et les variations géographiques (Ellouze et *al.*, 2012 ; Gaff et *al.*, 2020).

Le piégeage des radicaux libres DPPH de notre huile essentielle a indiqué un puissant potentiel antioxydant. La forte activité antioxydante peut être due aux monoterpènes oxygénés (acétate de citronellyle, acétate de géranyle et oxyde de (Z)-limonène, et aux hydrocarbures monoterpènes (α -terpinène, β -myrcène, limonène et β -ocimène) (Ruberto et Baratta, 2000 ;

Badawy et *al.*, 2019). Des résultats similaires ont été mentionnés par Dosoky et Setzer (2018) et Değirmenci et Erkurt (2020). Cependant, Sarrou et *al.* (2013) et Mejri et *al.* (2022) ont indiqué que l'HE des vieilles feuilles à une activité antioxydante supérieure à celle des jeunes feuilles.

Le profil chimique de l'huile essentielle a été déterminé par analyse chromatographique en phase gazeuse. Les principaux composés détectés étaient le limonène (17,6 %), l'acétate de géranyle (11.9 %), le géraniol (10.8 %), le citral (10.3 %), le linalol (9.9 %) et l'acétate de linalyle (5.7 %). La connaissance de la composition de l'HE pourrait aider à reconnaître son mécanisme d'action. Des rapports sur les huiles essentielles extraites des feuilles de *C. aurantium* ont mentionné qu'elles contiennent presque les mêmes composants avec une variation significative de concentration en fonction de l'âge des feuilles (jeunes ou vieilles) et de la zone géographique. Les échantillons chinois contenaient comme composants principaux du terpinène-4-ol (21.0 %), du dipentène (limonène) (11.7 %), du terpinène (9.2 %) (Jiang et *al.*, 2011). Un autre échantillon de Tunisie contenait comme principaux composants du linalol (43.2 % à 66.0 %), de l'acétate de linalyle (0.8 à 24.8) et de l' α -terpinéol (9.3 à 12.1) (Ellouze et *al.*, 2012).

Pour lutter contre les espèces de *Fusarium* agents de pourriture racinaire et du collet chez le blé, l'effet antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux obtenu à partir des feuilles de *C. aurantium* a été évalué *in vitro* en le comparant avec un fongicide commercial (difénoconazole). Nos résultats ont démontré que tous les traitements utilisés à différentes concentrations ont une activité différentielle contre la croissance de *F. graminearum* et *F. pseudograminearum* de manière proportionnelle à la concentration. L'HE appliquée par incorporation dans le milieu PDA a fortement réduit la croissance radiale de *Fusarium* spp. Cependant, l'extrait aqueux a montré les taux d'inhibition les plus faibles. Le fongicide difénoconazole utilisé comme témoin positif a montré un effet inhibiteur plus élevé sur la croissance mycélienne, ce dernier perturbe la biosynthèse des stérols (Syngenta). L'ergostérol est un composant essentiel des membranes cellulaires des champignons, par conséquent son insuffisance inhibe la croissance fongique (Rodrigues, 2018).

Nos résultats sont en accord avec de nombreuses études, Elgat et *al.* (2020) ont remarqué que l'HE de *C. aurantium* peut contrôler *Aspergillus* spp. Ortuño et *al.* (2011) ont rapporté l'activité antifongique de cette huile contre *Penicillium digitatum*. Hajlaoui et *al.* (2021) ont démontré que les huiles essentielles d'agrumes peuvent également être utilisées comme produit

antibactérien. Selon Zabka et Pavela (2018), l'effet antifongique des huiles essentielles dépend d'une teneur élevée en terpénoïdes tels que le limonène. Jing et *al.* (2014) ont mentionné certaines molécules (limonène, octanal, citral, α -terpinéol, néral, géraniol et β -myrcène) qui agissent contre un large groupe de pathogènes. En raison des propriétés de ces composants bioactifs (faible solubilité dans l'eau et forte hydrophobicité), plusieurs études ont suggéré que les composés volatils pourraient cibler les composants de la membrane cellulaire (Lang et Buchbauer, 2012 ; Reyes et *al.*, 2020). À titre d'exemple, il a été démontré dans des études précédentes que les terpènes et les composés phénoliques agissent en se liant aux groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes, provoquant une altération de la perméabilité et une fuite des composants intracellulaires (Wan et *al.*, 2019 ; Konuk et *al.*, 2020). Ces molécules réagissent également avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des champignons (Giordani et Kaloustian, 2006).

L'extrait aqueux qui a évoqué un changement de couleur du mycélium des deux champignons traités du rouge brique au jaune a démontré une différence entre les composés organiques et volatils. O'Mara et *al.* (2020) ont déclaré que le pH était le facteur majeur dans le changement de couleur de *Fusarium*. Le changement de couleur est réversible, après repiquage des hyphes jaunes sur un nouveau milieu PDA, le champignon reprend sa couleur initiale. Cette modification peut également être due à une excitation du milieu par des composés organiques jaunes. Selon Qin et *al.* (2020), un test de stress oxydatif utilisant (H_2O_2) sur *Fusarium graminearum* peut induire une coloration jaunâtre.

Lors des essais sous serre, l'effet de *F. graminearum* et *F. pseudograminearum* sur les paramètres de croissance des plantes ont révélé un pourcentage plus faible d'émergence des semis et une régression significative du développement des racines et de la tige. De plus, une nécrose brune du collet a été observée sur les plantes infectées accompagnée avec un jaunissement des feuilles. Cependant, le traitement des semences de blé avec l'HE de *C. aurantium* a réduit l'incidence et la gravité de la pourriture du collet de manière significative. Les résultats de notre expérience sont cohérents avec ceux de Moutassem et *al.* (2019) qui ont rapporté que les HE de thym et de citronnelle étaient très efficaces pour réduire la gravité de la fusariose et induire une résistance systémique chez les plantes de pois chiche.

IV.7- Conclusion

Notre enquête met en évidence la valorisation de la plante *Citrus aurantium* L. en termes de composition chimique de l'huile essentielle, de la puissante activité antioxydante et de l'effet antifongique.

Les résultats ont clairement indiqué que l'HE testée peut réduire la croissance des agents pathogènes *in vitro* et *in vivo*. De l'étude actuelle, nous pouvons déduire que l'huile essentielle extraite des feuilles de *Citrus aurantium* L. peut être utilisée comme bioproduit antifongique contre les champignons phytopathogènes.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la toxicité de cette huile essentielle *in vivo* afin d'établir leur efficacité en tant que biopesticides et leurs aspects de sécurité.

Conclusion générale

Conclusion Générale et perspectives

En agriculture, les plantes sont continuellement exposées à un large éventail d'agressions extérieures notamment les maladies cryptogamiques d'origine telluriques. Aujourd'hui, l'exploitation de nouvelles approches écologiques pour lutter contre les champignons phytopathogènes est une préoccupation constante des chercheurs. Ces approches privilégient l'utilisation de produits d'origine naturelle, qui semblent être efficaces et moins nocifs que les pesticides de synthèse.

Les microorganismes, y compris les bactéries et les champignons, constituent une partie importante des agents utilisés dans le contrôle biologique, d'où la pertinence de notre travail visant l'évaluation de la diversité fongique tellurique de la culture du blé, ainsi que l'élaboration d'une stratégie de lutte vis-à-vis de quelques parasites.

Le présent travail nous a permis d'isoler à partir de la rhizosphère du blé une collection d'isolats fongiques pathogènes, saprophytes et antagonistes. Ces isolats appartiennent aux genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Chaetomium* et *Cladosporium*.

L'analyse des critères morphologiques, biométriques et pathologiques du genre le plus dominant (*Fusarium*) nous a permis d'identifier 10 espèces à savoir, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. cerealis*, *F. oxysporium*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides* et *F. acuminatum*.

Le test de pathogénicité des isolats obtenus sur la variété de blé dur vitron connu par sa sensibilité vis-à-vis de la fusariose, a montré une variabilité du pouvoir pathogène. La plupart des espèces testées montrent des symptômes des pourritures du collet chez les plantules de blé inoculées artificiellement.

Dans le cadre de recherche des moyens de lutte biologique vis-à-vis des espèces les plus virulents (*Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum* et *F. equiseti*), une collection des agents antagonistes, des rhizobactéries, et des champignons antagonistes a été testée à l'égard des agents pathogènes ciblés.

L'évaluation de l'effet antagoniste de nos microorganismes *in vitro*, qui implique les tests de confrontation directe et indirecte a montré une variabilité du pouvoir inhibiteur de ces agents. *Pseudomonas azotoformans* était l'agent le plus efficace dans la réduction de la

Conclusion générale et perspectives

croissance mycélienne des pathogènes testés dans la technique de confrontation directe. En revanche, la souche *Trichoderma gamsii* a donné l'effet antagoniste le plus élevé dans l'essai de confrontation à distance.

Pour la caractérisation du mode d'action de ces microorganismes antagonistes, des tests enzymatiques, et d'autres tests d'identification de quelques métabolites secondaires synthétisés par ces derniers ont été réalisés. Les résultats obtenus ont démontré que Les propriétés métaboliques de ces souches microbiennes ont été quasiment différentes en fonction de l'espèce testée. Les isolats de *Trichoderma* et les souches des PGPR ont la potentialité de synthétiser une collection de composés chimiques. Ces molécules peuvent être regroupées dans trois catégories, y compris la bioprotection (chitinase, protéase, acide cyanhydrique, sidérophores), la bio-fertilisation (solubilisation de phosphate) et la phyto-stimulation (acide indole acétique). Ces résultats confirment que le l'inhibition des champignons phytopathogènes par les agents antagonistes est lié à une cascade de mécanismes directs et indirects conduisant à la suppression de la croissance de *Fusarium* et à la protection des plantes contre les maladies telluriques.

La variabilité des résultats obtenus dans la production des métabolites secondaires nous a conduits à l'utilisation d'une combinaison d'agents de lutte biologique. En effet, le criblage a mis en évidence une interaction de compatibilité totale entre les deux agents telluriques les plus performants (*Trichoderma gamsii* et *Pseudomonas azotoformans*).

Des essais dans des conditions contrôlées ont été effectués pour évaluer l'efficacité des deux espèces microbiennes en tant qu'agents de lutte biologique et de promotion de la croissance des plantes. Ces expériences en serre montrent des différences de réponse en fonction du traitement appliqué. En effet, le traitement des graines de blé par *P. azotoformans* et *T. gamsii* séparément a diminué de manière significative la pourriture du collet des plantules de blé. Cependant, l'effet synergétique de la rhizobactérie et *Trichoderma* a marqué une diminution plus importante de la sévérité de la maladie et une amélioration dans la croissance des plantes.

Un autre objectif de ce travail de thèse était la recherche de molécules biologiquement actives d'origine végétale pour la lutte contre la fusariose du blé. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à la valorisation d'une plante aromatique de la famille des *Rutacées* (*Citrus aurantium*) en évaluant sa composition chimique, son pouvoir antifongique et antioxydant.

Conclusion générale et perspectives

La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de bigaradier extraite par hydrodistillation a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse GC-MS. Les principaux composés détectés étaient le limonène (17,6 %), l'acétate de géranyle (11,9 %), le gèranial (10,8 %), le citral (10,3 %), le linalol (9,9 %) et l'acétate de linalyle (5,7 %). La grande proportion des monoterpènes oxygénés et des hydrocarbures monoterpènes dans cette essence est responsable de l'activité antioxydante observée.

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux des feuilles de *C. aurantium* a été testé sur la croissance mycélienne de *Fusarium* spp. *in vitro* et sur la sévérité de la maladie *in vivo*. L'essence testée s'est montrée à activité antifongique très importante sur la croissance mycélienne des agents pathogènes. L'effet le plus efficace a été enregistré à une concentration de 250 $\mu\text{l L}^{-1}$ avec un pourcentage d'inhibition de 100 %. Cependant, l'extrait aqueux a montré des taux d'inhibition plus faibles. Lors des essais sous serre, le traitement des semences de blé avec l'HE de *C. aurantium* a réduit l'incidence et la gravité de la pourriture du collet de manière significative. Un effet positif sur le taux d'émergence et l'amélioration de la croissance des plantes a été également observé.

En générale, notre travail de thèse a permis d'exploiter de nouveaux agents de lutte biologique et d'approfondir les connaissances sur leur mode d'action en vue d'améliorer leur utilisation et leur efficacité contre les champignons d'origine tellurique.

En perspectives, la complexité des interactions pathogènes-antagonistes au niveau de la rhizosphère, nécessite de poursuivre cette étude par d'autres voies complémentaires, et par une étude en plein champs afin de confirmer les performances mises en évidence.

Il serait également intéressant d'effectuer un échantillonnage plus large dans les principales zones céréalières du pays et dans les différents étages bioclimatiques tels que Saida et Tiaret, afin d'obtenir autres souches antagonistes qui peuvent être efficaces.

Isoler et Purifier les molécules bioactives à partir des agents antagonistes testés, et de l'huile essentielle du bigaradier et l'étude de leur toxicité à différentes doses.

La possibilité de l'exploitation des résultats obtenus dans la proposition de formulations bio-fongicides et biofertilisants commerciales efficaces vis-à-vis des champignons telluriques, et avec un impact positif sur la croissance des plantes.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdallah-Nekache N., Laraba I., Ducos C., Barreau C., Bouznad Z., and Bouregghda H., 2019.** Occurrence of Fusarium head blight and Fusarium crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 154(3): 499-512 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01673-7>
- Abdel-Fattah G. M., Shabana Y. M., Ismail A. E., and Rachad Y. M., 2007.** *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164(2): 81-89.
- Abramova S. L., Ryazantsev D. Y., Voinova T. M., and Zavriev S. K., 2008.** Diagnostics of phytopathogen fungi *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* by fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH) PCR. *Russian journal of bioorganic chemistry*, 34: 97-102.
- Abuzar S., 2013.** Antagonistic effects of some fluorescent *Pseudomonas* strains against root rot fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) on chili (*Capsicum annum*). *World Applied Sciences Journal*, 27(11): 1455-1460.
- Acharya K., Dutta A. K., and Pradhane 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.
- Adams R. P., 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured publishing corporation Carol Stream.
- Adhikari K. B., Tanwir F., Gregersen P. L., Steffensen S. K., Jensen B. M., Poulsen L. K., and Fomsgaard I. S., 2015.** Benzoxazinoids: Cereal phytochemicals with putative therapeutic and health-protecting properties. *Molecular nutrition & food research*, 59(7): 1324-1338.
- Agrios G. N., 2005.** *Plant pathology*, Fifth Edition. Elsevier Academic Press. Department of Plant Pathology, University of Florida. 922 p.
- Alamri S., Hashem M., and Mostafa Y. S., 2012.** *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*, 17(4): 155-167.
- Ali S., Liu Y., Ishaq M., Shah T., Abdullah A., and Din I. U., 2017.** Climate change and its impact on the yield of major food crops: Evidence from Pakistan. *Foods*, 6(6), 39.
- Almasudy A., You M. P., and Barbetti M. J., 2015.** Influence of fungicidal seed treatments and soil type on severity of root disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-8 on wheat. *Crop Protection*, 75: 40-45.
- Anonyme 1, 2022.** <https://fr.wikipedia.org/wiki/B1%C3%A9#>:
- Anonyme 2, 2015.** <https://www.syngenta.fr/cultures/cereales/article-fongicide/maladies-du-ble>.
- Anonyme 3, 2011:** <https://mieux-se-connaître.com/2011/04/loranger-amer/>

- Anwar S., Ahmed N., Speciale A., Cimino F., and Saija A., 2016.** Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Elsevier: 259-268.
- Aouali S., and Douici-Khalfi A., 2009.** Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie: symptômes, développement et moyens de lutte. ITGC, EL Harrach, Alger. 56p.
- Aqueel M. A., and Leather S. R., 2011.** Effect of nitrogen fertilizer on the growth and survival of *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Sitobion avenae* (F.)(Homoptera: Aphididae) on different wheat cultivars. *Crop Protection*, 30(2): 216-221.
- Araujo R., Dunlap C., and Franco C. M., 2020.** Analogous wheat root rhizosphere microbial successions in field and greenhouse trials in the presence of biocontrol agents *Paenibacillus peoriae* SP9 and *Streptomyces fulvissimus* FU14. *Molecular plant pathology*, 21(5): 622-635.
- Arzani A., and Ashraf M., 2017.** Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health beneficial food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3): 477-488.
- Ashrafuzzaman M., Hossen F. A., Ismail M. R., Hoque A., Islam M. Z., Shahidullah S. M., and Meon S., 2009.** Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7).
- Assia F. R., Righi K., Boungab K., and Mokabli A., 2019.** Étude de l'infestation des céréales par les nématodes à kyste « *Heterodera* spp. » et distribution des espèces en cause dans l'Ouest de l'Algérie. *Cahiers Agricultures*, 28: 17. <https://doi.org/10.1051/cagri/2019017>
- Azhdarzadeh F., and Hojjati M., 2016.** Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1): 43-50.
- Badawy M. E., Marei G. I. K., Rabea E. I., and Taktak N. E., 2019.** Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through *in vitro* and *in silico* studies. *Pesticide biochemistry and physiology*, 158: 185-200. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.008>
- Badri D. V. and Vivanco J. M., 2009.** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32: 666-681.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S. and Vivanco G. M., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266.
- Bakkali F., Averbek S., Averbek D., and Idaomar M., 2008.** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.
- Bakker, P. A., Pieterse C. M., and Van Loon L. C., 2007.** Induced systemic resistance by *fluorescent Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2): 239-243.
- Banerjee S., Singh S., Pandey S., Bhandari M. S., Pandey A., Giri K., 2020.** Biocontrol potential of *Pseudomonas azotoformans*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt of *Dalbergia sissoo*. *Forest Pathology*, 50:1–5. <https://doi.org/10.1111/efp.12581>

- Barloy D., Lemoine J., Abelard P., Tanguy A. M., Rivoal R., and Jahier J., 2007.** Marker-assisted pyramiding of two cereal cyst nematode resistance genes from *Aegilops variabilis* in wheat. *Molecular Breeding*, 20: 31-40.
- Barnett H. L., and Hunter B. B., 1972.** Illustrated genera of imperfect fungi. Illustrated genera of imperfect fungi.(3rd ed).
- Beccari G., Prodi A., Pisi A., Nipoti P., Onofri A., Nicholson P., Pfohl K., Karlovsky P., Gardiner D. M., and Covarelli L., 2018.** Development of three *Fusarium* crown rot causal agents and systemic translocation of deoxynivalenol following stem infection of soft wheat. *Plant Pathology*, 67: 1055-1065
- Bednarek J., 2012.** Analyse fonctionnelle de TaGW2, une E3 ligase de type RING, dans le développement du grain de blé tendre (*Triticum aestivum*), Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Bekki S., Benmehaia M. A., and Kaci A., 2022.** Les enjeux de la dépendance de la filière de blé en Algérie : Analyse par asymétries de réponses de l'offre dans la chaîne de valeur. *New mediterranean* n. 1/2022 : 133 -147. DOI : 10.30682/nm2201h.
- Belaid D., 1996.** Aspect de la céréaliculture Algérienne Ed: OPU. 200p.
- Bencheikh A., Meziti H., Daichi Barkahoum M., Gharzouli A., Belkadi K., and Rouag N., 2022.** Efficiency of durum wheat seeds biopriming by rhizobacteria in the biocontrol of *Fusarium culmorum* and *Fusarium chlamydosporum* infecting durum wheat in Algeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. DOI: 10.1080/03235408.2021.2025006
- Bencheikh A., Rouag N., Mamache M., and Belabed I., 2020.** First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303>
- Bernhoft A., Clasen P. E., Kristoffersen A. B., and Torp M., 2010.** Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives and Contaminants*, 27(6): 842-852.
- Bertin C., Yang X., and Weston L. A., 2003.** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256: 67-83.
- Bhattacharyya P. N., and Jha D. K., 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Binagwa P. H., Bonsi C. K., Msolla S. N., and Ritte I. I., 2016.** Morphological and molecular identification of *Pythium* spp. isolated from common beans (*Phaseolus vulgaris*) infected with root rot disease. *African Journal of Plant Science*, 10(1): 1-9.
- Bissett J., 1991.** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian journal of botany*, 69(11): 2418-2420.
- Blaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., and Jedryczka M., 2014.** *Trichoderma* spp.–application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*, 54(4).

