



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

N° d'ordre 12 / D3C / 2022

N° de série 01 / BA / 2022

THÈSE

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité : Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés

Présentée par :

BOUANAKA Hamza

Sujet de recherche

Interaction *Triticum durum/aestivum*, *Fusarium* spp. et *Trichoderma* spp. : effet du traitement par *Trichoderma* spp. sur la résistance chez le blé à l'égard des fusarioses.

Soutenue le 14/03/2022, devant le jury ci-dessous

Président : KHELIFI D.

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1

Directrice de thèse : BELLIL I.

MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

Examineur : BENBELKACEM A.

D.R. Institut National de la Recherche Agronomique

Examineur : HAMIDECHI M. A.

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1

Examineur : KACEM CHAOUCHE N.

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire 2021/2022

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à mon Dieu, que votre volonté soit faite. Vous êtes ma lumière, mon guide et mon secours. Vous n'êtes cessé de me montrer le bon chemin, le chemin de la vérité, du travail et de la réussite. Que ce travail honore et glorifie votre nom.

Je suis entièrement reconnaissant envers ma directrice de thèse Dr Ines BELLIL pour m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail avec beaucoup d'attention, pour ses conseils et ses critiques constructives et pour le temps qu'elle m'a consacré malgré ses nombreuses responsabilités et tâches administratives comme adjointe chef de Département de Biologie Appliquée, Merci pour votre encadrement exceptionnel, discussions enrichissantes et conseils que vous m'avez apportés tout au long de cette thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Pr Douadi KHELIFI pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire, ainsi que pour avoir bien accepté de présider ce jury.

Un grand merci à toute l'équipe INRAA de Constantine en particulier le Professeur Abdelkader BENBELKACEM, pour son soutien, sa gentillesse mais surtout son aide apportée durant la réalisation de ce travail. Ainsi qu'au Dr Wahiba HARRAT, et Saoussene BOUSSAHA.

Je remercie également les membres de jury pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail, et pour les judicieux conseils qu'ils m'auront gracieusement offerts, chacun dans sa discipline : le Professeur Noredine KACEM CHAOUCHE, ainsi que le Professeur Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI.

Je remercie vivement Dr Amor BENCHEIKH pour ses conseils et ses discussions enrichissantes sur la bioinformatique et la pathologie végétale.

Je remercie chaleureusement l'ensemble du personnel du Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, de leur gentillesse et de leur disponibilité aide et conseils en particulier Mr Belbekri Mohamed Nadir et Melle Radia.

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à ma famille pour m'avoir toujours aidé et soutenu. Merci à ma femme et à ma mère de m'avoir toujours accompagné dans mes projets et supporter mes mauvaises humeurs durant ces trois années de thèse.

Enfin un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de la réalisation de ce travail.

Productions scientifiques

Publications internationales

1. **Bouanaka H**, Bellil I, Khelifi D (2021) Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium Head Blight and Crown Rot in Algeria, *Physiol Mol Plant Pathol* 115, 101683. [https:// doi. org/10.1016/j.pmpp.2021.101683](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101683)
2. **Bouanaka H**, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A et al. (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, 68. [https:// doi. org/10.1186/s41938-021-00416-3](https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3)
3. **Bouanaka H**, Bellil I, Khelifi D (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*. 55:5, 597-614, <https://doi.org/10.1080/03235408.2022.2035557>

Publications internationales sous révision

1. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Wahiba Harrat, Douadi Khelifi. Isolation and characterization of *Fusarium* spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness. *Journal of Plant pathology*, 2021 (sous révision)
2. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. Varietal resistance of bread wheat against *Fusarium culmorum*, the main agent of crown rot. *Annals of Agricultural Sciences*, 2021(sous révision)

Communications internationales

1. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. Biodiversity of *Fusarium* spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness: 1st International Conference of Environmental Biotechnology and Biodiversity (ICEBB 2021), held online on 14–16 December 2021, Lab EcoBiologie Animale, Algeria.
2. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. *Trichoderma afroharzianum* as biocontrol against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria: 1st International E-day on Microbial Biotechnology (IDMBT.2021) University of Algiers 1 Benyoucef Benkhedda Faculty of sciences (Webinar) November 18, 2021, Algiers 1 university, Algeria.
3. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. Biodiversity of *Fusarium* spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness: First report. 1st International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences (Webinar) November 1-3, 2021, Konya, Turkey.

4. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Isolation and characterization of *Fusarium* spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness. International “Microbes For Life” Webinar; 20-22 October 2021, Algiers, Algeria.
5. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Bio-contrôle par *Trichoderma afroharzianum* contre *Fusarium culmorum* responsable de la fusariose du blé en Algérie. International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems: (In support of sustainable development) Online participation (webinar). On 28 and 29 April 2021 in M'sila, Algeria.
6. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Evaluation of Algerian durum wheat resistance against fusarium crown rot and fusarium head blight. International Congress on Biological and Health Sciences (*icbh 2021*), Online 26-27-28 February 2021, Turkey.
7. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Evaluation of biological control by *Trichoderma* spp. against *Fusarium* wheat diseases in Algeria. International Congress on Biological and Health Sciences (*icbh 2021*), Online 26-27-28 February 2021, Turkey.

Communications nationales

1. Hamza Bouanaka, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2022. *Trichoderma afroharzianum* as biocontrol against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria. Vème Journée Scientifique Annuelle du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, les 23-24 Février 2022, université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel (webinaire) Algérie.
2. Hamza Bouanaka, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. Premier signalement de *Fusarium cerealis* ; identification et virulence en tant qu'agents responsables de la pourriture du collet sur le blé en Algérie. Séminaire National sur La recherche agronomique au cœur de la sécurité alimentaire et au service de l'environnement, les 1-2 décembre 2021, université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- Bordj Bou Arreridj (webinaire) Algérie.
3. Hamza Bouanaka, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. *Trichoderma* sp. une alternative prometteuse contre la pourriture du collet et la brûlure de l'épi causé par *Fusarium* spp. chez le blé en Algérie. Séminaire National sur Les Applications Biotechnologiques en Agriculture (SNABA, 2021) Institut des Sciences et Technologies, Département des Sciences de la Nature et de la Vie Laboratoire des Sciences et Matériaux Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila, le 10 Novembre (webinaire) Algérie.

4. Hamza Bouanaka, Ines Bellil, Douadi Khelifi. 2021. «*Trichoderma Afroharzianum*, une alternative prometteuse contre la pourriture du collet et la brûlure de l'épi causé par *Fusarium culmorum* chez le blé en Algérie». Séminaire National sur les Pesticides: Législation, Environnement et Santé (SNP).Le Laboratoire de Bio-Informatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules. Université M'hamed Bougara Boumerdes, le 24 – 25 Novembre (webinaire) Algérie.
5. **HamzaBouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Isolement Et Pathogénicité Des *Fusarium* spp. causant la pourriture du collet et la brûlure de l'épi sur le blé en Algérie. Les journées nationales de l'Agri-Eco-Biotechnologie (JNAEB 2021), Laboratoire de biotechnologie et des productions végétales (LBPV), Faculté des Sciences de la nature et de la vie (Blida 1), le 15 et 16 Octobre (webinaire) Algérie.
6. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Isolement Et Pathogénicité Des *Fusarium* spp. Causant la pourriture du collet et la brûlure de l'épi sur le blé en Algérie. 1er Séminaire National sur les Substances Naturelles, Biotechnologie et Innovation (SNBI, 2021). Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf – Mila (webinaire) 26 et 27 Octobre 2021- Mila, Algérie.
7. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Isolement et pathogénicité des *Fusarium* spp. causant la pourriture du collet et la brûlure de l'épi sur le blé en Algérie. Second national webinar on Biodiversity, Biochemistry & Environmental Microbiology. Held in the University of Amar-Telidji Laghouat on 17th October 2021 Algérie.
8. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi. **2021**. Évaluation de la lutte biologique par *Trichoderma* spp. Contre les maladies du blé dues au genre *Fusarium* en Algérie. 1er séminaire national sur la production et la protection des végétaux ' (SNPPVI) (webinaire). Organisé par l'Université Amar-Telidji Laghouat le19 Juin 2021 Algérie.
9. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil, Douadi Khelifi.**2021**. Occurrence de la fusariose de blé algérien : identification des espèces associées et évaluation de leurs agressivités. séminaire national 'Bio-ressources: Nutrition, Santé et Environnement (Br.NSE2021) (webinaire). Organisé par l'Université Mohamed Boudiaf M'sila le17 et 18 Mai 2021 Algérie.
10. **Hamza Bouanaka**, Ines Bellil. **2019**. Étude préliminaire de l'interaction *Triticum durum*, *Fusarium* spp: isolement et caractérisation microscopique de quelques agents pathogènes. 1 Séminaire national sur les biotechnologies : quelle biotechnologie pour un développement durable en Algérie (SNBA 2019). École national supérieur de biotechnologie "Taoufik Khaznadar", Constantine le 03 et 04 Décembre 2019 Algérie.



Séquençage des souches fongiques isolées et dépôt de séquence d'ADN (ITS) dans la base de données Genbank (NCBI)

BOUANAKA Hamza, BELLIL Ines, KHELIFI Douadi

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1

- 35 séquences d'ADN (ITS) des souches fongiques sont déposées au niveau de la base de données Genbank (NCBI).
- Les informations sur nos souches fongiques algériennes isolées, identifiées et séquencées concernent : l'espaceur transcrit interne 1, l'ARN ribosomal 5.8S, l'espaceur transcrit interne 2 et l'ARN ribosomal de grande taille.
- Dans le tableau suivant sont présentés les codes des souches fongiques déposées, l'espèce identifiée, la longueur de la séquence et le numéro d'accèsion attribué par la base de données Genbank (NCBI).

Code de l'isolat	Espèce	Longueur de la séquence	Numéro d'accèsion
FC1	<i>Fusarium culmorum</i>	468 bp	MW366637
FC2	<i>Fusarium culmorum</i>	482 bp	MW165423
FC3	<i>Fusarium culmorum</i>	471 bp	MW363060
FC4	<i>Fusarium culmorum</i>	489 bp	MW165434
FC5	<i>Fusarium culmorum</i>	475 bp	MW349658
FC6	<i>Fusarium culmorum</i>	474 bp	MW358285
FC7	<i>Fusarium oxysporum</i>	483 bp	MW353146
FC8	<i>Fusarium graminearum</i>	472 bp	MW349656
FC9	<i>Fusarium culmorum</i>	471 bp	MW353156
FC10	<i>Fusarium culmorum</i>	482 bp	MW353149
FC11	<i>Fusarium culmorum</i>	473 bp	MW151664
FC12	<i>Fusarium culmorum</i>	471 bp	MW349657
FC13	<i>Fusarium culmorum</i>	485 bp	MW353157
FC14	<i>Fusarium cerealis</i>	472 bp	MW358286
FC15	<i>Fusarium culmorum</i>	479 bp	MW447383
FC16	<i>Fusarium culmorum</i>	481 bp	MW450585
FC17	<i>Fusarium cerealis</i>	484 bp	MW447299
FC18	<i>Fusarium culmorum</i>	475 bp	MW353140
FC19	<i>Fusarium acuminatum</i>	501 bp	MW353145
FC20	<i>Fusarium culmorum</i>	460 bp	MW165435
FC21	<i>Fusarium acuminatum</i>	490 bp	MW447502
FC22	<i>Fusarium culmorum</i>	471 bp	MW353148
FC23	<i>Fusarium cerealis</i>	491 bp	MW447774
FE1	<i>Fusarium culmorum</i>	472 bp	MW353147
FE2	<i>Fusarium equiseti</i>	477 bp	MW448184
FE3	<i>Fusarium culmorum</i>	470 bp	MW353158
FE4	<i>Fusarium culmorum</i>	483 bp	MW450591
FE5	<i>Fusarium graminearum</i>	449 bp	MW358916
FE6	<i>Fusarium asiaticum</i>	484 bp	MW366557
FE7	<i>Fusarium incarnatum</i>	503 bp	MW450593
FE8	<i>Fusarium incarnatum</i>	492 bp	MW448396
FE9	<i>Fusarium fujikuroi</i>	475 bp	MW450594
FE10	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	484 bp	MW450596
FE11	<i>Fusarium incarnatum</i>	500 bp	MW450597
T14	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	533 bp	MW159753

Liste des abréviations

3-ADON: 3-acétyl-déoxynivalénol
15-ADON: 15-acétyl-déoxynivalénol
ANOVA: Analysis of variance
AUDPC: Area under the disease progress curve
CD: Confrontation Directe
CI: Confrontation Indirecte
CLA: Carnation Leaf-Piece Agar
cv: cultivar
DAI: Day After Inoculation
DON: Déoxynivalénol
DS: Disease Severity
ETS: Effector Triggred Susceptibility
ETI: Effector Triggered Immunity
FAO: Food and agriculture organization
GI: Germination inhibition
IAA: Indole-3 Acétique
ITS1: Internaltranscribedspacers;
QTL: Quantitative Trait Locus
Ma : 10⁶ années
MAMPs: Microbial-Associated Molecular Pattern
NaClO: Sodium hypochlorite
nm: nanomètre
LCO: Lipochito-oligosaccharides
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDA: Potato Dextrose Agar
PES : le pourcentage d'épillets symptomatiques
PNR: peptides non ribosomaux
PR : protéines liées à la pathogénèse
PRR: PAMP-Recognition Receptors
PSA: Potato sucrose agar
PSS: le pourcentage de graines symptomatiques
PTI: PAMP-Triggered Immunity
TEF1- α : Translation elongation factor1-alpha
FDK: Fusarium-Damaged Kernels.
TKW: Thousandkernel weight
TKWloss: Thousand Kernel Weight loss;
RISR:Résistance systémique induite par les rhizobactéries
SAR: Résistance systémique acquise
ZEN: Zéaralénone

Liste des figures

Figure 1 :	Histoire évolutive du blé.....	8
Figure 2 :	Principaux stades de développement du blé et leurs correspondances sur l'échelle de Zadoks (Zadoks et al. 1974).....	10
Figure 3 :	Anatomie de l'épi de blé, de l'épillet et de la fleur (Setter and Carlton 2000).....	12
Figure 4 :	Les différentes parties constituant un grain de blé mature d'après Surget and Barron (2005).....	13
Figure 5 :	Micrographie de l'infection d'une cellule de l'épiderme du lemme par un hyphes de <i>Fusarium culmorum</i> (Kang and Buchenauer 2002).	16
Figure 6 :	Cycle de vie de <i>Fusarium graminearum</i> sur blé tendre (Trail 2009).....	24
Figure 7 :	<i>Fusarium culmorum</i> . A - D: Macroconidies. Barre d'échelle = 25µm	26
Figure 8 :	Taxonomy de <i>Trichoderma</i> (Adnan et al. 2019).....	29
Figure 9 :	Isolement et application de <i>Trichoderma</i> isolé de la matière organique du sol, des racines et du bois décomposé (Adnan et al. 2019).....	27
Figure 10 :	Le schéma de gauche représente les différentes structures d'infection chez les champignons et les Oomycètes. Le schéma de droite représente des molécules effectrices sécrétées par les haustoria (a) et les hyphes (b) Petre and Kamoun (2014).....	42
Figure 11 :	Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène (Jones and Dangl 2006).....	45
Figure 12 :	Étapes clés d'un cycle infectieux d'un agent pathogène chez une plante hôte sensible (Lapin and Van den Ackerveken 2013).....	47
Figure 13 :	Interaction entre <i>Trichoderma</i> et plante. Système d'interaction in vitro entre <i>T. virens</i> Gv29-8 et <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia-0 (Contreras-Cornejo et al. 2019).....	49
Figure 14 :	Modèle décrivant le mode d'action de <i>Trichoderma</i> spp. contre les pathogènes et l'amélioration de la croissance des plantes.....	59
Figure 15 :	Méthode de suspension dilution.....	65
Figure 16 :	Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélosé.....	76
Figure 17 :	Schéma illustrant les parcelles et les cas de traitement utilisé dans le test de l'inoculation de l'épi dans le champ.....	85
Figure 18 :	Histogramme montrant l'effet de bio-contrôle de T14+T11 sur les symptômes de la FCR (DS, CL et CW) du blé dur GTAdur, dans les 6 cas testés.....	178
Figure 19 :	Histogrammes montrant l'effet de bio-contrôle de T14+T11 sur les symptômes de la FHB (AUDPC et TKW) du blé dur GTAdur, dans les 6 cas testés. a : Test de la serre. b : Test du champ.....	179
Figure 20 :	Images illustrant les résultats des différents cas de traitement utilisé dans le bio-contrôle.....	181

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production de l'Algérie de blé entre 2014-2019 (Source : FAOSTAT 2021).....	6
Tableau 2 : Les différentes souches de <i>Trichoderma</i> contre différents pathogènes bactériens.....	32
Tableau 3 : Efficacité des espèces de <i>Trichoderma</i> contre les champignons pathogènes du sol (Muhammad et al. 2018).....	56
Tableau 4 : Les variétés de semence de blé dur cultiver à Constantine durant 5 campagnes entre 2014-2015 jusqu'à 2018-2019 (OAIC, 2019) Office Algérien Interprofessionnel des Céréales.....	69
Tableau 5 : la sévérité de la FCR (inoculation par FC4) et l'effet de bio-contrôle de (T14+T11) sur les paramètres (DS, CL et CW) dans le test d'inoculation du collet dans les pots.....	177
Tableau 6 : la sévérité de la FHB (inoculation par FC4) et l'effet antagoniste induit par le mélange T14+T11 dans les deux tests <i>in vivo</i> (inoculation de l'épi dans la serre et le champ).....	179

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 1 : Le blé	6
1. Intérêt socio-économique du blé	6
2. Classification taxonomique du blé	7
3. Description du blé	7
3.1. Histoire évolutive et caractéristiques génétiques	7
3.2. Caractéristiques botaniques	8
3.3. Caractéristiques culturelles et développementales	9
3.4. Caractéristiques morphologiques	10
4. Grain de blé	12
4.1. Structure du grain de blé	12
4.2. Développement du grain	13
4.2.1. Croissance et développement du grain	14
4.2.2. Remplissage du grain	14
4.2.3. Déshydratation et maturation du grain	14
CHAPITRE 2 : La fusariose	15
1. La fusariose du collet (FCR) et la brûlure de l'épi du blé (FHB)	15
1.1. Généralités	15
1.2. Symptômes de la FCR et la FHB	15
1.3. Conditions favorables au développement de la maladie	17
1.3.1. Facteurs climatiques et phénologiques	17
1.3.2. Facteurs agronomiques	18
1.3.3. Facteurs physiologiques	18
1.4. Moyens de lutte contre la fusariose	18
1.4.1. Pratiques culturales	18
1.4.2. Résistance variétale et contrôle génétique	19
1.4.3. Lutte chimique	21
2. Les champignons du genre <i>Fusarium</i>	21
2.1. Le genre <i>Fusarium</i>	21
2.2. Cycle de vie du pathogène	23
2.3. <i>Fusarium</i> et mycotoxines	25
2.4. <i>F. culmorum</i> , agent principal responsable de la fusariose en Algérie	25
2.4.1. Principaux caractères à examiner sur milieux de cultures	25
2.4.2. Taxonomie, pathologie et écologie	26
CHAPITRE 3 : <i>Trichoderma</i>	28
1. Introduction	28
2. Taxonomie de <i>Trichoderma</i>	28
3. Le genre <i>Trichoderma</i>	29
3.1. Description de <i>Trichoderma</i>	30
3.2. Biodiversité et richesse des espèces de <i>Trichoderma</i>	30
4. <i>Trichoderma</i> comme agent antagoniste potentiel	32
5. Avantages de l'application de <i>Trichoderma</i>	33
5.1. Tolérance au stress abiotique	33
5.1.1. Tolérance au stress salin	33

5.1.2. Tolérance des conditions défavorables	34
5.1.3. Tolérance au stress thermique	34
5.1.4. Tolérance au stress nutritionnel	35
5.2. Vitesse de colonisation	35
5.3. Établissement facile de <i>Trichoderma</i> après inoculation	38
5.4. Modification de la rhizosphère	38
5.5. Bio-fertilisation	39
6. Habitats agricoles	39
CHAPITRE 4 : Interactions plantes, pathogènes et antagonistes	41
1. Interaction plante et environnement biotique	41
1.1. Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent symbiotique	43
1.2. Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent pathogène	43
1.3. La sensibilité des plantes aux agents pathogènes	46
2. Interaction plante- <i>Trichoderma</i>	47
2.1. Colonisation des racines par <i>Trichoderma</i>	50
2.2. Métabolites fongiques impliqués dans la croissance des plantes	51
2.3. Renforcement de l'immunité des plantes par <i>Trichoderma</i>	53
3. Interaction <i>Trichoderma</i> et pathogène	55
3.1. Antagonisme direct	55
3.1.1. Le mycoparasitisme	55
3.1.2. Antagonisme par voie mixte (Antibiose et métabolites secondaires)	56
3.2. Antagonisme indirect	57
3.2.1. La compétition	57
3.2.2. Résistance systémique induite de l'hôte	58
3.3. Activité endophytique	59
3.4. Plantes transgéniques	60

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel fongiques	61
1.1. Isolement et identification de l'agent pathogène <i>Fusarium</i>	61
1.1.1. Prospection et échantillonnage	61
1.1.2. Isolement de l'agent pathogène <i>Fusarium</i>	61
1.1.3. Purification des isolats par la culture monospore	62
1.1.4. Conservation des isolats de <i>Fusarium</i>	62
1.2. Identification des isolats fongiques	62
1.2.1. Identification morphologique	62
1.2.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique	63
1.3. Isolement et identification de l'agent antagoniste <i>Trichoderma</i>	64
1.3.1. Site de prélèvement et échantillonnage	64
1.3.2. Isolement de l'antagoniste <i>Trichoderma</i> spp.	65
1.3.3. Purification et conservation des <i>Trichoderma</i> spp.	66
1.3.4. Identification de l'isolat de <i>Trichoderma</i>	66
2. Evaluation de la pathogénicité des souches <i>Fusarium</i> et mesure de leurs traits de vie ...	66
2.1. Vitesse de croissance	66
2.2. Capacité de sporulation	66
2.3. Test de pathogénicité des isolats de <i>Fusarium</i> sur le collet (FCR)	67
2.3.1. Test <i>in vitro</i> dans la chambre de culture	67
2.3.2. Test <i>in vivo</i> dans la serre	68
3. Évaluation de la résistance variétale du blé dur à la fusariose	69

3.1. Matériel fongique et préparation de l'inoculum	70
3.2. Test de boîte de Pétri (test <i>in vitro</i>)	70
3.3. Test d'inoculation du collet dans la chambre de culture (test <i>in vivo</i>)	71
3.4. Inoculation de l'épi dans la serre (test <i>in vivo</i>)	72
3.5. Évaluation des propriétés physiques du grain	73
4. Évaluation de la résistance variétale du blé tendre à la fusariose	73
4.1. Préparation de l'inoculum	74
4.2. Test des boîtes de pétri (test <i>in vitro</i>)	74
4.3. Test des tubes dans la chambre de culture (<i>in vivo</i>)	75
5. Lutte biologique par <i>Trichoderma</i> spp.	76
5.1. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de <i>Trichoderma in vitro</i>	76
5.1.1. Antagonisme par confrontation directe	76
5.1.2. Antagonisme par confrontation indirecte	76
5.1.3. Mesure de l'inhibition exercée par <i>Trichoderma</i>	77
5.2. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de <i>Trichoderma in vivo</i>	77
5.2.1. Test de l'inoculation du collet dans des tubes à essai dans la chambre de culture	77
5.2.2. Test de l'inoculation du collet dans les pots dans la chambre de culture	78
5.2.3. Test de l'inoculation de l'épi dans la serre	78
5.3. Évaluation des propriétés physiques du grain	80
6. Sélection d'un traitement de bio-contrôle par une mixture de <i>Trichoderma</i> contre <i>Fusarium culmorum</i>	80
6.1. Matériel biologique	80
6.2. L'agent pathogène <i>Fusarium</i>	81
6.3. Préparation des inocula	81
6.3.1. Inoculation par disque	81
6.3.2. Inoculation par suspension	81
6.4. Activité antagoniste des isolats T14+T11 contre la FCR	81
6.5. Activité antagoniste des isolats T14+T11 contre la FHB	83
6.5.1. Test de l'inoculation de l'épi dans la serre	83
6.5.2. Test de l'inoculation de l'épi dans le champ	84

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 1 : Isolement, identification et pathogénicité des souches de <i>Fusarium</i> et mesure de leurs traits de vie	86
1. Préambule	86
2. Article 1. Isolation and characterization of <i>Fusarium</i> spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness	89
CHAPITRE 2 : <i>Fusarium cerealis</i> : premier rapport, identification et virulence en tant qu'agents responsables de la pourriture du collet sur le blé en Algérie	114
1. Préambule	114
2. Article 2. First Report on <i>Fusarium cerealis</i> ; Identification and virulence as causal agents of Crown Rot on Wheat in Algeria	117
CHAPITRE 3 : Test de la résistance variétale chez le blé dur	135
1. Préambule	135
2. Article 3. Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against <i>Fusarium culmorum</i> the causal agent of Fusarium head blight and crown rot in Algeria	138

CHAPITRE 4 : La résistance variétale chez le blé tendre	146
1. Préambule	146
2. Article 4. Varietal resistance of bread wheat against <i>Fusarium culmorum</i> , the main agent of crown rot	149
CHAPITRE 5 : La lutte biologique par <i>Trichoderma</i> spp.	160
1. Préambule	160
2. Article 5. On the biocontrol by <i>Trichoderma afroharzianum</i> against <i>Fusarium culmorum</i> responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria	163
CHAPITRE 6 : Sélection d'un traitement de bio-contrôle par une mixture de <i>Trichoderma</i> contre <i>Fusarium culmorum</i> agent causal de la fusariose de l'épi et de la pourriture du collet	176
1. Préambule	176
6.1. Effet de la mixture T14+T11 dans la réduction de la FCR <i>in vivo</i>	176
6.2. Effet de la mixture T14+T11 dans la réduction de la FHB <i>in vivo</i>	178
6.2.1. Test des pots dans la serre	178
6.2.2. Test du champ	180
6.2.3. Corrélation entre les paramètres des deux tests <i>in vivo</i> dans la serre et le champ	180
Discussion Générale	182
Conclusion & Perspectives	188
Références Bibliographiques	190
ANNEXES	
Annexe 1	222
Annex2	227
RESUMES	
Résumé	235
ملخص	237
Abstract	239

Introduction générale

Introduction générale

Le blé (*Triticum* spp.) est un aliment de base et l'une des plus importantes cultures dans le monde entier, aussi l'un des piliers de la sécurité alimentaire mondiale pour environ 40 % de la population (Bockus et al. 2010; Moore et al. 2015). En Algérie le blé est cultivé de manière extensive dans les wilayas arides et semi-arides du nord du pays. Des quantités énormes de blé dur sont consommées traditionnellement sous forme de semoule et de pain ainsi que le blé tendre utilisé dans les industries agro-alimentaires et surtout les boulangeries productrices de pain largement consommé par la population.

Malheureusement, le blé peut être infecté par beaucoup de maladies causées par les microorganismes et qui diminuent la qualité et la quantité de la récolte. Parmi ces maladies, la pourriture fusarienne du collet (FCR) et la fusariose de l'épi (FHB), qui sont deux maladies fongiques les plus destructrices et dommageables du blé, transmises par les sols et les résidus dans de nombreux pays du monde, notamment l'Algérie qui fait partie des pays du pourtour méditerranéen (Burgess et al. 2001 ; Tunali et al. 2008 ; Shikur Gebremariam et al. 2018). Outre la perte de rendement, une variété de mycotoxines puissantes qui s'accumulent dans les grains pendant l'infection, sont produites par plusieurs espèces de *Fusarium*, le champignon phytopathogène responsable des maladies de la fusariose.