- Bnina E.B., Hajlaoui H., Chaieb I., Daami-Remadi M., Ben Said M., Ben Jannet H., 2019.** Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the tunisian *Citrus aurantium* essential oils. Czech Journal of Food Sciences, 37: 81–92.
- Bonjean A., and Picard E., 1990.** Les cereales a paille: Origine histoire economie selection.
- Booth C., 1971.** The genus fusarium. The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.
- Booth C., 1975.** The present status of Fusarium taxonomy. Annual review of phytopathology, 13(1): 83-93.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthir S., Guy P. H., Larpent J. P., Raymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisible importance industrielle, (end) Masson, Paris.
- Bouanaka H., Bellil I., Harrat W., Boussaha S., Benbelkacem A., Khelifi D., 2021.** On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria. Egyptian Journal of Biological Pest Control, <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3>.
- Bouanaka H., Ines B., Douadi K., 2022.** First report on *Fusarium cerealis*, identification and virulence as causal agents of crown rot on wheat in Algeria. Archives of Phytopathology and Plant Protection. DOI: 10.1080/03235408.2022.2035557
- Boulal H., Zaghouane O., El Mourid M., and Rezgui S., 2007.** Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). ITGC, INRA, ICARDA, Algérie 176.
- Boulif M., 2016.** Maladies du blé liées au sol. Fiche Technique N° 16. CECAMA. Centre de conseil agricole Maroc-Allemand. 4P.
- Boungab K., Tadjeddine A., Belabid L., Fortas Z. and Bayaa B., 2015.** Exploitation of some plant extracts for ecofriendly management of Net Blotch of Barley. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(2):732-739.
- Bozõ glu T., Dervi S., Imren M., Amer M., Özdemir F., Paulitz T. C., Morgounov A., Dababat A. A., and Özer G., 2022.** Fungal Pathogens Associated with Crown and Root Rot of Wheat in Central, Eastern, and Southeastern Kazakhstan. Journal of Fungi, 8, 417. <https://doi.org/10.3390/jof8050417>
- Bozzini A., 1988.** Origin, distribution, and production of durum wheat in the world.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., and Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Bric J. M., Bostock M., and Silverstone E., 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and Environmental Microbiology, 57(2): 535-538.
- Brussaard L., De Ruiter P. C., and George G., 2007.** Soil biodiversity for agricultural sustainability. Agriculture, Ecosystems and Environment. 121: 233-244.
- Bubici G., 2018.** *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. CABI Reviews, 13: 050.

- Cai F., and Druzhinina I. S., 2021.** In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107(1): 1-69.
- Calderón C. E., Ramos C., de Vicente A., and Cazorla F. M., 2015.** Comparative genomic analysis of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 reveals new insight into antifungal compounds involved in biocontrol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3): 249-260.
- Carroll J., Bergstrom G. C., and Gray S. M., 2002.** Assessing the resistance of winter wheat to wheat spindle streak mosaic bymovirus. *Canadian journal of plant pathology*, 24(4): 465-470.
- Cassán F., Vanderleyden J., and Spaepen S., 2014.** Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33: 440-459.
- Celar F., 2003.** Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control*, 28(1): 19-24.
- Chakraborty S., Liu C. J., Mitter V., Scott J. B., Akinsanmi O. A., Ali S., and Simpfendorfer S., 2006.** Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management. *Australasian Plant Pathology*, 35(6): 643-655.
- Chambers J. E., Greim H., Kendall R. J., Segner H., Sharpe R. M., and Van Der Kraak G., 2014.** Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical reviews in toxicology*, 44(2): 176-210. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.855163>
- Champion R., 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA éditions. Paris, France, 39Sp.
- Chan Y. K., Barraquio W. L., and Knowles R., 1994.** N₂-fixing pseudomonads and related soil bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 13(1): 95-117.
- Chandrashekara C., Bhatt J. C., Kumar R., and Chandrashekara K. N., 2012.** Suppressive soils in plant disease management. *Eco-Friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*, ed A Singh (New Delhi: International Book Distributors): 241-256.
- Chekali S., Gargouri S., Berraies S., Gharbi M. S., Nicol M. J., and Nasraoui B., 2013.** Impact of *Fusarium* foot and root rot on yield of cereals in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 8: 75-86
- Chen H. Y., Lin Y. C., and Hsieh C. L., 2007.** Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food chemistry*, 104(4): 1418-1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.004>
- Chen J. L., Sun S. Z., Miao C. P., Wu K., Chen Y. W., Xu L. H., Guan H. L., and Zhao L. X., 2016.** Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40 (4): 315-324. doi: 10.1016/j.jgr.2015.09.006
- Chen X., 2020.** Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. *Food Security*, 12(2): 239-251.

- Chet I., Ordentlich A., Shapira R., and Oppenheim A., 1990.** Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil*, 129(1): 85-92.
- Chetouhi C., Bonhomme L., Lasserre-Zuber P., Cambon F., Pelletier S., Renou J. P., and Langin T., 2016.** Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes. *Functional & integrative genomics*, 16(2): 183-201.
- Chtioui W., Balmas V., Delogu G., Migheli L., Oufensou S., 2022.** Bioprospecting Phenols as Inhibitors of Trichothecene-Producing *Fusarium*: Sustainable Approaches to the Management of Wheat Pathogens. *Toxins*, 14, 72. <https://doi.org/10.3390/toxins14020072>
- Clarke J., Norvell W. A., Clarke F. R., and Buckley W. T., 2002.** Concentration of cadmium and other elements in the grain of near-isogenic durum lines. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(1): 27-33.
- Clement G., and Prats J., 1970.** Les céréales. Collection d'enseignement agricole 2.
- Copping L. G., and Menn J. J., 2000.** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(8): 651-676.
- Cornu J. Y., Elhabiri M., Ferret C., Geoffroy V. A., Jezequel K., Leva Y., and Lebeau T., 2014.** Contrasting effects of pyoverdine on the phytoextraction of Cu and Cd in a calcareous soil. *Chemosphere*, 103: 212-219.
- Cumagun C. J. R., Bowden R. L., Jurgenson J. E., Leslie J. F., and Miedaner T., 2004.** Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology*, 94(5): 520-526.
- Curtis B. C., Rajaram S., and Gómez Macpherson H., 2002.** Bread wheat: improvement and production, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Da Cruz Cabral L., Pinto V. F., and Patriarca A., 2013.** Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 166(1): 1-14.
- Dal Bello G., Sisterna M. N., and Monaco C. I., 2003.** Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. *International Journal of Pest Management*, 49(4): 313-317.
- Daniel R., and Simpfendorfer S., 2008.** The impact of crown rot on winter cereal yields. GRDC Update www.grdc.com.au/resources-and-publications/grdc-update-papers/tab-content/grdc-updatepapers/2008/06/the-impact-of-crown-rot-on-winter-cereal-yields.
- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale, Paris, France: Editions INRA
- Davet P., and Rouxel F., 1997.** Détection et isolement des champignons du sol. INRA, Paris, 203 p.
- Degenkolb T., Von Doehren H., Fog Nielsen K., Samuels G. J., and Brückner H., 2008.** Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(5): 671-680.

- Değirmenci H., and Erkurt H., 2020.** Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium L.* flowers. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1): 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.017>
- Dekker J., 2018.** The fungicide resistance problem: Current status and the role of systemics. *Pesticide Interactions in Crop Production*, CRC Press: 163-180.
- Del Rio J. A., Benavente O., Castillo J., and Borrego F., 1992.** Neodiosmin, a flavone glycoside of *Citrus aurantium*. *Phytochemistry*, 31(2): 723-724.
- Delaux P. M., Séjalon-Delmas N., Bécard G., and Ané J. M., 2013.** Evolution of the plant–microbe symbiotic ‘toolkit’. *Trends in plant science*, 18(6): 298-304.
- Demirci E., and Dane E., 2003.** Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica*, 31(2): 170-173. <https://doi.org/10.1007/bf02980787>
- Derbal N., Benbelkacem A., and Tahar A., 2015.** Spatial variation of quality traits in Algerian durum wheat cultivated in different environments. *African Journal of Agricultural Research*, 10(9): 919-925. DOI: [10.5897/AJAR2015.9492](https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9492)
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., and Mnif W., 2016.** Essential oils’ chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review of Medicines, 3(4): 25.
- Djermoun A., 2009.** La production céréalière en Algérie: les principales caractéristiques. *Nature & Technology*, 1, 45- 53.
- Doane J.F., and Olfert O., 2008.** Seasonal development of wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae), in Saskatchewan, Canada. *Crop Protection*, 27(6): 951-958.
- Dosoky N. S., and Setzer W. N., 2018.** Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1966. <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>
- Dröge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1): 47-95.
- Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., and Kubicek C. P., 2011.** *Trichoderma* : the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, 9(10): 749-759.
- Dugassa A., Alemu T., and Woldehawariat Y., 2021.** In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease (*Fusarium solani*) of faba bean (*Vicia faba L.*). *BMC Microbiology*, 21:115. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02181-7>.
- Dunlap C. A., 2019.** Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. *Biological control*, 134: 82-86.
- Duveiller E., 1997.** The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management, CIMMYT.
- Dvořák J., Terlizzi P. D., Zhang H. B., and Resta P., 1993.** The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, 36(1): 21-31.

- Dyer A. T., Johnston R. H., Hogg A. C., and Johnston J. A., 2009.** Comparison of pathogenicity of the Fusarium crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 387-395.
- Eilenberg J., Hajek A., and Lomer C., 2001.** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biological Control*, 46(4): 387-400.
- El Hajji M., Rebuffat S., Le Doan T., Klein G., Satre M., and Bodo B., 1989.** Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 978(1): 97-104.
- Elad Y., and Baker R., 1985.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75(9): 1053-1059.
- Elgat W. A., Kordy A. M., Böhm M., Černý R., Abdel-Megeed A., and Salem M. Z., 2020.** *Eucalyptus camaldulensis*, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* Essential Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. *Processes*, 8(8), 1003. <https://doi.org/10.3390/pr8081003>
- Elgayyar M., Draughon F. A., Golden D. A., and Mount J. R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of food protection*, 64(7): 1019-1024. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.1019>
- Ellouze I., Abderrabba M., Sabaou N., Mathieu F., Lebrihi A., and Bouajila J., 2012.** Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: chemical composition and biological activities. *Journal of food science*, 77(9): T173-T180. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02846.x>
- Ellouze W., Hamel C., DePauw R. M., Knox R. E., Cuthbert R. D., and Singh A. K., 2016.** Potential to breed for mycorrhizal association in durum wheat. *Canadian journal of microbiology*, 62(3): 263-271.
- Emmert E. A., and Handelsman J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1): 1-9.
- Escartin I., 2011.** Guide des agrumes. Protection et valorisation du patrimoine végétal. Institut Klorane. CIRAD, Montpellier.
- Ezzahiri B., 2001.** Les maladies du blé: identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. *Transfert de technologie en agriculture*, 77: 1-4.
- Feillet P., 2000.** Le grain de blé: composition et utilisation, Editions Quae.
- Feliachi K., 2000.** Programme de développement de la céréaliculture en Algérie. Actes du 1er Symposium Internat. sur la filière blé, Alger.
- Feng C., Xu F., Li L., Zhang J., Wang J., Li Y., Liu L., Han Z., Shi R., Wan X., and Song Y., 2023.** Biological control of Fusarium crown rot of wheat with *Chaetomium globosum* 12XP1-2-3 and its effects on rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1133025. Doi: 10.3389/fmicb.2023.1133025
- Ferhat M., Meklati B. Y., and Chemat F., 2010.** Citrus d'Algérie: les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions.(Ed) OPU Alger.

- Fernandez M. R., and Chen Y., 2005.** Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Disease*, 89: 164–169.
- Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., and Scheffe, J. J., 2008.** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4): 213-226.
- Fredot E., 2005.** *Connaissance des aliments*, Tec & Doc Lavoisier.
- Freitas J. R. d., and Germida J. J., 1991.** *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian journal of microbiology*, 37(10): 780-784.
- Gaff M., Esteban-Decloux M., and Giampaoli P., 2020.** Bitter orange peel essential oil: a review of the different factors and chemical reactions influencing its composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 35 (3): 247-269.
- Gajera H., Domadiya R., Patel S., Kapopara M., and Golakiya B., 2013.** Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4): 133-142.
- Gallagher L. A., and Manoil C., 2001.** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of bacteriology*, 183(21): 6207-6214.
- Gams W., and Bissett J., 1998.** Morphology and identification of Trichoderma. In *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics (CP Kubicek & GE Harman, eds): 3–34.
- Gärtner B. H., Munich M., Kleijer G., and Mascher F., 2008.** Characterisation of kernel resistance against *Fusarium* infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessments. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 61-68.
- Gate P., 1995.** *Ecophysiologie du blé*. Tec & Doc-Lavoisier.
- Georgieva T., Evstatieva Y., Savov V., Bratkova S., and Nikolova D., 2018.** Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16: 285-292.
- Gianinazzi-Pearson V., and Brechenmacher L., 2004.** Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic cell programme. *Canadian journal of botany*, 82(8): 1228-1234.
- Gilligan C., 1994.** The dynamics of infection by the take-all fungus on seminal roots of wheat: sensitivity analysis of a stochastic simulation model. *New phytologist*, 128(3): 539-553.
- Giordani R., and Kaloustian J., 2006.** Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des m[®] dicaments antifongiques. *Phytothérapie*, 4(3): 121-124.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., and Stewart A., 2012.** Have biopesticides come of age? *Trends in biotechnology*, 30(5): 250-258.
- Glinushkin A., Akimov T., Beloshapkina O., Diuldin M., and Molnár J., 2019.** Fungicidal activity of seed disinfectants against root rot of wheat in various types of soils. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 390(1): 12015.

- Glynn N. C., Hare M. C., Parry D. W., and Edwards S. G., 2005.** Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. *Mycological Research*, 109: 872–880.
- González García V., Onco M. P., and Susan V. R., 2006.** Biology and Systematics of the for genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1): 55-79.
- Goswami R. S., and Kistler H. C., 2004.** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5(6): 515-525.
- Grey W., and Mathre D., 1984.** Reaction of spring barleys to common root rot and its effect on yield components. *Canadian Journal of Plant Science*, 64(2): 245-253. <https://doi.org/10.4141/cjps84-038>
- Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., and Dinooor A., 2001.** Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91(7): 621-627.
- Gull M., and Hafeez F. Y., 2012.** Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. *African Journal of Microbiology Research*, 6(33): 6308-6318.
- Gupta R., Singal R., Shankar A., Kuhad R. C., and Saxena R. K., 1994.** A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3), 255-260.
- Gustafson P., Raskina O., Ma X., and Nevo E., 2009.** Wheat evolution, domestication, and improvement. *Wheat: science and trade*. Wiley, Danvers: 5-30.
- Haj Ammar A., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Romdhane M., and Zagrouba F., 2012.** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(21): 1034-1040.
- Hajlaoui H., Arraouadi S., Aouadi K., Snoussi M., Noumi E., and Kadri A., 2021.** GC-MS profile, α -glucosidase inhibition potential, antibacterial and antioxidant evaluation of peels *Citrus aurantium* (L.), essential oil. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33: 1580-1591. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i60b34781>
- Hamadache A., Abdellaoui Z., and Aknine M., 2002.** Facteurs agrotechniques d'amélioration de la productivité du blé dur en Algérie. Cas de la zone sub-humide. *Recherche Agronomique*, 10: 5-18.
- Handa S., 2008.** An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1: 21-40.
- Hankin L., and Anagnostakis S., 1975.** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3): 597-607.
- Haran S., Schickler H., Oppenheim A., and Chet I., 1996.** Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9): 980-985.
- Haskett T. L., Tkacz A., and Poole P. S., 2021.** Engineering rhizobacteria for sustainable agriculture. *The ISME Journal*, 15(4): 949-964.
- Hernandez-Restrepo M., Groenewald J. Z., Elliott M. L., Canning G., McMillan V. E., and Crous P. W., 2016.** Take-all or nothing. *Studies in Mycology*, 83(1), 19-48.

- Howell C., 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.
- Huisman O., 1982.** Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual review of phytopathology*, 20(1): 303-327.
- Innocenti G., Roberti R., Montanari M., and Zakrisson E., 2003.** Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. *Mycological research*, 107(4): 421-427.
- Iqbal U, and 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.
- Islam M. A., Nain Z., Khasrul Alam M., Akhter Banu N., and Islam Md. R., 2018.** *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. Cucumerinum. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28:90. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>.
- Izquierdo-García L. F., González-Almario A., Cotes A. M., 2020.** *Trichoderma virens* GI006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling *Fusarium* wilt of cape gooseberry. *Scientific Reports*, 10, 6857. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63689-y>.
- Jankiewicz U., and Koltonowicz M., 2012.** The involvement of *Pseudomonas* bacteria in induced systemic resistance in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3): 244-249.
- Jennings P., Coates M. E., Walsh K., Turner J. A., and Nicholson P., 2004.** Determination of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53(5): 643-652.
- Jensen B., Knudsen I. M., and Jensen D. F., 2000.** Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 106(3): 233-242.
- Jiang M. H., Yang L., Zhu L., Piao J. H., and Jiang J. G., 2011.** Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium L.* var. amara. *England Journal of food science*, 76(9): C1219-C1225. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02421.x>
- Jing L., Lei Z., Li L., Xie R., Xi W., Guan Y., and Zhou Z., 2014.** Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(14): 3011-3033. <https://doi.org/10.1021/jf5006148>
- Jourdan E., Ongena M., and Thonart P., 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *BASE*.
- Kamala T., Indira S., 2011.** Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech* 1(4): 217-225.
- Kammoun L. G., Gargouri S., Hajlaoui M. R., and Marrakchi M., 2009.** Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, 157(9), 546-551.

- Kapri A. and Tewari, L., 2010.** Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 787-795.
- Karnwal A., 2009.** Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*: 61-63.
- Karthikeyan V., and Karthikeyan J., 2014.** *Citrus aurantium* (bitter orange): A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *International journal of drug discovery and herbal research*, 4(4): 766-772.
- Kazan K., and Gardiner D. M., 2018.** Fusarium crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal crops: recent progress and future prospects. *Molecular plant pathology*, 19(7): 1547-1562.
- Keijser B. J., Ter Beek A., Rauwerda H., Schuren F., Montijn R., van der Spek H., and Brul S., 2007.** Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *Journal of bacteriology*, 189(9): 3624-3634.
- Khaldia M., Hadjira B., and Merouane A., 2022.** Survey of barley stripe mosaic virus (BSMV) in multiple cereal varieties cultivated in Chlef province, northwest of Algeria. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 34(1): 127-133.
- Khan M. R., Fischer S., Egan D., and Doohan F. M., 2006.** Biological control of Fusarium seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology*, 96(4): 386-394.
- Kim D. S., Cook R. J., and Weller D. M., 1997.** *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87(5): 551-558.
- Kim K. H., Kabir E., Jahan S. A., 2017.** Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*, 575: 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kocić-Tanackov S., and Dimić G., 2013.** Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Metabolism*, 4(5).
- Konuk H. B., and Ergüden B., 2020.** Phenolic–OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. *Folia Microbiologica*, 65(4), 775-783. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00787-4>
- Kour D., Harpreet K., Sofia S., Rabiya T., Mansavi B., Swadha K., Chandresh K., Shafaq R., Ajar N., Yash P., 2023.** Biodiversity and Functional Attributes of Rhizospheric Microbiomes: Potential Tools for Sustainable Agriculture. *Current Microbiology*. 80:192 <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03300-5>
- Krstic D., Djalovic I., Nikezic D., and Bjelic D., 2012.** Aluminium in acid soils: chemistry, toxicity and impact on maize plants. *Food production—approaches, challenges and tasks*, 231-242.
- Krumova K., and Cosa G., 2016.** Overview of reactive oxygen species..
- Kumar K., Amaresan N., Bhagat S., Madhuri K., and 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 S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Kumar S., Kashyap P. L., Singh I., Jasrotia P., and Singh G. P., 2022.** Field screening and identification of stable resistance sources in wheat germplasm against loose smut disease caused by *Ustilago segetum* var. *tritici*. *Journal of Cereal Research*, 14 (1): 76-81. <http://doi.org/10.25174/2582-2675/2022,119668>.
- Kurniati E., Arfarita N., Ima T., Higuchi T., Kanno A., Yamamoto K., And Sekine M., 2014.** Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil. *Journal Of Environmental Sciences*, 26(6): 1223-1231. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60592-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60592-6)
- Kuyper T. W., and Giller K. E., 2011.** Biodiversity and ecosystem functioning below-ground. *Agrobiodiversity Management for Food Security- a critical review*. CABI, Oxfordshire: 134-149.
- Lagrouh F., Dakka N., and Bakri Y., 2017.** The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie medicale*, 27(3): 303-311.
- Lang G., and Buchbauer G., 2012.** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1): 13-39. <https://doi.org/10.1002/ffj.2082>
- Lei Z. H.A.O., and Zhang Y.Q., 2015.** Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(8): 1588-1597.
- Leslie J. F., and Summerell B. A., 2008.** *The Fusarium laboratory manual*, John Wiley & Sons.
- Liu K., McInroy J.A., Hu C.H., and Kloeppel J.W., 2018.** Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Disease*, 102:67-72. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0478-RE>.
- Loper J., and Schroth M., 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4): 386-389.
- Lucas P., Smiley R. W., and Collins H. P., 1993.** Decline of *Rhizoctonia* root rot on wheat in soils infested with *Rhizoctonia solani* AG-8. *Phytopathology*, (USA).
- Lucchesi M. E., 2005.** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).
- Lugtenberg B., and Kamilova F., 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63: 541-556.
- Luo M. C., Yang Z. L., You F. M., Kawahara T., Waines J. G., and Dvorak J., 2007.** The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(6): 947-959.