Dans un contexte général d'optimisation de la gestion des cultures et donc de la protection des plantes, il apparaît primordial de développer des connaissances sur l'épidémiologie de la fusariose encore peu connue dans le monde d'autant plus qu'en Algérie. Les espèces de *Fusarium* varient en fonction du temps et de la géographie (Leonard and Bushnell 2003 ; Xu and Nicholson 2009), dont *F. pseudograminearum*, *F. culmorum* et *F. graminearum* connues par leur haute pathogénicité. Ces espèces provoquent des symptômes et des pertes de rendement plus graves et elles sont les espèces les plus courantes dans de nombreux pays (Smiley et al. 2005; Dyer et al. 2009). En Algérie les enquêtes menées ont révélé que les souches de *F. culmorum* en plus des pertes de rendement provoquent aussi l'accumulation de divers mycotoxines comme la 3-acétyl désoxynivalénol (3ADON) ou la nivalénol (NIV) (Abdallah et al. 2019; Touati et al. 2016; Laraba et al. 2017). Avec les changements climatiques rapides et les conditions météorologiques, l'évolution dans la distribution et la prévalence d'agents pathogènes de la FCR devient évidente et peut être différente dans chaque région agro-écologique.

La fusariose regroupe plusieurs espèces qui ont des caractéristiques et de traits de vie différents qui peuvent potentiellement influencer leur développement ou leur production de toxines lors d'une épidémie (Picot et al. 2012). Également, dans une région donnée, du fait d'optima de température et d'humidité différents, la distribution et la prédominance d'un ou plusieurs de ces pathogènes est en grande partie liée aux facteurs environnementaux (Xu and Nicholson, 2009). Les nombreuses espèces et souches formant ce complexe fusarien ont fait l'objet de plusieurs travaux d'étude, notamment au niveau de leur différence d'agressivité. La quantification des traits de vie des *Fusarium* spp. ainsi que les variables de sévérité sur collet du blé qui leur sont associées, est une étape indispensable afin de définir les liens entre les caractéristiques des souches et leur capacité à induire la FCR. Il est nécessaire donc d'approfondir les informations sur le pouvoir pathogène des *Fusarium*spp. et également les variables de sévérité de manière à caractériser les souches selon leur agressivité *in vivo*.

C'est dans ce contexte que les objectifs de la première partie de thèse sont d' (i) évaluer la diversité actuelle des espèces de *Fusarium* associées à la FCR et à la FHB en Algérie. (ii) identifier et mesurer *in vitro* les caractéristiques et les principaux traits de vie des souches et les variables de sévérité propres à chaque souche en milieu artificiel, (iii) évaluer leur pathogénicité et leur agressivité sur un blé dur sensible, (iv) essayer de mettre en évidence des liens entre les traits de vie, facilement et rapidement mesurables *in vitro*, et les mesures de sévérité *in vivo* de manière à identifier des traits de vie suffisants à la caractérisation du développement *in vivo* et (v) isoler le phytopathogène *F. cerealis* décrit pour la première fois dans le territoire algérien et pour le blé, et son identification morphologique et moléculaire avec une étude phylogénétique. Les détails de cette partie font l'objet des articles 1 et 2.

L'absence de fongicides totalement efficaces pour lutter contre la fusariose, nous oblige à chercher d'autres mesures d'atténuation, telles que l'utilisation de cultivars résistants. Les tentatives d'obtenir des lignées de blé résistantes demeurent un défi du fait de son extrême sensibilité à la maladie et de la faible variabilité génétique disponible pour ce caractère (Hadjout et al. 2017). Ces lignées résistantes sont considérées comme essentielles en matière de lutte intégrée contre la fusariose et comme le levier le plus efficace et le plus économique pour contrôler et réduire les dommages liés à cette maladie (Francesconi et al. 2019; Gilbert and Haber 2013). La sélection de diverses sources de résistance variétale exige des méthodes

de dépistage efficaces et reproductibles, qui ne devraient pas présenter d'effets négatifs et d'interaction avec d'autres traits agronomiques.

En Algérie, les services agricoles des céréales et phytosanitaires font beaucoup d'efforts qui s'orientent vers le développement de variétés rentables, mais peu de ces efforts se focalisent sur la résistance variétale aux maladies. Des génotypes déjà existants et largement commercialisés peuvent être une source importante de gènes de résistance à la fusariose.

Les objectifs de cette deuxième partie de la thèse sont les suivants: (i) mesurer les différents paramètres principaux (AUDPC1, DS, AUDPC2) et les paramètres supplémentaires (%GI, %TKW_{loss}, %FDK), obtenus à partir des trois essais de la résistance/sensibilité de huit génotypes de blé dur largement cultivés en Algérie contre la FCR et la FHB, (ii) corrélérer et comparer les résultats des deux maladies, (iii) classer les huit cultivars de blé dur selon leur sensibilité à la FCR et la FHB et aux deux maladies à la fois à partir des résultats obtenus. Les détails de cette partie font l'objet de l'article 3.

Dans ce même contexte de la résistance variétale, mais cette fois ci concernant le blé tendre, une troisième partie de la thèse a été menée dont l'objectif principal est l'évaluation de la résistance variétale de neuf cultivars locaux de blé tendre, par l'usage de deux tests *in vitro* et *in vivo*. Les détails de cette partie font l'objet de l'article 4.

L'absence de mesures de contrôle efficaces et constantes contre les *Fusarium* et l'absence de cultivar totalement résistant, font que le contrôle de la maladie est basé principalement sur les traitements chimiques qui constituent un risque potentiel pour la santé humaine et animal, et qui augmentent la pollution de l'environnement. Leur efficacité diffère selon les espèces fongiques concernées. Ces derniers temps, les contrôles biologiques ont été acceptés comme une alternative écologique (Mesterházy et al. 2003; Akrami and Yousefi 2015), C'est l'un des outils les plus prometteurs pour maintenir le niveau actuel de la production agricole et contrôler les *Fusarium* spp. à la fois (Tian et al. 2016).

Les espèces de *Trichoderma* sont apparues comme les plus puissants des bio-protecteurs, pour la gestion d'un certain nombre de maladies des plantes, en raison de leur action à large spectre (Mukhopadhyay 2005). *Trichoderma* spp. est un champignon

cosmopolite commun dans différents biotopes sans effets néfastes sur l'environnement, non toxique pour la santé humaine (Gwa and Nwankiti 2017; Bouregghda and Bouznad 2009; Galarza et al. 2015; Ghazalibiglar et al. 2016) et avec une capacité à produire des substances fongitoxiques volatiles et non volatiles. La production d'antibiotiques est la capacité antagoniste la plus importante. Cependant, le mycoparasitisme a été proposé comme le principal mécanisme antagoniste affiché par *Trichoderma* spp. (Kubicek et al. 2003; Mukherjee et al. 2011; Zeilinger et al. 2016).

Trichoderma est facilement obtenu par la technique de dilution à multiples tubes en raison de sa formation de chlamydospores et de la colonisation de substrats organiques (Khandelwal et al. 2012). Les conidies ont été couramment utilisées pour la lutte biologique et la biomasse conidienne peut être cultivée par la méthode de culture submergée ou sur substrat solide (Harman and Kubicek 1998).

Dans le cadre général de bio-contrôle par les champignons du genre *Trichoderma* que cette quatrième partie de thèse a été conduite. Les objectifs spécifiques sont les suivants (i) Isolement de *Trichoderma* spp. et évaluation *in vitro* du pouvoir antagoniste contre quatre souches de *F. culmorum*, agent causal de la FCR et la FHB en Algérie. (ii) Évaluation et appréciation de l'effet antagoniste de l'isolat T14 comme agent de bio-contrôle contre la FCR par deux tests *in vivo* dans la chambre de culture (iii) Évaluation du potentiel de bio-contrôle contre la FHB dans l'essai *in vivo* des pots dans la serre. Les détails de cette partie font l'objet de l'article 5.

Dans le même contexte du bio-contrôle et pour mettre en pratique tous les résultats obtenus des parties précédentes, un dernier chapitre présentera les résultats supplémentaires obtenus concernant l'application directe de *Trichoderma* comme agent de bio-contrôle où l'évaluation *in vivo* de son effet antagoniste vis-à-vis de l'agent pathogène *Fusarium culmorum* sous des conditions environnementales contrôlées (en serre) et non contrôlées (dans le champ) est estimée. L'objectif principal est de sélectionner un type de traitement adéquat qui donne plus d'efficacité de bio-contrôle ainsi qu'un rendement élevé.

Ce travail de thèse a été réalisé dans sa totalité au laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales de l'Université Frères Mentouri Constantine 1. Le travail de

thèse est un projet à impact socioéconomique certain et rentre dans les priorités de l'état en l'occurrence la sécurité alimentaire et la santé du citoyen.

Le cadre bibliographique de ces problématiques est présenté dans 4 chapitres bien distincts : Le chapitre 01: le blé, tout d'abord, une description de la plante hôte étudiée, permettra de mieux appréhender le développement de la fusariose. Ensuite, le chapitre 2: La fusariose, les agents pathogènes responsables de cette maladie seront présentés mettant en évidence la grande diversité des espèces, de souches, et de caractéristiques épidémiologiques qui leur sont propres. Le chapitre 3: *Trichoderma*, l'intérêt mondial a été donné aux recherches liées au champignon *Trichoderma* grâce à ses applications dans le domaine de l'agriculture et de la biotechnologie. Le chapitre 04: interactions plantes, pathogènes, et antagonistes. À partir de ces éléments, la seconde partie expérimentale de la thèse sera présentée suivant les chapitres qui leur sont associés. Le travail expérimental est basé sur les différents tests et techniques utilisés et d'une autre partie exposant les résultats obtenus détaillés dans les articles publiés et/ou soumis pour publications dans le contexte de cette thèse.

Enfin, le manuscrit se termine par une discussion générale qui reprendra et discutera les principaux résultats obtenus, et présentera la conclusion générale et les perspectives possibles de ce travail.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1: Le blé

Chapitre 1: Le blé

1. Intérêt socio-économique du blé

Le blé est une des trois plus importantes céréales au niveau mondial avec le riz et le maïs. Il est essentiellement utilisé pour l'alimentation humaine (panification, biscuits, ...) (58 % de la récolte), et dans une moindre importance, pour l'alimentation d'animaux d'élevage comme fourrage (34 %), et pour l'industrie (8 %). Il joue un rôle majeur dans la sécurité alimentaire mondiale avec environ 760 millions de tonnes produits en 2020 (Source : FAOSTAT 2020) et une contribution de 20% au total des calories et protéines consommées en alimentation humaine. Avec une projection d'une population mondiale de 9.7 milliards d'habitants d'ici 2050, un des défis pour la filière productrice de blé est l'augmentation des rendements dans un contexte général complexe.

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (Kezih et al. 2014). Les céréales sont la principale source calorique (60%) pour les différentes couches de la population quel que soit leur niveau de vie. Elles assurent aussi 71% de l'apport protéique (Kellou 2008).

Tableau 1 : Production Algérienne de blé entre 2014-2019(Source : FAOSTAT 2021)

Année	Superficie récoltée (ha)	Production (tonnes)	Rendement (hg/ha)
2014	1651311	2436197	14753
2015	1814722	2656731	14640
2016	2062179	2440097	11833
2017	2118469	2436503	11501
2018	2087003	3981219	19076
2019	1974987	3876876	19630

La wilaya de Constantine avec ses 222910 ha, dont 70% de surfaces utiles, est une plateforme nationale des grandes récoltes qui ne cesse de réaliser des performances de saison en saison, elle est réputée pour la filière de céréaliculture. Selon la direction des services agricoles (DSA) de la wilaya, la capitale de l'est du pays s'est imposée comme le premier producteur du pays en céréales pour l'exercice agricole 2017-2018. Une production qualifiée de «record» par les services agricoles. Près de 3 millions de quintaux de céréales ont été récoltés cette année, ce qui représente une première depuis 22 ans.

Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette augmentation de la production, dont les conditions climatiques favorables, la disponibilité et la qualité des semences et engrais en quantités suffisantes et en temps opportun, l'importance de la superficie emblavée, ainsi qu'à l'encadrement technique et économique en direction des céréaliculteurs.

2. Classification taxonomique du blé

Selon l'Angiosperm Phylogeny Group (APG III) (Chase and Reveal 2009), la classification botanique du blé *Triticum* Desf. est la suivante :

- Règne *Plantae*,
- Sous-règne *Tracheobionta*,
- Division *Magnoliophyta*,
- Classe *Liliopsida*,
- Sous-classe *Commelinidae*,
- Ordre *Poales*
- Famille *Poaceae*,
- Sous_famille *Pooideae*,
- Tribu *Triticeae*,
- Genre *Triticum*.

3. Description du blé

3.1. Histoire évolutive et caractéristiques génétiques

L'histoire du genre *Triticum* est marquée par plusieurs évènements d'allopoléidisation liés pour certains à la domestication (Dubcovsky and Dvorak 2007) et aboutissant à des espèces modernes de ploïdie variée. A la base de ces espèces modernes, trois ancêtres communs diploïdes présentant trois génomes distincts peuvent être identifiés : *Triticum urartu* (portant le génome AA; $2n=14$), une espèce diploïde inconnue proche de l'espèce *Aegilops speltoides* (portant le génome BB; $2n=14$) et *Triticum tauschii* (portant le génome DD; $2n=14$). Il y a environ 0.5 Ma (10^6 années), une première hybridation entre *T. urartu* portant le génome AA, et une espèce diploïde inconnue proche de l'espèce *A.speltoides* portant le génome BB a eu lieu pour donner une nouvelle espèce tétraploïde, l'amidonniér sauvage, (*T. dicoccoides*) portant le génome AABB. La domestication de cette nouvelle espèce tétraploïde est à l'origine de *T. durum* (blé dur). Il y a environ 8000 - 10000 ans, une deuxième hybridation entre l'amidonniér cultivé et *Aegilops tauschii*, est à l'origine du blé tendre

allohexaploïde *T. aestivum* (AABBDD), composé des trois sous-génomes ancestraux et par conséquent de $6n = 42$ chromosomes (**Figure 1**).

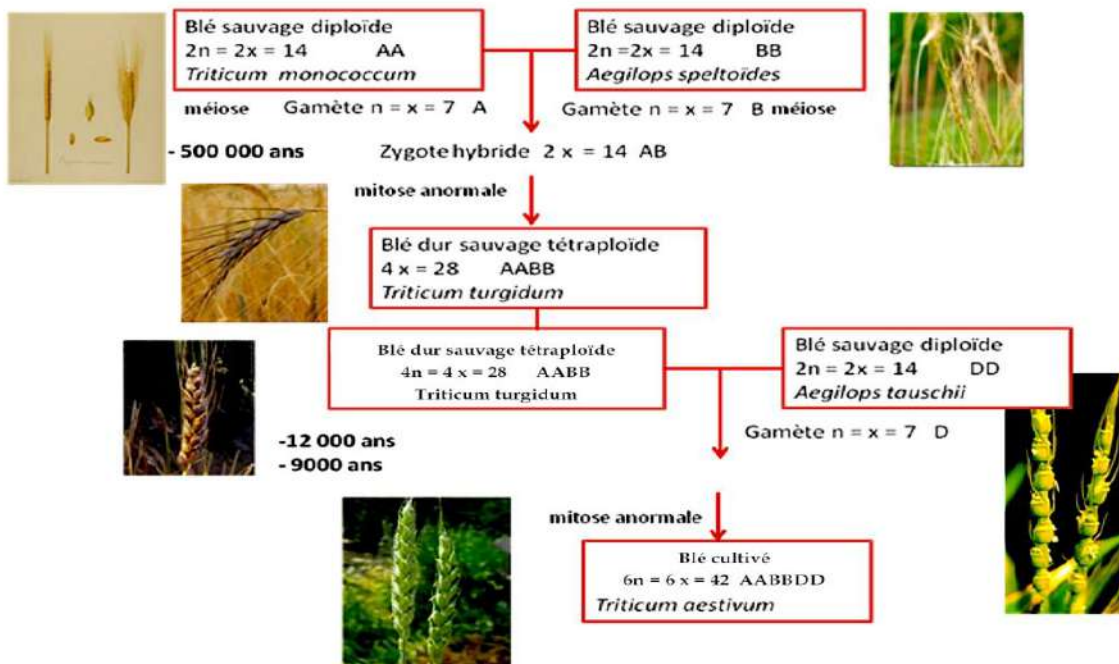


Figure 1 : Histoire évolutive du blé. L'hybridation de *Triticum monococcum urartu* (A) avec *Aegilops speltoides* (S) a conduit à la formation de *Triticum turgidum dicoccum*(AB) il y a environ 3 Millions d'années. Ce dernier a ensuite été domestiqué et sélectionné pour donner le blé dur (AB). *Triticum turgidum dicoccum* (AB) s'est hybridé avec *Aegilops tauschii* (D) pour former *Triticum aestivum* (ABD) qui représente le blé tendre (Feldman et al. 1995).

3.2. Caractéristiques botaniques

Le blé est une plante annuelle, monocotylédone, à feuilles alternes, formée d'un chaume portant un épi. L'épi de blé est formé de deux rangés d'épillets situés de part et d'autre du rachis émis par une base appelée le nœud. Chaque épillet est formé d'une paire de grandes glumes externes portant chacune trois ou quatre fleurs dont chacune est constituée de deux téguments extérieurs, appelés lemma et paléa, qui renferment les organes reproducteurs. L'organe reproducteur femelle est formé d'un stigmate attaché à l'ovaire par un stylet. L'organe reproducteur mâle ou les anthères en nombre de trois sont également portés par la même fleur. À la maturité, le pollen germe sur le stigmate et forme le tube pollinique renfermant deux gamètes mâles qui se développent le long du stylet lors de leur migration. Quand ils atteignent l'ovule et les noyaux polaires, ils les fertilisent et forment respectivement, l'embryon et l'albumen du grain. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscant (qui ne s'ouvre pas), appelé caryopse, constitué d'une graine (composée

d'un embryon et d'un tissu de réserve constitué de 70 % d'amidon et 15 % de gluten) et de téguments (**Figure 3**) (Setter and Carlton 2000).

3.3. Caractéristiques culturelles et développementales

Le blé peut être qualifié d'hiver ou de printemps. Le blé d'hiver est semé en automne et récolté en été, il caractérise les régions méditerranéennes et tempérées. Le blé de printemps est semé au printemps, ce genre de blé n'a pas besoin de vernalisation, il est plus répandu dans les régions à hiver très rude comme le Canada. Le cycle du blé (**Figure2**) débute par la germination d'une graine après humidification. L'embryon n'a qu'un cotylédon (le blé est une monocotylédone) et la plantule comporte un coléorhize, qui donnera la racine, et un coléoptile, qui donnera l'axe feuillé. La levée commence quand la plantule sort de terre, le coléoptile forme un étui protégeant les premières feuilles. Il apparaît un renflement dans la partie supérieure du rhizome qui grossit et forme le plateau de tallage. Ensuite, le stade 3 feuilles est une phase repère pour le développement du blé ; c'est à partir de ce stade qu'il entre en vernalisation, mimée en conditions contrôlées par un passage en chambre climatique à 6°C pendant 6 à 8 semaines. Des bourgeons se forment à l'aisselle des feuilles et donnent des pousses appelées talles. Le tallage commence au début de l'hiver et se poursuit jusqu'à la reprise du printemps. Il est marqué par l'apparition d'une ou plusieurs tiges secondaires qui donneront chacune un nouvel épi. L'épi se développe au sommet du bourgeon terminal puis commence le stade de montaison correspondant à la montée de l'épi et à l'allongement des entre-nœuds. Enfin l'épiaison, en avril ou mai en Algérie, a lieu lorsque la gaine éclatée laisse entrevoir l'épi qui va s'en dégager peu à peu. À ce stade, le nombre total d'épis est défini, de même que le nombre total de fleurs par épi. La reproduction se fait par cléistogamie, ou autopollinisation automatique puisque les fleurs ne s'ouvrent pas. Chaque fleur peut potentiellement donner un grain. La floraison s'observe à partir du moment où quelques anthères sont visibles dans le tiers moyen de l'épi, elles entraînent l'ouverture des épillets et sortent en dehors des glumelles, laissant l'entrée possible aux agents pathogènes comme ceux responsables de la fusariose des épis. À leur sortie les anthères sont jaunes puis deviennent blanches après exposition au soleil. En conditions de culture au champ, le stade floraison correspond à 50% des épis fleuris.

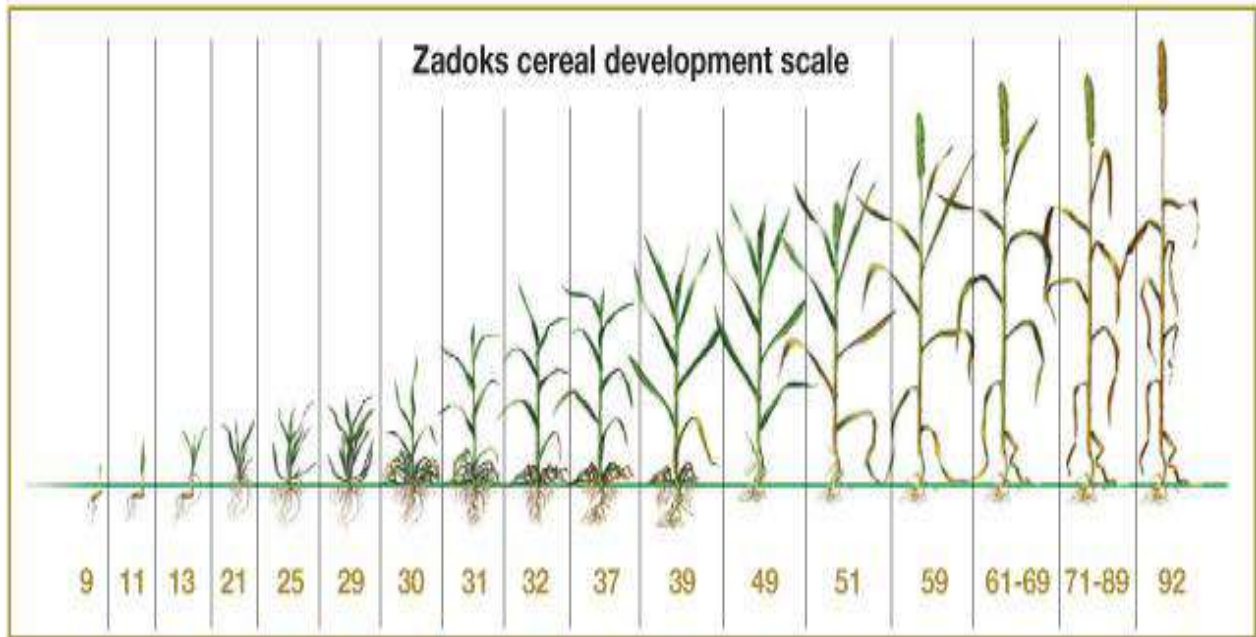


Figure 2 : Principaux stades de développement du blé et leurs correspondances sur l'échelle de Zadoks (Zadoks et al. 1974). Les schémas illustrent ces principaux stades (<https://wheat.pw.usda.gov>) consulté le 02/06/2021.

Environ 15 jours après la floraison, le blé commence à changer de couleur : il perd sa couleur verte pour tourner au jaune - doré. Le cycle s'achève par la maturation qui dure en moyenne 45 jours. Les grains vont progressivement se remplir et passer par différents stades tels que les stades laiteux, puis pâteux, au cours desquels la teneur en amidon augmente et le taux d'humidité diminue. Durant cette phase, les réserves migrent depuis les parties vertes jusqu'aux grains. Afin de caractériser précisément les stades de développement du blé, le phytopathologiste Néerlandais Jan C. Zadoks a proposé une échelle en 1974 présentée dans la **Figure 2**. Cette échelle est aujourd'hui couramment utilisée en recherche et en agriculture (Zadoks et al. 1974).

3.4. Caractéristiques morphologiques

Le principal représentant des blés tétraploïdes à grains nus : le blé dur, est une plante de climats chauds et secs. L'épi a généralement de longues barbes, et une section carrée ou comprimée. L'épillet a 2-5 fleurs. Les glumes n'ont pas d'arêtes. Le grain nu est translucide et très dur. Par conséquent le blé tendre compte en général cinq à sept nœuds ainsi que trois ou quatre feuilles véritables. Les entre-nœuds sont creux. Les feuilles sont composées d'une gaine glabre ou pubescente en surface, munie d'auricules falciformes,

d'une ligule membraneuse de 1 mm de long, et d'un limbe plat, pubescent en surface, de 10 à 60 cm de long sur 10 à 15 mm de large (Clayton et al. 2018).

Les épillets fertiles, ovales, comprimés latéralement, de 10 à 15 mm de long sur 9 à 18 mm de large, comprennent de 2 à 4 fleurons fertiles, avec des fleurons réduits à l'apex (Clayton et al. 2018).

La domestication du blé a eu des conséquences sur les caractéristiques morphologiques de la plante via la sélection empirique d'allèles mutés sur certains locus (Shewry 2009; Xie et al. 2018). Une diminution de la dormance de la graine, une diminution du nombre de talles, une modification de l'architecture de l'épi de blé (d'un épi fragile avec un rachis cassant à un épi solide et compact) ainsi qu'une augmentation de la taille des grains sont également des caractéristiques morphologiques issues de la domestication (Dubcovsky and Dvorak 2007). Ces caractères morphologiques ont ensuite constamment évolué sous la pression des processus de sélection.

Les racines : deux sortes de racines : • Les racines primaires : ou séminales issues de la semence qui se développent au moment de la germination ; la radicule qui débouche 1ere paire de racines qui va sortir en même temps ; et la 2ème paire racinaire. Ces racines qui sont constituées que de tissus primaires vont nourrir la plantule jusqu'au stade tallage. • Un système racinaire fasciculé ; assez développé, (racines adventives ou coronaires) ; qui sont produites par le développement de nouvelles talles. Elles peuvent atteindre jusqu'à 1m50.

Les tiges : Elles sont constituées de chaumes, cylindriques, souvent creux par résorption de la moelle centrale mais chez le blé dur est pleine. Elles se présentent comme des tubes cannelés, avec de longs et nombreux faisceaux conducteurs de sève. Ces faisceaux sont régulièrement entre croisés et renferment des fibres à parois épaisses, assurant la solidité de la structure. Les chaumes sont interrompus par des nœuds qui sont une succession de zones d'où émerge une longue feuille.

Les feuilles : Engainent la tige puis s'allongent en un limbe étroit à nervures parallèles lancéolées, issues chacune d'un nœud ; compte à la gaine est un cylindre qui permet d'attacher le limbe au nœud le plus bas, son rôle est chlorophyllien, conservation d'eau et d'air et avant l'allongement des talles les gaines protègent l'apex qui se trouve en cercle concentrique au

plateau de tallage. L'oreillette ou stipules sont des organes membranaires dépourvus de chlorophylle dont le rôle n'est pas encore bien déterminé (elles forment des joints empêchant particulièrement l'eau de pluie ou de rosé de s'infiltrer à l'intérieur de la gaine (**Figure 3**) ; la ligule est un organe membranaire qui se forme à l'adjonction entre le limbe et la gaine (Prats et al.1971). Chez toutes les graminées la présence et la forme des oreillettes ou stipules et de la ligule, permet de déterminer l'espèce avant l'apparition de l'épi (Soltner 1988).

L'appareil reproducteur : L'inflorescence du blé dur est un épi muni d'un rachis portant des épillets séparés par de courts entre nœuds .Chaque épillet comporte deux glumes (bractées) renfermant de deux à cinq fleurs distiques sur une rachéole. Un épillet regroupe de deux à cinq fleurs, et souvent trois fleurs à l'intérieur de deux glumes (**Figure 3**). Chaque fleur est dépourvue de pétales, et est entourée de deux glumelles. Elle contient trois étamines qui ont la forme en x (les pièces mâles), un ovaire surmonté de deux styles plumeux dichotomiques (les pièces femelles). La fleur du blé est dite cléistogame (Prats 1966). C'est-à-dire que, le plus souvent, le pollen est relâché avant que les étamines ne sortent de la fleur. Il s'attache alors aux stigmates, où peut se produire la fécondation (**Figure 3**). À cause du caractère cléistogame de la fleur, l'autofécondation est le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés : ce sont les anthérozoïdes issus du pollen d'une fleur qui fécondent l'oosphère et la cellule centrale du sac embryonnaire de l'ovaire de cette même fleur (les cellules sexuelles femelles sont protégées dans un sac embryonnaire fermé au sein d'un ovule).