- Lushchak V. I., 2014.** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224: 164-175.
- Lynch J. M., 1983.** Soil biotechnology: microbiological factors in crop productivity, Blackwell Scientific Publications.
- Macleod K., Rumbold K., and Padayachee K., 2015.** A systems approach to uncover the effects of the PGPR *Pseudomonas koreensis* on the level of drought stress tolerance in *Helianthus annuus*. *Procedia Environmental Sciences*, 29: 262-263.
- Maksoud S., Abdel-Massih R. M., Rajha H. N., Louka N., Chemat F., Barba F. J., and Debs E., 2021.** *Citrus aurantium* L. active constituents, biological effects and extraction methods. an updated review. *Molecules*, 26(19), 5832.
- Markovich N. A., and Kononova G. L., 2003.** Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39: 341-351.
- Marriott P. J., Shellie R., and Cornwell C., 2001.** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of chromatography, A* 936(1-2): 1-22.
- Matny O. N., 2015.** Fusarium head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. *Advances in plants and agriculture research*, 2(1), 00039.
- Matthijs S., Tehrani K. A., Laus G., Jackson R. W., Cooper R. M., and Cornelis P., 2007.** Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti *Pythium* activity. *Environmental Microbiology*, 9(2), 425-434.
- Mavrodi O.V., Walter N., Elateek S., Taylor C.G., and Okubara P.A., 2012.** Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control*, 62(2): 93-102.
- Meena M., Swapnil P., Divyanshu K., Kumar S., Harish Tripathi Y. N., and Upadhyay R. S., 2020.** PGPR mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10): 828-861.
- Mejri H., Khetatfa T., Aidi Wannes W., Smaoui A., and Saidani Tounsi M., 2022.** Histochemistry, chemical composition and antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. essential oil during leaf development. *Journal of Essential Oil Research*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2067255>
- Mesbah A., Boufersaoui A., and Moumen A., 2002.** Contrôle du cycle biologique de *Geotrogus deserticola* (Blanch.), insecte coléoptère ravageur des céréales en Algérie. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 127(2): 137-148.
- Meyer C., and Reusser F., 1967.** A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia*, 23(2): 85-86.
- Meyer S. L., and Roberts D. P., 2002.** Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of nematology*, 34(1): 1.
- Miedaner T., and Voss H. H., 2008.** Effect of dwarfing Rht genes on Fusarium head blight resistance in two sets of near isogenic lines of wheat and check cultivars. *Crop Science*, 48(6), 2115-2122.

- Miller S. H., Browne P., Prigent-Combaret C., Combes-Meynet E., Morrissey J. P., and O'Gara F., 2010.** Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology reports*, 2(3): 403-411.
- Minchev Z., Kostenko O., Soler R., and Pozo M. J., 2021.** Microbial Consortia for Effective Biocontrol of Root and Foliar Diseases in Tomato. *Front. Plant Science*, 12:756368. doi: 10.3389/fpls.2021.756368.
- Moenne-Loccoz Y., Mini A., Richard R., Valente J., Prigent-Combaret C., and Le Gouis J., 2019.** Intéractions racines x rhizobactéries et leur variabilité génétique chez le blé. *Sélectionneur Français*, (70), 87-93.
- Moghaddam M., and Mehdizadeh L., 2017.** Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. *Soft chemistry and food fermentation*, 379-419.
- Mokrani S., Nabti E., 2020.** Heavy metal resistance and bioremediation capacity of rhizospheric strain BioRPaz-3 *Pseudomonas azotoformans* endowed with antifungal activities and multi-abiotic stress tolerance in *in vitro* trials. *SN Applied Sciences*, 2, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03828-2>.
- Mokrani S., Rai A., Belabid L., Cherif A., Cherif H., Mahjoubi M., and Nabti E., 2019.** *Pseudomonas* diversity in western Algeria: role in the stimulation of bean germination and common bean blight biocontrol. *European Journal of Plant Pathology*, 153(2): 397-415.
- Monreal C. M., and Schnitzer M., 2013.** The chemistry and biochemistry of organic components in the soil solutions of wheat rhizospheres. *Advances in agronomy*, 121: 179-251.
- Montesinos E., 2003.** Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 6: 245–252. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0144-x>
- Moraes T. M., Kushima H., Moleiro F. C., Santos R. C., Machado Rocha L.R., Marques M.O., Vilegas W., and Hiruma-Lima C. A., 2009.** Effects of limonene and essential oil from (*Citrus aurantium*) on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 180, 499–505.
- Mottaleb K. A., Kruseman G., and Snapp S., 2022.** Potential impacts of Ukraine-Russia armed conflict on global wheat food security: A quantitative exploration. *Global Food Security*, 35, 100659.
- Mouchacca J., 2005.** Champignons thermophiles : Evolution des concepts taxonomiques. In *J du Rés de Mycol*. Université de Provence et de la Méditerranée, Marseille.
- Moule C., 1971.** Céréales II. Phytotechnique spéciale. Ed. La maison rustique, Paris.
- Mourad A., Mahdy E., Bakheit B. R., Abo-Elwafaa A., and Baenziger P. S., 2018.** Effect of common bunt infection on agronomic traits in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of plant Genetic Breed*, 2: 1-7.
- Moussa T., Almaghrabi O. A., and Abdel-Moneim T. S., 2013.** Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia. *Annals of applied biology*, 163(1): 72-81.

- Moutassem D., Belabid L., Bellik Y., Ziouche S., and Baali F., 2019.** Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55(3): 202-217. <https://doi.org/10.17221/134/2018-pps>
- Nagarajkumar M., Bhaskaran R., and Velazhahan R., 2004.** Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, 159(1): 73-81.
- Naik P. R., and Sakthivel N., 2006.** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology*, 157(6): 538-546.
- Nair A., Juwarkar A., and Singh S., 2007.** Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180(1): 199-212.
- Neal A. L., Ahmad S., Gordon-Weeks R., and Ton J., 2012.** Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PloS one*, 7(4): e35498.
- Nelson P. E., Toussoun T. A., and Marasas W. F. O., 1983.** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification.
- Nesbitt M., 2001.** Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence. *Wheat taxonomy: the legacy of John Percival*.
- Newton A. C., Fitt B. D., Atkins S. D., Walters D. R., and Daniell T. J., 2010.** Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in microbiology*, 18(8): 365-373.
- Nicholson W. L., 2002.** Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 410-416.
- O'Mara S. P., Broz K., Boenisch M., Zhong Z., Dong Y., and Kistler H. C., 2020.** The *Fusarium graminearum* t-SNARE Sso2 is involved in growth, defense, and DON accumulation and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(7), 888-901. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-20-0012-r>
- Ortuño A., Díaz L., Alvarez N., Porrás I., García-Lidón A., and Del Río J., 2011.** Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different *Citrus* species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 125(1), 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.012>
- Osborne L. E., and Stein J. M., 2007.** Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International journal of food microbiology*, 119(1-2): 103-108.
- O'sullivan D. J., and O'Gara F., 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4): 662-676.
- Ouedrhiria W., Bouhdida S., Balouria M., El Ouali Lalamib A., Mojac S., Ouazzani Chahdid F. and Greche H., 2015.** Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1): 78-84

- Ouffroukh A., Khelifi D., and Dehimat L., 2011.** Contribution à l'étude des maladies foliaires des céréales "approche à l'étude épidémiologique et identification de la jaunisse nanisante de l'orge dans les céréales d'hiver dans les régions de l'est d'Algérie". Sciences & Technologie, N°33: 53-61.
- Ouhaibi-Ben Abdeljalil N., Vallance J., Gerbore J., Yacoub A., Daami-Remadi M., and Rey P., 2021.** Combining potential oomycete and bacterial biocontrol agents as a tool to fight tomato Rhizoctonia root. Biological Control, 155:104521. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104521>.
- Owlia P., Sadari H., Rasouli I., and Sefidkon F., 2009.** Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8 (2):107-114.
- Parry D., Jenkinson P., and Mcleod L., 1995.** Fusarium Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals - a Review ». Plant Pathology, 44(2): 207-238.
- Pavlova A., Leontieva M. R., Smirnova T. A., Kolomeitseva G. L., Netrusov A. I., and Tsavkelova E. A., 2017.** Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. Journal of applied microbiology, 123(1): 217-232.
- Peix A., Ramírez-Bahena M. H., and Velázquez E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection, genetics and evolution, 9(6): 1132-1147.
- Pellan L., Dieye C. A. T., Durand N., Fontana A., Strub C., and Schorr-Galindo S., 2021.** Biocontrol agents: Toolbox for the Screening of weapons against mycotoxigenic *Fusarium*. Journal of Fungi, 7(06): 446.
- Periyannayagam K., Dhanalakshmi S., and Karthikeyan V., 2013.** Pharmacognostical, SEM and EDAX profile of the leaves of *Citrus aurantium L.*(Rutaceae). Innovare Journal of Health Sciences, 1(2): 1-5.
- Pineda-Mendoza D. Y., Gonzalez-Mancilla A., Almaraz J. J., Rodríguez-Guzman M. P., García-Barradas O., and Argumedo-Delira R., 2018.** Characterization of the antifungal activity of three rhizobacterial strains against *Rhizoctonia solani*. Spanish Journal of Agricultural Research, 16(4): 1011. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018164-13334>.
- Poole G. J., Smiley R. W., Walker C., Huggins D., Rupp R., Abatzoglou J., and Paulitz T. C., 2013.** Effect of climate on the distribution of *Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. Phytopathology, 103(11): 1130-1140.
- Pouleur S., and Comeau A., 2011.** Effet des rotations et des travaux de sol sur les maladies des racines de différentes cultures commerciales, phases I et II. Rapport de recherche présenté à La Fédération des producteurs de cultures commerciales du Québec.
- Prasanna R., Joshi M., Rana A., and Nain L., 2010.** Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. Polish Journal of Microbiology, 59(2), 99.

- Qian H., Du J., Chi M., Sun X., Liang W., Huang J., and Li B., 2018.** The Y137H mutation in the cytochrome P450 FgCYP51B protein confers reduced sensitivity to tebuconazole in *Fusarium graminearum*. *Pest management science*, 74(6): 1472-1477.
- Qin J., Wu M., and Zhou S., 2020.** FgEaf6 regulates virulence, asexual/sexual development and conidial septation in *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 66(3), 517-529. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01043-0>
- Qualhato T. F., Lopes F. A. C., Steindorf, A. S., Brandao R. S., Jesuino R. S. A., and Ulhoa C. J., 2013.** Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 35(9): 1461-1468.
- Quan C. S., Wang X., and Fan S. D., 2011.** Antifungal compounds of plant growth promoting rhizobacteria and its action mode. *Plant growth and health promoting bacteria*, 117-156.
- Raaijmakers J., Paulitz T., Steinberg C., Alabouvette C., and Moënne-Loccoz Y., 2009.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321: 341-361.
- Ramon-Laca L., 2003.** The introduction of cultivated citrus to Europe via Northern Africa and the Iberian Peninsula. *Economic Botany*, 57(4): 502-514.
- Ratti C., Budge G., Ward L., Clover G., Rubies-Autonell C., and Henry C., 2004.** Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of virological methods*, 122(1): 95-103.
- Rayhane H., Josiane M., Gregoria M., Yiannis K., Nathalie D., Ahmed M., and Sevastianos R., 2019.** From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of environmental management*, 252: 109496.
- Reyes-Jurado F., Navarro-Cruz A. R., Ochoa-Velasco C. E., Palou E., López-Malo A., and Ávila-Sosa R., 2020.** Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(10): 1641-1650. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1586641>
- Riaz U., Murtaza G., Anum W., Samreen T., Sarfraz M., and Nazir M. Z., 2021.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. *Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health*: 181-196.
- Roberti R., Veronesi A., Cesari A., Cascone A., Di Bernardino I., Bertini L., and Caruso C., 2008.** Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 175(3): 339-347.
- Robin D. C., and Marchand P. A., 2019.** Evolution of the biocontrol active substances in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest management science*, 75(4): 950-958.
- Robinson-Boyer L., Jeger M. J., Xu X. M., and Jeffries P., 2009.** Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology*, 19(10): 1051-1065.

- Rodgers P. B., 1993.** Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science*, 39(2): 117-129.
- Rodrigues M. L., 2018.** The multifunctional fungal ergosterol. *MBio*, 9(5), e01755-18.
- Rouxel F., 2001.** Le sol, un milieu complexe à appréhender: Agents phytopathogènes du sol. *Phytoma-La Défense des végétaux*, (542): 10-12.
- Ruberto G., and Baratta M. T., 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69(2), 167-174. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00247-2)
- Sah S., Singh N., and Singh R., 2017.** Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas siderophore*. *3 Biotech*, 7(2): 1-7.
- Salis L., Goula M., Izquierdo J., Gordún E., and Palumbo J., 2013.** Population density and distribution of wheat bugs infesting durum wheat in Sardinia, Italy. *Journal of Insect Science*, 13(1).
- Salwan R., Rialch N., and Sharma V., 2019.** Bioactive volatile metabolites of *Trichoderma* : An overview. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*, 87-111.
- Sang M. K., Kim E. N., Han G. D., Kwack M. S0, and Kim J. Y. C., 2014.** Priming-mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology*, 104:834–842. <https://doi.org/10.1094/phyto-11-13-0305-r>.
- Sarrocco S., Matarese F., Moncini L., Pachetti G., Ritieni A., Moretti A., and Vannacci G., 2013.** Biocontrol of fusarium head blight by spike application of *Trichoderma gamsii*. *Journal of Plant Pathology*, 95(1).
- Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Theriou K., and Therios I., 2013.** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647. <https://doi.org/10.3390/molecules180910639>
- Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., and Migheli Q., 2013.** *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat." *Molecular plant pathology*, 14(4): 323-341.
- Schwarzott D., Walker C., and Schüßler A., 2001.** Glomus, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(2): 190-197.
- Segarra G., Casanova E., Avilés M., and Trillas I., 2010.** *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial ecology*, 59(1): 141-149.
- Sehrawat A., Sindhu S. S., and Glick B. R., 2022.** Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32(1): 15-38.
- Seifert K., 1996.** Fuskey: Fusarium interactive key, Agriculture and Agri-Food Canada.
- Sempere Ferre F., and Santamarina M. P., 2010. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of microbiology*, 60(2): 335-340.

- Sharma S., Rashmi D., and Patel S. I., 2022.** Symptomatology Study in Different Wheat Varieties in Response to *Puccinia graminis tritici*. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 15(3): 693-698.
- Sharon N., and Lis H., 2004.** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, 14(11): 53R-62R.
- Shikur Gebremariam E., Sharma-Poudyal D., and Paulitz T. C., 2018.** Identity and pathogenicity of Fusarium species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 150: 387–399.
- Sinsabaugh R. L., Gallo M. E., Lauber C., Waldrop M. P., and Zak D. R., 2005.** Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. Biogeochemistry, 75: 201-215.
- Smiley R. W., Cook R. J., and Paulitz T., 2002.** Seed treatments for small grain cereals.
- Smiley R. W., Gourlie J. A., Easley S. A., Patterson L. M., and Whittaker R. G., 2005.** Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. Plant Disease, 89(6): 595-604.
- Soltner P., 2005.** Les bases de la production végétales : La plante et son amélioration. 4èmeEd. Collection et Techniques Agricoles, 248p.
- Sood M., Kapoor D., Kumar V., Sheteiwy M. S., Ramakrishnan M., Landi M., and Sharma A., 2020.** *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. Plants, 9(6): 762.
- Soylu E., Soylu S., and Kurt S., 2006.** Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161(2), 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Sreenivasaprasad S., and Sreenivasaprasad M., 1993.** Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. International Journal of Pest Management, 39(2): 167-171.
- Stack R., 1980.** Disease progression in common root rot of spring wheat and barley. Canadian journal of plant pathology, 2(4): 187-193.
- Steinberg G., and Gurr S. J., 2020.** Fungi, fungicide discovery and global food security. Fungal Genetics and Biology, 144: 103476.
- Stephane F. F. Y., and Jules B. J., 2020.** Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils. Essential Oils-Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications, IntechOpen London, UK.
- Stiles C. M., Datnoff L. E., and Rayside P. A., 2007.** *Pythium* spp. isolated from bermudagrass during overseed transitions in Florida and pathogenicity of *Pythium irregulare* on *Poa trivialis*. Plant disease, 91(10): 1237-1244.
- Sukul P., Kumar J., Rani A., Abdillahi A. M., Rakesh R. B., and Kumar M. H., 2021.** Functioning of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their mode of actions: An overview from chemistry point of view. Plant Archives, 21(1): 628-634.
- Sulochana M. B., Jayachandra S. Y., Kumar S., and Dayanand A., 2014.** Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. Journal of Basic Microbiology, 54(5): 418-424.

- Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Sulciner D. J., Gutkind S., IRANI K. J., and Finkel T., 1996.** Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac 1. *Biochemical Journal*, 318(2): 379-382.
- Sutton J. C., Sopher C. R., Owen-Going T. N., Liu W., Grodzinski B., Hall J. C., and Benchimol R. L., 2006.** Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica*, 32(4): 307-321.
- Szkop M., and Bielawski W., 2013.** A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(3): 683-691.
- Tedersoo L., Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Yorou N. S., Wijesundera R., and Abarenkov K., 2014.** Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213): 1256688.
- Touati-Hattab S., Barreau C., Verdal-Bonnin M. N., Chereau S., Richard-Forget F., Hadjout S., Mekliche L., and Bouznad Z., 2016.** Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-016-0869-y.
- Touhami O., and Douira A., 2019.** Study of the fungal complex responsible for root rot of wheat and barley in the north-west of Morocco. *Plant Archives*, 19(2): 2143-2157.
- Trabelsi D., Hamdane A. M., Said M. B., and Abderraba M., 2016.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves and peels of Tunisian *Citrus aurantium* against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7): 1660-1674. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2016.1141069>
- Tunali B., Nicol J. M., Hodson Z., Uçkun O., Büyük D., Erdurmuş D., 2008.** Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9): 1299-1306. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-9-1299>
- Turrens J. F., 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2): 335-344.
- US Food and Drug Administration, 2010.** Guidance for industry and FDA: advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-products used for animal feed, US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Valade R., 2014.** Fusariose. Mieux comprendre *Microdochium*. *Perspectives agricoles*. N° 416: 70-72
- van Egmond H. P., Schothorst R. C., and Jonker M. A., 2007.** Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1): 147-157.
- Van Veen J., and Kuikman P., 1990.** Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms. *Biogeochemistry*, 11(3): 213-233.
- Vand S. H., and Abdullah T. L., 2012.** Identification and introduction of thornless lime (*Citrus aurantifolia*) in Hormozgan, Iran. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(11): 3670-3673.

- Vargas W. A., Mandawe J. C., and Kenerley C. M., 2009.** Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant physiology*, 151(2): 792-808.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F., and van Sinderen D., 2007.** Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3): 495-548.
- Verhagen B. W., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M., and Aziz A., 2010.** *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 61(1): 249-260.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. N., and Valero J. R., 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1): 1-20.
- Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E. L., Lorito M., and Sivasithamparam K., 2006.** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in applied microbiology*, 43(2): 143-148.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Barbetti M. J., Li H., and 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.
- Vyas P., Chauhan A., and Gulati A., 2007.** Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological research*, 111(8): 931-938.
- Walter S., Nicholson P., and Doohan F. M., 2010.** Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New phytologist*, 185(1): 54-66.
- Wan J., Zhong S., Schwarz P., Chen B., and Rao J., 2019.** Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food chemistry*, 291, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.032>
- Willyerd K., Li C., Madden L. V., Bradley C. A., Bergstrom G. C., Sweets L. E., and Paul P. A., 2012.** Efficacy and stability of integrating fungicide and cultivar resistance to manage *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. *Plant Disease*, 96(7): 957-967.
- Wilson W., Dahl B., and Nganje W., 2018.** Economic costs of *Fusarium* Head Blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal*, 11(2): 291-302.
- Xiao-Yan S., Qing-Tao S., Shu-Tao X., Xiu-Lan C., Cai-Yun S., and Yu-Zhong Z., 2006.** Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology letters*, 260(1): 119-125.
- Xu X. M., Nicholson P., Thomsett M. A., Simpson D., Cooke B. M., Doohan F. M., and Edwards S. G., 2008.** Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*: 98(1), 69-78.
- Xu X., and Nicholson P., 2009.** Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual review of phytopathology*, 47: 83-103.

- Xue A. G., 2003.** Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology*, 93(3): 329-335.
- Yadav R., and Agarwala M., 2011.** Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 3(12). <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.1.16>
- Yildiz E., Kaplankiran M., Demirköser T. H., and Toplu C., 2013.** Seasonal Patterns of Carbohydrates in Mandarin cvs.'Fremont','Nova'and'Robinson'on Different Rootstocks. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1): 255-262. <https://doi.org/10.15835/nbha4118937>
- Yu L., Chen M., Liu J., Huang X., He W., Qing Z., and Zeng J., 2020.** Systematic detection and identification of bioactive ingredients from *Citrus aurantium* L. var. amara using HPLC-Q-TOF-MS combined with a screening method. *Molecules*, 25(2), 357. <https://doi.org/10.3390/molecules25020357>
- Zabka M., and Pavela R., 2018.** Review Chapter: Fusarium genus and essential oils. In *Natural Antimicrobial Agents*, (pp. 95-120) : Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_5
- Zaim S., Bekkar A. A., and Belabid L., 2018.** Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection science*, 51(3-4):217–226.
- Zeilinger S., and Omann M., 2007.** Trichoderma biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene regulation and systems biology*, 1: GRSB. S397.
- Zhang A., Yang X., Lu J., Song F., Sun J., Wang and Zhao B., 2021.** OsIAA20, an Aux/IAA protein, mediates abiotic stress tolerance in rice through an ABA pathway. *Plant Science*, 308, 110903.
- Zhang X., Li Z. Y., Ma Y. L., and Ma S. C., 2015.** Progress in research of traditional Chinese medicine *Citrus aurantium*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 40(2): 185-190.
- Zhao P., Ren A., Dong P., Sheng Y., and Li D., 2018.** Antimicrobial peptaibols, trichokonins, inhibit mycelial growth and sporulation and induce cell apoptosis in the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(4): 396-403.
- Zohary D., Hopf M., and Weiss E., 2012.** Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin, Oxford University Press on Demand.

Annexes

ANNEXE 1

Composition des différents milieux de cultures utilisés

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rapilly, 1968)

Pomme de terre (200 g)

Glucose (20 g)

Agar (20 g)

Eau distillée (1 L)

pH : 7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Milieu Czapek

Nitrate de sodium NaNO_3 (2g)

Chlorure de potassium KCl (0.5g)

Sulfate de magnésium MgSO_4 (0.5g)

Sulfate ferreux FeSO_4 (10g)

Phosphate de potassium KH_2PO_4 (30g)

Agar (20g)

Eau distillée (1 L)

pH : 6.8

Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes

Milieu SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar) (Gerlach and Nirenberg 1982)

KNO_3 (1,0 g)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g)

KCl (0,5 g)

Glucose (0,2 g)

Saccharose (0,2 g)

Agar (20,0 g)

Eau distillée (1 L)

Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes

Milieu Pikovasky solide de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948)

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5g)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5g)

KCl (0,2g)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1g)

glucose (10g)

FeSO_4 (0,005g)

Bleu bromophénol (0,25g)

Agar (15g)

Eau distillée (1L)

pH : 7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

ANNEXE 1

Milieu Trypticase soja additionné de glycine

Glycine (4,4 g)
Tryptic soy broth (3 g)
Agar (20g)
Eau distillée (1L)
pH : 7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

- Solution de picrate de sodium : cette solution a couleur jaune contenant (2,5g/L) d'acide picrique et (12,5g/L) de carbonate de calcium.

Milieu de Luria-Bertani enrichi avec du tryptophane (LBT) (Bric *et al.*, (1991)

L-tryptophane (1,02 g)
Tryptone (10 g)
Extrait de levure (5g)
NaCl (5 g)
Agar (20g)
Eau distillée (1L)
pH : 7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

- Solution de Salkowski est composée de 2% de FeCl₃ (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique

Milieu minimal utilisé pour la production de chitinase (Kamala et Indira Devi, 2011)

Glucose (5 g)
Na₂HPO₄ (3g)
NH₄Cl (1g)
NaCl (0,5 g)
CaCl₂ (0,1)
MgSO₄ (0,12g)
Chitine colloïdale 1%
Agar (20g)
Eau distillée (1L)
pH : 4,7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Milieu utilisé pour la production de protéase (Berg *et al.*, 2002)

Lait écrémé (non gras) (300 mL)
Agar (20 g)
Eau distillée (1L)

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

ANNEXE 1

Milieu utilisé pour la production d'amylase (Abe *et al.*, 2015)

Extrait de levure (3 g)

Peptone (5 g)

Amidon soluble (2 g)

Agar (15 g)

Eau distillée (1L)

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Milieu utilisé pour la production de lipase (Abe *et al.*, 2015)

Tween 20 (10 mL)

Peptone (10 g)

NaCl (5 g)

CaCl₂·2H₂O (0,1 g)

Agar (17 g)

Eau distillée (1L)

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

Milieu succinate (SSM)

K₂HPO₄ (6g)

KH₂PO₄ (3g)

(NH₄)₂SO₄ (1g)

MgSO₄ 7H₂O (0,2g)

Acide succinique (4g)

Eau distillée (1000ml)

pH : 7

Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes

ANNEXE 2

Classification des champignons détectés

Genre	Phylum	Ordre	Famille
<i>Fusarium</i>	Ascomycota	Hypocréales	Nectriaceae
<i>Alternaria</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Penicillium</i>	Ascomycota	Eurotiales	Aspergillaceae
<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	Eurotiales	Aspergillaceae
<i>Rhizoctonia</i>	Basidiomycota	Cantharellales	Ceratobasidiaceae
<i>Trichotecium</i>	Ascomycota	Hypocreales	Myrotheciomycetaceae
<i>Ulocladium</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Stemphylium</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Mucor</i>	Zygomycota	Mucorales	Mucoraceae
<i>Rhizopus</i>	Zygomycota	Mucorales	Rhizopodaceae
<i>Bipolaris</i>	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Pythium</i>	Oomycota	Ascomycota	Pythiaceae
<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae
<i>Chaetomium</i>	Ascomycota	Sordariales	Chaetomiaceae
<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	Cladosporiales	Cladosporiaceae

ANNEXE 3

Séquences des gènes ITS de *Fusarium graminearum* et *Fusarium pseudograminearum*

Fusarium graminearum isolate F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: ON685926.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS ON685926 338 bp DNA linear PLN 12-JUN-2022
DEFINITION *Fusarium graminearum* isolate F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION ON685926
VERSION ON685926.1
KEYWORDS .
SOURCE *Fusarium graminearum* (Gibberella zeae)
ORGANISM [Fusarium graminearum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; *Fusarium*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 338)
AUTHORS [Makhlouf,Ke. and Boungab,K.](#)
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-JUN-2022) Agronomy, university mustapha stambouli of Mascara, Mascara, Mascara 29000, Algeria

F10 ITS (*F. graminearum*) :

```
AAGGGACGGCCCCGCCGAGGAACCCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAACAA  
ATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG  
TATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTG  
CAGTCCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACAC  
ATCGTT
```

Fusarium pseudograminearum isolate F4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: ON687723.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS ON687723 347 bp DNA linear PLN 12-JUN-2022
DEFINITION *Fusarium pseudograminearum* isolate F4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION ON687723
VERSION ON687723.1
KEYWORDS .
SOURCE *Fusarium pseudograminearum*
ORGANISM [Fusarium pseudograminearum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; *Fusarium*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 347)
AUTHORS [Makhlouf,Ke. and Boungab,K.](#)
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-JUN-2022) Agronomy, university mustapha stambouli of Mascara, Mascara, Mascara 29000, Algeria

F4 ITS (*F. pseudograminearum*) :

```
GCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCCGCCGAGGAACCCCAAACCTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGA  
GTATAAAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTG  
GTGTTGGGAGCTGCGTCCGCGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTA  
GTAATTTACACATCGT
```

ANNEXE 4

Séquences des gènes ITS et EF de *Trichoderma longibrachiatum*

LOCUS OQ976976 558 bp DNA linear PLN 18-MAY-2023
DEFINITION *Trichoderma longibrachiatum* strain T4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION OQ976976
VERSION OQ976976.1
KEYWORDS .
SOURCE *Trichoderma longibrachiatum*
ORGANISM *Trichoderma longibrachiatum*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 558)
AUTHORS Makhlouf,Ke. and Boungab,K.
TITLE Harnessing the Biocontrol Potential of *Trichoderma longibrachiatum* and *Pythium lycopersicum* for Sustainable Management of *Fusarium pseudograminearum* in Wheat
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 558)
AUTHORS Makhlouf,Ke. and Boungab,K.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-MAY-2023) Agronomy, university mustapha stambouli of Mascara, Mascara, Mascara 29000, Algeria

T4 ITS (*T. longibrachiatum*) :

```
AGTTTGGGGTGTTTTACGGCTGTGGCCGCGCCGCGCTCCCGGTGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCA  
GGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGGGGCGGCCCGGTGAGGGGCCGATCCCCAAC  
GCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACT  
GGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC  
ATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTC  
GAGACGCCCGCTAGGGTCGCCGAGAAAGGCTCAGAGCAAAAATAAAACAGAGCCGCGACGGGAG  
CCGCGACGGAGAGAAAAAGAGTTTGGAGTTGGTCTCCGGCGGGCGCCATGGGATCCGGGGCTG  
CGACGCGCCCGGGGCAAGAGAATCCCGCCGAGGCAACAGATTGGTAACGTTACATTGGGGTTTG  
GGAGTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCAGG
```

T4 EF (*T. longibrachiatum*) :

```
GTCTGTCAGAGGGCATTAGTATGTTGTTGTGGCGATGATGCAATGAGTGCACGGGATCAAACATAC  
CAATGACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGGGCAATGTCGATGGTGATACCAC  
GCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCACGCTACTTGAAGGAACCCCTGCCGAGTTCGG  
CGGCTTCTGTTGAGGGGAAAATGATTAGCATTGCTGCGCAGACTGTTGGAAGGTTGATGACGCAA  
GCGCAAAGGTGTTGGAGACGAGAGCAGAGGGCGGCAGAGGATAGTGGTTGCTGGAGGTGCATC  
CCCCTAAAACCCGAAACGCAACAAAAAAATTTGCGTCCGCCAAAGGAGGGGTAGGAGAAAGC  
GGGGTGGTGAAAAAAAGATGTTGGGCAGAGGCACAGGAAATCGTCCGAAAATTGAAGGGATCTC  
AAGCTTACCTTCTCGAACTTCTCAATG
```

ANNEXE 5

Analyses statistiques

Source : préparé par le chercheur en utilisant les résultats de SPSS (Version 26)

Tableau : Analyse de la variance du test de pathogénicité de *Fusarium* spp.

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergruppes	45839,438	35	1309,698	95,331	,000
Intragruppes	989,187	72	13,738		
Total	46828,604	107			

Tableau : Analyse de la variance du test de l'effet des deux souches antagonistes sur le développement de la maladie causée par *Fusarium graminearum in vivo*

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
severité	Intergruppes	3424,067	3	1141,356	191,964	,000
	Intragruppes	47,565	8	5,946		
	Total	3471,632	11			
reduction	Intergruppes	10395,000	3	3465,000	295,191	,000
	Intragruppes	93,905	8	11,738		
	Total	10488,905	11			

Tableau : Analyse de la variance du test de l'effet des deux souches antagonistes sur le développement de la maladie causée par *Fusarium pseudograminearum in vivo*

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
severité	Intergruppes	7914,591	3	2638,197	386,382	,000
	Intragruppes	54,624	8	6,828		
	Total	7969,215	11			
reduction	Intergruppes	10498,767	3	3499,589	497,314	,000
	Intragruppes	56,296	8	7,037		
	Total	10555,062	11			

Tableau : Analyse de la variance du test de l'effet des deux souches antagonistes sur les paramètres de croissance

Longueur de la tige

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	1547,104	12	128,925	59,064	,000
Intragroupes	56,753	26	2,183		
Total	1603,857	38			

Longueur des racines

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	483,644	12	40,304	24,060	,000
Intragroupes	43,553	26	1,675		
Total	527,197	38			

Poids frais des tiges

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	36,654	12	3,055	28,443	,000
Intragroupes	2,792	26	,107		
Total	39,447	38			

Poids frais des racines

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	10,773	12	,898	6,819	,000
Intragroupes	3,423	26	,132		
Total	14,196	38			

Poids sec des tiges

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	3,540	12	,295	56,850	,000
Intragroupes	,135	26	,005		
Total	3,675	38			

Poids sec des racines

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	,297	12	,025	8,568	,000
Intragroupes	,075	26	,003		
Total	,373	38			

Tableau : Analyse de la variance de l'effet de HE sur l'émergence et le développement de coléoptile et coléorhize

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
emergence	Intergroupes	5420,833	5	1084,167	31,224	,000
	Intragroupes	625,000	18	34,722		
	Total	6045,833	23			
coléoptile	Intergroupes	168,498	5	33,700	233,137	,000
	Intragroupes	2,602	18	,145		
	Total	171,100	23			
coléorhize	Intergroupes	229,110	5	45,822	144,448	,000
	Intragroupes	5,710	18	,317		
	Total	234,820	23			

ANNEXE 6

Identification des publications

Intitulé de la revue : Archives of Phytopathology and Plant Protection

ISSN : 0323-5408 eISSN : 1477-2906

Url de la revue/ article : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03235408.2023.2178056>

Catégorisation de la revue : catégorie B

Intitulé de la publication: Synergistic effect of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* in management of Fusarium crown rot of wheat

Intitulé de la revue : Pakistan Journal of Phytopathology

ISSN : 1019-763X eISSN : 2305-0284

Url de la revue/ article : <https://www.pjp.pakps.com/index.php/PJP/article/view/798>

Catégorisation de la revue : catégorie B

Intitulé de la publication: Antifungal activity of *Citrus aurantium* L. essential oil against crown rot of wheat caused by *Fusarium graminearum*

Publications



Synergistic effect of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* in management of Fusarium crown rot of wheat

Kamel Eddine Makhlouf, Karima Boungab & Slimane Mokrani

To cite this article: Kamel Eddine Makhlouf, Karima Boungab & Slimane Mokrani (2023): Synergistic effect of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* in management of Fusarium crown rot of wheat, Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: [10.1080/03235408.2023.2178056](https://doi.org/10.1080/03235408.2023.2178056)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03235408.2023.2178056>



Published online: 10 Feb 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Synergistic effect of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* in management of *Fusarium* crown rot of wheat

Kamel Eddine Makhoul^a , Karima Boungab^a and Slimane Mokrani^{a,b}

^aDepartment of Agronomy Faculty of Natural Science and Life, Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics, University of Mascara, Mascara, Algeria; ^bLaboratory of Renewable Energies Management, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Bejaia, Bejaia, Algeria

ABSTRACT

Fusarium crown rot is the major soil-borne disease of wheat and occurs throughout cereal producing areas of the world including Algeria. This study evaluated 10 bacterial and fungal strains, originating from Algeria as potential biological control agents against three soil-borne phytopathogens responsible for *Fusarium* crown rot of wheat (*Fusarium pseudograminearum* ON687723, *F. graminearum* ON685926 and *F. equiseti* MK361175). All beneficial microbial strains tested inhibited the pathogens mycelial growth *in vitro*. Isolate P58 (*Pseudomonas azotoformans* NR_113600) was the most effective antagonist against all the test pathogens in direct confrontation assay, and exhibited average of 70% growth inhibition of *Fusarium* spp. Isolate T2 (*Trichoderma gamsii* MK361138) proved suppression efficacy in the range of 61.87 to 71.64% toward plant pathogens. Under greenhouse conditions, wheat seeds treated with isolate P58 and T2 separately reduced the severity of crown rot disease significantly and improved the growth parameters of wheat seedlings as compared to control. The combined use of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* increased the effectiveness of the antagonists and promoted wheat growth. Thus, it can be concluded that these strains can be utilized as a biocontrol agent for management of soilborne cereal pathogens.

ARTICLE HISTORY

Received 21 August 2022
Accepted 3 February 2023

KEYWORDS

Wheat-biocontrol;
Trichoderma;
rhizobacteria;
Fusarium crown rot

1. Introduction

Wheat (*Triticum* spp.) is one of the most important cereal crops and major source of protein worldwide (Zhen et al. 2020). In Algeria, it is

CONTACT Kamel Eddine Makhoul  kamel.makhoul@univ-mascara.dz  Department of Agronomy Faculty of Natural Science and Life, Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics, University of Mascara, Mascara, Algeria

the main grain crop and occupies a strategic place in national economy (Derbal et al. 2015; Bouanaka et al. 2021). Among common wheat, the main cultivated species are bread wheat (*T. aestivum* L.) and durum wheat (*T. durum* Desf.). Wheat is widely used for human food particularly, in production of bread, couscous, traditional cake and other Algerian meals and for animal nutrition (Kezih et al. 2014). However, this cropping is challenged by several soil-borne diseases. Fusarium crown rot (FCR) is a major disease of wheat in Algeria leading to heavy yield losses in most wheat-growing areas (Abdallah-Nekache et al. 2019; Bencheikh et al. 2020).

The disease has been attributed by different *Fusarium* species. The most important species associated with this disease in Algeria are *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *Fusarium equiseti*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum* and *F. cerealis* (Abdallah-Nekache et al. 2019; Bencheikh et al. 2020; Bouanaka et al. 2022).

The fungus attacks basal tissue of the stem and root causing necrotic lesions in the crown. This disease can also lead to lowering of seedling emergence and plant stands due to post germination death (Mnasri et al. 2017; Abdallah-Nekache et al. 2019; Bencheikh et al. 2020).

In addition to substantial losses in yield, *Fusarium* species, particularly *F. culmorum* and *F. graminearum* are known to produce zearalenone (ZEA), and type B trichothecenes (TCTB) mycotoxins that represents a risk to animal and human health (Touati-Hattab et al. 2016; Chtioui et al. 2022).

Sustainable wheat production is essential in order to accomplish the demand of wheat of the country in future and is impossible without diseases management (Afzal et al. 2022). Indeed, Fusarium crown rot was mainly controlled using chemical fungicides; however, these synthetic approaches resulted in adverse effects on soil microbial biodiversity, deterioration of the environment, development of resistant pathogen strains, in addition to the harmful effects on humans and animals (Ishii and Hollomon 2015; Zin and Badaluddin 2020). Hence, there is an urgent need to identify alternative methods for disease management that are more environments friendly.