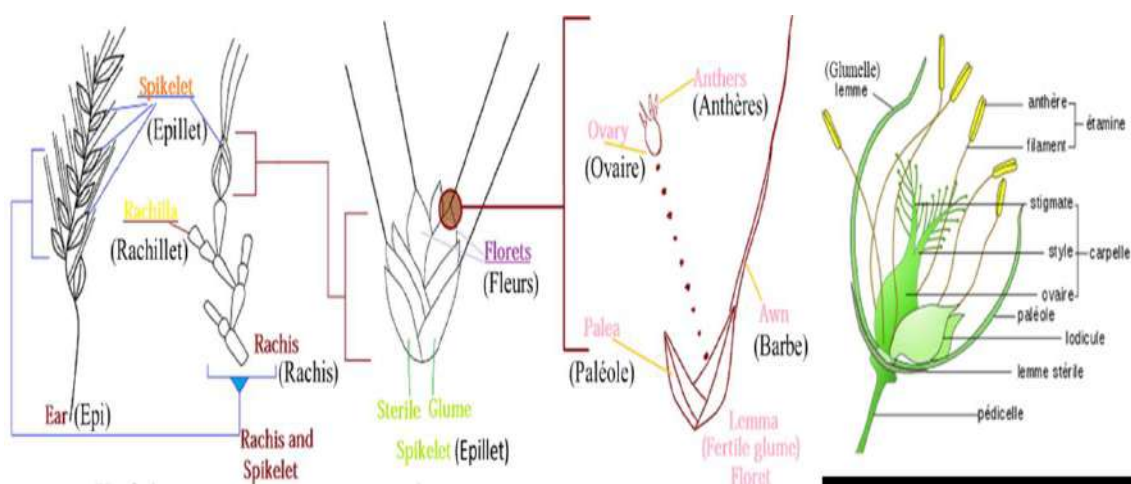


Figure 3 : Anatomie de l'épi de blé, de l'épillet et de la fleur (Setter and Carlton 2000).

4. Grain de blé

4.1. Structure du grain de blé

Le grain de blé est un caryopse nu (Soltner 2005) constitué d'un albumen représentant 80% à 85% du grain, d'enveloppes de la graine et du fruit (13% à 17% du grain). Après fécondation, l'ovaire donnera le grain de blé. Dans le cas du blé, le grain est à la fois le fruit et la graine. En effet, les enveloppes du fruit sont soudées à celles de la graine. Le grain de blé est un fruit particulier, le caryopse. L'enveloppe externe est adhérente à la matière végétale de la graine et la protège des influences extérieures. Au cours de la mouture, les enveloppes (téguments) sont parfois séparées du grain (embryon + albumen) et commercialisées en tant que son. Le grain contient 65 à 70 % d'amidon ainsi qu'une substance protéique (le gluten) dispersée parmi les grains d'amidon. Cette viscoélasticité permet de faire du pain de qualité : les bulles de CO₂ dégagées lors de la dégradation anaérobie de l'amidon par les levures sont piégées dans le réseau de gluten à la fois tenace et élastique (la pâte "lève"). L'embryon ou germe est la partie essentielle de la graine permettant la reproduction de la plante : en se développant il devient à son tour une jeune plante. Du fait qu'il contient beaucoup de matières grasses (environ 15%) ou d'huiles et qu'il pourrait donc rancir, le germe est souvent éliminé lors du nettoyage des grains. Les embryons de céréales sont vendus dans les boutiques de diététique car ils sont considérés comme très sains en raison de leur haute teneur en sels minéraux, vitamines, protéines et huiles (Surget and Barron2005) (**Figure 4**).

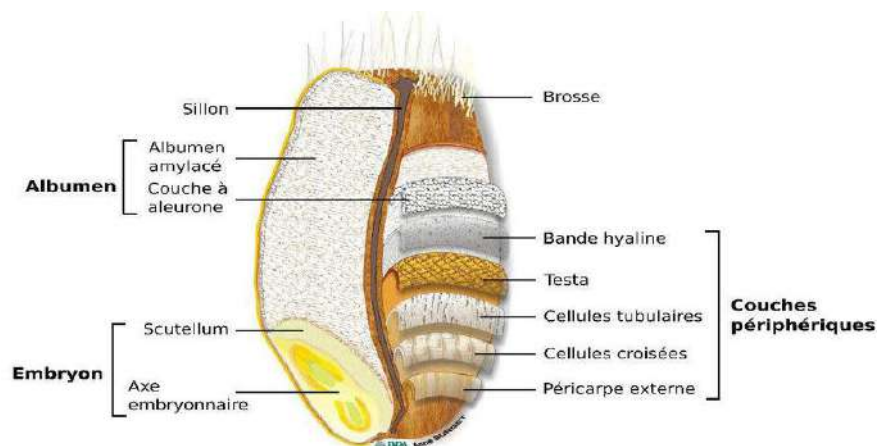


Figure 4 : Les différentes parties constituant un grain de blé mature. Le grain de blé est constitué de trois parties : l'embryon, l'albumen et les couches périphériques. D'après Surget and Barron (2005).

4.2. Développement du grain

Le développement du grain se fait en trois importantes étapes : (1) étape de la croissance et du développement du grain, (2) le remplissage du grain et enfin (3) déshydratation et maturation du grain.

4.2.1. Croissance et développement du grain

Après le double fécondation, l'endosperme et le sac embryonnaire subissent des changements et des modifications dans leur structure. La formation de l'endosperme commence à cette phase avec deux étapes clés (Olsen 2001) : (i) une étape de multiples divisions nucléaires qui aboutit à la formation du cénocyte (0-1 jours après l'anthèse) suivie d'une étape de (ii) cellularisation avec formation des différentes couches du grain dont la couche aleurone (3-6 jours après l'anthèse, 50-100°Cd (degrees Celsius day) (températures journalières cumulées). La cellularisation se caractérise par l'initiation de la formation de la paroi cellulaire et d'une activité mitotique intense suivie par une endoreduplication qui se produit jusqu'à 8 ou 10 jours après l'anthèse (135-165°Cd). L'étape de différenciation cellulaire inclut donc la formation des principaux types cellulaires du grain dont les cellules de transfert, la couche aleurone, l'endosperme et l'embryon.

4.2.2. Remplissage du grain

Cette étape correspond à la croissance des cellules de l'endosperme grâce à l'accumulation des réserves notamment de l'amidon et les protéines (Li et al. 2011). Pendant cette phase, les couches périphériques du grain se compressent avec l'endosperme qui croît avec l'accumulation des protéines de réserve dans les corps protéiques et la synthèse et l'accumulation de granules d'amidon. Quant à l'embryon, il continue de se diviser et devient de plus en plus important.

4.2.3. Déshydratation et maturation du grain

Les couches périphériques du grain subissent un processus de mort cellulaire programmée à ce stade et deviennent de couleur jaune. Le grain subit également une diminution de la teneur en eau et un arrêt de l'accumulation des réserves. L'embryon est complètement formé et continue de recevoir les réserves en lipide et en protéines à partir de l'endosperme.

Chapitre 2: La fusariose

Chapitre 2: La fusariose

1. La fusariose du collet (FCR) et la brûlure de l'épi du blé (FHB)

1.1. Généralités

La fusariose est une maladie qui peut toucher tous les organes de la plante. Le terme "fusariose" regroupe trois types distincts de symptômes (Parry et al. 1995) : (i) Fusariose des semences ou fonte des semis (Seedling Blight), qui provoque des pertes de levée, (ii) Fusariose du collet (Fusarium Crown Rot FCR) entraînant la nécrose des tissus du collet, et (iii) Fusariose de l'épi (Fusarium Head Blight FHB). La fusariose de l'épi a été décrite pour la première fois par W. G. Smith en 1884 est nommée « gale du blé en anglais wheat scab », terme modifié en 1920 par Atanasoff en « maladie de *Fusarium* », « Fusarium blight », puis « fusariose » par Douin en 1926 (Leonard and Bushnell 2003).

En Algérie, plusieurs maladies de blé sont responsables de pertes de rendement ou encore d'une dégradation de la qualité sanitaire des grains. Les plus importantes, sont la septoriose (*Septoria* spp.), les rouilles (*Puccinia striiformis* et *tritricina*), et les fusarioses (*Fusarium* spp.). Parmi ces maladies, la pourriture fusarienne du collet (FCR) et la fusariose de l'épi (FHB) sont deux maladies fongiques les plus destructrices et dommageables du blé (Abdallah-Nekache et al. 2019; Touati-Hattab et al. 2016; Laraba et al. 2017).

1.2. Symptômes de la FCR et la FHB

La FCR est une maladie grave du blé et d'autres céréales telles que l'orge et le maïs. La spore qui se trouve sur la plante hôte germe en produisant un mycélium. Les hyphes qui forment le mycélium parviennent à pénétrer dans la plante, c'est-à-dire à l'infecter par des ouvertures naturelles ou des blessures à la surface de la plante. Lorsque le champignon s'est introduit dans un tissu, celui-ci progresse d'abord de manière intercellulaire, c'est la phase asymptomatique de la maladie. Le champignon rejoint les vaisseaux conducteurs du xylème et se développe ainsi dans la moelle de la tige. Cela permet au champignon de se développer dans l'ensemble de la plante. L'hyphes pénètre dans les cellules de l'hôte en traversant la paroi (**Figure 5**). C'est le début de la phase symptomatique de la FCR caractérisée par la nécrose et la pourriture sèche de la couronne, le tissu basal de la tige et de la racine, la colonisation des tissus vasculaires par les hyphes, l'avortement des talles, et formation de points blancs avec des grains ratatinés. L'infection initiale des plantules se caractérise par des lésions brunes, qui deviennent apparentes dans la couronne, ainsi qu'un degré accru de décoloration des tiges et

s'étend à l'intérieur des gaines, des feuilles et des tiges (Chakraborty et al. 2006 ; Scherm et al. 2012).

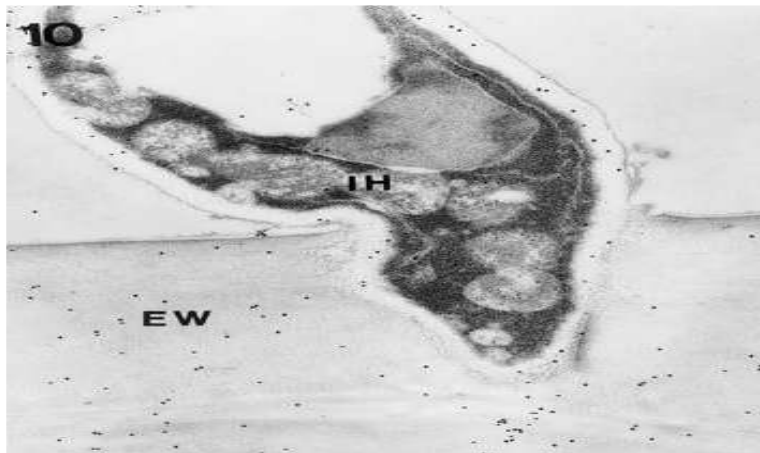


Figure 5: Micrographie de l'infection d'une cellule de l'épiderme du lemme par un hyphes de *Fusarium culmorum* (Kang and Buchenauer 2002). **EW:** Paroi de la cellule de l'épiderme : **IH :** Hyphes du parasite.

La FHB est une maladie complexe et dommageable du blé et d'autres céréales telles que l'orge et le maïs. Lorsque des conditions favorables à l'ouverture du périthèce sont réunies (obscurité et humidité suffisante), les ascospores se diffusent dans l'air ce qui permet la colonisation des fleurs, de la tige voire des grains par les ascospores du champignon (**Figure 6**). Le champignon est alors sous sa forme sexuée, *Gibberella*. Par la suite, les ascospores vont germer si l'humidité relative est supérieure à 85% et la température avoisine les 25-30°C. L'infection peut intervenir à différents stades de développement de la plante-hôte, à partir des ouvertures de tissus dues à la sénescence, ou par les anthères après la floraison (Kang and Buchenauer 2002). La floraison est le stade le plus favorable à l'infection du blé qui est appelée fenêtre de susceptibilité (György et al. 2020). La FHB est donc initiée par le dépôt de spores matures sur des épis de blé en fleur. Ces spores extrudées germent et colonisent les anthères, généralement dans la partie médiane de l'épi, où commence la floraison et où l'humidité est supérieure à celle des autres épillets (Walter et al. 2010; Leonard and Bushnell 2003). Ils entrent dans la fleur et se développent afin de rejoindre la graine en formation, les bractées florales et le rachis. La pénétration dans l'épi peut également avoir lieu en surface des glumes ou via des ouvertures naturelles (stomates, blessures, base de l'épillet) (Brown et al. 2010; Champeil et al. 2004). Au cours de l'infection par la FHB, les vaisseaux végétaux deviennent bloqués, empêchant l'approvisionnement en eau et en

nutriments comme mécanisme de défense, et provoquant un flétrissement soudain des épillets (Kang and Buchenauer 2000; Kheiri et al. 2018). Le blanchiment dû à l'absence naturelle d'eau et de nutriments pourrait être confondu avec les symptômes de la FHB (Zwart et al. 2008). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose. Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose. En cas d'infection précoce, les grains sont de taille normale mais avec une décoloration rose.

1.3. Conditions favorables au développement de la maladie

Trois facteurs indépendants conditionnent la sévérité des attaques et les symptômes des épidémies de *Fusarium*: les facteurs climatiques, les facteurs culturels et les facteurs physiologiques de la plante hôte (Bai and Shaner 1994; Alvarez et al. 2010; Walter et al. 2010).

1.3.1. Facteurs climatiques et phénologiques

Les facteurs climatiques, en particulier, l'humidité et la température, jouent un rôle primordial, puisqu'ils vont conditionner à la fois la germination des spores du champignon et l'infection. Chaque espèce de *Fusarium* a des conditions optimales de température et d'humidité. Des souches de la même espèce issues de régions géographiques différentes peuvent également avoir des conditions de températures et d'humidité optimales différentes, suggérant l'existence chez certaines espèces de champignons phytopathogènes d'une spécialisation géographique et climatique (Shikur Gebremariam et al. 2017; Xu and Nicholson 2009; Doohan et al. 2003). *F. culmorum* a une température optimale de 26.5°C (Rossi et al. 2001). Ainsi, *F. culmorum*, *F. poae*, et *F. avenaceum* sont préférentiellement retrouvés dans des zones géographiques à climat plutôt froid et humide, comme l'est et le nord de la France ou le Royaume-Uni, alors que *F. graminearum* est plutôt présent dans les régions plus tempérées (Doohan et al. 2003).

Au niveau de l'humidité, des pluies fréquentes, une forte hygrométrie et / ou de fortes rosées autour de la floraison et des stades précoces de remplissage des grains sont favorables à l'initiation et au développement de la maladie sur l'épi. Durant tout le cycle cultural, l'humidité et le vent favorisent également la survie et la dispersion de l'inoculum primaire (Alvarez et al. 2011). Si les conditions favorables sont discontinues, l'infection peut toujours avoir lieu mais avec une efficacité réduite (Dewolf et al. 2003).

1.3.2. Facteurs agronomiques

Un précédent cultural sensible à la fusariose et potentiellement infecté lors de son cycle (maïs, blé, orge), joue un rôle principalement dans la conservation de l'inoculum primaire, il constitue une source potentielle d'inoculum pour la culture suivante via ses résidus. Également, un travail du sol augmenterait la dégradation des résidus en favorisant l'activité microbienne et donc limiterait la colonisation des résidus par les *Fusarium* (Pereyra et al. 2004). Enfin, les grandes surfaces de cultures sensibles à la fusariose sont propices au développement de celle-ci par la multiplication des sources d'inoculum (Mc Mullen et al. 1997).

1.3.3. Facteurs physiologiques

Les facteurs physiologiques de la plante hôte sont nombreux et influencent plus ou moins le développement de la fusariose. L'intensité de la maladie dépend non seulement de la quantité d'inoculum initial et de la virulence des souches pathogènes, mais aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (taille, densité d'épillets...), son état de stress, son stade de développement, la date et la durée de la floraison et le niveau de résistance de la variété (Xu et al. 2005; Audenaert et al. 2009).

La floraison est le stade le plus favorable à l'infection du blé qui est appelée fenêtre de susceptibilité (György et al. 2020). Le champignon aurait plus de difficultés à pénétrer dans les grains du fait de la présence du tégument autour de la graine (Champeil et al. 2004). La sensibilité de la plante à un stade de développement du blé restreint explique également pourquoi cette maladie est monocyclique (Audenaert et al. 2009).

1.4. Moyens de lutte contre la fusariose

Les principaux leviers de lutte contre la fusariose regroupent les pratiques culturales, la résistance variétale et la lutte chimique.

1.4.1. Pratiques culturales

Les pratiques culturales peuvent avoir un effet sur le développement de la fusariose étant donné que l'inoculum principal est conservé dans les résidus de la culture précédente. Bien qu'il soit évident que les rotations du maïs, du blé, et l'orge peuvent réduire les niveaux de maladie (Dill-Mackyand Jones 1999), il s'est avéré plus difficile d'évaluer les effets des différentes pratiques de travail du sol sur la maladie et sur son développement et sa gravité

(Mc Mullen et al. 1997). Miller et al. (1998) ont conclu que les conditions météorologiques sont plus influentes que les pratiques de travail du sol dans le développement de la fusariose. Il existe des preuves que *Fusarium* n'est pas bien adapté à la survie dans le sol en l'absence de résidus de culture. Sturzand Johnston (1985) ont trouvé *F. graminearum* sur des débris organiques dans le sol de la moitié d'un champ qui avait conservé le chaume d'une culture céréalière précédente, mais pas dans le sol de l'autre moitié, qui était restée en jachère pendant 2 ans. La rotation des cultures est la principale pratique culturale pour la gestion de la FCR, les niveaux d'inoculum dans le sol peuvent prédire l'expression de la maladie dans les années à venir, les cultures précédente sont un impact important sur la population de *F. culmorum* dans le sol, ainsi que l'incidence et la gravité de la FCR dans le blé dur, les cultures de rupture sont efficaces pour réduire l'inoculum de *F. culmorum* dans le sol, les racines et la tige du blé (Khemir et al. 2020)

1.4.2. Résistance variétale et contrôle génétique

Bien qu'il n'existe pas de variétés de blé totalement résistantes à la fusariose, il existe des variétés tolérantes, possédant des niveaux de résistance partiels permettant de limiter les pertes de rendements et l'accumulation des toxines dans la récolte. L'utilisation de ces variétés est la méthode la plus fiable et la plus rentable pour lutter contre cette maladie (Gebremariam et al. 2019).

La résistance génétique reste l'option de gestion de la fusariose la plus souhaitable. La résistance à la fusariose du blé est quantitative, contrôlée par 2 à 5 gènes (Miedaner 1997). Le nombre des sites d'emplacements chromosomiques putatifs contenant les gènes de résistance est révélateur de la difficulté de cribler cultivars et lignées pour la résistance à la fusariose (Buerstmayr et al. 1999). Parmi les programmes de sélection du blé de printemps dans le monde, on se fie beaucoup à la résistance à la fusariose, le cas de cultivar (cv) Frontana qui a été utilisé comme source de résistance à la fusariose dans les blés d'hiver au Canada (Pandeya et al. 1996).

Cinq mécanismes de résistance à la FHB ont été proposés : le type I est la résistance à l'infection initiale telle que manifestée dans le cv. Frontana ; le type II empêche la propagation dans l'épi après l'infection; le type III est la résistance à l'infection du grain ; le type IV est la tolérance qui permet de maintenir les rendements malgré la présence de la maladie ; et le type V est la capacité des hôtes à dégrader les toxines (Mesterhazy 1995). Les méthodes d'inoculation par pulvérisation sont utilisées pour cribler les lignées pour la résistance de type I. Les lignées de blé qui intègrent les qualités du type I et II, et qui résistent à la fois à

l'infection initiale et à la propagation dans l'épi, sont utilisées dans les programmes de sélection. Les types de résistance III, IV et V sont plus difficiles à manipuler et (ou) plus coûteux et ne sont pas utilisés dans les programmes de sélection actuels.

La relation entre espèces de *Fusarium* qui provoquent la brûlure de l'épi et la pourriture du blé a été examinée en détail par Miedaner (1997), qui a observé que la sélection dans les premiers stades de croissance ou sur un seul organe de la plante permettait rarement de prédire la résistance aux stades adultes de la plante. Le dépistage de la résistance à la fusariose demande beaucoup de travail et de temps, car il faut cultiver les plantes jusqu'à l'anthèse avant l'inoculation et pendant 2 à 3 semaines supplémentaires avant la notation.

Les techniques d'haploïdes doublés (Aung 1998) sont efficaces et sont utilisées par plusieurs laboratoires pour amener les lignées à l'homogénéité aussi rapidement que possible. Des marqueurs moléculaires de la résistance à la FHB sont également recherchés, en utilisant plusieurs méthodes, notamment les RFLP, les AFLP et les amorces PCR à base d'ADN.

Buerstmayr et al. (1999) ont trouvé que les chromosomes 5A, 3B, 4B, 6B et 6D renforçaient la résistance à la FHB. Bai et al. (1999) ont signalé un important locus de caractères quantitatifs (QTL) associé au bras long du chromosome 7B, tandis que Waldron et al. (1999), à l'aide d'une analyse RFLP, ont indiqué que le bras le plus significatif associé à la résistance à la fusariose était le bras court du chromosome 3B.

De nouvelles connaissances sur la découverte de gènes et la création de nouveaux cultivars comportant des allèles souhaitables pour améliorer la résistance à la FCR du blé ont été révélées par Jin et al. (2020). La sélection de diverses sources de résistance variétale exige des méthodes de dépistage efficaces et reproductibles, qui ne devraient pas présenter d'effets négatifs et d'interaction avec d'autres traits agronomiques. L'efficacité de la sélection peut être améliorée par la génétique des sources de résistance. Des progrès significatifs dans l'identification des Quantitative Trait Locus (QTL) conférant une résistance à la FCR et dans une relation de compréhension entre la FCR et d'autres caractères d'importance agronomique sont fabriqués à partir de blé et d'orge. Des études de cartographie biparentale ont détecté des loci de résistance à la fusariose sur 13 des 21 chromosomes de blé possibles de ceux qui sont partiellement des génotypes résistants (Liu and Ogbonnaya 2015). À ce jour, la plupart des QTL signalés jusqu'à présent ont été détectés sur la base des essais sur des semis en serre (Zheng et al. 2014; Martin et al. 2015).

1.4.3. Lutte chimique

La lutte fongicide reste une option de gestion pour réduire à la fois l'accumulation de mycotoxine déoxynivalénol (DON) et l'incidence des maladies associées à la fusariose. De nombreux fongicides appliqués en tant que traitements de semences se sont avérés efficaces contre la brûlure des semis et réduisent suffisamment la croissance fongique (Gilbert and Tekauz 1995). Les fongicides foliaires ont donné des niveaux variables de contrôle de la fusariose (Mc Mullen et al. 1997). Au Manitoba, le propiconazole a permis de contrôler partiellement les cultivars sensibles, mais pas dans le cultivar modérément sensible (Tekauz and Gilbert 1998). Aussi le propiconazole et le triadimefon ont réduit la sévérité de la maladie sur les épis ont abaissé les valeurs de DON dans les essais inoculés artificiellement. Tandis que le thiabendazole a réduit la contamination par le DON mais a eu peu d'effet sur la gravité de la maladie contre la fusariose (Boyacioglu et al. 1992).

Dans des études menées par Mesterhazy and Bartók (1996) le tébuconazole et le propiconazole ont constamment réduit les DON dans le grain, bien que pas toujours de manière significative, mais l'application du fongicide azoxystrobine a été associée à une augmentation de l'accumulation de DON (Hart and Ward 1997). Il est intéressant de noter que l'application des fongicides au blé inoculé a réduit l'incidence et la gravité des symptômes de la fusariose, mais n'a pas entraîné d'augmentation significative du rendement par rapport au blé non inoculé (Hart and Ward 1997).

2. Les champignons du genre *Fusarium*

2.1. Le genre *Fusarium*

La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809 (Règne *fungi*, Division *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, Sous-classe *Hypocreomycetidae*, Ordre *Hypocreales*, Famille *Nectriaceae*, Genre *Fusarium*). Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées. Il appartient à la division des Ascomycètes et à la famille des Nectriacées. À l'heure actuelle nous utilisons principalement un classement dérivé de celui de Nelson et al. (1983) lesquels regroupent les *Fusarium* dans 15 sections. Ce classement a été amendé par Burgess et al. (1994), puis par d'autres chercheurs grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire (Leslie and Summerell 2006). De nombreuses espèces fusariennes ont été identifiées dans la nature dont les principales capables d'induire la fusariose de l'épi de blé : *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F.*

arthrosporioides, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, et *F. crookwellense* (Xu and Nicholson 2009). Ce complexe d'espèces de *Fusarium* responsable aussi de la FCR, varie en fonction du temps et de la géographie (Leonard and Bushnell 2003; Xu and Nicholson 2009), dont, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum* et *F. graminearum* connus par leur haute pathogénicité provoquent des symptômes et des pertes de rendement plus graves et elles sont les espèces les plus courantes dans de nombreux pays (Smiley et al. 2005; Dyer et al. 2009). Cependant, autres espèces à faible pathogénicité, y compris *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. cerealis* (*crookwellense*), *F. chlamydosporum* et *F. avenaceum*, sont principalement isolées des tissus du sous-sol du blé et sont régulièrement considérées comme des colonisateurs secondaires ou des saprophytes plutôt que des agents pathogènes primaires (Fernandez and Jefferson 2004; Smiley et al. 2005; Bencheikh et al. 2020).

Les principales espèces capables d'induire la FHB sont: *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. arthrosporioides*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* et *F. crookwellens* (Xu and Nicholson 2009). Ce complexe d'espèces subit une dynamique au cours du temps. Les formes téléomorphes (formes parfaites) de quelques-unes d'entre elle sont bien connues. Cependant, plusieurs d'entre elles ont une forme téléomorphe toujours inconnue. Les champignons appartenant à ce genre présentent une grande diversité morphologique et une grande variabilité de croissance, ce qui rend plus difficile leur classification et leur caractérisation (Summerell et al. 2003). Outre des critères morphologiques et de croissance, des critères moléculaires sont utilisés pour affiner la caractérisation des différentes espèces de ce genre. Le genre *Fusarium* est présent dans toutes les régions du monde, des zones tempérées aux régions tropicales ou désertiques.

En 2014 et 2015, une recherche a été menée pour étudier les espèces associées à ces deux maladies en Algérie. Les couronnes et les épis symptomatiques ont été recueillies dans différentes régions productrices de blé. Les identifications morphologiques et moléculaires ont montré l'existence de six espèces fongiques isolées des couronnes : *Fusarium culmorum* (68%), *F. pseudograminearum* (10%), *F. verticillioides* (3 %), et *F. avenaceum* (2%). Deux espèces seulement, *F. culmorum* (94,1%) et *F. pseudograminearum* (5,9%), ont été obtenues à partir des épis et que *F. culmorum* est l'espèce dominante et la plus agressive sur les semis de blé associée à la FHB et la FCR à la fois (Abdallah-Nekacheet al. 2019).

2.2. Cycle de vie du pathogène

Le cycle de vie des agents pathogènes responsables de la fusariose est illustré dans la **figure 6** par le cycle de *F. graminearum*. Pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, les *Fusarium* spp. responsables de la fusariose des épis survivent dans le sol sous forme de chlamydospores (Bai and Shaner 1994). Cet inoculum primaire est capable d'infecter les semis et induire une fonte des semis (seedling blight) et une pourriture du collet (crown rot) (Arsan et al. 2011). Les ascospores et les conidies sont dispersées par le vent (Fernando et al. 1997) ou par splashing (dispersion par la pluie de feuille en feuille).

Trois sources d'inoculum peuvent être à l'origine du développement des fusarioses : les résidus de culture infectés l'année précédente (source principale) et en particulier les tissus qui se dégradent plus difficilement comme les nœuds (Champeil et al. 2004; Osborne and Stein 2007). La survie des champignons sur résidus peut atteindre plus de 2 ans après récolte ce qui les classe en « source à long terme ». Lorsque les résidus restent en surface, la survie de l'inoculum est plus longue (Pereyra et al. 2004; Audenaert et al. 2009). Les précédents culturaux les plus à risque sont les cultures hôtes de la fusariose comme le maïs, le blé, et l'orge. Dans la partie plus profonde du sol, seules les chlamydospores peuvent subsister jusqu'à quatre ans; ces spores ont une vie ralentie et une paroi épaisse leur permettant de résister longtemps à la sécheresse et l'asphyxie (Caron 1993).

Les semences infectées : lors des infections sur épi, le mycélium attaque les grains à travers les glumes, pénètre dans le péricarpe, l'albumen, voire l'embryon. Cette source d'inoculum permet à la maladie de se développer dès l'automne. Pendant la germination, le mycélium reprend son activité, et selon le degré de pénétration initial, il ralentit ou inhibe la germination, entraînant des manques à la levée et la fonte des semis (Xu and Nicholson 2009). Les plantes hôtes (*Agrostis*, *Bromus*, *Medicago*, *Festuca...*), peuvent également jouer le rôle de réservoir de *Fusarium* sans présenter de symptômes visibles (Leonard and Bushnell 2003; Champeil et al. 2004).

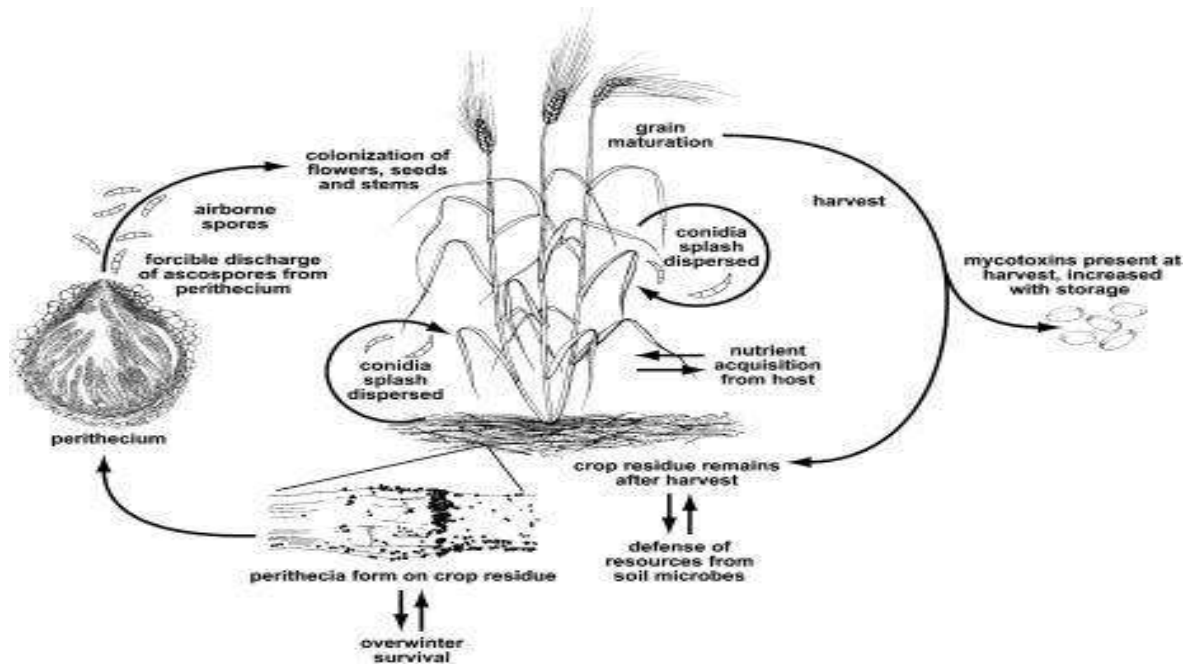


Figure 6 : Cycle de vie de *Fusarium graminearum* sur blé tendre (Trail 2009).

La fusariose regroupe plusieurs espèces qui ont des caractéristiques et traits de vie différents qui peuvent potentiellement influencer leur développement ou leur production de toxines lors d'une épidémie (Picot et al. 2011). Également, dans une région donnée, du fait d'optima de température et d'humidité, la distribution et la prédominance d'un ou plusieurs de ces pathogènes est en grande partie liée aux facteurs environnementaux (Xu and Nicholson 2009). Les nombreuses espèces et souches formant ce complexe fusarien ont fait l'objet de plusieurs travaux d'étude, notamment au niveau de leur différence d'agressivité ou de production de toxines.

La quantification des traits de vie des *Fusarium* spp. ainsi que les variables de sévérité sur collet du blé qui leur sont associées, est une étape indispensable afin de définir les liens entre les caractéristiques des souches et leur capacité à induire la FCR. Selon les chercheurs, les relations entre les concentrations en mycotoxines, la biomasse fongique et la quantité de symptômes observés sont complexes, très controversées et très aléatoires. Ces variables semblent dépendantes de l'environnement, des espèces de champignon (Reid et al. 1999; Xu et al. 2005) et même des souches présentes sur la culture (Goswami et al. 2005). Plusieurs études, portant sur le lien entre l'évaluation visuelle de la maladie, le développement du champignon et la concentration en mycotoxines, ont montré une forte corrélation entre la biomasse fongique et les symptômes sur épi (Burlakoti et al. 2007).

2.3. *Fusarium* et mycotoxines

Les champignons du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques nommés mycotoxines, dont la présence augmente l'incidence de la maladie sur les productions agricoles. Les espèces de *Fusarium* font partie des dangereux pathogènes des céréales qui présentent un potentiel de toxicité élevé. Les métabolites secondaire de ces champignons, tels que le déoxynivalénol (DON), la zéaralénone (ZEN) et la fumonisine B1, font partie des cinq mycotoxines les plus importantes à l'échelle européenne et mondiale (Mielniczuk et al. 2020). En Italie le chémotype 15-acétyldéoxynivalénol (15ADON) était le plus fréquent (83,4%), suivi de la 3 acétyldéoxynivalénol (3ADON) (10,7%) et nivalénol (NIV) (5,9 %) accumulés par *F. graminearum* (Prodi et al. 2011). Alors qu'en Algérie les enquêtes menées ont révélé que les souches de *F. culmorum* en plus des pertes de rendement provoquent aussi l'accumulation de diverses mycotoxines comme 3-acétyl désoxynivalénol (3ADON) ou du Nivalénol (NIV) (Abdallah et al. 2019; Laraba et al. 2017 ; Touati et al. 2016).

2.4. *F. culmorum*, agent principal responsable de la fusariose en Algérie

Ce champignon se trouve couramment dans les régions tempérées. Il est associé aux couronnes et aux grains des céréales, ainsi qu'aux débris végétaux dans le sol.

2.4.1. Principaux caractères à examiner sur milieux de cultures

Pour les caractères qui sont examinés sur milieu Carnation Leaf-Piece Agar (CLA), les macroconidies sont formées en abondance dans des sporodochies orange, elles sont courtes et robustes, avec une cellule de pied peu développée et une cellule apicale arrondie. Les macroconidies sont formées à partir de monophialides sur des conidiophores ramifiés dans les sporodochies.

Les caractéristiques sur Potato Dextrose Agar (PDA) montrent que *Fusarium culmorum* se développe rapidement produisant des sporodochies abondantes dans une grande masse centrale de spores (1 à 2 cm de diamètre), qui est initialement orange pâle mais devient marron à marron foncé avec l'âge. Des anneaux de masses de spores peuvent être formés par certains isolats dans des conditions de lumière et de température alternées. La plupart des souches forment des pigments rouges dans la gélose, mais certaines peuvent avoir un mycélium brun olive. Les sporodochia de couleur orange à marron et relativement commune, sa morphologie générale est robuste, relativement courte, et à paroi épaisse. Nombre de septa généralement entre 3 ou 4 septa (Leslie and Summerell 2006). Ces macroconidies sont

généralement de forme et de taille uniformes (**Figure 7**). Microconidies absentes. Chlamydo-spores habituellement abondantes et se forment relativement rapidement, nécessitant 3-5 semaines sur CLA (Leslie and Summerell 2006).

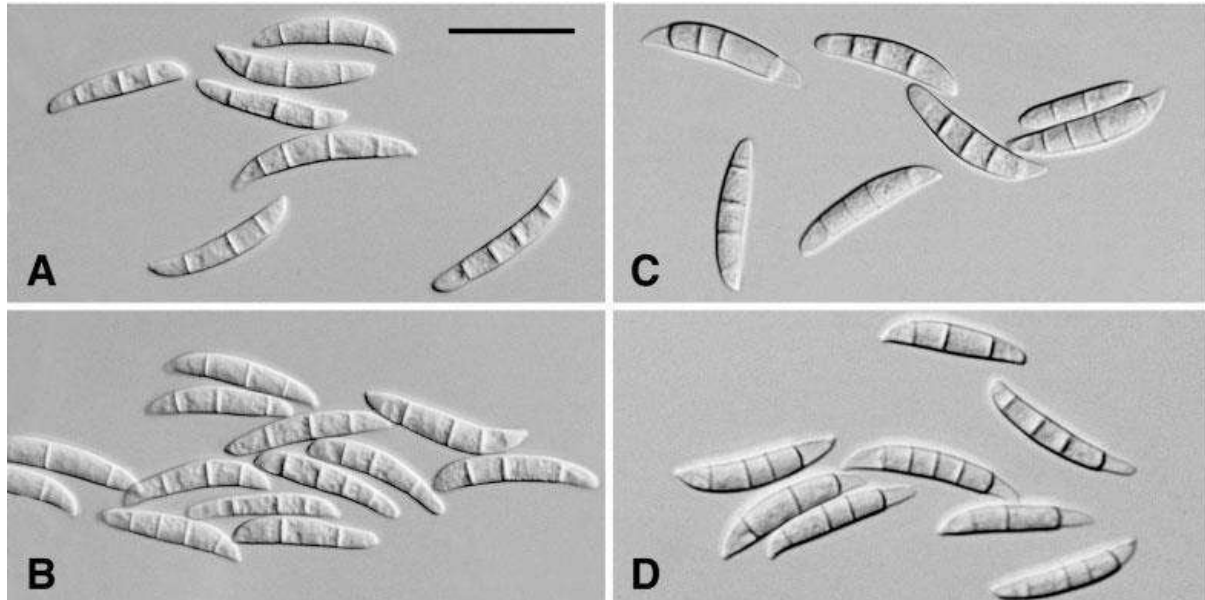


Figure 7: *Fusarium culmorum*. A - D: Macroconidies. Barre d'échelle = 25 µm (Leslie and Summerell 2006).

2.4.2. Taxonomie, pathologie et écologie

Le *Fusarium culmorum* peut être confondu avec le *F. sambucinum* ou *F. crookwellense*, car tous peuvent être isolés à partir des hôtes et régions climatiques similaires. La cellule apicale du *F. culmorum* est généralement émoussée (arrondie) mais dans certains isolats elle est légèrement papillaire, ce qui peut entraîner une confusion avec celles de *F. sambucinum*.

Le taux de croissance relativement rapide de *F. culmorum* le distingue de *F. sambucinum*, qui se développe lentement. *F. culmorum* se distingue de *F. crookwellense* par la forme de la macroconidie. Les macroconidies de *F. crookwellense* sont plus longues, ont une base distincte en forme de pied base de la cellule basale, et ont une cellule apicale effilée, tandis que les macroconidies de *F. culmorum* sont courtes, robustes et n'ont pas de cellule basale distincte en forme de pied (Gagkaeva2010). Phylogénétiquement, *F. culmorum* est le plus étroitement lié à *F. graminearum* et à *F. crookwellense* (Mulè et al. 2004). Le stade sexuel de *F. culmorum* est probablement hétérothallique (Kerényi et al. 2002). En plus des différences basées sur l'ADN, ces espèces peuvent également être distinguées par leurs profils de métabolites secondaires (Thrane 1990).

Fusarium culmorum est le plus commun dans les régions tempérées, et est souvent associé à des pourritures du pied des céréales, en particulier dans les régions froides d'Europe. L'interaction entre le *F. culmorum* et le virus de la naine jaune de l'orge peuvent intensifier les symptômes de la maladie observés (Koch and Huth 1997). Les plantes atteintes de la brûlure de l'épi présentent des grains rétrécis de type " pierre tombale ", mais ces grains malades ne sont pas toujours visibles (Gilbert et al. 2003). Une protéine de transport ABC est nécessaire pour la pathogenèse de *F. culmorum* sur le blé, ce qui suggère que le blé synthétise un composé antifongique que cette protéine est capable d'exporter de la cellule (Skov et al. 2004). Bien qu'étant un champignon du sol, *F. culmorum* peut être dispersé par éclaboussures à l'épi de certaines céréales, par exemple le blé et l'orge (Jenkinson and Parry 1994), où il peut provoquer des symptômes de brûlure de l'épi et coloniser largement le grain (Jackowiak et al. 2005).

Chapitre 3: *Trichoderma*

Chapitre 3: *Trichoderma*

1. Introduction

Trichoderma est un champignon cosmopolite, saprotrophe que l'on trouve principalement dans des environnements différents tels que le sol forestier, les racines et les feuilles et dans tous les types de sols, qui incluent les marais salants, l'agriculture, et même les sols désertiques. Ce champignon a été déclaré champignon du sol en raison de sa croissance rapide. Il a montré une grande capacité à utiliser différents types de substrats complexes et peuvent démontrer une forte résistance à différents types de produits chimiques toxiques. Par conséquent, l'espèce *Trichoderma* est très abondante sur le bois en décomposition. Ceci est principalement dû aux interactions hétérotrophes telles que les endophytes opportunistes (Howell 2003).

En outre, *Trichoderma* a été utilisé comme un agent de bio-contrôle efficace contre les phytopathogènes (Sharma et al. 2019). Selon Bissett et al. (2015) sur 260 espèces établies, environ 35 espèces ont été principalement découvertes pour leur importance économique plus précisément en raison de leur capacité à produire diverses enzymes ou pour être utilisées comme agents de bio-contrôle.

L'intérêt mondial a été donné aux recherches liées au champignon *Trichoderma* grâce à ses applications dans le domaine de l'agriculture et de la biotechnologie (Verma et al. 2017). On pense que *Trichoderma* est associé aux plantes en tant qu'épiphytes et endophytes. Les épiphytes sont des microflores bénéfiques que l'on trouve sur les parties aériennes des plantes qui peuvent être soit nuisibles soit bénéfiques pour la plante (Yadav et al. 2020). Il existe peu de rapports soutenant le fait que les espèces de *Trichoderma* se trouvent comme endophytes des plantes.

2. Taxonomie de *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* a été décrit pour la première fois par Parsoon en 1794 (Samuels 1996). Sa classification a été considérée comme contradictoire et douteuse et plus tard, de véritables tentatives ont été faites par Rifai en 1969 (Samuels 1996). Il a classé le genre *Trichoderma* d'une manière réalisable et les a regroupés en neuf espèces (Harman et al. 2004a). Le genre *Trichoderma* Pers. Ex Fr. appartient à *Deuteromycotina*, *Hyphomycetes*, *Phialosporae*, *Hyphales*, et *Dematiaceae*. Dennis and Webster (1971) ont placé ce genre comme *Hypocrea* Fr. dans les *Hypocreales*, *Ascomycotina* par la téléomorphe (**Figure 8**). Les études morphologiques détaillées et étendues basées sur les principales caractéristiques

morphologiques clés du genre *Trichoderma* ont été produites plus tard par Bissett (1991). L'étude avancée de *Trichoderma* a été réalisée par Samuels (1996). Il a développé des méthodologies basées sur des techniques moléculaires pour classer le genre *Trichoderma* et a contribué à améliorer la compréhension du genre jusqu'au niveau de l'espèce (Klyce 1984). L'identification des espèces de *Trichoderma* par des techniques moléculaires a également été mentionnée plus tard (Hermosa et al. 2000). De nombreux travaux ont été réalisés par différents scientifiques sur *Trichoderma* pour décider de sa classification morphologique ou moléculaire (Howell 2003).

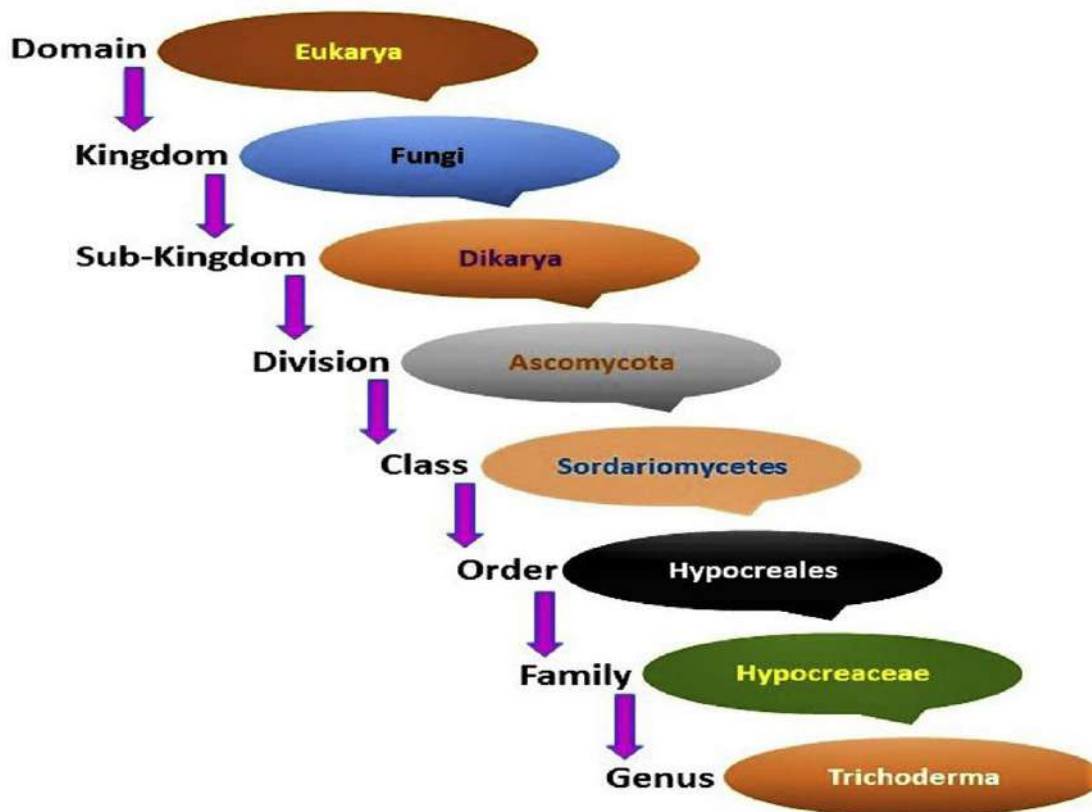


Figure 8 : Taxonomie de *Trichoderma* (Adnan et al. 2019)

3. Le genre *Trichoderma*

En 2000, Kiffer et Morelet ont identifié trente-six espèces au total du genre *Trichoderma* (Migahed 2003). Dans la même année, Samuel et al. (2006) ont ajouté plusieurs espèces à la liste. Bissett et al. (2003) ont décrit diverses méthodes pour étudier et définir les nouvelles espèces de *Trichoderma* d'Asie. Harman et al. (2004) ont travaillé sur l'identification des espèces du genre *Trichoderma* en utilisant des bases moléculaires et morphologiques et

ont identifié 75 espèces de *Trichoderma*. Enfin, les chercheurs ont suivi diverses méthodologies moléculaires et biochimiques en plus de la taxonomie et ont identifié 104 espèces au total (Samuel et al. 2006).

3.1. Description de *Trichoderma*

Les champignons appartenant au genre *Trichoderma* sont connus comme des champignons imparfaits car ils n'ont pas de stade sexuel connu (Gupta et al. 2014). Ces champignons peuvent être caractérisés par une production massive de spores (conidies) de différentes nuances de couleur verte et une croissance rapide sur les milieux (Klyce 1984). Les revers des colonies sur boîte de Pétri apparaissent souvent comme chamois, incolores, jaunes, vert-jaune ou ambrées et de nombreuses espèces peuvent produire des quantités exceptionnelles de chlamydospores (spores à paroi épaisse) dans le mycélium submergé (Vinale et al. 2008).

Les *Trichoderma*spp. ont des fructifications de couleur vive qui facilitent leur détection et leur reconnaissance (Harman et al. 2012). Ces champignons aiment les plantes herbacées et boisées où les formes télémorphes sont généralement trouvées. Cependant, de nombreuses souches de bio-contrôle et d'autres souches n'ont pas de stade sexuel. Les formes asexuées apparaissent dans la nature comme des populations ou des individus clonaux, parfois hétérocaryotes, qui ont pu évoluer indépendamment au stade asexué (Gupta et al. 2014). Elles présentent une diversité génétique de haut niveau, et peuvent être utilisées pour la production d'un large éventail de produits d'intérêt écologique et commercial (Kubicek et al. 2011 ; Woo et al. 2006). C'est dans les années 1930 qu'il a été reconnu pour la première fois que les espèces de *Trichoderma* ont un potentiel de bio-contrôle contre les maladies des plantes. Dans les années qui ont suivi, diverses maladies ont été ajoutées à cette liste (Papavizas 1985 ; Chet and Inbar 1994). Cela a abouti à la production commerciale d'espèces de *Trichoderma* pour l'amélioration de la croissance et le contrôle des maladies de diverses cultures aux États-Unis, en Suède, en Inde et en Nouvelle-Zélande (Verma et al. 2007 ; Nawrocka and Małolepsza 2013 ; Benítez et al. 2004).

3.2. Biodiversité et richesse des espèces de *Trichoderma*

Des études approfondies ont été réalisées sur la taxonomie et la biodiversité de *Trichoderma* en Amérique du Nord et dans diverses régions d'Europe où la répartition des espèces est bien connue (Bissett et al. 2003; Lieckfeldt et al. 2001). Kullning et al. (2000) ont rapporté soixante-seize isolats du nord de l'Inde, du Népal et de la Russie, dans lesquels il a

signalé 7 espèces (*T. asperellum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. oblongisporum*, *T. Virens* et *T. harzianum*) ainsi que 5 nouveaux taxons. Leurs résultats suggèrent que *T. harzianum* est génétiquement l'espèce la plus diversifiée. Quatre-vingt-seize souches de *Trichoderma* ont été isolées et identifiées au niveau de l'espèce par l'analyse de la séquence de l'espaceur transcrit interne 1 et 2 par Kubicek et al. (2003), les isolats les plus courants étaient *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. virens*, *T. coningii*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. hamatum*, *T. viride* et *T. ghanense*. De même, en Asie du Sud-Est, Kubicek et al. (2003) ont signalé aussi que *T. asperellum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. viride*, *T. virens* comme neuf nouvelles espèces. En Chine, la biogéographie et la biodiversité de *Trichoderma* a été évaluée par Zhang et al. (2005) de quatre régions différentes : la province de Hebei dans le nord, la province de Zhejiang au sud-est, le Tibet à l'ouest et la province du Yunnan dans le sud-ouest. Ils ont identifié *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. velutinum*, *T. viride*, *T. cerinum*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. sinensis*, *T. longibrachiatum* et *T. citrinoviride* en plus de deux espèces nouvellement acceptées. Hoyos-Carvajal et al. (2009) ont démontré que dans les zones tropicales, *T. asperellum* était plus répandu que *T. harzianum*. Les isolats de *T. asperellum* ont été trouvés dans des sols contenant des matières peu décomposées comme des résidus de récolte ou des feuilles mortes dans les zones de climat froid du Pérou, de la Colombie et du Brésil.

La Sardaigne, un pays chaud de la méditerranée, où la biodiversité a été étudiée par Migheli et al. (2009) qui ont étudié l'effet des facteurs abiotiques sur la distribution de *Trichoderma*. Dans des recherches ultérieures, 482 souches de *Trichoderma* ont été identifiées dans des environnements perturbés et non perturbés (terres arbustives, forêts et steppes herbeuses pâturées de manière extensive ou non). Une autre enquête a décrit la diversité des espèces de *Trichoderma* au Japon, en Indonésie, au Vietnam et en Mongolie. 332 souches ont été isolées dont *T. harzianum*, *T. virens*, *T. hamatum* et *T. crissum*, elles étaient réparties dans tous les habitats (Jaklitsch and Voglmayr 2015). Sadfi-zouaoui et al. (2009), ont trouvé *T. longibrachiatum*, et *T. harzianum* dans les sols forestiers du nord ; *T. hamatum* et *T. atroviride* dans les champs de culture du nord-est ; *T. saturnisporum* dans les sols forestiers du centre et *T. hamatum* et *T. harzianum* dans les sols des oasis du sud de la Tunisie. Tandis qu'en Algérie, Haouhach et al. (2020) ont reporté pour la première fois *T. atrobrunneum* (le sud), *T. longibrachiatum* (le sud), et *T. afroharzianum* (le nord-ouest). Ainsi Benttoui et al. (2020) ont caractérisé *T. harzianum*, *T. afroharzianum* et *T. hirsutum* parmi les champignons colonisant le nématode phytoparasite *Globodera rostochiensis*. En

outre Bouanaka et al. (2021a) ont caractérisé *T. afroharzianum* à partir du sol (le nord-est algérien).

4. *Trichoderma* comme agent antagoniste potentiel

Trichoderma, que l'on trouve dans tous les types de sols du monde entier, est reconnu comme un symbiote opportuniste avirulent des plantes (Samuels 2004). Une interaction mutualiste endophyte avec les plantes est la caractéristique clé de plusieurs espèces de *Trichoderma*, ce qui leur permet d'être activement utilisées comme agent antagoniste (AA) contre diverses maladies fongiques des plantes (Bongiorno et al. 2016). Les espèces de *Trichoderma* peuvent facilement s'établir dans tout type de sol de la rhizosphère et peuvent y survivre pendant plusieurs mois (Ellis 2013). L'existence de *Trichoderma* dans un sol supprime la population d'autres micro-organismes compétitifs, ce qui en fait un agent de biocontrôle dominant au niveau local (Rasool Azarmi 2011).

Des microbes diversifiés existent dans la rhizosphère du sol qui comprend également *Trichoderma* et les exsudats racinaires. Ces microbes jouent un rôle vital en attirant *Trichoderma* et en favorisant sa colonisation (Vinale et al. 2008) (**Tableau 2**). La défense des plantes est renforcée par divers *Trichoderma* spp. grâce à la production de plusieurs MAMPs (Microbial-Associated Molecular Pattern) (Maaløe 2002; Mathys et al. 2012). Il peut s'agir de xylanases, de swollénines, de peptaïbols, et de cérato-platanines.

Tableau 2 : Les différentes souches de *Trichoderma* contre différents pathogènes bactériens.

Espèce de <i>Trichoderma</i>	Plante	pathogène	Mécanismes/ activité	Références
<i>Trichoderma harzianum</i>	Tomate	<i>Clavibactermichiganensis subsp.michiganensis</i>	Lysosime et empêcher l'activité	Utkhede and Koch (2004)
<i>Trichodermas</i> pp.	Riz	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	Activité de biocontrôle	Gokil-Prasad and Sinha(2012)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Tomate	<i>Xanthomonascampes tris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Activité de biocontrôle, dosage de l'antagonisme	Suárez-Estrella et al. (2014)
<i>Trichoderma harzianum</i> T23	Activité <i>in vitro</i>	<i>Clavibactermichiganensis</i> et <i>Erwinia Amylovora</i>	Production de viridiofongine A(VFA)	El-Hasan et al. (2009)
<i>Trichoderma</i>	Arabidop	<i>Clavibacter</i>	Production extracellulaire d'e	Saloheim

<i>reesei</i>	sis et la tomate	<i>michiganensis</i>	nzyme, swollenine	o et al. (2002)
<i>Trichoderma asperelloides</i> T203	Tomate	<i>Pseudomonas syringe</i> pv.	Augmenter le niveau de WRKY 40 facteur de transcription	Brotman et al. (2012)
<i>Trichoderma atroviride</i>	Tomate	<i>Alternaria solani</i>	Sécrète Sm1 et protéine Ep11	Salas-Marina et al. (2011)

5. Avantages de l'application de *Trichoderma*

En tant qu'agent antagoniste, *Trichoderma* présente un certain nombre d'avantages par rapport aux autres agents de bio-contrôle (**Figure9**). Les détails sont expliqués ci-dessous.