Biological control by means of specific organisms or natural products in agroecosystems has been previously explored as an alternative strategy for reducing the use of chemicals pesticides in sustainable agriculture. Microbial antagonist strains are known for their ability to produce a wide range of secondary metabolites exhibiting effective antagonistic activities toward plant pathogens, and have attracted more attention in agro-biotechnological applications.

Species belonging to *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* are frequently used as antagonist agents, since they produce essential

phytohormones, support plant defense against phytopathogens and inducing the host systemic resistance (Islam et al. 2018; Iqbal and Mukhtar 2020).

The aim of the study is to investigate the ability of several isolates belonging to Rhizobacteria and *Trichoderma* spp. to reduce the mycelial growth of *Fusarium* spp. *in vitro* and to evaluate the single and combined application of the most potent antagonistic agents (*Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii*) in controlling Fusarium crown rot (FCR) in wheat, and its inoculation effect on the growth parameters of wheat seedlings under greenhouse conditions.

2. Material and methods

2.1. Pathogenic fungi

Fusarium spp. isolates used in this study, *Fusarium pseudograminearum* (ON687723), *F. graminearum* (ON685926) and *F. equisti* (MK361175) coded as Fps, Fgr and Feq, respectively) were isolated from wheat seedlings with typical symptoms of crown rot disease collected from several regions located in Northwestern of Algeria.

Morphological characteristics were used to identify the three pathogenic fungi, which were then confirmed by molecular techniques.

The target fungi were cultured on potato dextrose agar (PDA) medium, and their pathogenicity was confirmed.

2.2. Microbial antagonist strains

Nine rhizobacterial strains belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* were obtained from the Laboratory Research on Biological Systems and Geomatics, Mascara University, Algeria (Table 1). All strains were stored at -80°C in tryptic soy broth (TSB) with 20% (v/v) glycerol for long-term use.

Trichoderma gamsii isolate used in this study was obtained by Dr. Rajaa Chamekh, Faculty of Science of Nature and Life, Mascara University, Algeria. The antagonistic fungal was isolated from the soil of cereal crops located in the Northwestern of Algeria (Chamekh et al. 2019). This strain has been previously characterized as highly antagonistic isolate against some *Fusarium* species (Unpublished data).

2.3. Screening of antagonistic strains against *Fusarium* spp

2.3.1. Dual culture assay

The antagonism of the rhizobacterial strains was checked with respect to the ability to suppress fungal growth using 24h old culture maintained

Table 1. Antagonists species used in this study.

Strains	Species	GPS coordinate	Accession number	Similarity %
P4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	35°24'N 0°19'E	NR_117946	99
P8	<i>Bacillus subtilis</i>	35°24'N 0°19'E	NR_112116.2	99
P15	<i>Bacillus subtilis</i>	35°18'N 0°04'E	NR_113265	99
P25	<i>Pseudomonas agarici</i>	35°13'N 0°37'W	NR_036998	99
P56	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	35°42'N 0°31'E	NR_025881	94
P57	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	35°42'N 0°31'E	NR_114226	99
P58	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	35°42'N 0°31'E	NR_113600	99
P64	<i>Pseudomonas monteilii</i>	35°27'N 0°14'E	NR_114224	99
P71	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	35°35'N 0°03'E	NR_114225	99
T2	<i>Trichoderma gamsii</i>	35°31'N 0°47'E	MK361138	100

in TSB medium. Antifungal bioassay was performed with the dual culture according to Pineda-Mendoza et al. (2018). Each bacterial isolate was streaked in lines on PDA medium. After 24 h, an agar disc of a seven-day old culture of *Fusarium spp.* was inoculated 5 cm away from the bacterial culture.

In another hand, confrontations between the biocontrol agent *Trichoderma gamsii* and the fungal pathogens were carried out according to Bouanaka et al. (2021). A mycelial plug (6 mm) of each *Fusarium* isolate was inoculated at opposite side on PDA plates, keeping a distance of three centimeters between the two fungi. The plates without antagonists serve as negative control, replicated thrice for each and adopted completely randomized design.

After a week of incubation at 28 °C. Percentage (%) of radial mycelial growth inhibition was calculated according to the following formula (Dugassa et al. 2021),

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1}$$

where R1 is radial growth of the pathogen in control plate, R2 is the radial growth of the fungal colony in the presence of the antagonist.

2.3.2. Double plate assay

The effect of volatile antifungal compounds of *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* isolates on the mycelial growth of *Fusarium spp.* was tested by the double plate technique described by Bencheikh et al. (2022). Ten microlitres (10) of one day old cultures of bacterial strains maintained in TSB medium was spread on nutrient agar (NA) medium in a Petri plates. On another hand, 6 mm discs of *Trichoderma gamsii* from 7-days old culture were inoculated in the center of fresh PDA

medium dishes (90 mm in diameter). The top of each Petri plate was replaced with bottom of a PDA dish inoculated centrally with the pathogenic fungus, and then sealed using Parafilm. The paired dishes were incubated at 28 °C for 7 days. The same setup without antagonistic agents was used as control. The experiment was performed in triplicates.

The degree of antagonisms was determined as described in section dual culture assay

2.4. In vivo effects of antagonistic agents on fungal pathogens

2.4.1. Microbial inoculums preparation

The highly antagonistic strains (P58 and T2), based on *in vitro* efficacy test, were chosen for to evaluate their antagonistic activities on wheat seedlings.

Compatibility test was performed between the two microbial strains (P58 and T2) using dual culture essay according to Dugassa et al. (2021).

For bacterial inoculum preparation, the selected strain was grown in TSB liquid medium and incubated at 28 °C in a rotatory shaker at 200 rpm. After 24 h of incubation, the bacterial suspension was centrifuged at 5000 rpm for 15 min, and after discarding the supernatant, the harvested bacterial cells were resuspended in sterile tap water, then, the bacterial inoculum was adjusted to final concentration of 10^8 cells/mL (Minchev et al. 2021).

In the case of fungal inoculum, *Trichoderma gamsii* strain was inoculated on potato dextrose agar (PDA) medium. After 7 days of incubation, conidia were scraped from sporulating plates in sterile distilled water, and the concentration of the conidial suspension was adjusted to 10^6 conidia/mL using a hemocytometer.

2.4.2. Seed treatment procedure

For greenhouse bioassays, durum wheat (*T. durum* cv. Vitron) was used for its susceptibility to Fusarium crown rot of wheat. Seeds were surface-sterilized in 2% sodium hypochlorite for 3 min, then rinsed thrice in sterile distilled water and shade dried.

Washed seeds were soaked separately into the microbial suspensions (*Pseudomonas azotoformans* at 10^8 CFU mL⁻¹) or (*Trichoderma gamsii* at 10^6 conidia/mL), or treated with both antagonistic agents (*Pseudomonas* and *Trichoderma*) and were air-dried at ambient temperature for 30 min.

The seeds were then sown in 8 cm diameter pots containing a sterilized soil previously inoculated with different *Fusarium* strains (Fernandez and Chen 2005; Abdallah-Nekache et al. 2019; Bencheikh et al. 2022).

Non-treated seeds (neither *Fusarium spp.* nor antagonistic agents) served as negative control and seeds inoculated only with *Fusarium spp.* were served as positive control.

After inoculation, the pots were placed in a greenhouse (day/night cycle of 12/12 h, a temperature of 25 °C and RH 60% ± 2% relative humidity).

The experiment was carried out in a completely randomized blocks design with three replications for each treatment, and it was repeated three times.

At the end of the experiments (30 days post inoculation), plants from each treatment were carefully uprooted, washed in running tap water to remove peat traces, and air-dried. Parameters noted were plant height (cm) and fresh and dry weight of the vegetative parts and roots system (g).

2.4.3. *Fusarium crown rot assessment*

Four weeks post inoculation; *Fusarium crown rot* severity (DS) was scored using a 0–3 rating scale (Grey and Mathre 1984) (0 = no symptoms, 1 = 1–25% of crown browning, 2 = 25–50% of crown browning, 3 = greater than 50% of crown browning).

The disease severity percentage (DS) was calculated according to the formula

$$DS = \left[\sum (c \times f) / n \times N \right] \times 100$$

where c = disease class, f = frequency, n = number of observations and N = the highest scale value (scale 3) (Abdallah-Nekache et al. 2019).

The efficiency of the bioagents application was evaluated by the disease reduction percentage (DR), with was calculated as follows:

$$DR \% = \left[(A - B) / A \right] \times 100$$

A: percentage of disease in the control, B: percentage of disease with the application of antagonistic agents.

2.5. Assays for biocontrol potential and plant growth-promoting traits

2.5.1. Rhizobacterial traits

2.5.1.1. Siderophore production. The siderophore production by the bacterial strain P58 was tested on sodium succinate medium (SSM) according to the protocol mentioned by Sah et al. (2017). SSM supplemented with 20 μM

Fe was inoculated with fresh culture of *Pseudomonas azotoformans* and incubated for 24 h at 28 °C in incubator shaker at 250 rpm. After incubation, the culture formed was centrifuged at 8000 rpm for 8 min and absorbance of the supernatant obtained was measured at 400 nm using a Biochrom Libra S80 spectrophotometer.

Siderophore concentration = $OD \times 1500 \times 1000 / 16,500 (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ was calculated.

2.5.1.2. Cyanide detection essay. The hydrocyanic acid production (HCN) by P58 was verified. The strain was inoculated, using a loop of platinum, on a Petri dish containing Trypticase soy medium supplemented with 4.4 g L⁻¹ glycine. A sterile filter paper (9 cm Ø) was placed in the Petri dish lid in inverted position. The paper was then impregnated with a yellow solution containing picric acid and sodium carbonate. Petri dish was sealed with parafilm and kept in reverse position in an incubator at 28 °C for 5 days. The production of hydrocyanic acid (HCN) was assessed by the color changing observed on filter paper from yellow to brown or reddish-brown. The reaction was marked as weak (light brown), moderate (dark brown) and strong (reddish brown) (Trivedi et al. 2008).

2.5.1.3. Production of indole-3-acetic acid (IAA). The IAA production was tested qualitatively on Luria-Bertani medium supplemented with tryptophan (5 g/L). The medium was inoculated with fresh bacterial culture. A sterile filter paper (9 cm Ø) was placed above the medium directly and incubated at 30 °C/96 h. After three days, the filter paper was impregnated with 2 mL of Salkowski's reagent (50 mL of perchloric acid 35% and 1 mL of FeCl₃ at 0.5 M) and incubated for 20 min in the dark. IAA concentration was determined by the color changing observed on the filter paper (pink-red) (Bric et al. 1991).

2.5.2. Fungal traits

2.5.2.1. Chitinase production. Chitinase production by *Trichoderma gamsii* T2 was determined using the optimized medium for chitinase production supplemented with colloidal chitin and bromocresol purple (pH indicator). The pH of medium was adjusted to 4.7 and incubated for 3 days at 25 °C, a color changing was observed from yellow to purple violet in the chitin utilization region around the *Trichoderma* colonies following the pH increasing (Kamala and Indira 2011).

2.5.2.2. Protease production. Protease activity of *Trichoderma gamsii* was measured using skim milk agar medium. 6-day-old *Trichoderma* culture was inoculated on skim milk agar medium and incubated at 28 °C ± 2 for 72 h.

Trichoderma with protease activity gave a clearance zone around the colony indicating the production of protease enzymes (Kamala and Indira 2011).

2.5.2.3. Phosphate solubilization. Phosphate solubilization by the fungus was tested using the solid Pikovskaya medium (PVK) containing with $(Ca_3(PO_4)_2)$. A 6 mm disc from *Trichoderma* culture was placed in the center of the Petri dish containing solid PVK medium supplemented with bromophenol blue. After 7 days of incubation at 28 °C, the phosphate solubilization activity gave a clearance zone around the colony. The solubilization activity was estimated by the ratio of the total diameter (halo + colony) and the diameter of the colony (Vyas et al. 2007).

2.6. Statistical analysis

The obtained data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SPSS version 26. Results are presented as the mean percentage values \pm standard deviation, and the treatment means were compared at 5% level of significance with Tukey HSD (Honestly Significant Difference).

3. Results

3.1. Effect of different antagonists on *Fusarium* radial growth in the dual culture assay

After 7 days of incubation on PDA medium, results of dual culture test revealed variable inhibition of the fungal mycelial growth (Table 2).

All antagonists tested had antifungal effect against *Fusarium* spp. However, inhibition differed with each *Fusarium* isolate depending on the biocontrol agent used in this study. Isolate P58 was the highest antagonistic against all fungal strains tested and exhibited means percentages inhibition of mycelium growth by 68.73%, 69.00% and 72.27% against *F. pseudograminearum*, *F. graminearum* and *F. equisti*, respectively (Figure 1).

Table 2. Growth inhibition (%) of *Fusarium* spp. using different microbial antagonists in a dual culture technique.

Microbial strains	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equisti</i>
P4	36.66 \pm 0.770 _e	32.31 \pm 1.213 _e	43.40 \pm 1.121 _e
P8	50.34 \pm 2.590 _d	45.54 \pm 1.032 _d	55.59 \pm 0.430 _d
P15	26.23 \pm 0.594 _f	27.56 \pm 1.305 _f	36.61 \pm 1.140 _f
P25	19.38 \pm 1.142 _g	23.75 \pm 1.420 _g	30.76 \pm 1.214 _g
P56	14.25 \pm 0.865 _h	16.69 \pm 0.846 _h	24.63 \pm 1.202 _h
P57	56.03 \pm 2.078 _b	72.93 \pm 0.612 _b	63.46 \pm 0.810 _b
P58	68.73 \pm 0.432 _a	69.00 \pm 1.004 _a	72.27 \pm 1.033 _a
P64	52.542.798 _c	47.37 \pm 1.953 _c	65.27 \pm 1.645 _c
P71	17.30 \pm 1.123 _h	18.88 \pm 0.910 _h	26.11 \pm 0.832 _h
T2	62.31 \pm 1.241 _b	61.87 \pm 0.992 _b	71.64 \pm 0.786 _b

The values represent the mean of the 3 replicates \pm standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $p \leq 0.05$.



Figure 1. Dual culture assay (a) P58 against Fps, (b) P58 against Fgr, (c) P58 against Feq, (d) compatibility test between T2 and P58.

Trichoderma gamsii inhibited the maximum mycelial growth of *Fusarium* spp. in tune of 65.27% (Figure 2), followed by P57, P64 and P8 with inhibition percentage of 64.14%, 55.06% and 50.49%, respectively. However, the average inhibition percentages of the three *Fusarium* species by the other bacterial strains were less than 50%. Isolate P56 showed the least mean percentage inhibition of 18.52%.

3.2. Microbial volatile compound activity

Microbial volatile compound activity tested by double plate assay demonstrated different effects of microbial agents on *Fusarium* growth (Table 3).

Trichoderma gamsii was the most potent antagonistic which reduced *Fusarium* mycelial growth by 50.33% as compared to the control.

P58 recorded 46.05% the mycelium inhibition, followed by P64 (40.54%), P8 (36.29%) and P4 (31.57%), and for the other bacteria, the mean inhibition ranged from 8.50% to 24.34%.

The results showed that *F. equisti* isolate was more susceptible to the microbial volatile compounds, compared with *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*.

3.3. In vivo biocontrol of FCR of wheat by the selected microbial agents

The tested strains of *Fusarium* spp. were pathogenic causing crown rot in wheat seedlings. The control plants remained symptomless and healthy throughout the experiment. Disease severity was recorded using FCR rating scale with reference to the uninoculated control. The three *Fusarium* species (*Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum* and *F. equisti*) recorded crown rot severity with 86.83%, 57.33% and 51.50%, respectively.

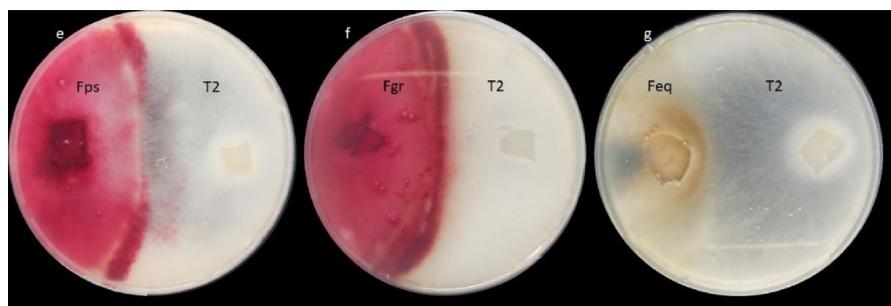


Figure 2. Dual culture assay (e) T2 against Fps, (f) T2 against Fgr, (g) T2 against Feq.

Table 3. Inhibition (%) of *Fusarium* spp. mycelial growth in a double plate assay.

Antagonists	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equisti</i>
P4	30.16 ± 1.166 _e	31.87 ± 1.049 _e	32.70 ± 1.404 _e
P8	31.59 ± 0.553 _d	33.69 ± 0.771 _d	43.59 ± 1.408 _d
P15	17.57 ± 0.951 _f	23.50 ± 1.173 _f	31.96 ± 1.322 _f
P25	3.46 ± 0.961 _h	6.21 ± 0.861 _h	15.85 ± 0.612 _h
P56	12.02 ± 1.459 _{gh}	7.19 ± 0.918 _{gh}	8.05 ± 1.001 _{gh}
P57	12.56 ± 0.992 _g	7.07 ± 0.880 _g	15.91 ± 0.660 _g
P58	37.53 ± 0.960 _b	46.19 ± 1.352 _b	54.45 ± 2.075 _b
P64	34.12 ± 0.630 _c	40.55 ± 1.190 _c	46.97 ± 1.379 _c
P71	10.79 ± 0.767 _{gh}	7.89 ± 0.664 _{gh}	14.59 ± 1.206 _{gh}
T2	43.62 ± 0.750 _a	50.77 ± 0.750 _a	56.61 ± 0.777 _a

The values represent the mean of the 3 replicates ± standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $p \leq 0.05$.

The compatibility test between the biocontrol strains showed that *Trichoderma gamsii* (T2) and *Pseudomonas azotoformans* (P58) were compatible, there was no inhibition zone between each other (Figure 1d).

To assess the efficiency of antagonistic agents against *Fusarium* crown rot on wheat seedlings *via* seed treatment, the two compatible microbial strains (P58 and T2) were tested in greenhouse assay under controlled conditions.

Seed treatments with individual antagonistic agents resulted in a significant reduction in FCR severity ranged from 48.38 to 70.36%.

The bacterium *Pseudomonas azotoformans* (P58) was the most potent antagonistic agent which reduced crown rot disease as compared to the positive control. *Trichoderma gamsii* also showed high antifungal potent against tested phytopathogenic fungi. However, application of *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* in combination proved the most effective in suppression of mycelial growth of *Fusarium* species in the range of 79.10 to 90.40% under *in vivo* trials. The combination of both biocontrol agents showed synergistic effect in the reduction of the disease severity at 30 days after the application of treatments (Table 4).

Table 4. *In vivo* effect of antagonistic strains on disease severity (%).

Biological treatments	Disease severity (%)	Disease reduction (%)
Positive control Fps	86.83 ± 1.166 _d	00 ± 0.0 _d
Positive control Fgr	57.33 ± 1.452 _c	00 ± 0.0 _d
Positive control Feq	51.50 ± 1.258 _d	00 ± 0.0 _d
Fps + P58	32.03 ± 1.265 _b	63.11 ± 1.250 _b
Fps + T2	44.81 ± 2.240 _c	48.38 ± 2.587 _c
Fps + P58 + T2	18.15 ± 1.059 _a	79.10 ± 1.060 _a
Fgr + P58	24.14 ± 1.250 _b	57.89 ± 1.755 _b
Fgr + T2	29.47 ± 1.778 _b	48.60 ± 2.783 _c
Fgr + P58 + T2	11.01 ± 1.043 _a	80.69 ± 2.196 _a
Feq + P58	18.34 ± 1.549 _c	64.49 ± 2.191 _c
Feq + T2	11.60 ± 0.756 _b	77.36 ± 2.053 _b
Feq + P58 + T2	4.95 ± 0.602 _a	90.40 ± 1.063 _a

The values represent the mean of the 3 replicates ± standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $p \leq 0.05$.