5.1. Tolérance au stress abiotique

Les graines traitées par *Trichoderma* se développent plus rapidement que les graines non traitées dans des conditions de stress (température, sel ou pression osmotique). La réponse cohérente à divers stress peut faire intervenir un mécanisme commun dans lequel l'association champignon-plante augmente la tolérance des variétés aux stress biotiques et abiotiques (Ahmad et al. 2015). Il a déjà été signalé que la croissance des plantes est améliorée en association avec des espèces de *Trichoderma*, de la même manière que d'autres microorganismes favorisant la croissance des plantes. Mais les effets sont plus importants avec *Trichoderma* lorsque les plantes sont sous stress biotiques et abiotiques et/ou physiologiques (Rasool Azarmi 2011; Bimenya et al. 2002; Berg 2009). Plusieurs rapports montrent que pendant la croissance de la plante, les champignons augmentent la tolérance de la plante aux stress, ce qui peut être dû à une amélioration de la croissance des racines, de l'absorption des nutriments (par exemple, le potassium) ou de la capacité de rétention d'eau (Ahmad et al. 2015).

5.1.1. Tolérance au stress salin

La salinité croissante des sols agricoles est une préoccupation récente qui a un impact important sur l'écosystème microbien du sol et son association symbiotique avec les plantes cultivées (Shrivastava and Kumar 2015). Les espèces thermo-tolérantes de *Trichoderma* ont été testées pour leur tolérance au sel en les traitant avec une concentration accrue de NaCl, ont indiqué qu'elles pouvaient mieux survivre dans des conditions salines que dans des conditions de chaleur (Poosapati et al. 2014). Les isolats qui peuvent tolérer des concentrations plus

élevées de sel sont : *T. harzianum*, TaDOR671; *T. asperellum*, TaDOR673; *T. asperellum*, TaDOR564; *T. asperellum*, TaDOR33 et *T. asperellum*, TaDOR693 avec une réduction de 65-70% de la croissance des colonies (Poosapati et al. 2014).

Ils ont également testé 13 isolats thermo-tolérants *in vivo* sur l'arachide contre *Sclerotium rolfsii*. 4 isolats *T. asperellum* TaDOR7316, *T. harzianum* TaDOR671, *T. asperellum* TaDOR79, et *T. asperellum* TaDOR673, ont réduit de 70 à 80 % la croissance fongique par rapport aux témoins (Poosapati et al. 2014).

5.1.2. Tolérance des conditions défavorables

Certains antagonistes peuvent survivre dans des conditions de sol extrêmement compétitives avec des champignons ; effet statique dû à la présence de sécrétions métaboliques de plantes ou d'autres espèces pathogènes. Lorsqu'elles sont inoculées au sol, les espèces de *Trichoderma* peuvent se développer rapidement car elles sont assez résistantes à divers produits chimiques toxiques, notamment les insecticides, les fongicides et les herbicides comme les composés phénoliques et le DDT (Chaparro et al. 2011), même après l'ajout de doses sub-létales de ces composés, les isolats de *Trichoderma* peuvent se rétablir rapidement. Le système de transport ABC dans les souches de *Trichoderma* peut être la raison de leur résistance contre ces composés toxiques (Harman 2006).

5.1.3. Tolérance au stress thermique

Des isolats tolérants à la température ont été collectés dans diverses régions de l'Inde et caractérisés morphologiquement par le séquençage de la section du facteur d'élongation 1 du gène alpha. Selon la base de données de séquences GenBank du NCBI BLAST et leur comparaison en utilisant les outils TrichoKey et TrichoBLAST ont permis de constater que de nombreux isolats identifiés étaient des *T. asperellum* (Santos-Villalobos et al. 2013). Poosapati et al. (2014) ont conduit une étude dans laquelle ils ont étudié la capacité de tolérance à la température des isolats de *Trichoderma*. Des températures de 52°C, 50°C et 48°C pendant 1 h, 2 h et 4 h ont été utilisées afin de distinguer les isolats les plus tolérants. Les résultats ont montré que le nombre de spores (UFC) diminuaient considérablement avec l'augmentation de la température et pour une durée plus longue. Ces isolats ont été ré-inoculés sur PDA et ont montré une réduction du nombre de spores mais une augmentation de la croissance hyphale et de la pigmentation jaune. Les isolats de *Trichoderma* qui ont été capables de résister aux conditions défavorables étaient *T. asperellum* TaDOR564, *T. asperellum* TaDOR293, *T. asperellum* TaDOR79, et *T. harzianum* TaDOR671. Le seul isolat *T. asperellum* TaDOR673 peut résister à 52°C pendant 4 h et a pu facilement germé après ré-

inoculation, ce qui témoigne de sa capacité à survivre à des conditions stressantes (Poosapati et al. 2014).

5.1.4. Tolérance au stress nutritionnel

L'absence des nutriments est la cause la plus courante de la mort des microbes, la compétition pour des nutriments limités aidera à contrôler les phytopathogènes (Scott 1995). Certaines espèces de *Trichoderma* peuvent produire des sidérophores qui peuvent chélater le fer, ce qui réduit les chances de croissance d'autres champignons pathogènes en raison de la non-disponibilité du fer, qui est un composant important pour leur croissance (Vinale et al. 2013). Ceci est évident dans le cas de *Pythium* contrôlé par *Trichoderma* en raison de l'influence de la composition du sol. Dans certains cas, lorsque la concentration de nutriments diminue, l'effet de bio-contrôle augmente, car *Trichoderma* peut survivre à des conditions défavorables par rapport aux agents pathogènes, par exemple, *Fusarium oxysporum* contrôlé par *T. harzianum* T35 (Thangavelu et al. 2004; Martínez-Medina et al. 2010). La capacité de *Trichoderma* à survivre sur des milieux déficients sur le plan nutritionnel aide à contrôler *Botrytis cinererea* car cet agent pathogène est très sensible à la carence en nutriments (Druzhinina et al. 2011). *Trichoderma* est plus efficace que les autres micro-organismes pour consommer les nutriments du sol. Cette capacité est basée sur l'obtention d'ATP en métabolisant divers sucres, en particulier ceux présents dans le milieu fongique, la chitine, le glucane et la cellulose, qui produisent tous du glucose comme produit final (Scott 1995).

5.2. Vitesse de colonisation

On entend par colonisation, la capacité de *Trichoderma* à adhérer et à pénétrer les racines de la plante et de résister aux métabolites toxiques de la plante sécrétés en réponse à l'invasion ou à l'attaque d'organismes étrangers.

Les *Trichoderma* spp. sont capables de coloniser très rapidement les racines des plantes et peuvent stimuler les réponses de défense des plantes telles que la production de chitinases, de β -1,3 Glucanase, de phénylalanine, de peroxydases et d'hydroperoxydase lyase; ainsi que l'activation des voies de signalisation de la biosynthèse, et peuvent provoquer l'accumulation de phytoalexines de faible poids moléculaire (Brotman et al. 2013; Brotman et al. 2008; Harman 2011). La résistance aux métabolites végétaux toxiques est associée à l'apparition de système de transport ABC dans les souches de *Trichoderma* (Harman 2011). La colonisation des racines serait favorisée en isolant des souches qui possèdent des répulsifs

et des hydrophobines ainsi que la surexpression des transporteurs ABC (López-Bucio et al. 2015).

L'interaction physique du concombre et de *T. harzianum* T-203 a été observée au microscope électronique, ce qui a révélé que le champignon avait pénétré jusqu'au cortex externe de la racine, ce qui a entraîné une augmentation de la chitinase et de la peroxydase (Chacón et al. 2007). *Trichoderma* tolère mieux ces composés que les autres champignons, c'est pourquoi ils peuvent coloniser les racines plus facilement que les autres champignons (Harman 2011). Cette interaction est plus probablement une relation symbiotique entre *Trichoderma* et la plante dans laquelle *Trichoderma* prend les nutriments tout en protégeant la plante des maladies. La souche de *Trichoderma* 2413 peut stimuler la croissance de la tomate, du coton et du tabac; et protège ces cultures contre divers champignons pathogènes (Chacón et al. 2007).

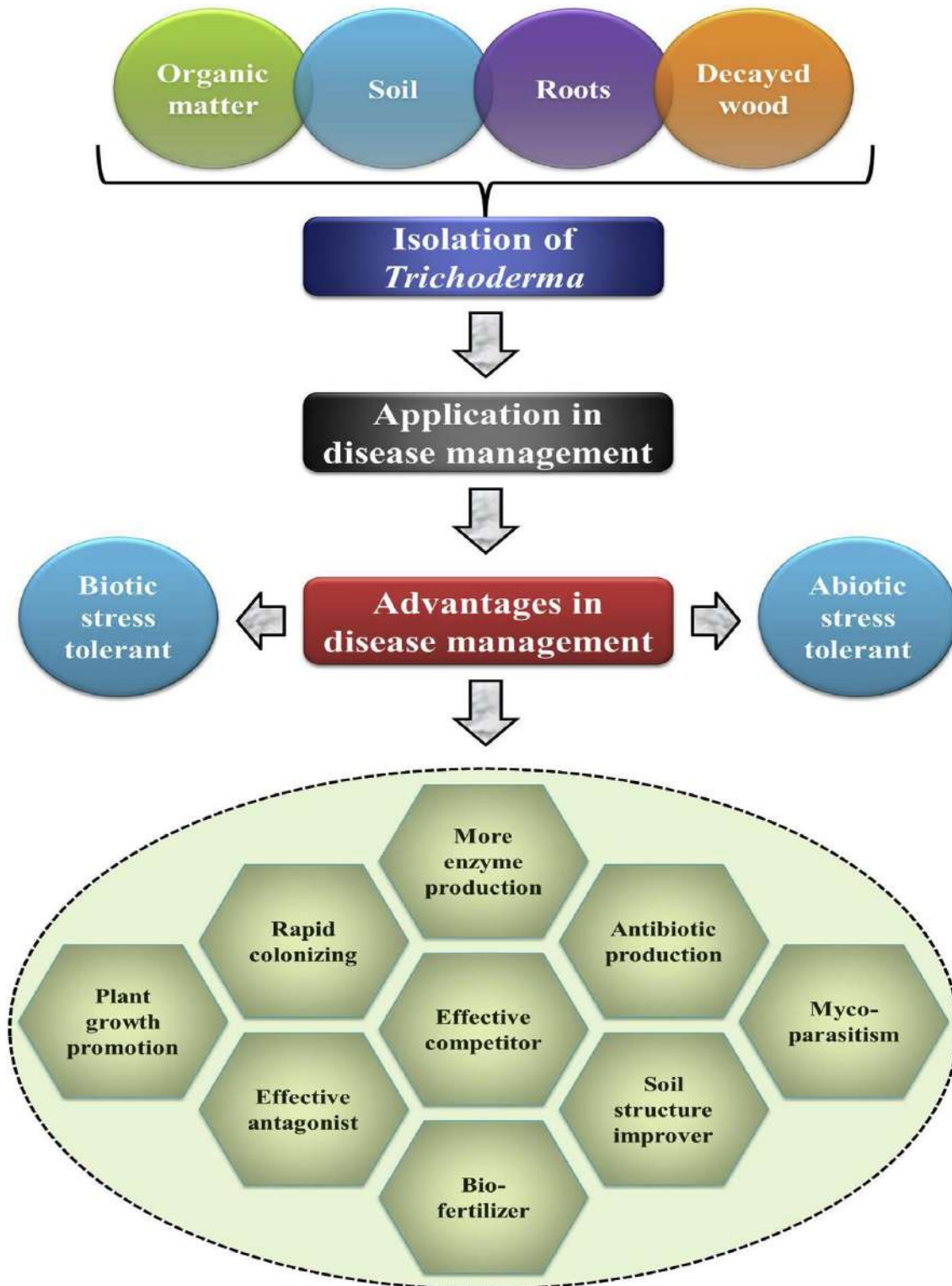


Figure 9 : Isolement et application de *Trichoderma* isolé de la matière organique du sol, des racines et du bois décomposé. De plus, l'application de *Trichoderma* et ses multiples avantages dans la gestion des maladies sont également soulignés ici (Adnan et al. 2019).

5.3. Établissement facile de *Trichoderma* après inoculation

L'établissement de *Trichoderma* après inoculation dépend de divers facteurs tels que la souche utilisée, l'espèce végétale, les conditions environnementales, l'âge des feuilles, le profil nutritionnel de la plante, l'interaction et l'effet de la microflore phylloplane et les opérations agricoles (Benítez et al. 2004; Mukherjee et al. 2013). La propagation des *Trichoderma* spp. dans la phyllosphère augmentera la compétition en termes d'espace et de nutriments et entraînera un changement dans le paradigme biologique global de la surface de la plante. Cette interaction peut entraîner l'augmentation ou la réduction des populations de champignons, de levures et de bactéries présentes sur la phylloplane (Viljoen 2006), ce qui a un effet considérable sur la survie de *Trichoderma* spp..

L'humidité relative, la température et la présence de résidus de fongicides à la surface des feuilles peuvent également affecter les chances de propagation et de survie de *Trichoderma* (Freeman et al. 2004). Afin de survivre à la surface et de proliférer, les *Trichoderma* spp. doivent parasiter les champignons pathogènes, ce qui leur permet d'utiliser pleinement les nutriments et l'espace disponibles, par exemple dans l'application de *T. harzianum* T39 sur des feuilles de concombre a donné des résultats minimes par rapport à ceux de *T. atroviride* C65 sur des kiwis au stade du bourgeonnement, qui a pu survivre plus de trois mois (Elad 2000; Colla et al. 2015).

5.4. Modification de la rhizosphère

La chimie du sol a un effet considérable sur la germination des spores, la formation des chlamydospores et la production de métabolites secondaires tels que les enzymes, les antibiotiques et les sidérophores (Kilmer and Hanson 2018). De même, les agents de bio-contrôle efficaces modifient également la rhizosphère comme la production de métabolites toxiques et d'antibiotiques par les champignons entomopathogènes, mycoherbicides ou mycoparasites (Whipps 2001; Shores et al. 2010).

Le pH de l'environnement est le principal facteur qui affecte la pathogénicité des différents microbes et l'activité de *Trichoderma*. Certains antibiotiques sont détruits à un pH élevé, tandis qu'à un pH faible, les protéases acides peuvent provoquer la dénaturation des enzymes (Benítez et al. 2004). En raison de l'adaptabilité de *Trichoderma* aux sols acides, il peut survivre dans des conditions de pH très variables. Afin d'assurer les valeurs optimales des enzymes sécrétées, certaines souches de *T. harzianum* peuvent synthétiser diverses protéines extracellulaires à différents pH. De même, au niveau de la transcription, plusieurs

glucanases, protéases, transporteurs de glucose et protéines de la paroi cellulaire sont contrôlés par le pH (Ahmad et al. 2011).

Les conditions de pH sont également importantes pour les facteurs de pathogénicité des agents pathogènes car ils sont sécrétés dans un petit intervalle de pH (Carreras-Villaseñor et al. 2012). Cela signifie que la modification du pH peut aider le pathogène à envahir et à coloniser l'hôte. L'adaptabilité et la modification du pH externe par les souches de *Trichoderma* pourraient réduire les chances de production de facteurs de pathogénicité, et par conséquent, réduire la virulence de l'agent pathogène (Carreras-Villaseñor et al. 2012).

5.5. Bio-fertilisation

Les souches de *Trichoderma* après la colonisation des racines peuvent augmenter le développement et la croissance des racines, la tolérance au stress abiotique, l'utilisation et l'absorption de nutriments et la productivité des cultures (Gupta et al. 2014; Ellis 2013). La productivité des cultures après inoculation avec *T. koningii* ou *T. hamatum* peut augmenter jusqu'à 300% sur le champ (Sanjeev et al. 2014). Des molécules semblables à la cytokinine ont été signalées comme étant produites par les souches de *Trichoderma*, par exemple la gibbérelline GA-3 ou GA3 et la zéatine, qui pourraient contribuer à améliorer la qualité de la culture.

La plupart des souches de *Trichoderma*, en plus de la stimulation ou de la synthèse des phytohormones, ont un effet positif sur l'environnement, peuvent acidifier leur voisinage par la sécrétion d'acide fumarique, citrique ou gluconique (Hermosa et al. 2012). Ces acides organiques résultent du métabolisme des sources de carbone, notamment le sucre et ils ont la capacité de solubiliser les cations minéraux y compris le manganèse, le magnésium et le fer, d'autres micronutriments et les phosphates également (Verma et al. 2007). Par conséquent, l'ajout de *Trichoderma* à ces sols déficients en cations pourrait améliorer la production agricole grâce à la bio-fertilisation en solubilisant ces métaux (Harman et al. 2012).

6. Habitats agricoles

Le stress abiotique et biotique joue un rôle significatif sur la population et la diversité de toutes les communautés microbiennes dans les écosystèmes agricoles (Rana et al. 2019). Il s'agit notamment de l'espèce de la plante et de son stade de croissance, des caractéristiques physiques du sol et des propriétés du produit chimique utilisé, l'utilisation de pesticides, la région géographique et, surtout, la compétition de la microflore microbienne totale (Druzhinina et al. 2008).

Les *Trichoderma* spp. sont préférés pour être isolés de la rhizosphère et des sols non rhizosphériques plutôt que de la phyllosphère. Certaines espèces sont omniprésentes alors que d'autres sont limitées à certaines zones géographiques (Kour et al. 2019). L'isolement de ce champignon à partir de divers champs de cultures agricoles a été effectué afin de mener des études sur sa capacité de lutte biologique contre les phytopathogènes, de sorte que seul un nombre limité d'études traitant l'abondance et la diversité du genre *Trichoderma* dans des champs de culture spécifiques ont été réalisées. *Trichoderma* spp. est très présent dans les champs de cultures céréalières et il est l'un des champignons dominants et des taxons prévalent parmi les autres communautés fongiques (Yadav et al.2000). Dans les champs de céréales, le temps, le type de sol et la gestion agricole, influencent grandement la distribution des *Trichoderma* spp. Les espèces mono et dicotylédones montrent une forte résistance à l'attaque de divers pathogènes lorsque la plante est bien prétraitée avec *Trichoderma*. La colonisation de la plante causée par ce champignon inhibe la croissance de différents pathogènes au moment de l'inoculation et également lorsque le champignon de bio-contrôle est inoculé à des moments ou des sites différents de ceux du pathogène (Yadav et al.2000).

Chapitre 04: Interactions plantes, pathogènes et antagonistes

Chapitre 4 : Interactions plantes, pathogènes et antagonistes

1. Interaction plante et environnement biotique

Dans leur environnement naturel, les plantes sont capables d'établir des interactions plus ou moins étroites avec un cortège complexe et diversifié d'organismes eucaryotes ou procaryotes. Suivant les modalités et le devenir de ces interactions, celles-ci peuvent être regroupées en 3 classes principales : **mutualistes, symbiotiques ou parasitaires.**

- a- Mutualisme,** Le mutualisme est une association facultative où les deux partenaires peuvent tout à fait vivre l'un sans l'autre. Les mycorhizes sont le résultat de l'association mutualiste entre des champignons et les racines des plantes. Dans cette association, les hyphes d'un champignon colonisent les racines d'une plante et l'aident à obtenir des sels minéraux présents dans le sol. En retour, le champignon bénéficie de la photosynthèse de la plante sous forme de matière organique riche en énergie (triacyl glycérol) essentielle à sa survie (Parniske 2008).

- b- Symbiose,** La symbiose est une association obligatoire entre deux partenaires, car hôte et symbiote s'échangent des molécules indispensables à leur survie. L'hôte ne peut pas utiliser une ressource présente dans son biotope, tandis que le symbiote est capable d'utiliser cette même ressource et de la transformer en substance assimilable par l'hôte. Les lichens sont des organismes formés à partir d'une association symbiotique entre une algue unicellulaire et un champignon. Dans cette interaction, l'algue puise l'eau et les sels minéraux à partir du champignon de façon à assurer sa survie, et en parallèle, elle assure l'approvisionnement en glucose, produit par photosynthèse, nécessaire au développement du champignon (Selosse 2000).

- c- Parasitisme,** Dans une interaction parasitaire, l'un des partenaires de l'interaction symbiote porte atteinte et vit aux dépens d'un autre organisme. Les micro-organismes parasites de plantes peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des oomycètes ou encore des nématodes. La compréhension de la réponse de la plante vis-à-vis de ces agents pathogènes nécessite de s'arrêter sur la nature de l'interaction entre les micro-organismes phytopathogènes et la plante hôte. Il existe différents modes d'interaction entre une plante et un agent pathogène : le cycle infectieux peut être de nature biotrophe (les parasites ne sont capables de se développer que dans des tissus

végétaux vivants), nécrotrophe (les parasites se développent sur des tissus morts) ou hémibiotrophe (parasites ayant une première phase biotrophe, suivie plus ou moins rapidement d'une phase nécrotrophe). Ces processus infectieux peuvent être associés à la mise en place de structures d'infection spécialisées, comme par exemple, les appressoria, structures plus ou moins élaborées permettant à l'agent pathogène de fracturer les premières barrières physiques que constituent les cuticules et les parois protégeant les cellules végétales, les vésicules d'infection ou les haustoria, créant des invaginations au sein de la membrane plasmique de l'hôte, les hyphes invasives, qui explorent l'espace extracellulaire (apoplaste), et assurent la colonisation des tissus végétaux en cours d'infection (**Figure 10**) (Petre and Kamoun 2014).

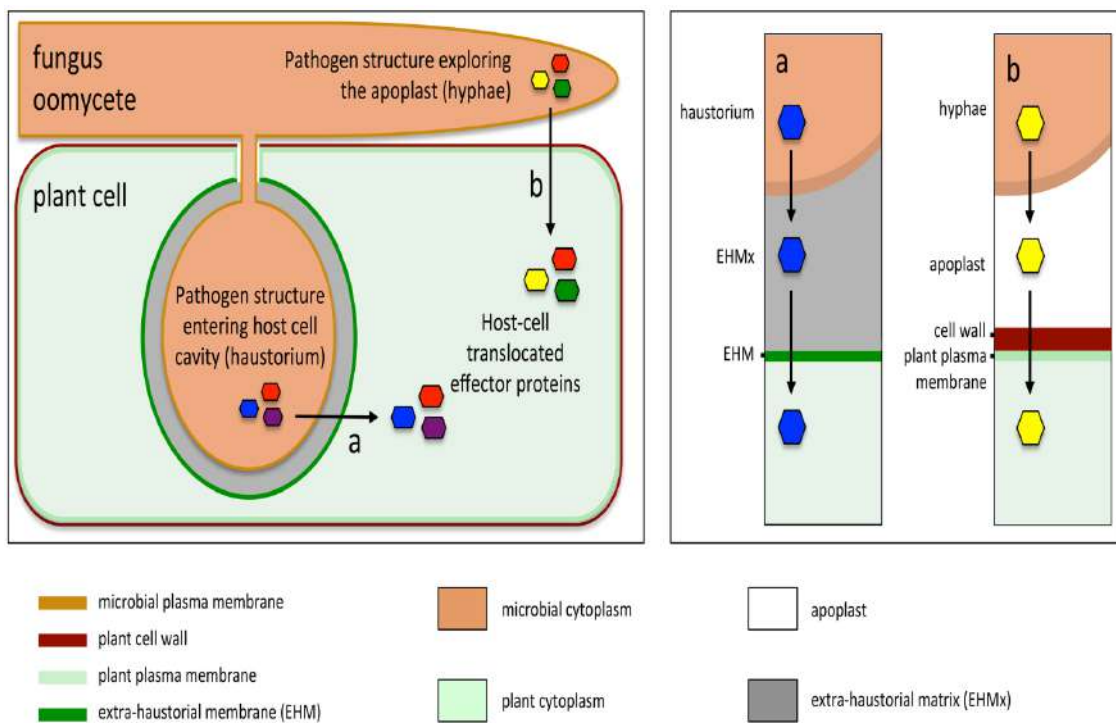


Figure 10 : Le schéma de gauche représente les différentes structures d'infection chez les champignons et les Oomycètes tels que des hyphes extracellulaires, ainsi que des hyphes invasives avec des invaginations dans la membrane plasmique. Haustoria (a) et les hyphes (b) sécrétant des molécules effectrices qui sont transportées dans le cytoplasme de la cellule hôte par des mécanismes qui restent encore inconnus. Le schéma de droite représente des molécules effectrices sécrétées par les haustoria (a) et les hyphes (b) et traversant les différentes interfaces biologiques (matrice extra-haustoriale/membrane extra-haustoriale) pour les molécules sécrétées par les haustoria et (l'apoplaste/paroi cellulaire végétale / membrane plasmique de la cellule végétale) pour les molécules sécrétées à partir des hyphes d'après Petre and Kamoun (2014).

1.1. Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent symbiotique

Les interactions entre une plante et les micro-organismes pathogènes ou symbiotiques sont contrôlées par l'émission et la perception par les deux partenaires de signaux plus ou moins spécifiques, mettant en jeu des programmes génétiques complexes conduisant à la mise en place de structures et de réponses appropriées. Les premières phases de cet échange de signaux, dont l'issue va conditionner le devenir de l'interaction, est dans tous les cas, extrêmement précoce.

Dans le cas des interactions symbiotiques, et en particulier, lors de l'interaction symbiotique entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium*, la formation sur les racines de la plante hôte de nodules fixateurs d'azote résulte d'un échange complexe de signaux entre les cellules des tissus racinaires et les bactéries. Cela commence par un rejet de substances dont certaines appartiennent au groupe des flavonoïdes tels que les flavones, isoflavones, flavonone (Räsänen and Lindström 2003) qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Une fois ce signal perçu par le rhizobium, ce dernier induit la synthèse des facteurs Nod par les bactéries (Oldroyd et al. 2001). Les facteurs Nod sont des lipochito-oligosaccharides (LCO). Leur synthèse implique des enzymes des gènes communs, puis modifiés par les enzymes des gènes spécifiques, qui introduisent des fonctions ou des molécules sur le squelette oligosaccharidique. Ces facteurs Nod vont ensuite cibler le programme organogénétique de la plante pour déclencher un programme de nodulation (Patriarca et al. 2004).

1.2. Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent pathogène

Dans le cas d'une interaction pathogène, les deux partenaires vont établir très tôt un échange de signaux dont l'issue va conditionner le devenir de l'interaction pathogène, résistance de la plante si celle-ci a réussi à mettre en place un mécanisme efficace de défense, sensibilité si l'agent pathogène a eu la possibilité de développer son processus infectieux. Bien que dans leur milieu naturel, les plantes soient constamment exposées à des micro-organismes pathogènes, le développement d'épidémies reste une situation exceptionnelle. En effet, le développement de l'infection dépend de nombreux facteurs, dont l'efficacité des mécanismes de défense de la plante, l'agressivité de l'agent pathogène, les conditions environnementales. Les mécanismes de défense sont généralement classés en deux classes. Ils peuvent être passifs tels que les différentes barrières physiques naturelles (cuticule, cire, cutine, stomates, paroi pecto-cellulosique) qui empêchent la pénétration de l'agent pathogène ou des barrières chimiques (composés antimicrobiens) assurant une protection efficace de la

plante ou actifs qui sont induits lors d'un phénomène d'infection ou de blessures. Cependant, certains microorganismes parviennent à mettre en place des stratégies qui leur permettent de franchir ces barrières, de les contourner et de coloniser la plante hôte via la production et l'action des toxines, d'enzymes, de cutinases, de cellulases et des pectine-méthyl estérases. Les agents phytopathogènes (bactéries, champignons, virus), les moins évolués, impliquent des mécanismes de reconnaissance non-spécifiques entre la plante hôte et son agent pathogène comme la PTI (PAMP-triggered immunity) déclenchée par la reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par les PRR (PAMP recognition receptors). Cette immunité est l'une des stratégies développées par la plante pour bloquer la colonisation par l'agent pathogène (Chisholm et al. 2006) (**Figure 11**). Chez les champignons, les PAMP sont le plus souvent représentées par la chitine, un constituant majeur de la paroi fongique. Deux récepteurs qui reconnaissent cette molécule ont été identifiés chez le riz et *Arabidopsis thaliana* (CERK1, CEBiP). Plusieurs études ont montré que certaines molécules sécrétées par les agents pathogènes (effecteurs ou facteurs Avr) sont capables de réprimer la PTI, ce qui permet à l'agent pathogène de s'installer et de se développer dans les tissus de l'hôte et donc d'entraîner le développement des symptômes de la maladie ou l'ETS (Effector Triggered Susceptibility). Parmi les systèmes de reconnaissance, le plus connu et le plus étudié est la réaction dite gène pour gène. En effet, au cours de leur processus infectieux, les agents pathogènes expriment un gène dit d'a virulence, le produit de ce gène est reconnu par la plante via le produit du gène de résistance *R*. Cette reconnaissance conduit à l'apparition des nécroses des tissus végétaux autour du point d'entrée d'un pathogène ce qui empêche le développement de l'agent pathogène (Flor 1971). Les premiers gènes *Avr* ont été identifiés chez les bactéries (Staskawicz et al. 1984) et le premier gène *Avr* fongique a été cloné en 1991 (Van Kan et al. 1991).

En outre, au cours de l'évolution, les plantes ont su développer d'autres moyens pour faire échouer les stratégies des agents pathogènes. Parmi elles, l'ETI (Effector Triggered Immunity) qui entraîne une réaction de défense rapide de la plante en incluant la réponse hypersensible ou HR (Mur et al. 2008), dont la composante principale est un processus de mort cellulaire génétiquement programmée affectant les cellules localisées au point d'infection. Les stratégies infectieuses développées par les différents agents pathogènes et les réponses de l'hôte afin de les contrecarrer sont en perpétuelle course évolutive, leur coévolution a permis aux agents pathogènes de créer des mutations dans les effecteurs existants ou de développer de nouveaux effecteurs qui permettent de contourner l'ETI,

induisant le développement chez la plante de nouveaux facteurs de résistance, et ainsi de suite (**Figure 11**) (Jones and Dangl 2006).

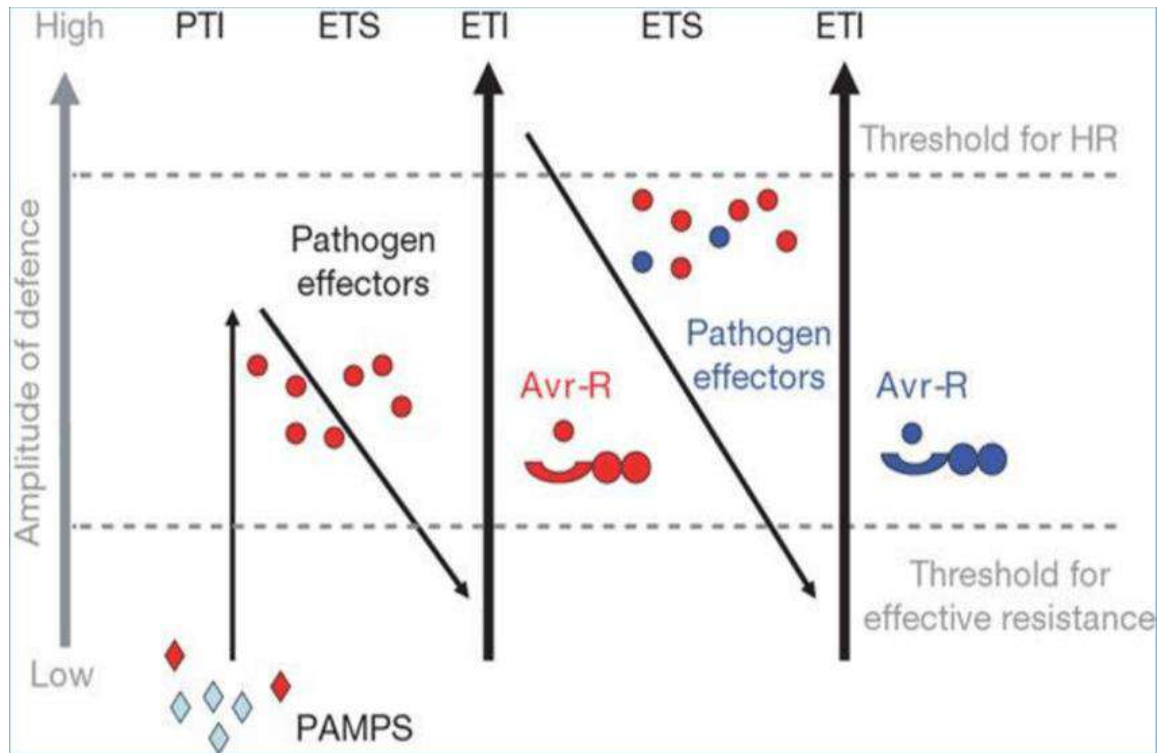


Figure 11 : Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène (Jones and Dangl 2006).

Ce schéma montre que l'amplitude de la résistance ou de la sensibilité à une maladie chez les plantes est proportionnelle aux amplitudes de la PTI, d'ETS et de l'ETI. Dans la Phase 1, les plantes détectent les PAMP ou MAMPS (Microbial-Associated Molecular Pattern) (losanges rouges) via PRR (Pattern Recognition Receptors) pour déclencher la PAMP-Triggered Immunity (PTI), il y a un niveau de résistance basal. Dans la Phase 2, les agents pathogènes victorieux produisent des molécules dites effecteurs qui interfèrent négativement avec la PTI pour la supprimer et entraîner l'ETS, il y a un développement de la maladie. Dans la Phase 3, un effecteur (ronds rouges) est reconnu par une protéine de résistance de type NBLRR et induit l'ETI, une version de la PTI amplifiée qui passe souvent un certain seuil peut induire la HR. La résistance est spécifique. Dans la Phase 4, les agents pathogènes qui ont perdu ou modifié l'effecteur (rouge) peuvent gagner de nouveaux effecteurs par des flux horizontaux de gènes (ronds bleus), ceux-ci peuvent à leur tour contribuer à la suppression de l'ETI et induire le retour à un état sensible (ETS). Dans la Phase 5, la sélection favorise l'apparition de nouvelles protéines de résistance (nouveaux

allèles NB-LRR) qui peuvent reconnaître un des effecteurs nouvellement acquis, induisant de nouveau une ETI d'après Jones and Dangl (2006).

1-3- La sensibilité des plantes aux agents pathogènes

La sensibilité d'une espèce végétale à un agent pathogène est définie comme l'incapacité de cette espèce à restreindre la croissance et le développement d'un micro-organisme pathogène ou d'un ravageur donné, ce qui conduit à l'établissement d'une interaction compatible entre cette espèce végétale et cet agent pathogène. Il est maintenant admis que la sensibilité de la plante, et donc le développement des symptômes de la maladie causée par l'agent pathogène, résulte principalement d'un processus actif dont la composante principale est un processus de manipulation parasitaire, dont l'objectif est de créer dans les tissus végétaux en cours d'infection, un environnement plus favorable au développement de l'agent pathogène : contourner les mécanismes de défense de l'hôte, acquérir les éléments nutritifs, assurer sa multiplication et sa dissémination (Poulin 2011). La notion de manipulation parasitaire est apparue pour la première fois dans les années 1950, puis a été rediscutée à partir des années 1970, et progressivement étendue à toutes les principales classes d'agents pathogènes : virus, bactéries, oomycètes, champignons (Lefèvre et al. 2009). Cette manipulation parasitaire repose sur la modification ou la suppression de fonctions et processus cellulaires plus ou moins importants (mécanismes de défense, métabolisme primaire, développement, cycle cellulaire,...). Cette manipulation parasitaire va mettre en jeu deux types d'acteurs : les **effecteurs**, qui composent l'arsenal plus ou moins complexe utilisé par l'agent pathogène pour manipuler son hôte, et les **facteurs ou gènes de sensibilité**, cibles végétales de ces effecteurs. Ces dix dernières années, le développement des outils d'analyse massive des génomes et de leur expression, et de validation fonctionnelle a conduit à l'identification et à la caractérisation de nombreux gènes de sensibilité et d'effecteurs.

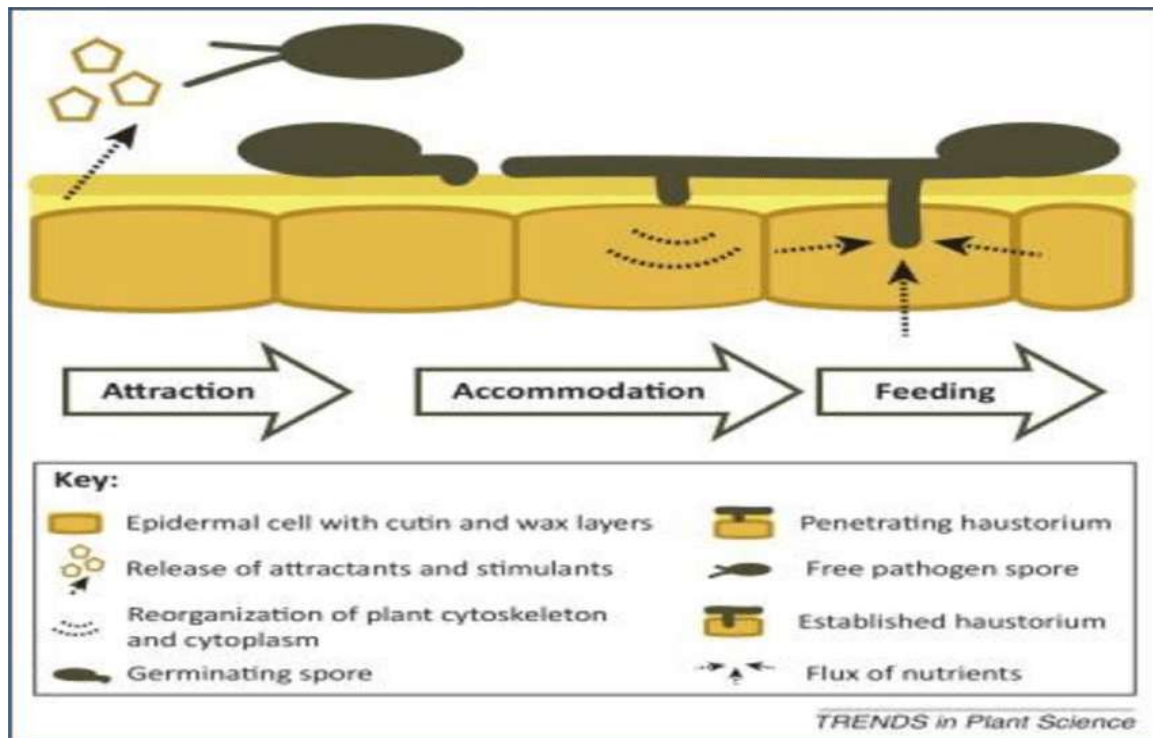


Figure 12 : Étapes clés d'un cycle infectieux d'un agent pathogène chez une plante hôte sensible (Lapin and Van den Ackerveken 2013).

La sensibilité d'une plante hôte à un agent pathogène peut être décomposée en 3 étapes clés : (i) attraction de l'agent pathogène par des molécules d'origine végétale, stimulation de son attachement et son développement à la surface des tissus de l'hôte, (ii) pénétration de l'agent pathogène et mise en place de structures d'infection spécialisées comme les haustoria, (iii) acquisition des éléments nutritifs nécessaires à son développement par l'agent pathogène d'après Lapin and Van den Ackerveken (2013).

2. Interaction plante-*Trichoderma*

Les *Trichoderma* spp. établissent des associations naturelles avec un certain nombre de plantes (Carreras-Villaseñor et al. 2012). Dans une étude récente portant sur les biomes fongiques endémiques de *Trichoderma* de l'Afrique du Nord-Ouest à la Nouvelle-Zélande en passant par les Alpes européennes et Madagascar, d'importantes différences entre les populations fongiques associées aux plantes endémiques de ces régions ont été signalées. En particulier, la plante cosmopolite qu'est le maïs (*Zeamays*) partageait la majorité des souches fongiques (65%). En outre, pour les régions étudiées *Trichoderma koningii* et *Trichoderma koningiopsis* présentaient une communauté de base fongique globale (Zachow et al. 2016). Dans la rhizosphère, les espèces de *Trichoderma* libèrent de manière constitutive un mélange

riche en métabolites secondaires qui sont impliqués dans les différents effets bénéfiques de la plante (Contreras-Cornejo et al. 2016).

Les composés de *Trichoderma* spp. comprennent des peptides non ribosomiaux (PNR), sidérophores, anthraquinones, daucanes, pyrones, koniginines, trichodermamides, viridines, viridifungines, composés hétérocycliques azotés, trichodénones et dérivés de la cyclopenténone, acoranes, azaphilones, harzialactones, buténolides, trichothécènes, composés isocyaniques, métabolites de type sétine, bisorbicillinoïdes, les dicétopipérazines, les dérivés de l'ergostérol, les peptaïbols, les dérivés du cyclonérodiol, les statines, les dérivés du kononerodiol, les statines, l'acide kononique (acide heptelidique) et ses dérivés (Reino et al. 2008).

Certains composés peuvent favoriser la croissance des plantes, tandis que d'autres activent la résistance systémique contre les agents pathogènes des plantes. Dans les interactions entre *Trichoderma* et les plantes, il a été observé d'importants changements dans la modulation des facteurs de croissance des plantes. Des enzymes fongiques participent à la biosynthèse des métabolites secondaires. Par exemple, *T. virens* Gv29-8 code pour le gène TvCyt2 (une protéine homologue de la p450 monooxygénase) qui est régulé à la baisse au début de l'interaction champignon-plante. L'analyse GC-MSa a révélé que TvCyt2 est impliqué dans la production des composés suivants viridiflorol, tau-muurolol, α -cadinol et pyrazine (Zeilinger et al. 2016; Harman 2006) indole-1, 4-diène, 2,3-dihydro-2-méthyl-3-méthylène, et ses composés ont déclenché des réponses de défense des plantes (Ramírez-Valdespino et al. 2018).

Lorsque *Trichoderma* interagit avec les racines des plantes, il provoque des modifications profondes et substantielles au niveau biochimique, qui, en fonction du type de métabolite régulé *in planta*, affectent la physiologie de la plante, sa défense et ses réponses au stress (Shoreshand Harman 2008; Contreras-Cornejo et al. 2014a; Contreras-Cornejo et al. 2014b; Fiorini et al. 2016). Dans les tissus végétaux, des changements considérables dans la teneur en phytohormones après l'introduction de *Trichoderma* spp. dans la plante ont été détectés (Segarra et al. 2007; Contreras-Cornejo et al. 2011). Dans le cas du melon (*Cucumis melo*) inoculé avec *T. harzianum*, des augmentations significatives des teneurs en zéatine, indole-3 acétique (IAA), d'acide abscissique (ABA), de 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC, un précurseur de l'éthylène), de l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA) ont été détectés dans la pousse (Martínez-Medina et al. 2011).

La figure 13a, b montre le schéma de croissance *d'Arabidopsis thaliana* dans des plantes témoins et des plantes inoculées par *T. virens*, respectivement. La promotion de la croissance des racines a été corrélée avec l'augmentation de l'expression du gène *CycB1::GUS*, un rapporteur de la division cellulaire dans la phase G2/M du cycle cellulaire (Fig. 13c, f). Ici, les plantes inoculées ont présenté un phénotype qui ressemble aux effets induits par le régulateur de croissance des plantes, l'auxine (IAA) (Contreras-Cornejo et al. 2009). En fait, le contenu des phytohormones modulées par *Trichoderma* spp. dans les plants de melon est directement lié à leur phénotype (Martínez-Medina et al. 2011).

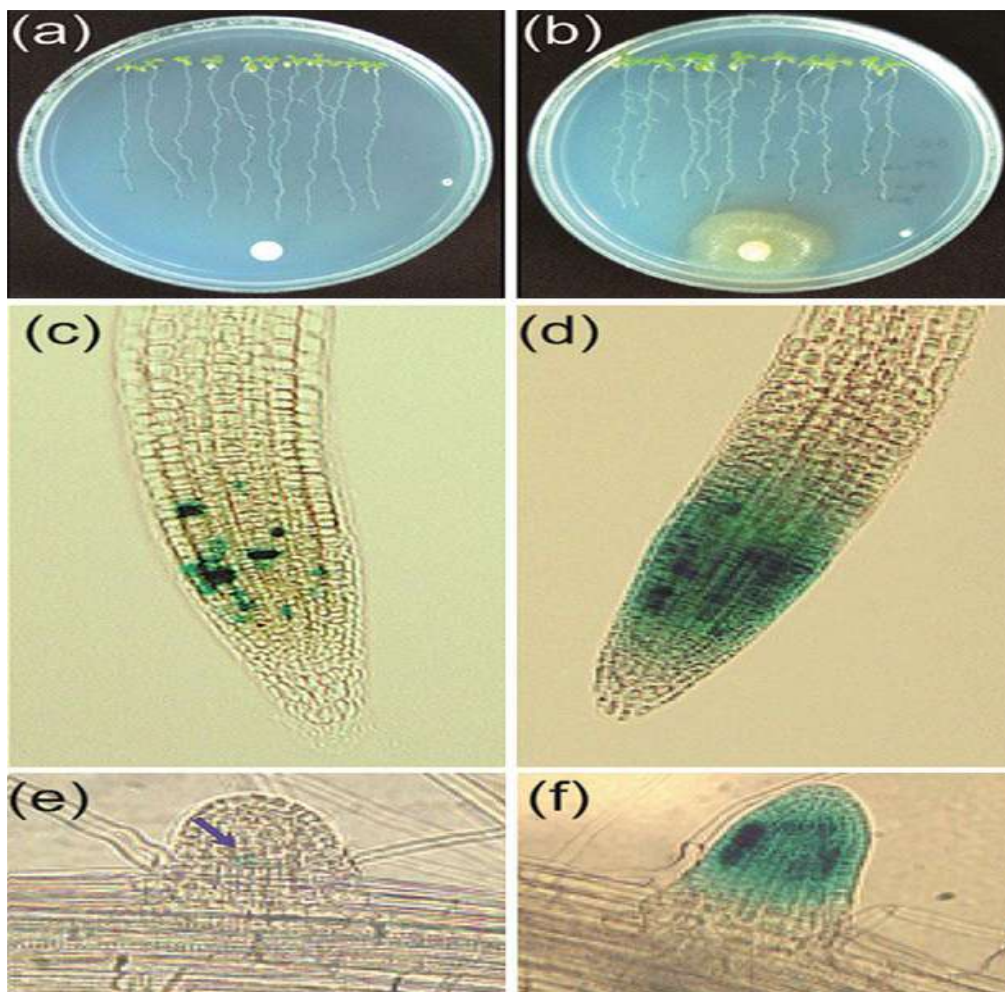


Figure 13 : Interaction entre *Trichoderma* et plante. Système d'interaction *in vitro* entre *T. virens* Gv29-8 et *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia-0. Les plantes ont été germées et cultivées pendant 4 jours sur un milieu MS 0,2 puis inoculées avec 10^6 spores fongiques et cultivées pendant une période supplémentaire de 4 jours. (a) Plantes témoins, (b) plantes inoculées avec *T. virens* Gv29.8. Notez l'abondance des racines latérales et la des pousses dans les plantes inoculées. Partenaire d'expression de *CycB1::GUS*, un marqueur transgénique de la phase G2/M dans le cycle cellulaire de division dans l'extrémité de la racine primaire de (c) une plante témoin et (d) une plante inoculée avec *T. virens* comme indiqué ci-dessus. (e et f) montrent l'expression du marqueur *CycB1::GUS* dans les racines latérales de plantes témoins et inoculées par *T. virens*, respectivement. Notez que *CycB1::GUS* est régulé à la hausse en présence du champignon, ce qui suggère une modulation du cycle cellulaire de la division (Contreras-Cornejo et al. 2019).

2.1. Colonisation des racines par *Trichoderma*

Au début de l'interaction entre *Trichoderma* et la racine, les plantes soumises à différentes conditions environnementales (stressées ou non) émettent des molécules de signalisation qui attirent le champignon vers la racine (Lombardi et al. 2018). Le saccharose dérivé des plantes semble être un métabolite clé dans l'association *Trichoderma*-racine (Vargas et al. 2009; Macías-Rodríguez et al. 2018). Il est connu que la ThPG1 de *T. harzianum* T34 est une enzyme de dégradation de la paroi cellulaire végétale nécessaire pour la colonisation fongique des racines (Morán-Diez et al. 2009). Dans le processus d'association champignon-racine, ces champignons pénètrent l'épiderme et les premières couches de cellules corticales de la racine (Druzhinina et al. 2011; Mendoza-Mendoza et al. 2018). En général, la croissance de *Trichoderma* est limitée à l'apoplaste des cellules racinaires (Nogueira-Lopez et al. 2018).

Au premier stade de la colonisation des racines, la plante limite la colonisation endophytique de *Trichoderma* par le renforcement de la paroi cellulaire et l'accumulation de composés antimicrobiens et d'espèces réactives de l'oxygène (Martínez-Medina et al. 2013). D'autre part, il a été observé que lorsque *T. virens* colonise les racines de maïs par l'apoplaste racinaire, le champignon libère plusieurs protéines qui sont probablement impliquées dans la suppression de l'immunité de la plante, ce qui facilite la colonisation des racines par le champignon. Les protéines fongiques sécrétées dans l'apoplaste correspondent à l'hydrolyse de la paroi cellulaire et à l'élimination de la pollution (Nogueira-Lopez et al. 2018).

Les enzymes sécrétées par *Trichoderma* qui doivent faciliter la colonisation des racines sont les suivantes ; les glycosidehydrolases, les glycosyltransférases, les polysaccharides lyases, les glucides estérases, et des protéines de liaison aux hydrates de carbone. Parmi ces protéines, les glycosidehydrolases sont les enzymes les plus abondantes dans *T. atroviride* IMI 206040, *T. virens*Gv29-8, *T. reesei* QM6a, *T. reesei* Rut C-30, *T. guizhouense* NJAU 4742, *T. harzianum* T6776, *T. parareesei* CBS 125925, et *T. gamsii*T6085 (Mendoza-Mendoza et al. 2018). Il a été signalé que les hormones végétales jouent un rôle clé dans la régulation de la colonisation des racines par *Trichoderma* (Contreras-Cornejo et al. 2019).

La colonisation des racines d'*A. thaliana* par *T. asperelloides*T203 a entraîné une modification substantielle du transcriptome de la plante, avec des changements marqués dans l'expression des mécanismes de défense (Brotman et al. 2013). Lorsque ces champignons colonisent les racines, différents processus végétaux aux niveaux chimique, biochimique et

moléculaire sont activés et peuvent causer des dommages moléculaires à la plante, et peuvent aussi favoriser la croissance de la plante, augmenter l'absorption de nutriments, et l'induction de défenses locales et systémiques (Contreras-Cornejo et al. 2016; Contreras-Cornejo et al. 2011; Singh et al. 2018). En ce qui concerne l'absorption des nutriments, on sait que *T. asperellum* T42 améliore l'efficacité de l'utilisation de l'azote, ce qui améliore directement la croissance des plantes (Singh et al. 2018). Les espèces de *Trichoderma* induisent également un impact bénéfique sur les plantes qui ont été cultivées dans des sols pollués par des éléments toxiques tels que le sodium (Na⁺) ou l'arsenic (As) (Contreras-Cornejo et al. 2019).

Dans le cas expérimental de plantules d'*A. thaliana* cultivées dans des concentrations néfastes préjudiciables de sel (100 mMNaCl), *T. virens* et *T. atroviride* ont amélioré la croissance des plantes par l'activation de la signalisation de l'auxine et les changements biochimiques qui comprennent l'accumulation de l'acide trans-abscisique, de l'acide ascorbique, un composé antioxydant, et de l'osmolyte L-proline (Contreras-Cornejo et al. 2014b). Dans le cas d'*Eucalyptus globulus* cultivé en présence de As, un élément qui diminue également la croissance des plantes, *T. harzianum* a favorisé la croissance d'*E. globulus* et a induit l'accumulation de chlorophylle, et dans ce scénario, *T. harzianum* a augmenté l'accumulation d'As dans les racines d'*E. globulus*, montrant ainsi le potentiel de bio-rémediation de l'As (Arriagada et al. 2009).

2.2. Métabolites fongiques impliqués dans la croissance des plantes

La synthèse microbienne de la phytohormone auxine est connue depuis longtemps. Cette propriété est mieux documentée pour les champignons qui interagissent avec les plantes car l'auxine fongique peut interférer avec de nombreux processus de développement des plantes (Splivallo et al. 2009). Chez les plantes, différentes voies qui partagent le L tryptophane (L-Trp) comme précurseur commun ont été signalées chez les micro-organismes (Woodward and Bartel 2005).

La production d'IAA par la voie de l'acide indole-3-pyruvique (IPA) a été identifiée chez le champignon *Colletotrichum acutum* (Chung et al. 2003). L'analyse HPLC et les colorations chromogènes après une séparation TLC par fluorescence ont permis d'identifier sans ambiguïté l'IAA, l'indole-3-éthanol (IET), l'indole-3-acétaldéhyde (IAAld) et l'IPA dans des cultures supplémentées en L-Trp. De manière intéressante, l'augmentation des concentrations de L-Trp a drastiquement les niveaux d'IET mais pas ceux d'IAA (Chung et al. 2003).

D'autres champignons tels que *Amanita muscaria*, *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Suillus bovinus*, et *Rhizopogon luteolus* isolés de *Pinus sylvestris* produisent également des auxines (Frankenberger and Poth 1987). L'analyse pharmacologique a révélé que les plantes ont une sensibilité différente aux substances dérivées de l'indole lors des interactions entre *Trichoderma* et les plantes. Par exemple, IAAld induit la formation de racines latérales et de poils racinaires chez *Arabidopsis thaliana*, mais IICAld a induit la formation de racines adventives (Contreras-Cornejo et al. 2011).

En outre, *T. asperellum* a augmenté la teneur en IAA dans les pousses et les racines des plantes de maïs. Très probablement, *T. asperellum* a favorisé la croissance du maïs en activant la H⁺-ATPase de la membrane plasmique (López-Coria et al. 2016). Chez les plantes, l'ET induit la formation du chevelu racinaire et contrôle la ramification des racines dans un mécanisme de diaphonie avec l'IAA (Contreras-Cornejo et al. 2015a). Plus récemment, il a été identifié que *T. virens* et *T. atroviride* produisent de l'acide cis, trans-abscisique (ABA), un composé isoprénoïde qui, chez les plantes, agit comme une hormone qui régule principalement l'ouverture des stomates (Contreras-Cornejo et al. 2015b). Les espèces de *Trichoderma* produisent également différents métabolites qui ont été considérés comme des régulateurs classiques de la croissance des plantes, tels que les auxines, l'ET et l'ABA, qui ont des structures moléculaires et des identités chimiques très différentes. Certains champignons Ascomycota produisent également la pyrone simple 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP), qui est un agent aromatique responsable de l'arôme de noix de coco associé à *T. harzianum*, *T. viride*, *T. viride*, et *Trichoderma koningii*. Dans le *T. atroviride* IMI206040, le 6-PP est un produit dérivé de l'acide linoléique (AL), et dans le mécanisme de biosynthèse, l'AL est oxydé en 13-hydroperoxyde-diène (13-HPOD), suivi de la formation de l'acide 5-hydroxy-2,4-décénoïque par la β -hydroperoxydation et isomérisation, et une estérification finale aboutit ensuite à la 6-PP (Zeilinger et al. 2016 ; Serrano-Carreón et al. 1993).