3.4. Effect of antagonists on the growth parameters of wheat seedlings

All wheat seedlings infected with *Fusarium* strains and treated with biocontrol agents applied separately or in combination showed significant increase in their growth parameters compared to untreated seedlings (Table 5). The present study demonstrated that inoculation of wheat seedlings with *Fusarium* strains affected growth parameters to varying degrees depending on the fungal isolate used. The development of disease in wheat seedlings inoculated with pathogens only was significantly reduced compared with the non-infected control and with treated seedlings. *Pseudomonas azotoformans* strain P58 improved significantly shoot and root growth in the presence of the three pathogenic fungi (*F. pseudograminearum*, *F. graminearum* and *F. equisti*). In another hand, the seedling grow parameters were significantly increased ($p < 0.05$) in plants treated by *Trichoderma gamsii* as compared with untreated seedlings. The highest increase was observed for seedlings infected with *F. pseudograminearum* strain (Fps + T2), the plants grow was improved from 13.8 cm to 33.33 cm, and from 9.56 cm to 19.33 cm for shoot and root length, respectively. The fresh and dry weights were also affected positively.

The combined treatment using both bioagents (P58 + T2) in the presence of pathogens led to the highest parameter increase as compared with wheat seedlings treated with *P. azotoformans* or *T. gamsii* separately.

3.5. Biochemical analysis

The production of secondary metabolites by the rhizobacteria P58 was clearly observed (Figure 3). The strain exhibited the production of siderophore in the presence of Fe by $7.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. In addition, the strain

Table 5. Effect of antagonistic strains on the growth parameters of wheat seedlings.

Biological treatments	Plant height (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
			Shoot	Root	Shoot	Root
Non infected control	35.3 ± 0.351 ^{ab}	21.83 ± 0.726 ^{ab}	4.07 ± 0.134 ^{ab}	1.72 ± 0.014 ^{abc}	0.97 ± 0.81 ^{ab}	0.33 ± 0.01 ^{abc}
Positive control Fps	13.8 ± 1.357 ^d	9.56 ± 1.140 ^e	1.32 ± 0.125 ^e	0.82 ± 0.032 ^c	0.14 ± 0.003 ^e	0.1 ± 0.005 ^e
Positive control Fgr	23.7 ± 0.808 ^c	15.73 ± 0.742 ^d	1.69 ± 0.043 ^e	1.02 ± 0.057 ^{bc}	0.34 ± 0.015 ^{de}	0.16 ± 0.01 ^{de}
Positive control Feq	27.2 ± 0.513 ^c	17.16 ± 0.202 ^{cd}	1.83 ± 0.026 ^e	1.2 ± 0.017 ^{bc}	0.40 ± 0.011 ^d	0.2 ± 0.003 ^{cde}
Fps + P58	32.5 ± 1.040 ^c	18.50 ± 0.5 ^{b,cd}	2.83 ± 0.166 ^d	1.56 ± 0.296 ^{bc}	0.44 ± 0.009 ^d	0.20 ± 0.05 ^{cde}
Fps + T2	33.33 ± 0.881 ^b	19.33 ± 0.666 ^{bcd}	3.16 ± 0.44 ^{bcd}	1.83 ± 0.166 ^{abc}	0.71 ± 0.06 ^c	0.23 ± 0.03 ^{bcd}
Fps + P58 + T2	35.50 ± 0.763 ^{ab}	21.93 ± 0.581 ^{ab}	3.93 ± 0.06 ^{ab}	1.93 ± 0.233 ^{ab}	0.92 ± 0.02 ^{bc}	0.3 ± 0.05 ^{abcd}
Fgr + P58	33.40 ± 0.862 ^b	20.00 ± 1 ^{abc}	2.93 ± 0.066 ^{cd}	1.76 ± 0.23 ^{abc}	0.72 ± 0.05 ^c	0.21 ± 0.03 ^{cde}
Fgr + T2	34.10 ± 0.781 ^{ab}	20.66 ± 0.726 ^{abc}	3.76 ± 0.145 ^{abcd}	2.10 ± 0.30 ^{ab}	0.88 ± 0.03 ^{bc}	0.25 ± 0.028 ^{bcd}
Fgr + P58 + T2	36.66 ± 0.666 ^{ab}	22.16 ± 0.927 ^{ab}	4.16 ± 0.166 ^a	2.66 ± 0.33 ^a	1.07 ± 0.072 ^{ab}	0.39 ± 0.01 ^{ab}
Feq + P58	33.83 ± 1.013 ^{ab}	21.66 ± 0.666 ^{ab}	3.66 ± 0.33 ^{abcd}	1.76 ± 0.233 ^{abc}	0.91 ± 0.05 ^{bc}	0.29 ± 0.006 ^{abcd}
Feq + T2	32.66 ± 0.333 ^b	19.33 ± 0.666 ^{bcd}	3.83 ± 0.16 ^{abc}	1.93 ± 0.23 ^{ab}	1.01 ± 0.05 ^{ab}	0.35 ± 0.028 ^{abc}
Feq + P58 + T2	38.16 ± 1.092 ^a	23.66 ± 0.726 ^a	4.28 ± 0.10 ^a	2.66 ± 0.333 ^a	1.14 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.037 ^a

The values represent the mean of the 3 replicates ± standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $p \leq 0.05$.

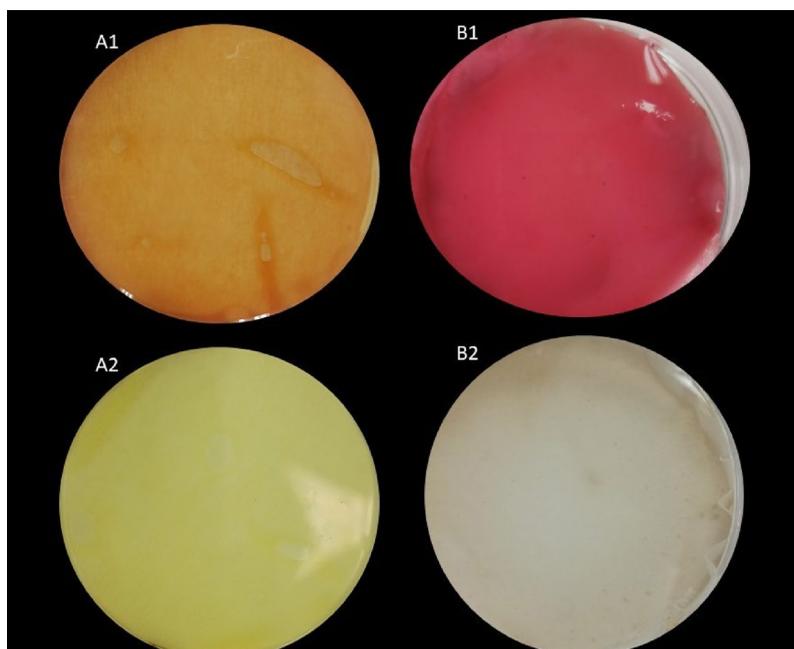


Figure 3. Secondary metabolite production by *Pseudomonas azotoformans* (A1) HCN production, (A2) control, (B1) IAA production, (B2) control.

P58 showed a strong production of hydrocyanic acid (HCN) which was assessed by the color changing observed on filter paper from yellow to reddish brown. Furthermore, the production of phytohormone as well IAA was confirmed in the presence of tryptophan. A strong production of IAA was noticed in the experiment.

3.6. Biochemical essay of *Trichoderma gamsii*

The screened strain T2 *Trichoderma gamsii* revealed the ability to produce three hydrolytic enzymes tested (chitinase, protease and phosphatase) (Figure 4). The intensity of the color and the diameter of the zones observed indicated a variability of hydrolytic enzyme productions. The ability of the strain T2 to produce chitinase showed a potent activity characterized by a zone of 79 mm. Followed by moderate protease and phosphatase productions characterized by a zone of 46 mm and a zone of 37.6 mm, respectively.

4. Discussion

Wheat crown rot caused by *Fusarium* spp. is one of the most serious constraints to wheat production all over the world that caused huge economic losses.

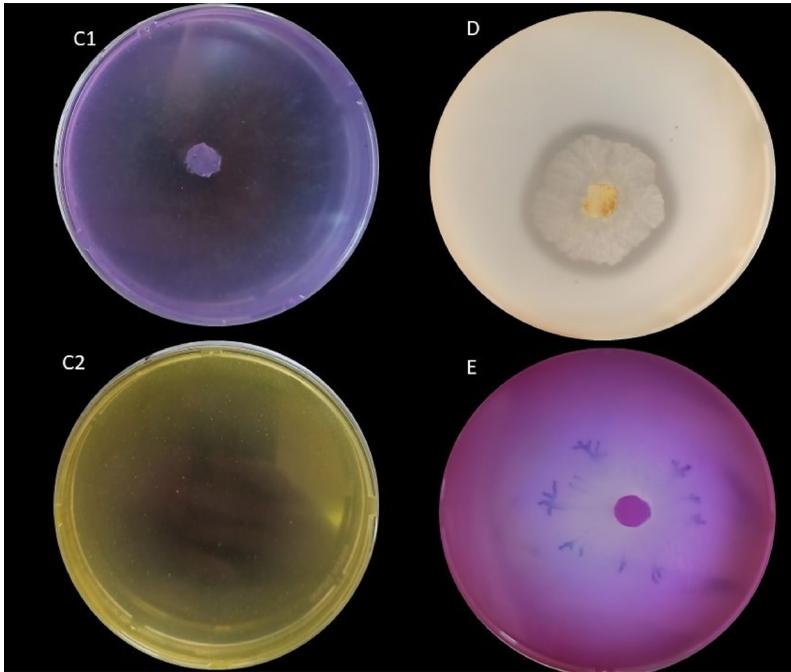


Figure 4. Hydrolytic enzymes production by *Trichoderma gamsii* (C1) chitinase production, (C2) control, (D) protease production, (E) phosphate solubilization.

In our investigation, three selected *Fusarium* species (namely *Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum* and *F. equisti*) were found pathogenic against wheat seedlings and caused crown rot. Therefore, an eco-friendly approach using biocontrol agents was explored to manage the pathogenic fungi. The antagonistic activity of our microbial strains against *Fusarium* spp. was evaluated through multiple tests.

Results of this work showed that the biocontrol agents used in this study had antifungal effect, which differed depending on the *Fusarium* species and the antagonistic strain.

Pseudomonas azotoformans was the most effective agent in reducing the mycelial growth of tested pathogens in dual culture test; however, *Trichoderma gamsii* isolate gave the highest antagonistic effect in double plate assay. Our results were concordant with those of Chen et al. (2016), who reported the antifungal activity of *T. gamsii* YIM PH30019 against root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng* via production of a volatile organic compound.

Results revealed that *Trichoderma gamsii*, evaluated for the first time in Algeria as biocontrol agent, could be considered as a promising biocontrol strategy against *Fusarium* spp. In addition, several studies have confirmed the efficiency of *Pseudomonas azotoformans* in controlling pathogenic fungi (Sang et al. 2014; Banerjee et al. 2020; Mokrani and Nabti 2020).

According to Mokrani and Nabti (2020), Some *Pseudomonas azotoformans* strains exhibited significant antifungal effect against the plant pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Stemphylium botryosum*).

The antifungal activity of *P. azotoformans* was confirmed by several tests including, siderophore production. Nair et al. (2007) have mentioned that *P. azotoformans* can produce a mixed type of siderophore both catecholate and hydroxamate type, by 5.3 mg/L. According to Sulochana et al. (2014), siderophore acts as a biocontrol agent, by depriving the pathogen from the iron nutrition, also these molecules may inhibit the conidial germination. Another bioactive molecule released by this strain may play a vital role in pathogen suppression, hydrocyanic acid.

Also, the antifungal effect of *Trichoderma gamsii* was proved by testing some biocontrol potential traits including lytic enzymes production tests. The strain T2 has the capacity to synthesis a various lytic enzyme such as chitinase and protease which hydrolyze the polysaccharide chain of the cell wall of the pathogenic fungi.

Based on *in vitro* antagonism results and compatibility test, the two compatible isolates (*Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii*) were selected for *in vivo* trials. Assays under greenhouse conditions were carried out to evaluate the efficacy of both microbial species as biocontrol and plant growth-promoting agents.

Coating seeds by *Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii* separately, decreased seedling crown rot significantly. However, application of both microbial strains (P58 + T2) provides better performances than individual treatments for *in vivo* pathogens suppression efficiency.

Interestingly, our results illustrate a significant increase in plant growth (plant height, fresh and dry weight of plants) when combined treatment using bioagents was used compared to control. We supported these results by testing the capacity of *P. azotoformans* to produce IAA and the ability of *T. gamsii* to solubilized phosphate.

Our results are in concordance with those of Bencheikh et al. (2022), who observed that the biological control *via* seed treatment is a promising technic that generated a protective effect against *Fusarium* diseases of wheat. In addition, Zaim et al. (2018), showed that seed treatment with *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* significantly protected chickpea seedlings from *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* as compared to untreated plants. The application of both antagonists effectively controlled *Fusarium* wilt disease and improved chickpea growth.

The capacity of the selected bioagents to inhibit the phytopathogenic fungi and promote plant growth is principally dependent on different mechanisms mainly mycoparasitism, antibiosis, competition and lytic enzyme production, in addition they stimulate the plant immune system,

priming plant defenses and leading to induced systemic resistance to various pathogens (Sang et al. 2014; Islam et al. 2018; Bencheikh et al. 2022).

In greenhouse trials, the biocontrol of *Fusarium* spp. using the two antagonistic agents provided the best effect against *F. equisti* (Feq) in comparison to Fgr and Fps strains. This variability can be due to the difference in virulence between to three pathogens. Indeed, pathogenicity tests showed that *F. pseudograminearum* was more virulent than Fgr and Feq strains on wheat seedlings. Similar results were also found by Abdallah-Nekache et al. (2019), in which *F. pseudograminearum* isolates were the most aggressive on wheat crown.

In recent years, the combined application of two or more biological control agents has been used in the control of diverse bio-aggressors (Izquierdo-García et al. 2020; Minchev et al. 2021). These strategies have been found to be more efficient than using only single strains. This method combines multiple modes of action of beneficial microorganisms with different environmental adaptations and promotes their spectrum of action to counter the plant pathogens through synergistic effect (Liu et al. 2018; Izquierdo-García et al. 2020; Ouhaibi-Ben Abdeljalil et al. 2021).

Overall, the results reported here show that the microbial strains combination can protect wheat seedlings from crown rot disease, stimulate plant growth and improve plant health and productivity.

5. Conclusion

In conclusion, the ten microbial strains tested in our study, showed variable antagonistic activities against *Fusarium* spp in dual culture assay.

The most effectiveness isolates (*Pseudomonas azotoformans* and *Trichoderma gamsii*) have significant potential as biocontrol and plant growth-promoting agent in wheat seedlings.

The obtained results suggested that the two selected strains could represent efficient agents for eco-friendly management of soilborne cereal pathogens and can offer an alternative to the excessive use of pesticides for crop protection.

Detection and characterization of indigenous bioagents are very useful for disease suppression and improvement of plant productivity. These strategies can be used as a component of integrated management to control the plant diseases.

Further research should be carried out to evaluate the potential efficiency of the selected microorganisms as biofertilizer and biocontrol agents of various pathosystem covering a wide range of plant species and under different environmental conditions.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Data availability statements

The datasets collected and analyzed during the current study are available from the corresponding author on request. The corresponding author had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

ORCID

Kamel Eddine Makhoulf  <http://orcid.org/0000-0003-4742-6175>

References

- Abdallah-Nekache N, Laraba I, Ducos C, Barreau C, Bouznad Z, Boureghda H. 2019. Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol.* 154(3):499–512.
- Afzal A, Ijaz M, Ashraf S, Nawaz HH, Iqbal J, Altaf R, Syed S. 2022. Determination of relationship of environmental factors with stripe rust in wheat. *Plant Prot.* 6(2):151–159.
- Banerjee S, Singh S, Pandey S, Bhandari MS, Pandey A, Giri K. 2020. Biocontrol potential of *Pseudomonas azotoformans*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt of *Dalbergia sissoo*. *For Pathol.* 50:1–5.
- Bencheikh A, Meziti H, Daichi Barkahoum M, Gharzouli A, Belkadi K, Rouag N. 2022. Efficiency of durum wheat seeds bioprimering by rhizobacteria in the biocontrol of *Fusarium culmorum* and *Fusarium chlamydosporum* infecting durum wheat in Algeria. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 55(6):653–675.
- Bencheikh A, Rouag N, Mamache M, Belabed I. 2020. First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 53(19-20):915–931.
- Bouanaka H, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A, Khelifi D. 2021. On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of *Fusarium* head blight and crown rot of wheat in Algeria. *Egypt J Biol Pest Control.* 31(1):1–13.
- Bouanaka H, Ines B, Douadi K. 2022. First report on *Fusarium cerealis*, identification and virulence as causal agents of crown rot on wheat in Algeria. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 55(5):597–614.
- Bric JM, Bostock M, Silverstone E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl Environ Microbiol.* 57(2):535–538.
- Chamekh R, Deniel F, Donot C, Jany J, Nodet P, Belabid L. 2019. Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and halophilic fungi from the Great Sebkh of Oran in Northwestern of Algeria. *Mycobiology.* 47(2):230–241.
- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K, Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with

- hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *J Ginseng Res.* 40(4):315–324.
- Chtioui W, Balmes V, Delogu G, Migheli Q, Oufensou S. 2022. Bioprospecting phenols as inhibitors of trichothecene-producing *Fusarium*: sustainable approaches to the management of wheat pathogens. *Toxins.* 14(2):72.
- Derbal N, Benbelkacem A, Tahar A. 2015. Spatial variation of quality traits in Algerian durum wheat cultivated in different environments. *Afr J Agric Res.* 10(9):919–925.
- Dugassa A, Alemu T, Woldehawariat Y. 2021. In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease (*Fusarium solani*) of faba bean (*Vicia faba* L.). *BMC Microbiol.* 21(1):1–11.
- Fernandez MR, Chen Y. 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* 89(2):164–169.
- Grey WE, Mathre DE. 1984. Reaction of spring barleys to common root rot and its effect on yield components. *Can J Plant Sci.* 64(2):245–253.
- 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.
- Ishii H, Hollomon DW. 2015. Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management. Tokyo (Japan): Springer; p. 978.
- Islam MA, Nain Z, Khasrul Alam Md A, Banu N, Islam MR. 2018. In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. *Egypt J Biol Pest Control.* 28(1):1–11.
- Izquierdo-García LF, González-Almario A, Cotes AM, Moreno-Velandia CA. 2020. *Trichoderma virens* Gl006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling *Fusarium* wilt of cape gooseberry. *Sci Rep.* 10(1):1–13.
- Kamala T, Indira S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech.* 1(4):217–225.
- Kezih R, Bekhouche F, Merazka A. 2014. Some traditional Algerian products from durum wheat. *Afr J Food Sci.* 8(1):30–34.
- Liu K, McInroy JA, Hu CH, Kloeppel JW. 2018. Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Dis.* 102(1):67–72.
- Minchev Z, Kostenko O, Soler R, Pozo MJ. 2021. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. *Front Plant Sci.* 12:756368.
- Mnasri N, Chennaoui C, Gargouri S, Mhamdi R, Hessini K, Elkahoui S, Djébali N. 2017. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria *in vitro* and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. *Eur J Plant Pathol.* 147(3):501–515.
- Mokrani S, Nabti E.-h. 2020. Heavy metal resistance and bioremediation capacity of rhizospheric strain BioRPaz-3 *Pseudomonas azotoformans* endowed with antifungal activities and multi-abiotic stress tolerance in *in vitro* trials. *SN Appl Sci.* 2(12):1–14.
- Nair A, Juwarkar A, Singh S. 2007. Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 180(1-4):199–212.