De plus, la production d'acides gluconique, citrique et fumarique par *Trichoderma* diminue le pH du sol, ce qui pourrait favoriser la solubilisation des phosphates et des cations minéraux comme le fer, le manganèse et le magnésium (Reino et al. 2008; Vinale et al. 2014). En revanche, la trichosétine, un composé de type sétine identifié chez *T. harzianum* et *Catharanthus roseus*, a inhibé la croissance des plantes *Oryza sativa*, *Vigna radiata*, *Medicago sativa*, *Capsicum frutescens*, et *Lycopersicon esculentum* (Marfori et al. 2003). De même, le viridiol, un composé stéroïdien produit par *T. viride*, a une activité phytotoxique (Reino et al. 2008).

2.3. Renforcement de l'immunité des plantes par *Trichoderma*

Trichoderma peut induire une capacité de défense accrue chez les plantes, ce qui leur assure une protection contre un large éventail de parasites des plantes (Contreras-Cornejo et al. 2016; Martínez-Medina et al. 2017). Les molécules fongiques qui déclenchent les réponses de défense des plantes sont connues sous le nom d'éliciteurs. En général, les glycoprotéines, glucides, les acides gras, les peptides et les enzymes microbiennes extracellulaires sont des éliciteurs non spécifiques (Velázquez-Robledo et al. 2011 ; Kishimoto et al. 2007).

Les molécules de signalisation impliquées dans l'établissement des réponses de défense des plantes déclenchées par *Trichoderma* commencent tout juste à être identifiées. Plusieurs espèces de *Trichoderma* produisent des trichothécènes, notamment de la trichodermine et de l'harzianum A (HA) (Degenkolb et al. 2008; Malmierca et al. 2013). Récemment, Malmierca et al. (2015) ont signalé que la perturbation du gène *tri4* de *Trichoderma arundinaceum* IBT 40837 (Ta37), qui code pour un cytochrome Pmonooxygénase du cytochrome P450 qui oxygène le trichodiène pour donner naissance à l'isotrichodiol, a réduit l'activité antifongique contre *B. cinerea* et *R. solani* ainsi que la capacité d'induire l'expression de l'ADN.

Djonovic et al. (2006) ont analysé le profil des protéines sécrétées par la souche Gv29-8 de *T. virens* souche Gv29-8. L'analyse électrophorétique des extraits de protéines a révélé une abondance remarquable d'une protéine de faible poids moléculaire. Cette protéine a été désignée comme Sm1 (petite protéine). La composition en acides aminés de Sm1 a révélé un pourcentage élevé de résidus hydrophobes (40 %), dont quatre cystéines et trois tryptophanes, et ses caractéristiques étaient conformes à celles signalées pour les éliciteurs fongiques. L'application exogène de l'éliciteur protéique Sm1 de *T. virens* dans les racines de coton (*Gossypium hirsutum*) a induit l'expression des gènes liés à la défense tels que GLU (β -1,3-glucanase), CHT (chitinase), POD6 (peroxydase), et GhLOX1 (lipoxygénase1).

De même, *T. atroviride* sécrète une protéine homologue de Sm1-Ep11, en présence de racines de maïs, qui est libérée sous forme de dimère, mais sous sa forme monomère, elle déclenche des réponses de défense efficaces contre le champignon pathogène *Colletotrichum graminicola* (Vargas et al. 2008). *Trichoderma formosa* produit également un petit peptide éliciteur de la défense des plantes homologue similaire à lacérato-platanine Ep11 de *T. formosa*, c'est un peptide de 12 kDa (Cheng et al. 2018). Ruocco et al. (2015) ont signalé que *T. longibrachiatum* MK1 et d'autres souches fongiques produisent une hydrophobine de type II qui possède 71 acides aminés et un poids moléculaire de 7218 Da, qui est capable d'activer la défense des plantes et d'améliorer la ramification des racines dans les plants de tomates.

Les espèces du genre *Trichoderma* sont des producteurs prolifiques de peptaïbols qui peuvent contenir de 7 à 20 acides aminés et présentent de manière caractéristique un groupe N-terminal acyléacylés, un alcool aminé C-terminal et une forte teneur en acide 2-aminoisobutyrique (Aib) (Reino et al. 2008; Mukherjee et al. 2011). Le premier peptaïbol identifié de cette classe est connu sous le nom d'alaméthicine provenant de *T. viride* (Brewer et al. 1987). Ce peptaïbol a une activité antimicrobienne contre les bactéries gram positives et est également un puissant éliciteur de composés volatils dans le haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*). D'autres peptaïbols sont la suzukacilline A, les trichorovines, les trichodécénines I et II et les trichocellines de *T. viride*, les trichokonines V-VIII de *T. koningii*, la trichobrachine A I-IV et B I-IV de *T. longibrachiatum*, des atroviridines de *T. atroviride*, etc. (Reino et al. 2008; Fujita et al. 1994; Mohamed-Benkada et al. 2006).

L'activation de la défense des plantes par *Trichoderma* comprend également l'induction et l'accumulation de phytoalexines. La camalexine est la principale phytoalexine d'*A. thaliana* qui peut être stimulée après une infection par des agents phytopathogènes bactériens ou fongiques (Contreras-Cornejo et al. 2011). Un certain nombre d'aldéhydes possèdent la capacité de réagir avec la cystéine pour former l'acide thiazolidine carboxylique correspondant (Zook et al. 1997). Il a été signalé que la synthèse de la camalexine peut se faire par la condensation de l'ICALd avec la L-cystéine, suivie d'une oxydation et d'une décarboxylation en deux étapes (Devys et al. 1991). De manière intéressante, une étude a montré que *T. virens* et *T. atroviride* ou l'application d'ICALd augmentaient l'accumulation de camalexine dans les semis d'*A. thaliana* (Contreras-Cornejo et al. 2011).

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule clé pour la régulation des réponses de défense des plantes, et il est rapidement généré après une interaction plante-micro-organisme (Scheler et al. 2013). Il existe des preuves que *T. asperelloides* supprime la génération de NO stimulée par le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*, probablement pour prévenir les effets toxiques causés par cette espèce réactive (Gupta et al. 2014). Ce raisonnement est étayé par la constatation que *T. harzianum* T-22 a amélioré les mécanismes antioxydants impliquant une activité plus élevée de l'ascorbate, du glutathion, de la super oxyde dismutase, de la catalase, et de l'ascorbate peroxydase dans des plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Jubilee) cultivées dans des conditions de stress abiotique (Mastouri et al. 2012).

3. Interaction *Trichoderma* et pathogène

La caractéristique la plus importante et la plus fascinante de *Trichoderma* est l'étude des mécanismes variés pour la gestion des phytopathogènes et des maladies des plantes (**Tableau 3**) (Pal and Gardener 2006). Les mécanismes de bio-contrôle directs et indirects pour contrôler les agents pathogènes des plantes sont les suivants (**Figure 14**).

3.1. Antagonisme direct

L'antagonisme direct résulte du contact physique de l'agent de bio-contrôle avec l'agent pathogène. Il comprend ;

3.1.1. Le mycoparasitisme : Le mycoparasitisme ou hyperparasitisme est un processus complexe (Harman et al. 2004b) qui implique l'interaction parasitaire de deux ou plusieurs champignons dans lequel l'un parasite le mycélium de l'autre (Druzhinina et al. 2011) et les espèces de *Trichoderma* parasitent une large gamme de mycoparasites en particulier les pathogènes du sol (Hajjehghrari et al. 2008). Dans ce processus, tout d'abord, les espèces de *Trichoderma* détectent l'agent pathogène et entrent en contact avec l'hôte, ce qui implique des changements morphologiques tels que l'enroulement et la formation d'appressoriums qui développent un trou à la surface de l'hôte ou de l'agent pathogène cible (Omann and Zeilinger 2010). Deuxièmement, les espèces de *Trichoderma* reconnaissent les signaux du champignon hôte qui activent la pénétration des hyphes de *Trichoderma* dans le lumen du champignon parasité cible (Kubicek and Druzhinina 2013). Troisièmement, une multiplication active a lieu à l'intérieur des hyphes des champignons cibles. L'attachement de *Trichoderma* et de l'agent pathogène est médié par la liaison des hydrates de carbone et de la lectine qui sont présents dans la paroi cellulaire de *Trichoderma* et dans l'agent pathogène cible respectivement.

Il est intéressant de noter que les enzymes extracellulaires de *Trichoderma* sont produites pendant le processus de pénétration qui inhibe la croissance hyphale du pathogène cible. On pense qu'une variété d'enzymes chitinolytiques et de β -1,3-glucanases sont des enzymes clés dans le mycoparasitisme (Kamala and Devi 2012) de l'espèce *Trichoderma* qui a montré un grand potentiel contre les phytopathogènes. Dans les études récentes, plus de 1100 souches de *Trichoderma* ont été trouvées comme mycoparasites à partir de 75 espèces définies sur le plan moléculaire (Druzhinina et al. 2011).

3.1.2. Antagonisme par voie mixte (Antibiose et métabolites secondaires)

Les espèces de *Trichoderma* provoquent la décomposition des champignons phytopathogènes sans aucun contact physique entre les micro-organismes en produisant des composés antimicrobiens. Ce processus est généralement appelé "antibiose" et le terme métabolites secondaires est un groupe de composés naturels hétérogènes et chimiquement divergents qui peuvent être associés à des fonctions de survie telles que la symbiose, la différenciation et la compétition contre les organismes, etc. pour l'organisme producteur (Wu et al. 2014). Les antibiotiques sont des produits naturels ayant la capacité d'inhiber la croissance de l'agent pathogène cible en corrélation avec l'activité de bio-contrôle. L'antibiose se produit pendant le processus d'interaction des souches de *Trichoderma* avec les microbes pathogènes, impliquant des antibiotiques ou des composés diffusibles de faible poids moléculaire qui retardent la croissance de l'agent pathogène (Reino et al. 2008). La plupart des espèces de *Trichoderma* produisent des composés métaboliques volatils et non volatils, notamment la tricholine, la massoilactone, l'acide heptelidique, la gliovirine, la 6-penthy-pyrone, l'acide harzianique, les glisoprénines, les peptaïbols, les alaméthiciens, et d'autres ont été étudiés qui sont toxiques pour l'agent pathogène cible (Qualhato et al. 2013). L'effet synergique des antibiotiques et des enzymes hydrolytiques permet d'atteindre un niveau maximal d'antagonisme plutôt qu'un mécanisme isolé (Monte 2001). *T. harzianum* et *T. virens* sont les agents de bio-contrôle les plus efficaces en liaison avec les antibiotiques qu'ils produisent : la gliovirine et la pyrone, respectivement.

Tableau 3 : Efficacité des espèces de *Trichoderma* contre les champignons pathogènes du sol (Muhammad et al. 2018).

Souches de <i>Trichoderma</i>	Le pathogène(s) <i>Fusarium</i>	Plante/ Culture	La maladie	Efficacité (Inhibition)	Expérience	Référence
<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium solani</i>	Tomate	Pourriture des racines	70-72%	<i>In vitro</i>	Haggag and El-Gamal (2012)
<i>T. harzianum</i> T-22	<i>F. verticillioides</i>	Maïs	Pourriture des épis et des grains	65% de réduction de la taille de la zone nécrosée		Ferrigo et al. (2014)
<i>T. harzianum</i>	<i>F. culmorum</i>	Blé dur	Fusariose du collet	53.59 et 51.79%,	Dans des conditions contrôlées	Kthiri et al. (2020)
<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>	Pois-chiche	Flétrissement du pois chiche	44-60%	Expérience sur le terrain	Dubey et al. (2007)
<i>T. afroharzianum</i>	<i>F. culmorum</i>	Blé dur	la pourriture du collet et la brûlure de l'épi	50 et 63.63%	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Bouanaka et al (2021)
<i>T. harzianum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis</i>	Concombre	Pourriture des tiges et des racines	12-79%	Expériences en pots	Alizadeh et al. (2013)
<i>T. viride</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>adzuki</i>	Soja	Pourriture des racines		<i>In vitro</i>	John et al. (2010)
<i>T. harzianum</i>	<i>F. solani</i>	Coton	Flétrissement	71%	<i>In vitro</i>	Asran-

			et pourriture des capsules			Amal et al. (2010)
<i>T. atrovirde</i> <i>T. Longibrachiatum</i> <i>T. virens</i> <i>T. hazianum.</i>	<i>F. sambucinum</i>	Pomme de terre	Pourriture sèche de la pomme de terre	<i>T. longibrachiatum</i> a montré la plus forte inhibition	<i>In vitro</i>	Ru and Di (2012)
<i>T. hazianum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	Flétrissement de la tomate	44.4%	Conditions in vitro et en pot	Alwathnani and Perveen (2012)
<i>T. hazianum</i>	<i>F. solani</i>	Yam	Pourriture des racines	59-87%	<i>In vitro</i>	Okigbo and Emeka (2010)
<i>T. hazianum</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	Haricot vert	Pourriture des racines	58-100% 56-100%	In vitro et en serre	El-Mohamedy and Alla (2013)
<i>T. harzianum</i> (Thazad) <i>T. viride</i> (O1 PP)	<i>F. oxysporum</i>	Petit pois	Flétrissement	58% 60%	<i>In vitro</i>	Shahid et al. (2014)
<i>T. hazianum</i> <i>T. viride</i>	<i>F. oxysporum</i>	Banane	Flétrissement	Zone d'inhibition de 1,4 cm Zone d'inhibition de 1,0 cm	<i>In vitro</i>	Thangavelu et al. (2004)
<i>T. hamatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	Lentilles	Flétrissement vasculaire	33%	Serre	El-Hassan et al. (2013)
<i>T. hazianum</i>	<i>F. oxysporum</i>	Pois-chiche	Pourriture et flétrissement des racines	Inhibe significativement la croissance des phytopathogènes	<i>In vitro</i>	Verma et al. (2014)
<i>T. hazianum</i> ITEM 3636 <i>T. longibrachiatum</i> ITEM 3635	<i>F. solani</i>	Arachide	Racine brune	<i>T. harzianum</i> est plus efficace que <i>T. longibrachiatum</i> pour réduire l'indice moyen de gravité de la maladie et augmenter le rendement.	Expérience sur le terrain	Rojo et al. (2007)
<i>T. harzianum</i>	<i>F. udum</i>	Petit pois	Flétrissement	L'application au sol de <i>T. harzianum</i> est plus efficace que le traitement des semences	Expérience sur le terrain	Prasad et al. (2002)
<i>T. harzianum</i> <i>T. aurepviride</i>	<i>F. moniliforme</i>	Maïs	Pourriture de la tige	<i>T. harzianum</i> a montré un antagonisme et une germination des graines maximaux.	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Harleen and Chander (2011)
<i>T. harzianum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	Flétrissement	5-7.5%	<i>In vitro</i>	Sriram et al. (2010)
<i>T. ghanense</i>	<i>F. oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i> et sp. <i>radicislycopersici</i>	Tomate	couronne et la pourriture des racines	53.1 et 48.3%,	<i>In vitro</i>	Debbi et al. (2018)
<i>T. harzianum</i> (Thr.4 and Thr.10) <i>T. viride</i> Tv.6	<i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. verticillioides</i>	blé	Fusariose du collet et de racine	La plus forte diminution de l'indice de la maladie (>70%)	<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Dendouga et al. (2016)

3.2. Antagonisme indirect

3.2.1. La compétition

La compétition est un phénomène dans lequel les espèces de *Trichoderma* et les pathogènes sont en concurrence pour la disponibilité limitée de nutriments et de l'espace.

Trichoderma est généralement considéré comme un compétiteur agressif contre les champignons pathogènes du sol, qui se développent très vite vers le pathogène et le colonisent rapidement (Cuervo-Parra et al. 2014). La compétition pour les nutriments liée à la rhizosphère du sol et la compétition pour les sites d'infection apparaissent à l'intérieur ou sur les racines de la plante. Chez la plupart des champignons filamenteux, l'absorption du fer est nécessaire pour la viabilité et la plupart des champignons produisent des chélateurs spécifiques du fer ferrique de faible poids moléculaire appelés sidérophores en cas de privation de fer qui mobilisent le fer environnemental (Eisendle et al. 2004). Les espèces de *Trichoderma* ont une plus grande capacité à mobiliser les nutriments du sol et à les absorber que les autres microbes. Parmi tous les mécanismes qui empêchent l'infection par le pathogène, la compétition pour les nutriments est le plus important (Verma et al. 2007).

3.2.2. Résistance systémique induite de l'hôte

L'induction de la résistance dans la plante hôte est un mécanisme complexe. En général, il existe trois voies pour induire la résistance dans la plante hôte. Deux d'entre elles impliquent l'assemblage direct de protéines liées à la pathogénèse (PR) qui peuvent être induites par d'autres organismes. Dans l'une des voies, la production de protéines PR résulte d'une attaque de microbes pathogènes, tandis que dans l'autre voie, la production de protéines PR résulte d'une nécrose ou d'une blessure, c'est-à-dire de l'herbivorie des insectes. Dans le troisième type de voie de résistance induite par les racines associées à des bactéries non pathogènes telles que les rhizobactéries, on parle de résistance systémique induite par les rhizobactéries (RISR).

La voie induite par les pathogènes et la voie de l'herbivorie dépendent de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique qui sont des molécules de signalisation produites par la plante et leur application exogène induit une réponse similaire à celle des molécules produites naturellement (Bostock et al. 2001). La voie liée au jasmonate est appelée résistance systémique induite et est relativement différente du processus initié par les rhizobactéries. Les deux voies (voies induites par le jasmonate et le salicylate) se caractérisent par la production en cascade de PR qui comprennent des enzymes antifongiques, notamment des chitinases, des thaumatines, des glucanases et des enzymes oxydatives. Les molécules déclenchant produites dans la réponse de *Trichoderma* sont encore inconnues (Druzhinina et al. 2011) et entraînent une accumulation directe de phytoalexines ou de protéines PR, désignée sous le nom de résistance systémique acquise (SAR). Le troisième type de résistance induite par les rhizobactéries non pathogènes associées aux racines de la plante RISR qui est

phénotypiquement similaire à la résistance induite par les salicates et les jasmonates. Les plantes traitées par *Trichoderma* ont montré une résistance accrue contre diverses maladies fongiques.

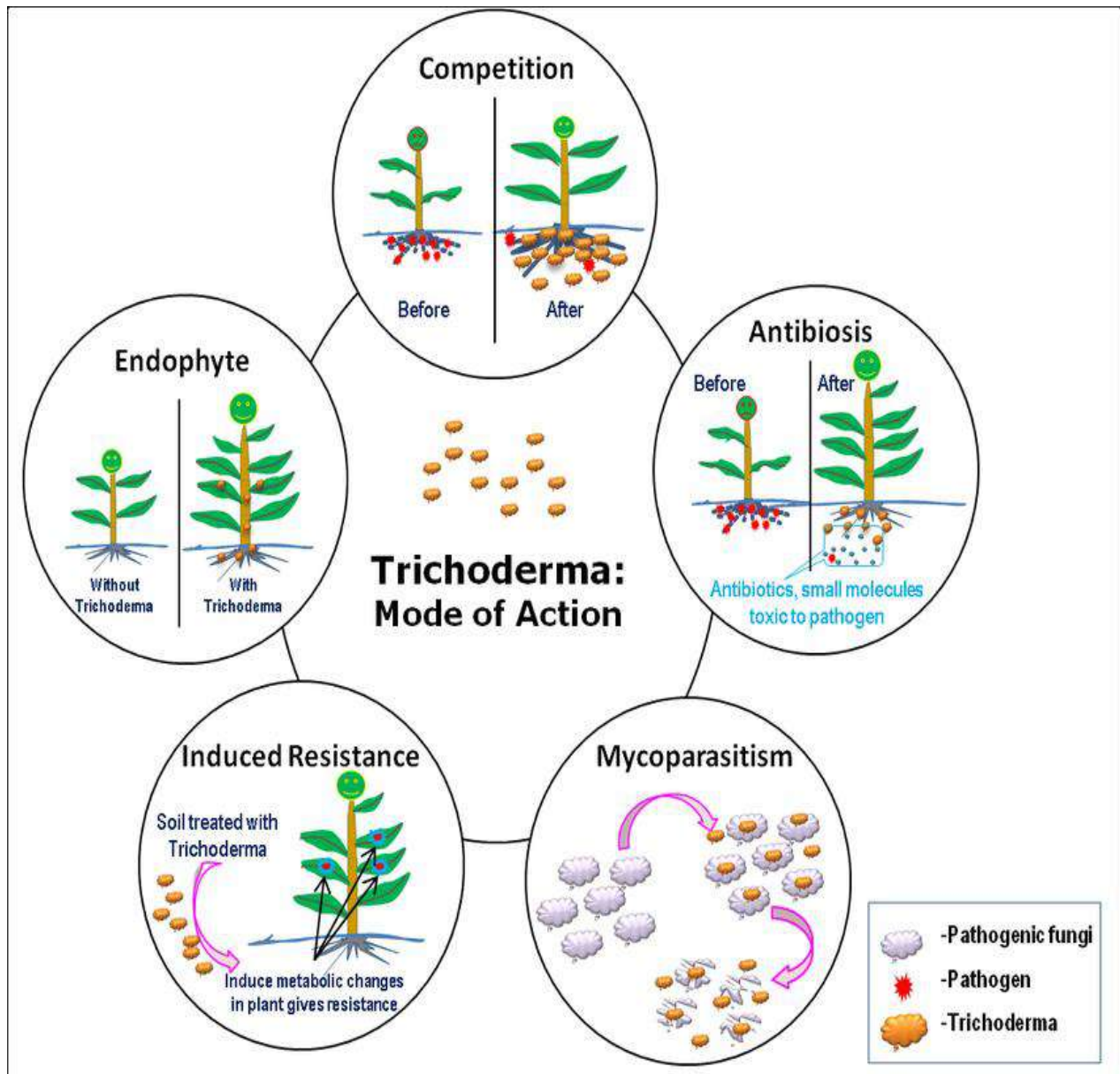


Figure 14 : Modèle décrivant le mode d'action de *Trichodermaspp.* contre les pathogènes et l'amélioration de la croissance des plantes (Muhammad et al. 2018).

3.3. Activité endophytique

L'activité endophytique de nombreux microorganismes (croissance à l'intérieur du tissu végétal sans aucun dommage) peut être utile à la plante hôte en stimulant la croissance de la plante, en retardant le début du stress de la sécheresse et en faisant obstacle aux pathogènes. Les espèces endosymbiotiques sont capables d'établir des colonies dans les

racines des plantes et déclenchent l'expression de nombreux gènes végétaux affectant les réponses au stress. Récemment, des rapports montrent que des isolats de *Trichoderma* agissent comme des symbiotes endophytes dans certaines plantes ligneuses (Chaverri et al. 2011).

Il est intéressant de noter que les souches qui s'associent aux racines modifient le modèle d'expression génétique dans les pousses. Ces changements sont les points clés de la modification de la physiologie des plantes et peuvent être exploités dans l'amélioration de nombreux traits importants tels que l'absorption des engrais azotés, la résistance aux stress abiotiques et biotiques, et l'efficacité photosynthétique conduisant à des rendements plus élevés (Harman et al. 2012). L'analyse phylogénétique classe toutes les espèces endophytes connues comme un taxon distinct, à l'exception de *T. koningiopsis*, *T. stilbohypoxyli* et *T. stromaticum* au sein de leurs clades en position terminale, ce qui suggère que l'endophytisme n'est pas un trait ancien mais a récemment évolué chez les espèces de *Trichoderma* (Druzhinina et al. 2011).

3.4. Plantes transgéniques

Les gènes de l'endochitinase de *Trichoderma* ont été clonés dans le tabac, la pomme de terre, tomate et d'autres plantes modèles, qui se sont avérés efficaces pour améliorer la résistance aux champignons pathogènes. La résistance à la croissance des champignons pathogènes. En particulier, ces transgéniques sont efficaces contre les pathogènes transmis par l'air tels que *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cineraria* ainsi que contre certains pathogènes comme *Rhizoctonia* spp. (Montero-Barrientos et al. 2010; Vishnevetsky et al. 2011; Distefano et al. 2008; Emani et al. 2003).

Matériel et méthodes

1. Matériel fongique

1.1. Isolement et identification de l'agent pathogène *Fusarium*

1.1.1. Prospection et échantillonnage

La prospection de l'agent pathogène *Fusarium* a été effectuée dans six wilayas les plus productrices de blé en Algérie, situées dans le nord-est Algérien (Constantine, Mila, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum el Bouaghi et Guelma) dans la période allant du mois de mars à mai 2019.

L'agent pathogène a été isolé du blé dur principalement mais aussi du blé tendre et d'orge, qui proviennent de différents champs de plusieurs communes des wilayas prospectées (**Annexe1**).

Les plantes de blé récoltées étaient celles qui présentaient des symptômes typiques de la pourriture du collet (brunissement du collet), ou de la fusariose de l'épi (échaudage de quelques épillets accompagné parfois d'amas de spores roses).

L'isolement de l'agent pathogène *Fusarium* est une étape indispensable pour renforcer nos connaissances sur les différentes espèces du genre *Fusarium* qui affectent le blé en Algérie et plus particulièrement le blé des régions agricoles de céréaliculture. L'**annexe 1** présente les détails sur les variétés de céréales collectées, les sites de prospection ainsi que la période d'échantillonnage.

1.1.2. Isolement de l'agent pathogène *Fusarium*

Pour l'isolement et l'identification des agents fongiques, les parties présentant les symptômes de la maladie ont été découpées en fragments d'environ 10mm pour les collets, en revanche les graines ont été épluchées de leurs glumes. Le tout a été désinfecté dans de l'hypochlorite de sodium à 2% (NaClO) pendant 5 minutes afin d'éliminer toutes contaminations superficielles, puis rincé dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile (Benhamou and Chet 1996).

Les échantillons ont été séchés entre deux feuilles de papier buvard stérile, puis déposés sur milieu de culture dans des boîtes de Pétri stériles contenant le milieu PSA (Potato Sucrose Agar), 5 fragments par boîte, et incubés à 28°C pendant 7 jours. Les colonies fongiques présentant les caractéristiques du genre *Fusarium* ont été repiquées sur de nouvelles boîtes de Pétri contenant le même milieu.

La composition du milieu PSA utilisé a été réduite de 50% de sa concentration en pomme de terre et en sucrose afin de ralentir le développement des champignons ainsi que les

bactéries saprophytes, mais aussi pour accélérer l'apparition des macroconidies (spores) avec leur forme en fuseau. La croissance bactérienne a été inhibée par l'addition de l'antibiotique Céfalexine monohydrate (LEXIN[®]) aux milieux de culture à une concentration de 5 mg/l (Botton et al. 1990).

1.1.3. Purification des isolats par la culture monospore

À partir des cultures du champignon âgées de 30 jours, une suspension de spores a été préparée dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile. Une goutte de chaque suspension a été prélevée et étalée de manière uniforme sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PSA. Les boîtes ont été incubées à 28°C. Après 24h, un prélèvement de spores en germination est effectué sous une loupe binoculaire et repiqué dans des boîtes de pétri contenant le même milieu. Ces dernières ont été incubées pendant 7 jours à 28°C.

1.1.4. Conservation des isolats de *Fusarium*

Deux méthodes de conservation des isolats de *Fusarium* obtenus ont été utilisées. La première consiste à repiquer chaque isolat en tube sur gélose PSA inclinée, les cultures ont été maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis stockées à 4°C (Botton et al. 1990). La seconde consiste à repiquer chaque isolat sous forme de disques de mycélium sur gélose dans des tubes Eppendorf (1.5 ml) contenant de l'eau glycérolée à 20 %. Les tubes sont stockés à -20°C ou -80°C (Siou et al. 2013).