- Ouhaibi-Ben Abdeljalil N, Vallance J, Gerbore J, Yacoub A, Daami-Remadi M, Rey P. 2021. Combining potential oomycete and bacterial biocontrol agents as a tool to fight tomato *Rhizoctonia* root. *Biol Control*. 155:104521.
- Pineda-Mendoza DY, Gonzalez-Mancilla A, Almaraz JJ, Rodriguez-Guzman MP, Garcia-Barradas O, Argumedo-Delira R. 2018. Characterization of the antifungal activity of three rhizobacterial strains against *Rhizoctonia solani*. *Span J Agric Res*. 16(4):16.
- Sah S, Singh N, Singh R. 2017. Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas siderophore*. *3 Biotech*. 7(2):1–7.
- Sang MK, Kim EN, Han GD, Kwack MS, Jeun YC, Kim KD. 2014. Priming-mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathol*. 104(8):834–842.
- Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar S, Dayanand A. 2014. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *J Basic Microbiol*. 54(5):418–424.
- Touati-Hattab S, Barreau C, Verdal-Bonnin MN, Chereau S, Richard-Forget F, Hadjout S, Mekliche L, Bouznad Z. 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *Eur J Plant Pathol*. 145(4):797–814.
- Trivedi P, Pandey A, Palni LM. 2008. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiol Res*. 163(3):329–336.
- Vyas P, Rahi P, Chauhan A, Gulati A. 2007. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycol Res*. 111(Pt 8):931–938.
- 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.
- Zhen S, Deng X, Xu X, Liu N, Zhu D, Wang Z, Yan Y. 2020. Effect of high-nitrogen fertilizer on gliadin and glutenin subproteomes during kernel development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop J*. 8(1):38–52.
- Zin NA, Badaluddin NA. 2020. Biological functions of *Trichoderma spp.* for agriculture applications. *Ann Agric Sci*. 65(2):168–178.



Official publication of Pakistan Phytopathological Society

Pakistan Journal of Phytopathology

ISSN: 1019-763X (Print), 2305-0284 (Online)

http://www.pakps.com



ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *CITRUS AURANTIUM L.* ESSENTIAL OIL AGAINST CROWN ROT OF WHEAT CAUSED BY *FUSARIUM GRAMINEARUM*

^aKamel E. Makhoulouf*, ^aKarima Boungab, ^aAbdelkader Elouissi, ^bZine E. Daikh

^aDepartment of Agronomy Faculty of Natural Science and Life, Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics, University of Mascara, Mascara, Algeria.

^bLaboratory of Physical Chemistry of macromolecules and Biological interfaces, Mascara University, Algeria.

ABSTRACT

Fusarium graminearum a causal agent of crown rot of wheat is an important soil-borne pathogen that causes yield reduction on cereal crops. Controlling this disease is crucial to ensure food security. The present study was conducted toward the research of biological method against this pathogen. Our research aimed to evaluate the antifungal activity of *Citrus aurantium* essential oil (EO) at different concentrations against *F. graminearum in vitro*. Also, we assessed the inhibitory effect of EO on disease development in greenhouse conditions. The results showed that EO exhibited a potent antifungal activity with no significant difference compared to chemical fungicide, Difenconazole. The tested EO effectively inhibited radial growth of the pathogen *in vitro*, and it revealed significant decreasing on disease incidence from 91.7% to 32.8% in the *in vivo* bioassay. In addition, the seed treatment with *C. aurantium* EO improved significantly the growth parameters of the wheat seedlings compared to the untreated control. The chemical characterization of *C. aurantium* essential oil using the gas chromatography analysis allowed the identification of monoterpene hydrocarbon as major group of volatile compounds. These were Limonene (17.6%), Geranyl acetate (11.9%), Geranial (10.8%), Citral (10.3%), Linalool (9.9%) and Linalyl acetate (5.7%). From the current study, we can deduce that essential oils extracted from *C. aurantium L.* leaves can be used as an antifungal bio-product against phytopathogenic *Fusarium* species.

Keywords: *Fusarium graminearum*, bio-fungicide, antioxidant activity, Chromatography analysis.

INTRODUCTION

Fusarium crown rot is a worldwide serious constraint that causes significant reduction on yield and quality of wheat grain (Tunali *et al.*, 2008). Several pathogens are the main responsible of this disease, especially *Fusarium culmorum*, and *F. graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*) (Beccari *et al.*, 2011). These fungi can have a negative impact on various plant organs at different stages of their development. Chemical control is the most used method against these fungal diseases. However, the adverse effects on

human health (carcinogenic, endocrine disrupting) caused by synthetic products (Kim *et al.*, 2017), the negative influences on the environment, including water, soil and air contamination (Chambers *et al.*, 2014). Moreover, the appearance of pathogen populations resistant to fungicides are serious disadvantages of this method (Hahn, 2014). Therefore, agricultural researches have continually focused on biological control of plant diseases. Finding antifungal compounds in plants is an efficient way to produce new pollution-free pesticides.

Medicinal plants contain some organic compounds and bioactive substances include tannins, alkaloids, terpenoids, steroids and flavonoids (Yadav *et al.*, 2011). They are commonly used in human therapy, veterinary, agriculture and scientific research. A wide range of phytochemicals

Submitted: August 28, 2022

Revised: November 16, 2022

Accepted for Publication: December 20, 2022

* Corresponding Author:

Email: kamel.makhoulouf@univ-mascara.dz

© 2017 Pak. J. Phytopathol. All rights reserved.

from various chemical classes have showed an inhibitory effect on a large group of microorganisms (Vaou *et al.*, 2021).

Essential oils are volatile oily liquids extracted from various plant parts that are widely used as food flavorings, also used for their antibacterial, antifungal, antiviral, insecticidal, and antioxidant properties (Elgayyar *et al.*, 2001). Different essential oils have been found to be more effective and an alternative method against pathogens (Ali *et al.*, 2018).

Citrus aurantium L. popularly known as "bitter orange" is commonly used as a rootstock for his beneficial properties, including resistance to different biotic and abiotic stresses, tolerance to climate change, improvement of fruit quality (Yildiz *et al.*, 2013), also it can be used as an ornamental tree. Furthermore, the plant's leaves, fruit peel and flowers are commonly used for medicinal purposes because of the several bioactive compounds it contains, such as vitamins, tannins, volatile oils, and proteins (Yu *et al.*, 2020).

The aim of the present study is to evaluate the antifungal activity of the essential oil and aqueous extract of *Citrus aurantium* against *Fusarium crown rot* of wheat caused by *Fusarium graminearum* in both, *in vivo* and *in vitro* experiments. Our research was executed as an alternative approach to chemical control, for this purpose, the GC-MS analysis was used to acquire chromatographic data on chemical components.

MATERIAL AND METHODS

Plant material: *Citrus aurantium* leaves were harvested from their natural habitat in Mascara province the North-West of Algeria in March 2022. The plant material was slightly dried at ambient temperature for 7 days.

Fungal material: The *Fusarium graminearum* FG10 isolate (GenBank accession No. ON685926) was obtained from diseased durum wheat seedling presenting typical symptoms of crown rot, collected from the North-West of Algeria in 2019. It was identified based on morphological and molecular characteristics. The strain was selected based on their high pathogenicity against sensible durum wheat variety (cv. Vitron) (Unpublished data). For the experiment, the target fungus was sub-cultured on potato dextrose agar medium (PDA) at 25 °C for 7 days.

Essential Oil and Aqueous Extract Extraction:

Essential oil was extracted from dried leaves by the hydro-distillation process for 3 h using a Clevenger-type device. The EO obtained was stored in glass dark vials at 4°C. The Aqueous Extract (AE) was prepared using the protocol described by Chen *et al.* (2007). After grinding Bitter Orange dried leaves, 20 g of plant powder were mixed with 200 ml of boiling distilled water for 30 min. After stirring and cooling down the mixture at ambient temperature, the extract was filtered through a filter paper Whatman N° 1, and the filtrate was freeze-dried.

Qualitative phytochemical analysis: To assess the presence of organic compounds, such as proteins, fixed oils, tannins, saponins, flavonoids and steroids. The medicinal plant screening was carried out using standard methods described by Yadav *et al.* (2011).

Antioxidant Activity: The antioxidant activity was determined using the DPPH radical scavenging method as described by Brand-Williams *et al.* (1995). DPPH solution was freshly prepared by mixing 4mg of DPPH with 100ml of methanol 95%. Five concentrations of essential oil were tested by adding 1.5 ml of methanolic DPPH solution to 250 µl of each concentration, then incubated in the dark at room temperature for 16 min. The absorbance was measured in triplicate at 517 nm using a JENWAY 6400 spectrophotometer. The methanolic DPPH solution and the ascorbic acid were used as negative and positive control respectively. The DPPH free radical scavenging activity was calculated using the following formula:

Radical scavenging activity (I%) = [(Abs control - Abs test) / Abs control] x 100

Abs control: absorbance of the control (DPPH solution)

Abs test: absorbance after addition of the essential oil

GC-MS analysis of essential Oil: The Shimadzu GCMS TQ8030 was used for the Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis. Capillary gas chromatograph directly coupled to the mass spectrometer system type GC-2010 plus, GCMS-TQ8030 from Shimadzu. A capillary column (30 mx 0,25 mm, 0,25 µm film thickness) was used under the following conditions: Column Oven Temperature: 50,0°C: Injection Temperature: 220 °C: Injection Mode: Split; Pressure: 100 kPa; Total Flow: 50.0 ml/min; Column Flow: 4.55 mL/min; Linear Velocity: 77.4 cm/sec; Purge Flow: 3,0 ml/min and Split Ratio: 50.0. The column temperature was programmed from 50.0°C to 220.0°C with a rate of 5.00°C/min. The

mass spectrometer (MS) conditions were as follows: Ion Source Temperature: 200.00 °C; Interface Temperature: 220.0 °C; Solvent Cut Time: 3,00 min and Detector Gain: 0.98 kV. The total running time was 31 minutes (Scan Start: 45.00 m/z and Scan End: 500.00 m/z) and Scan Speed: 1666. Authentic chemicals are identified by the database PubChem.

In vitro antifungal assays: The inhibitory effect of the essential oil and the aqueous extract was evaluated measuring the radial growth of *F. graminearum* *in vitro* using the poisoned food method as described by Soylu *et al.* (2006). For each treatment six concentrations were tested. Different volumes of the testing extracts were added separately to conical flasks containing 100 ml sterile PDA medium before its solidification to obtain the concentrations 50, 100, 200, 250, 500 and 1000 µl L⁻¹. A few drops of the emulsifier Tween 80 (3% of water volume) were added to obtain an aqueous emulsion feature. In addition, the systemic fungicide Score (250 g/L Difenoconazole) of Syngenta crop protection society obtained from Mascara market was used as comparing treatment. The controls consisted only of PDA medium with added Tween 80. Around 18 ml of the prepared medium was poured into each Petri dish.

Mycelial discs (6 mm Ø) taken from the periphery of an actively growing PDA culture of the tested fungi (*F. graminearum*) were placed at the center of the prepared Petri dishes. All plates were incubated at 25°C until the tested fungi reached full growth in the check treatment (approximately 7 days). Three replicates were used for each treatment. The percentage of fungal growth inhibition was calculated according to the following formula:

$$IC(\%) = \frac{DT - DT}{DT} \times 100$$

Where, IC = mycelial growth inhibition (%); Dt = the average diameters of fungal colony of control, DT = the average diameters of fungal colony of treatment.

Effect of EO on emergence, coleoptile and coleorhizae growth: To determine the efficacy of EO against *F. graminearum* pathogenicity, on emergence percentage, coleoptile and coleorhiza growth. The method mentioned by Abdallah-Nekache *et al.* (2019) was adopted. Conical flaks containing 50 ml of Potato Dextrose Broth were inoculated by four mycelial discs (6 mm Ø) taken from the periphery of 7 days' old growing PDA culture of the tested fungi. Flaks were incubated for 7 days at 25 °C in incubator shaker. Mycelium was

extracted by centrifugation (5000 g for 10 min), diluted to 13 mg/mL and homogenized by adding drops of the emulsifier Tween 80 (3%). Sterile filter paper was deposited on sterile Petri dishes, then, 8 ml of the previously prepared inoculum were added to the filter paper and a second filter paper was placed on top of the inoculum.

The essential oil formulation was prepared by fusing 500µl of EO with 1 L of sterile distilled water then adding a few drops of the emulsifier Tween 80 (3% of water volume) (Moutassem *et al.*, 2019).

For seed inoculation, susceptible durum wheat variety (cv. Vitron) was used in this experiment, which was obtained from the Cereals and Pulses Cooperative (CCLS) in Mascara, Algeria.

Durum wheat seeds (cv. Vitron), were disinfected with 2% sodium hypochlorite, then rinsed thrice with sterile distilled water, and dried between two sterile layers of filter paper.

The disinfected seeds were soaked in the homogenized essential oil formulation and were air-dried at ambient temperature for 30 min. After, the seeds were placed on each Petri plates, at the rate of 10 seeds per plate, and four replicates for each test.

The test included:

Seeds soaked in the homogenized essential oil formulation with pathogen inoculation.

Seeds soaked in distilled water with pathogen inoculation

Seeds soaked in distilled water only.

The plates were incubated at 22 °C in the dark for 6 days. The emergence percentage (%), coleoptile growth (mm) and coleorhiza length (mm) were measured at the end of the experiment.

Effect of essential oil on Fusarium crown rot of wheat in pot experiment: A pot experiment was carried out to examine the *in vivo* efficacy of the tested essential oil against crown rot of wheat.

Pathogenicity test was performed by soaking disinfected seeds (cv. Vitron) in the homogenized essential oil formulation (prepared as the previous experiment) and were air-dried at ambient temperature for 30 min. After, the seeds were sown into a 7cm diameter plastic pot, filled with a sterilized soil mixture and peat (V/V), and inoculated with explants of 6 mm diameter taken

from a 7-day FG10 culture (Demirci and Dane, 2003).

The experiment included two control treatments, seeds treated with sterile distilled water, and inoculated with FG10 were used as positive control, whereas, seeds treated with sterile distilled water and uninoculated with FG10 (healthy seedlings without fungus) were used as negative controls. Pots were placed in greenhouse and kept under observation for 30 days after sowing. All tests were performed in triplicate.

At the end of the experiment, plants were carefully removed and washed to evaluate plant height, root length, fresh and dried root and stem.

Disease assessment

Disease development of each treatment was evaluated in terms of disease incidence (DI), and disease severity (DS), 30 days after sowing using the following formula:

$(DI) (\%) = (\text{Number of infected plants} / \text{Total number of inoculated plants}) \times 100$

Disease severity (DS) of *Fusarium* crown rot was estimated using the disease scale (0-3) described by Grey and Mathre (1984), [0 = absence of crown

browning, 1 = 1-25% of crown browning, 2 = 26-50% of crown browning, 3 = > 50% of crown browning].

STATISTICAL ANALYSIS

The normality test of the data obtained was done using Shapiro-Wilk normality. The results were statistically evaluated using two-way analysis of variance (ANOVA) using R functions (R Core Team 2021). Mean separation was tested using Honest Significance Difference of Tukey, HSDT. Significance was evaluated at $p < 0.05$ for all tests. Each test was done in triplicate.

RESULTS

Qualitative phytochemical analysis: Preliminary phytochemical screening of leaves extract showed the presence of various metabolites such as flavonoids, tannin, saponins, terpenoids, volatile oil, proteins and amino acids, carbohydrates, reducing sugars, and absence of alkaloids and anthraquinones.

Antioxidant Activity: The DPPH scavenging activity increased with increasing essential oil concentration. The oil exhibited a potent antioxidant activity (80.8%) but lower than the synthetic Ascorbic Acid (98.1%) on 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 1).

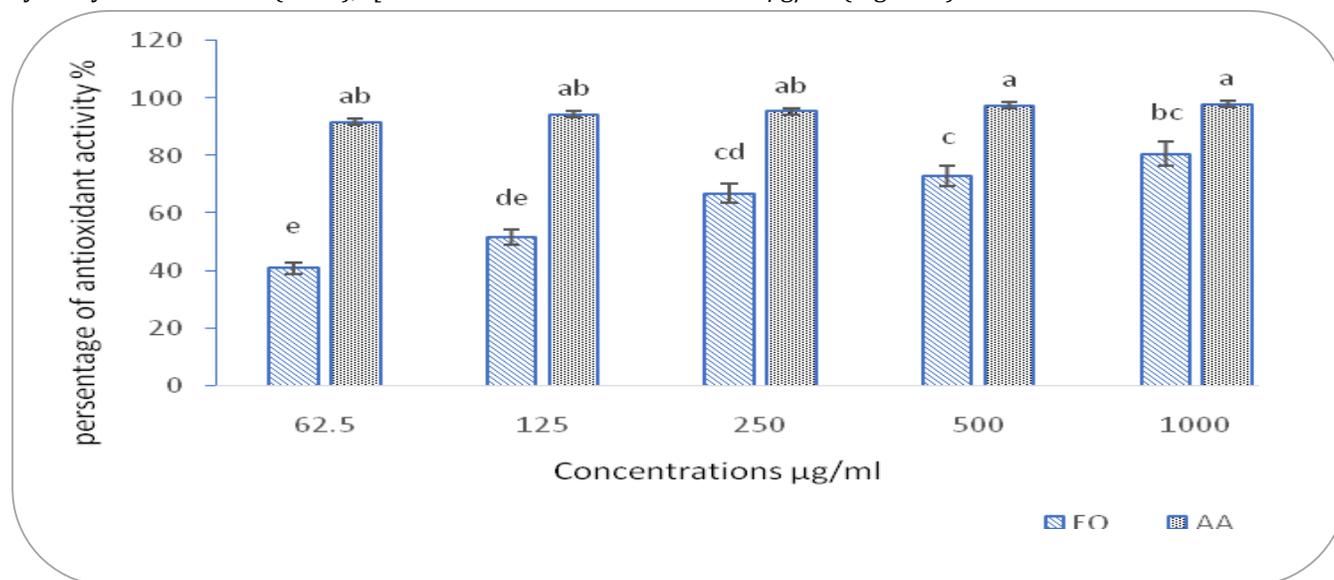


Figure 1. Antioxidant activity of *Citrus aurantium* EO at different concentrations, measured by DPPH radical. Ascorbic acid (AA) was used as standard.

GC-MS analysis of Essential Oil: The yield of essential oil from leaves was 0.5% through hydro distillation. The oil was pale yellow with aromatic odor. The GC-MS analysis showed the existence of monoterpene hydrocarbon as major group of volatile compounds. These were Limonene (17.6%), Geranyl

acetate (11.9%), Geranial (10.8%), Citral (10.3%), Linalool (9.9%), Linalyl acetate (5.7%), Geraniol (4.9%), Nerol (4.6%), α - Terpineol acetate (4.1%), Neryl acetate (3.9%), β -Ocimene (2.6%), Citronellal (1.9%), Eucalyptol (1.65%), Citronellol (1.1%) and other minor compounds (Table1).

Table 1. Chemical composition of essential oil from *Citrus aurantium* leaves.

Compounds	Height %	Area %	Retention time
Limonen	17.6	14.7	3.07
Geranyl acetate	11.8	14.5	14.00
Geraniol	10.8	6.7	14.04
Citral	10.3	14.6	12.85
Linalool	9.9	12.2	10.06
Linalyl acetate	5.7	5.7	10.15
Geraniol	4.9	4.5	16.68
Nerol	4.6	4.3	15.61
α - Terpineol acetate	4.1	4.0	13.23
Neryl acetate	4.0	4.0	14.64
β -Ocimene	2.6	1.6	3.85
Citronellal	1.9	1.9	8.30
Eucalyptol	1.6	0.9	3.13
Citronellol	1.1	1.1	14.92
α - Ocimene	0.8	0.5	3.59
γ -Caryophyllene	0.7	0.9	10.59
α - Terpineolene	0.7	0.4	4.27
Sulcatone	0.6	0.4	5.36
Other compounds	6.5		

Efficacy of plant extracts and synthetic fungicide against *F. graminearum* in vitro: Effect of essential oil, aqueous extract and difenoconazole on *F. graminearum* was evaluated measuring the radial growth inhibition *in vitro*. The results are presented in (Table 2). Essential oil treatment at 100, 200 and 250 μL^{-1} reduced the mycelial growth by 56.7, 69.6 and 100.0%, respectively. However Aqueous extract treatment showed lower inhibition activity on mycelial growth by 40.4, 47.5 and 66.5%, respectively. This treatment exhibited a

phenotypic modification represented in yellow pigmentation (Figure 2). Fungicide difenoconazole used as positive control showed a higher inhibitory effect on mycelial growth by 70.42, 82.92 and 100% respectively. Statistically analyzed result clearly indicated that the fungitoxicity of *C. aurantium* essential oil was significantly higher than aqueous extract. Compared to difenoconazole, essential oil treatment was slightly less inhibitory and aqueous extract treatment was significantly less inhibitory.

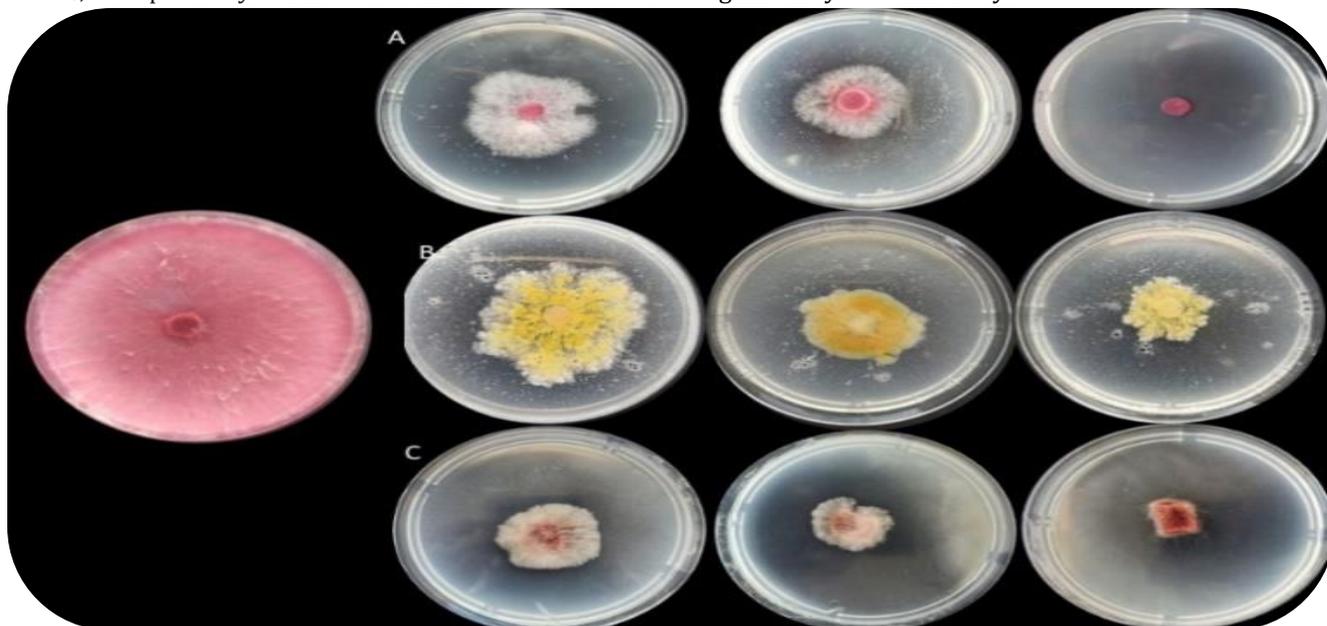


Figure 2. *F. graminearum* (FG10) colony development on PDA medium amended with, A (Essential Oil), B (Aqueous Extract) and C (difenoconazole) from left to right 100, 200 and 250 μL^{-1} compared to the control.

Table2. Effect of essential oil, aqueous extract of *citrus aurantium*, and difenoconazole on mycelia growth inhibition (%) of *Fusarium graminearum* (FG10).

Concentration ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Difenoconazole	Essential oil	Aqueous extract
50	61.67±0.83c	41.25±3.81d	17.92±2.53e
100	70.42±1.81bc	56.66±1.81c	40.42±1.10d
200	82.92±2.20b	69.58±2.31bc	47.5±0.72d
250	100±0.00a	100±0.00a	66.46±1.78c
500	100±0.00a	100±0.00a	70±0.72bc
1000	100±0.00a	100±0.00a	74.17±1.10bc

The values represent the mean of the 3 replicates ± standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $P \leq 0.05$.



Figure 3. mycelial membrane degradation and vacuolization due to EO treatment.

Effect of EO on emergence, coleoptile and coleorhizae growth: The efficacy of EO, on emergence percentage, coleoptile and coleorhiza length was assessed six days after sowing. The data of our experiment indicate that *F. graminearum* ON685926 was responsible for 33.33% of seed emergence inhibition, in addition, it caused 62% and 68% on coleoptile and coleorhiza length reduction respectively, compared to the control. Whereas, *C. aurantium* essential oil application on infected seeds increased emergence by 13%, and 30% of coleoptile length.

rot of wheat: The EO effect on disease development 4 weeks after treatment is reported in (Fig 5). Wheat seedlings of positive control (inoculated with pathogen only) showed symptoms of crown rot after 11 days of sowing (Figure 4). The symptoms of the disease were evident from day 20. Whereas the plants treated with *C. aurantium* EO showed significant effectiveness on the disease reduction. Between the positive control and the treated, the results revealed significant decreasing on disease incidence from 91.7% to 32.8%. Also, the severity was significantly decreased from 57% to 12%.

Efficacy of essential oil on Fusarium crown



Figure 4. Essential oil effect on disease development *in vivo*, A (seedling treated with EO solution and inoculated with pathogen) and B (seedling inoculated with pathogen only, positive control), A1-A2 (absence of crown and root rot symptoms), B1-B2 (crown rot and dry rot of root), A3-B3 (crown transversal cross-sections).



Figure 5. The inhibitory effect of EO on disease development (disease severity and incidence) 30days after inoculation. Furthermore, our results showed that the crown longitudinally cutting reveals a rot of sap conducting vessels in the untreated plant, compared to the treated plant the sup conduction vessels remain intact (Figure 4, A3-B3). This result may due to the mechanism applied of EO on the pathogens.

The application of EO controlled Fusarium crown rot of

wheat. This disease reduction was reflected to growth parameters (table 3). When compared to untreated control, the results showed significant decreases in plant stem height (31 cm and 23 cm), root length (27 cm and 17 cm), fresh stem weight (2.42 g and 0.7 g), dry stem weight (0.58 g and 0.14 g), fresh root weight (1.03 g and 0.34 g) and dry root weight (0.19 g and 0.047 g).

Table 3. Influence of *Citrus aurantium* EO on plant growth parameters in greenhouse experiment.

Treatment	Growth parameters					
	Plant height (cm)*	Root length (cm)*	Fresh weight(g)		Dry weight(g)	
			Shoot	Root	Shoot	Root
Control	41.03±1.01 ^a	30.50±0.37 ^a	4.07±0.13 ^a	1.72±0.14 ^a	0.97±0.03 ^a	0.32±0.01 ^a
<i>F.graminearum</i> .	23.7±0.80 ^c	16.97±1.18 ^c	0.70±0.08 ^c	0.34±0.06 ^c	0.14±0.02 ^c	0.047±0.002 ^c
<i>F.graminearum</i> + EO	31.46±1.27 ^b	27.43±0.40 ^a	2.43±0.09 ^b	1.30±0.07 ^b	0.58±0.04 ^b	0.195±0.02 ^b

The values represent the mean of the 3 replicates ± standard error; data marked by the different letters in the columns indicate a significant difference at $P \leq 0.05$.

DISCUSSION

Rutaceae family is known by mixture of bioactive components which act as antimicrobial substances and limited the negative impact of synthetic agents (Jing *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2016). Citrus essential oils are widely used not only in pharmaceutical products for their therapeutic and antiseptics properties, but also as food preserves and additives in several industries, in cosmetics and perfumes, and other industrial fields (Moraes *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2020). In recent years, several researchers have focused on the antimicrobial activity of *C. aurantium* EO as a novel approach in controlling human pathogenic and spoilage microorganisms in foods (Badawy *et al.*, 2019; Hajlaoui *et al.*, 2021), However, their applications

in plant protection against phytopathogenic fungi have not yet been studied extensively. Therefore, this study was conducted to evaluate *C. aurantium* EO as alternative to the synthetic pesticides in the control of Fusarium crown rot of wheat.

In our investigation, the essential oil of *C. aurantium* leaves was obtained by the hydrodistillation method. The obtained EO yield (0.5%) is lower than that found by Ouedrhira *et al.* (2015) from *C. aurantium* leaves and zest with 0.8 and 1.9% respectively. However, this value is greater than that obtained from *C. aurantium* growing in Greece and in Tunisia, which are 0.27% and 0.40% respectively (Sarrou *et al.*, 2013; Bnina *et al.*, 2019). Ellouze *et al.* (2012) reported a season’s variation impact on EO yields from

Tunisian *C. aurantium* leaves, which were ranged from 0.31% to 0.56% according to the harvest season. Generally, the yield of an EO depends on many factors; extraction technique, growth stage, genetic differences, environmental conditions and geographic variations (Ellouze *et al.*, 2012; Gaff *et al.*, 2020)

The DPPH radical scavenging of our essential oil indicated a potent antioxidant potential. According to Ruberto *et al.* (2000), Badawy *et al.* (2019), the strong antioxidant activity may due to oxygenated monoterpenes (Citronellyl acetate, geranyl acetate and (Z)-limonen oxide, and monoterpenes hydrocarbons (α -terpinene, β -Myrcene, limonene and β -ocimene)). Similar observation has been mentioned by Dosoky and Setzer (2018) and Değirmenci and Erkurt (2020). However, Sarrou *et al.* (2013) and Mejri *et al.* (2022) indicated that EO of old leaves has higher antioxidant activity than young leaves. The chemical profile of the essential oil was determined by gas chromatography analysis. The main compounds detected were Limonene (17.6%), Geranyl acetate (11.9%), Geranial (10.8%), Citral (10.3%), Linalool (9.9%) and Linalyl acetate (5.7%).

The knowledge about the EO composition could help to recognize its mechanism. Previous reports on essential oils extracted from *C. aurantium* leaves have mentioned that they contain almost the same components with a significant variation in concentration depending on leaves age (young or old), variety and location. Chinese samples contained as major components terpinen-4-ol (21.0%), dipentene (limonene) (11.7%), terpinene (9.2%) (Jiang *et al.*, 2011). Another samples from Tunisia contained as major components linalool (43.2% to 66.0%), linalyl acetate (0.8 to 24.8) and α -terpineol (9.3 to 12.1) (Ellouze *et al.*, 2012).

To control Fusarium crown rot, the antifungal effect of essential oil and aqueous extract obtained from *C. aurantium* leaves were assessed in comparison with that of a commercial fungicide. Our results demonstrated that all the treatments used at different concentrations have a differential activity against *F. graminearum* growth in a concentration-dependent manner. The EO applied by incorporation into PDA medium had strongly reduced *F. graminearum* growth, However, the aqueous extract showed the lowest inhibition rates. These

findings are in agreement with numerous studies; Elgat *et al.* (2020) found that *C. aurantium* EO can control *Aspergillus* spp, Ortuño *et al.* (2011) reported the antifungal activity of this oil against toward *Penicillium digatum*. Hajlaoui *et al.* (2021) demonstrated that *Citrus* essential oils can be used also as antibacterial product. According to Zabka and Pavela (2018), antifungal effect of essential oils depends on a high content of terpenoids such as limonene. Jing *et al.* (2014) have mentioned some molecules (limonene, octanal, citral, α -terpineol, neral, geranial and β -myrcene) which act against a large group of pathogens. Because of the properties of these bioactive components (low solubility in water and high hydrophobicity), several studies have suggested that volatile compounds may target the cell membrane (Figure 3) (Lang and Buchbauer, 2012; Reyes *et al.*, 2020). As an example, terpenes and phenolic molecules have been shown in previous studies to damage the membranes of both fungi and bacteria, causing proteins denaturation (Wan *et al.*, 2019; Konuk *et al.*, 2020).

Aqueous extract which evoked a yellowish color on mycelia compared to essential oil treatment demonstrated a difference among organic and volatile compounds. O'Mara *et al.* (2020) declared PH as the major factor of *Fusarium* colors. The color change is reversible, after re-cultivating the yellow hypha on new PDA medium, the fungi return to its original red color. This changing may also due to excitation of the medium by organic yellow compounds. According to Qin *et al.* (2020), an oxidative stress test using (H₂O₂) on *Fusarium graminearum* can induce a yellowish coloration.

Under greenhouse trials, *F. graminearum* effect on plant growth parameters revealed a lower percentage of seedling emergence and significant regression in development of root and stem. In addition, a brown necrosis crown was observed on the infected plants associated with leaf yellowing. However, wheat seeds treatment with *C. aurantium* EO reduced the incidence and severity of crown rot disease significantly and improved the growth parameters of wheat seedlings as compared to untreated control. The results of our experiment are consistent with those of Moutassem *et al.* (2019) who reported that thyme and lemongrass EOs were very effective in reducing the Fusarium wilt severity and inducing systemic resistance in chickpea seedlings.

CONCLUSION

Our investigation highlights the valorization of *Citrus aurantium L.* plant in terms of the chemical composition of their essential oil, the potent antioxidant activity and the antifungal effect. The results have clearly indicated that the tested EO can reduce the pathogen growth in both *in vitro* and *in vivo* experiments. From the current study, we can deduce that essential oil extracted from *Citrus aurantium L.* leaves can be used as an antifungal bioproduct against phytopathogenic fungi. Further researches are needed to evaluate the toxicity of this essential oil *in vivo* in order to establish their efficiency as biopesticides and their safety aspects.

Data availability statements: The datasets collected and analyzed during the current study are available from the corresponding author on request. The corresponding author had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Disclosure statement: No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

- Abdallah-Nekache, N., I. Laraba, C. Ducos, C. Barreau, Z. Bouznad and H. Bouregghda. 2019. Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 154: 499-512.
- Ali, A., M. A. Abro, R. N. Syed, M. Khan and H. Saeed. 2018. Effect of some essential oils on the growth and development of fruit rot of lemon caused by *Aspergillus niger* under in-vitro conditions. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 30: 199-205.
- Badawy, M. E., G. I. K. Marei, E. I. Rabea and N. E. Taktak. 2019. Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through in vitro and in silico studies. *Pesticide biochemistry and physiology*, 158: 185-200.
- Beccari, G., L. Covarelli and P. Nicholson. 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology*, 60: 671-684.
- Bnina, E.B., H. Hajlaoui, I. Chaieb, M. Daami-Remadi, M. Ben Said and H. Ben Jannet. 2019. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the Tunisian *Citrus aurantium* essential oils. *Czech Journal of Food Sciences*, 37: 81-92.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28: 25-30.
- Chambers, J. E., H. Greim, R. J. Kendall, H. Segner, R. M. Sharpe and G. Van Der Kraak. 2014. Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical reviews in toxicology*, 44: 176-210.
- Chen, H.Y., Y. C. Lin and C. L. Hsieh. 2007. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food chemistry*, 104: 1418-1424.
- Değirmenci, H. and H. Erkurt. 2020. Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium L.* flowers. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1): 58-67.
- Demirci, E. and E. Dane. 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica*, 31: 170-173.
- Dosoky, N. S. and W. N. Setzer. 2018. Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils. *International journal of molecular sciences*, 19: 1966.
- Elgat, W. A., A. M. Kordy, M. Böhm, R. Černý, A. Abdel-Megeed and M. Z. Salem. 2020. *Eucalyptus camaldulensis*, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* Essential Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. *Processes*, 8: 1003.
- Elgayyar, M., F. A. Draughon, D. A. Golden and J. R. Mount. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of food protection*, 64: 1019-1024.
- Ellouze, I., M. Abderrabba, N. Sabaou, F. Mathieu, A. Lebrihi and J. Bouajila. 2012. Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: chemical composition and biological activities.

- Journal of food science, 77: T173-T180.
- Gaff, M., M. Esteban-Decloux and P. Giampaoli. 2020. Bitter orange peel essential oil: a review of the different factors and chemical reactions influencing its composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 35: 247-269.
- Grey, W. and D. Mathre. 1984. Reaction of spring barleys to common root rot and its effect on yield components. *Canadian Journal of Plant Science*, 64: 245-253.
- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of chemical biology*, 7: 133-141.
- Hajlaoui, H., S. Arraouadi, K. Aouadi, M. Snoussi, E. Noumi and A. Kadri. 2021. GC-MS profile, α -glucosidase inhibition potential, antibacterial and antioxidant evaluation of peels *Citrus aurantium* L., essential oil. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33: 1580-1591.
- Jiang, M. H., L. Yang, L. Zhu, J. H. Piao and J. G. Jiang. 2011. Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of food science*, 76: C1219-C1225.
- Jing, L., Z. Lei, L. Li, R. Xie, W. Xi, Y. Guan, L. Sumner and Z. Zhou. 2014. Antifungal activity of *Citrus* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62: 3011-3033.
- Kim, K.H., E. Kabir and S. A. Jahan. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*, 575: 525-535.
- Konuk, H. B. and B. Ergüden. 2020. Phenolic-OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. *Folia Microbiologica*, 65: 775-783.
- Lang, G. and G. Buchbauer. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 13-39.
- Mejri, H., T. Khetatfa, W. Aidi Wannes, A. Smaoui and M. Saidani Tounsi. 2022. Histochemistry, chemical composition and antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. essential oil during leaf development. *Journal of Essential Oil Research*, 34: 329-338.
- Moraes, T.M., H. Kushima, F.C. Moleiro, R.C. Santos, L.R. Machado Rocha, M.O. Marques, W. Vilegas and C.A. Hiruma-Lima. 2009. Effects of limonene and essential oil from (*Citrus aurantium*) on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 180: 499–505.
- Moutassem, D., L. Belabid, Y. Bellik, S. Ziouche and F. Baali. 2019. Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55: 202-217.
- O'Mara, S. P., K. Broz, M. Boenisch, Z. Zhong, Y. Dong and H. C. Kistler. 2020. The *Fusarium graminearum* t-SNARE Sso2 is involved in growth, defense, and DON accumulation and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33: 888-901.
- Ortuño, A., L. Díaz, N. Alvarez, I. Porras, A. García-Lidón and J. Del Río. 2011. Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different *Citrus* species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 125: 232-239.
- Ouedrhira, W., S. Bouhdida, M. Balouria, A. El Ouali Lalamib, S. Mojac Ouazzani, F. Chahdid and H. Greche. 2015. Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7: 78-84.
- Qin, J., M. Wu and S. Zhou. 2020. FgEaf6 regulates virulence, asexual/sexual development and conidial septation in *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 66: 517-529.
- Reyes-Jurado, F., A. R. Navarro-Cruz, C. E., Ochoa-Velasco, E. Palou, A. López-Malo and R. Ávila-Sosa. 2020. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60: 1641-1650.
- Ruberto, G. and M. T. Baratta. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69: 167-174.
- Sarrou, E., P. Chatzopoulou, K. Dimassi-Therios and I. Therios. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18: 10639-10647.
- Soylu, E., S. Soyly and S. Kurt. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent

- Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161: 119-128.
- Trabelsi, D., A. M. Hamdane, M. B. Said and M. Abderraba. 2016. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves and peels of Tunisian *Citrus aurantium* against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19: 1660-1674.
- Tunali, B., J. M. Nicol, Z. Hodson, O. Uçkun, D. Büyük and D. Erdurmuş. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Disease, 92: 1299-1306.
- Vaou, N., E. Stavropoulou, C. Voidarou, C. Tsigalou and E. Bezirtzoglou. 2021. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. Microorganisms, 9: 2041.
- Wan, J., S. Zhong, P. Schwarz, B. Chen and J. Rao. 2019. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. Food chemistry, 291: 199-206.
- Yadav, R. and M. Agarwala. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of phytology, 3: 10-14.
- Yildiz, E., M. Kaplankiran, T. H. Demirkeseer and C. Toplu. 2013. Seasonal Patterns of Carbohydrates in Mandarin cvs.'Fremont', 'Nova' and 'Robinson' on Different Rootstocks. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41: 255-262.
- Yu, L., M. Chen, J. Liu, X. Huang, W. He, Z. Qing and J. Zeng. 2020. Systematic detection and identification of bioactive ingredients from *Citrus aurantium L.* var. *amara* using HPLC-Q-TOF-MS combined with a screening method. Molecules, 25: 357-362.
- Zabka, M. and R. Pavela. 2018. Review Chapter: Fusarium genus and essential oils in: Natural Antimicrobial Agents. (ed.). Springer. P. 95-120

Contribution of Authors:

Kamel E. Makhlouf	: Conduct research and wrote manuscript
Karima Boungab	: Supervised research and reviewed manuscript
Abdelkader Elouissi	: Statistical analysis
Zine E. Daikh	: Essential oil analysis by GC-MS