1.2. Identification des isolats fongiques

1.2.1. Identification morphologique

L'identification morphologique des *Fusarium* spp. fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques à l'état pur (Botton et al.1990 ; Leslie and Summerell 2006).

A. Identification macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la croissance et le développement du champignon, le diamètre de la colonie, sa texture, la couleur du thalle, la couleur du revers ainsi que son odeur (Rinaldi et al. 1998; Botton et al. 1990).

B. Identification microscopique

Cette étude permet de détecter la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la reproduction et les caractéristiques des fructifications et des spores (Hawksworth 1994; Gams et al. 1998). Le mycélium est fixé en utilisant une solution contenant 13ml de formaldéhyde (40%) et 5 ml d'acide acétique glacial, ajoutée à 200ml d'éthanol 50% (w/v). La préparation est colorée avec du lactophénol bleu coton (Packer and Thomas 1990).

1.2.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique

Pour confirmer l'identité des souches de *Fusarium* spp. obtenues, une identification moléculaire a été réalisée au niveau du laboratoire BIOfidal (CEDEX-France).

A. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par l'utilisation d'un kit commercial NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany). À partir du mycélium collecté en grattant la surface de culture de la boîte de Pétri de l'isolat purifié. Un volume de 100µl du tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA, 3% SDS et 1% 2-mercaptoéthanol) a été ajouté et les acides nucléiques ont été isolés selon la procédure de mini-préparation par micro-ondes décrite par (Goodwin and Lee 1993). Le dernier culot d'ADN a été repris dans 100µl de tampon TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA) et stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation.

B. Amplification

Les régions de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADNr ont été amplifiées à l'aide d'une amorce spécifique fongique, ITS-1 (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A '3) (Gardes and Bruns 1993). Toutes les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25µl contenant : 14.1µl d'eau ultra pure, 5 µl de tampon de Taq (Promega), 1.5µl MgCl₂, 0.2 µl DNTP, 1µl de chaque amorce oligonucléotidique (amorce F et R de sens et anti-sens, respectivement), 0.2µl Taq polymérase (Promega) et 2µl d'ADN génomique. Les produits d'amplification ont été révélés après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% et 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 system de biorad (USA).

C. Condition de température de la PCR

Dénaturation initiale à 95°C pendant 5min, suivie de 35 cycles, dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation à 55°C pendant 30s, élongation à 72°C pendant 45s, élongation finale à 72°C pendant 7min. Enfin un stockage avant révélation à 10°C jusqu'à utilisation.

D. Purification des produits PCR

Les produits PCR (fragments amplifiés) ont été purifiés par le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel (Germany) en suivant le protocole décrit par le fournisseur.

E. Séquençage des produits PCR

Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger et al. (1977) en utilisant le kit Big Dye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces PCR utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt. Les séquences obtenues ont été analysées et nettoyées par l'utilisation du logiciel SnapGene® Viewer 5.2. Les séquences finales ont été comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI pour l'identification des isolats étudiés en se basant sur le pourcentage d'homologie avec les souches de références.

F. Analyse phylogénétique

Les séquences de la région ITS des isolats obtenues ont été utilisées pour l'alignement de séquences multiples effectuées au format MEGA en utilisant l'option Clustal W du logiciel MEGA-X. L'arbre phylogénétique et la matrice de distance ont également été construits à l'aide du logiciel MEGA, qui a mis en œuvre le programme de dendrogramme Neighbour-Joining (NJ) de Saitou and Nei (1987). La distance phylogénétique a été fondée sur le modèle de Kimura 2-paramètre (K2P) (Kimura 1980).

1.3. Isolement et identification de l'agent antagoniste *Trichoderma*

1.3.1. Site de prélèvement et échantillonnage

Dans ce travail, l'agent antagoniste *Trichoderma* a été isolé principalement à partir de la rhizosphère (différents champs de blé des six wilayas prospectées) mais aussi des sols de différents écosystèmes dans le territoire algérien (Nord, Sud, Est et Ouest) (**Annexe 2**) à une profondeur de 10 à 20cm où les champignons du sol sont généralement recherchés (Davet and Rouxel 1997). Le sol a été prélevé à l'aide d'une tarière et recueilli dans des sacs en plastique

stériles. L'analyse microbiologique a été effectuée dès l'arrivée au laboratoire selon la méthode de (Rodriguez- Zaragoza et al. 2005).

1.3.2. Isolement de l'antagoniste *Trichoderma* spp.

L'isolement de *Trichoderma* spp. a été réalisé selon la méthode de suspension-dilution (Dilutions plates) (Davet and Rouxel 1997).

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter une masse connue de terre (en général 1g) à 9ml d'eau distillée stérile, puis à agiter pendant un temps donné (quelques secondes), ce qui constitue la dilution 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 1ml de cette suspension, et des suspensions suivantes, auxquels 9ml d'eau distillée stérile sont ajoutés à chaque fois vont constituer les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , ... jusqu'à 10^{-5} (Figure 15). Un volume de 1ml de chaque suspension a été déposé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PSA pour sélectionner les champignons du genre *Trichoderma*. Un antibiotique pour inhiber la croissance des bactéries est ajouté. Les préparations sont incubées à 28°C jusqu'au développement apparent de colonies (Botton et al. 1990).

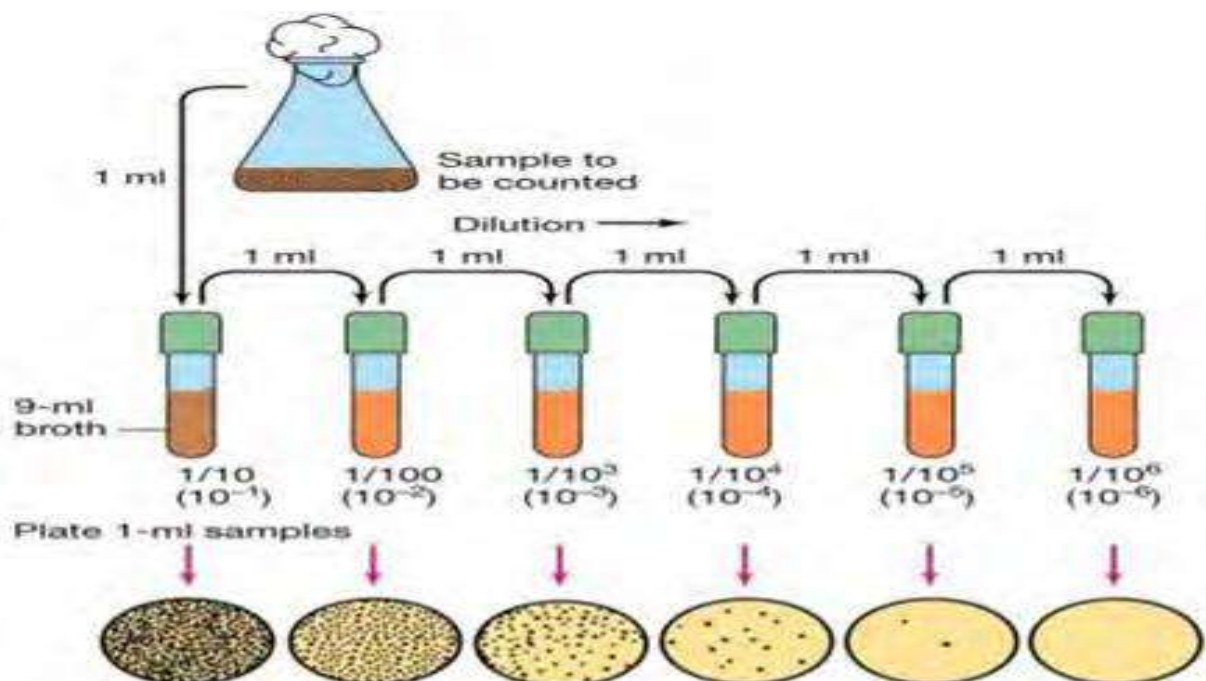


Figure 15 : Méthode de suspension dilution.

1.3.3. Purification et conservation des *Trichoderma* spp.

À partir des cultures âgées de 7 jours, la purification par la culture monospore et la conservation ont été effectuées comme indiqué ci-dessus pour les *Fusarium* spp.

1.3.4. Identification des isolats de *Trichoderma*

Uniquement l'isolat du genre *Trichoderma* qui a présenté une meilleure activité de bio-contrôle a été identifiée sur le plan morphologique et moléculaire. L'identification moléculaire a été réalisée par le laboratoire BIOfidal (CEDEX-France) comme indiqué ci-dessus.

2. Évaluation de la pathogénicité des souches *Fusarium* et mesure de leurs traits de vie

En plus de l'espèce, les champignons peuvent être caractérisés par leurs traits de vie qui leur sont propres. Ils sont mesurés dans des conditions favorables à leur développement comme leur capacité de sporulation (quantité de spores produites) ou encore leur vitesse de croissance en milieu de culture.

2.1. Vitesse de croissance

La mesure de croissance radiale sur boîte de Pétri a permis de déterminer la vitesse de croissance des isolats de *Fusarium* obtenus précédemment. À partir des souches mères en conservation, un repiquage a été réalisé sur milieu PSA sur boîtes de Pétri de 9cm de diamètre. Après quelques jours de croissance, un deuxième repiquage a été fait à l'aide d'un emporte-pièce de 6mm de diamètre sur un même milieu. Les boîtes de Pétri ainsi obtenues ont été incubées à 28°C dans l'obscurité pendant 5 jours. Pour chaque isolat trois répétitions ont été faites correspondant à 3 boîtes de Pétri par souche. Ces mesures ont permis de déterminer la vitesse de croissance de chaque souche en mm par jour.

2.2. Capacité de sporulation

La capacité de sporulation des souches a été mesurée par la détermination de la concentration en spores produites sur milieu PDA (potato dextrose agar, 39g.l⁻¹). Les souches de *Fusarium* en conservation ont été repiquées au préalable sur une boîte de Pétri contenant un milieu PDA et cultivées pendant 30 jours, à 28°C. Après confirmation microscopique que tous les isolats ont sporulé, un disque de mycélium (18mm) a ensuite été prélevé du centre de

chaque boîte pour chaque souche. Les disques ont été transférés dans 10ml d'eau distillée stérile dans un erlenmeyer de 50ml. Après 20mn d'agitation rotative à une vitesse de 200rpm, les suspensions obtenues ont été filtrées séparément à l'aide d'une étamine fine, ensuite les absorbances ont été mesurées par un spectrophotomètre à 530nm et la concentration sporale est déterminée par la formule linéaire suivante :

$$\text{Concentration} = 20090760 \times \text{Abs} - 100439$$

La spectrophotométrie s'est avérée être une méthode rapide, simple et précise pour estimer la concentration des suspensions de spores des isolats du genre *Fusarium* (Caligiore-Gei and Valdez 2015). Les concentrations sporales ont été confirmées aussi par comptage à la cellule de Malassez. Trois comptages ont été réalisés pour le même erlenmeyer ainsi que deux répétitions pour chaque isolat. La capacité de sporulation correspond donc à la concentration en spores, mesurée en nombre de spores produites par mL de suspension récoltée.

2.3. Test de pathogénicité des isolats de *Fusarium* sur le collet (FCR)

L'étude de la pathogénicité et l'agressivité des isolats de *Fusarium* sur le collet (FCR) a été évaluée selon deux méthodes *in vitro* et *in vivo*. Le cultivar de blé dur d'origine italienne (Simeto) reconnu par sa sensibilité à la fusariose du blé (Purahonget al. 2014) a été choisi pour la réalisation des tests.

2.3.1. Test *in vitro* dans la chambre de culture

Ce test a été inspiré d'Asad et al. (2009) avec des modifications majeures. Les fonds de 105 tubes à essai (14 × 3cm) ont été remplis avec 4cm de coton. Vingt millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes à essai sont recouverts avec du papier aluminium puis stérilisés par autoclavage à 180°C pendant 2h deux fois avec un intervalle de 24 heures. Les graines de blé (Simeto) ont été désinfectées en surface par NaClO à 2% pendant cinq minutes et rincées trois fois successives par de l'eau distillée stérile. Après séchage, les graines ont été soigneusement placées sur le coton humide dans chaque tube à essai (5 graines/tube). Un disque de 8mm d'isolat fongique âgé de 7 jours a été placé d'une façon adjacente des graines (3 tubes/ isolat). Les tubes ont été fermés avec des bouchons transparents et mis en incubation à 28 ± 1°C pendant 4 jours, puis transférés dans une chambre de culture (25/19°C température jour/nuit, 16/8 h cycle éclairage/obscurité). Les tubes ont été disposés selon un plan de randomisation complet. Après deux semaines, les classes de gravité de la FCR en fonction des symptômes qui comprenaient une décoloration

brune et nécrotique des tissus de la couronne ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4 où :

Classe 0 = couronne saine; 1 = brunissement léger de la couronne; 2 = brunissement de la moitié de la couronne; 3 = brunissement complet de la couronne; et 4 = mort des plantules.

La gravité de la maladie (DSt) de chaque traitement a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923), qui exprime le pourcentage de la gravité maximale de la maladie selon la formule :

$$DSt = \left\{ \sum (c \times f) / n \times N \right\} \times 100$$

Où c = classe de maladie, f = fréquence, n = nombre d'observations, et N = la plus grande valeur de l'échelle empirique adoptée (classe 4).

Les pourcentages de la longueur du coléoptile (%CL) ont été mesurés selon la formule suivante :

$$\%CL = (CLt \times 100) / CLc$$

Où %CL = le pourcentage de la longueur du coléoptile, CLt = la moyenne de la longueur du coléoptile, CLc = la moyenne de la longueur du coléoptile témoin.

2.3.2. Test *in vivo* dans la serre

Seulement les isolats de *Fusarium* qui ont montré une pathogénicité importante dans le premier test *in vitro* dans la chambre de culture ont été utilisés pour ce test *in vivo*. Cinq graines de blé dur (Simeto) ont été stérilisées en surface par NaClO à 2% pendant 8 min, puis rincées six fois avec de l'eau distillée stérile. Elles sont par la suite semées dans un pot de (8 × 12cm de hauteur) contenant un mélange de terre agricole et de fumier (1/2). Ce mélange a été stérilisé préalablement à 180°C pendant 2h (2 répétitions avec 24h d'intervalle). Pour chaque isolat deux répétitions et deux témoins non inoculés (5 pots/isolat) ont été utilisés.

Les pots ont été placés dans la serre (25/19°C température jour/nuit, 16/8 h cycle éclairage/obscurité). Après 3 semaines, quand les semis ont atteint le stade deux feuilles (Zadoks' GS 12: Zadoks et al. 1974), la terre autour des tiges a été enlevée et un disque PSA (13mm) d'une culture âgée de 7 jours a été déposé autour des tiges, à 2cm au-dessous du sol pour permettre au mycélium d'atteindre la base des tiges. La terre a ensuite été remise en place autour des plantules, les pots ont été organisés selon un plan complètement aléatoire. Les plantules ont été arrosées tous les 3 jours durant le test. Trois semaines après l'inoculation

(Zadoks' GS 20), chaque plante a été retirée soigneusement du sol et lavée avec de l'eau de robinet.

Les classes de gravité ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4. La gravité de la maladie (DSp) de chaque traitement a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923) comme indiqué ci-dessus (test *in vitro*).

La valeur DSp varie de 0% (non pathogène, absence du collet infecté) à 100% (très pathogène, toutes les plantules sont mortes). Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isollement de *Fusarium* sp. à partir de petites ou de grandes taches brunes sur les collets pour les deux tests.

3. Évaluation de la résistance variétale du blé dur à la fusariose

Les cultivars de blé dur local GTAdur, Cirta, Waha, Simeto, Hogar, Bousselem, Ammar 6 et Sétifis cités par ordre d'importance agronomique ont été choisis pour faire l'objet des tests de résistance variétale à la fusariose et de pathogénicité des isolats de *Fusarium*. Ces variétés ont été les plus commercialisées dans la wilaya de Constantine durant les six dernières campagnes (2014-2015 jusqu'à 2018-2019) (**Tableau 4**), dont deux variétés Ammar 6 et Sétifis très cultivées à Guelma et Sétif, respectivement.

Tableau 4 : Les variétés de blé dur cultivées à Constantine durant 5 campagnes entre 2014-2015 jusqu'à 2018-2019 (OAIC, 2019) Office Algérien Interprofessionnel des Céréales.

Quintaux	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	moyenne	classement
GTAdur	39087	38035	33115,5	27988,5	30816	33808,4	1
Cirta	22095,5	26484	21587,5	19786	23615,5	22713,7	2
Waha	7347	2850	5427,5	2733	4108	4493,1	3
Simeto	1659	1749	5582	2994	6945	3785,8	4
Hogar	1305	2232,5	678,5	1312	2054,5	1516,5	5
Bousselem	295,5	23,5	335,5	2442,5	3327,5	1284,9	6
wahbi	28,5	347,5	1006	1106,5	128	523,3	7
Megres	14	140	0	0	0	30,8	8
Ain Lehma	0	0	0	0	2	0,4	9

3.1. Matériel fongique et préparation de l'inoculum

La souche de *Fusarium culmorum* codée (FC11) caractérisée comme étant la plus agressive parmi notre collection de *Fusarium* phytopathogène du blé a été utilisée dans les tests.

Pour la préparation de l'inoculum fongique, la souche FC11 a été cultivée dans 6 boîtes de Pétri sur un milieu PSA pour une période de 30 jours. 10ml d'eau distillée stérile avec 0,05% (v/v) de Tween-20 ont été ajoutés à la partie aérienne mycélienne de chaque boîte, qui a été par la suite grattée soigneusement jusqu'à la récupération de toute la partie superficielle du champignon. Le mélange de macroconidies, mycélium et le milieu PSA a été récupéré dans un bécher et bien agité à l'aide d'un barreau magnétique afin de libérer les macroconidies du mycélium et homogénéiser leur dispersion, puis filtré à travers une double couche d'étamines. La concentration de la suspension macroconidienne a été ajustée jusqu'à obtenir 2×10^7 conidies /ml par la cellule de Malassez pour le test de boîte de Pétri, et de 10^7 conidies /ml pour le test d'inoculation de l'épi dans la serre. La préparation de l'inoculum a été réalisée suivant le protocole de Stein et al. (2009).

3.2. Test de boîte de Pétri (test *in vitro*)

Le test de boîte de Pétri a été inspiré de la méthode de Purahong et al. (2011) avec des modifications majeures. 250 graines de blé dur de chacun des huit cultivars, ont été stérilisées en surface par NaClO à 2% pendant 8min puis rincées six fois avec de l'eau distillée stérile. Pour chaque cultivars, 10 boîtes de Pétri (9cm de diamètre) préalablement couvertes par du papier absorbant en triple couche sur lequel 25 graines saines ont été déposées dans chacune des boîtes. Cinq boîtes ont été inoculées avec 10ml d'inoculum fongique FC11 et les 5 autres témoins avec 10ml d'eau distillée stérile. Les boîtes de Pétri ont été incubées dans une étuve à 25°C en obscurité totale. Les graines qui ont germé dans les boîtes témoins de chaque cultivar ont été comptées 3 jours après l'inoculation (DAI) et ce nombre a été considéré comme 100% de germination. Il en est de même pour les 5 boîtes infectées, et le nombre obtenu sert à calculer le pourcentage d'inhibition de la germination (GI%) :

$$GI \% = 100 - \left\{ \frac{GG_I \times 100}{GG_T} \right\}$$

Avec GG_I = nombre des graines germées dans les boîtes infectées, GG_T = nombre des graines germées dans les boîtes témoins. La valeur GI % varie de 0% (très résistant, les graines

germées \geq à celles du témoin) à 100% (très sensible, toutes les graines n'ont pas germé au jour 3).

Le paramètre The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC1) illustre les symptômes sur les graines déjà germées et donc la sensibilité à l'infection initiale par FC11. Les graines non germées ou avec des taches brunes sur les coléoptiles et/ou le mycélium couvrant complètement les graines ont été identifiées sur les boîtes de Pétri infectées et ont été comptées tous les jours de 3 à 6 DAI. La cinétique de progression de la maladie en pourcentage des graines symptomatiques (PGS) entre la première et la dernière notation a été notée. L'AUDPC1 est calculé selon la relation suivante :

$$\text{AUDPC1} = \left\{ \sum_0^n \left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \right\} / t$$

Avec Y_i le PGS à la i ème notation, t = nombre de jours écoulés entre la 1ère et la dernière notation, et n = nombre total de notations. Les valeurs du AUDPC1 sont limitées entre 0 (très résistant, les semis sont semblables à ceux du témoin) à 100 (très sensible, tous les semis sont malades au jour 3).

3.3. Test d'inoculation du collet dans la chambre de culture (test *in vivo*)

Cinq graines de blé stérilisées en surface ont été semées dans des pots de (8 × 12cm) contenant un mélange de terre agricole et de fumier (1/2), ce mélange a été stérilisé auparavant à 180°C pendant 2h (2 répétitions, 24h d'intervalle). Pour chaque cultivar, trois répétitions et deux témoins (5 pots) sont utilisés. Les pots ont été placés dans la chambre de culture (25/19°C température jour/nuite, 16/8 h cycle éclairage/obscurité). Après 3 semaines où les semis sont au stade deux feuilles : (Zadoks' GS 12), la terre autour des semis a été enlevée et un disque PSA de 13mm de diamètre (culture âgée de 7 jours de FC11) a été déposé autour des tiges, à 2cm au-dessous du sol, la terre a ensuite été remise en place autour des plantules. Les pots ont été organisés selon un plan complètement aléatoire. Trois semaines après l'inoculation (Zadoks' GS 20), chaque plante a été retirée soigneusement du sol et lavée. Les classes de gravité ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4, comme décrit précédemment.

La gravité de la maladie (DS) de chaque traitement a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923). La valeur DS varie de 0% (très résistant, absence du collet infecté) à 100%

(très sensible, tous les plantules sont mortes). Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolement de FC11 à partir de taches brunes sur les coléoptiles.

3.4. Inoculation de l'épi dans la serre (test *in vivo*)

Un total de 16 pots (24 × 20cm) ont été remplis d'une mixture de terre/ fumier (1/2) stérile. 20 graines stérilisées des 8 cultivars ont été semées (10 graines dans le pot test et 10 autres dans le pot témoin) à environ 2cm sous la surface du sol. Les plantes ont été cultivées dans des conditions environnementales contrôlées dans la serre. L'inoculation des épis est réalisée au stade floraison (Zadoks' GS 60) et pour chaque épi à part entière entre 1 et 3 jours après la sortie des premières anthères. La suspension macroconidienne du FC11 d'une concentration de 2×10^7 macroconidies/ml est préalablement préparée comme indiqué ci-dessus, et stockée à 4°C jusqu'à utilisation. Chaque épi a été étiqueté à la sortie des premières anthères afin d'identifier le début de la floraison.

L'inoculation a été effectuée par pulvérisation d'environ 1ml de suspension sur chaque face de l'épi, dans une cage en plexiglas pour éviter les contaminations croisées. Les épis ont ensuite été recouverts d'un sac en polyéthylène transparent pendant 72 h afin de maintenir une humidité relative maximale, nécessaire aux premières étapes de développement du champignon. Après 15 jours de l'inoculation, une évaluation visuelle de la maladie a été réalisée pour chaque épi, en comptant le pourcentage d'épillets symptomatiques (PES) de chaque épi inoculé. Environ 8 à 10 épis ont été notés pour chaque pot.

Vue la variabilité et la spécificité des cultivars, la floraison n'a pas eu lieu le même jour, même au sein du même génotype. La notation du PES des épis a été effectuée séparément. Pour chaque épi, 5 lectures avec 4 jours d'intervalle ont été réalisées, permettant ainsi d'illustrer la cinétique de la maladie sur 20 jours environ. L'AUDPC2 illustre la cinétique de progression de la maladie en PES entre la première et la dernière notation. L'AUDPC2 pour l'incidence de la fusariose de l'épi (FHB) a été pondéré par le nombre de jours d'observation et calculé comme décrit par Siou et al. (2015) :

$$\text{AUDPC2} = \left\{ \sum_0^n \left[\left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right] \right\} / \{t_n - t_0\}$$

Où Y_i le PES à la i ème notation, t_i le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la dernière notation, t_0 le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la 1ère notation et n le nombre total de notations.

Après la moisson, le poids de mille grains (Thousand Kernel Weight) (TKW) est mesuré pour chaque génotype mais aussi le pourcentage des grains fusariés est calculé. À maturité, chaque épi a été récolté, les épis ont été égrainés à la main de manière à récupérer la totalité des grains, y compris les grains momifiés qui sont très petits et collés aux glumes. Tous les grains ont été comptés et pesés de manière à obtenir le poids de mille grains des épis inoculés (TKW_I) et le poids de mille grains témoin (TKW_T) de chaque génotype. Le pourcentage du poids de mille grains perdu (%TKW_{loss}) est mesuré afin d'estimer le pourcentage de perte de rendement causée par le *Fusarium* FC11.

$$\%TKW_{loss} = 100 - \left\{ \frac{TKW_I \times 100}{TKW_T} \right\}$$

Par la suite, les grains sains et fusariés de chaque génotype ont été identifiés et comptés afin de définir le pourcentage de grains fusariés symptomatiques (Fusarium-Damaged Kernels) (%FDK). Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolément du pathogène FC11 à partir des grains infectés.

3.5. Évaluation des propriétés physiques du grain

L'effet de la fusariose sur les grains de blé a été estimé en analysant les propriétés physiques de ces derniers. Les grains de chaque cultivar (blé contrôle non fusarié et blé fusarié) ont été nettoyés manuellement. Les grains cassés et ratatinés sont éliminés. Afin de déterminer la taille moyenne du grain, dix grains ont été pris au hasard et leurs trois dimensions linéaires ; longueur L, largeur W et épaisseur T ; ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (Digital caliper 0-150mm) avec une précision de 0.01mm. Le diamètre moyen du grain a été calculé en utilisant la moyenne arithmétique (Da) et la moyenne géométrique (Dg) des trois dimensions axiales selon les relations suivantes (Mohsenin 1968) :

$$Da = \frac{(L + W + T)}{3} \quad Dg = (LWT)^{1/3}$$

4. Évaluation de la résistance variétale du blé tendre à la fusariose

Deux méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été utilisées pour évaluer la résistance variétale de neuf cultivars locaux de blé tendre; cv. Medracen, El Hachimia, Boumerzoug, Akhamokh, Nif Encer, Arz, Ain Abid, Bordj Mehis et Hidhab ; dont certaines sont cultivés dans la région nord-est de l'Algérie en utilisant l'agent pathogène *Fusarium culmorum* (isolat FC11) qui a

déjà été évalué pour sa pathogénéicité. Ces cultivars nous ont été fournis par l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA).

4.1. Préparation de l'inoculum

Des disques fongiques (13mm de diamètre) de FC11 utilisés dans le test des tubes, ont été obtenus à partir de jeunes cultures de 7 jours sur milieu PSA. La suspension d'inoculation a été préparée selon le protocole de Stein et al. (2009) comme décrit précédemment dans **évaluation de la résistance variétale du blé dur à la fusariose** (Titre 3). La concentration de la suspension macroconidienne a été ajustée jusqu'à obtenir 7×10^6 conidies /ml en utilisant la cellule de Malassez.

4.2. Test des boîtes de pétri (test *in vitro*)

Le test de la boîte de Pétri a été réalisé comme indiqué ci-dessus (Titre 3.2). 200 graines de blé tendre de chaque cultivar ont été stérilisées puis rincées. Pour chaque cultivar, 12 boîtes de Pétri recouvertes de papier absorbant en triple couche ont été utilisées. 25 graines saines ont été déposées dans chaque boîte. 4 boîtes ont été inoculées avec 10ml de la suspension sporale FC11 (7×10^6 conidies /ml), et les 4 autres boîtes ont été utilisées comme témoins (10ml d'eau distillée stérile). Toutes les boîtes ont été incubées à 28°C dans l'obscurité totale. Les graines germées dans les 4 boîtes inoculées de chaque cultivar ont été comptées 3 jours après l'inoculation (DAI), et de même pour les 4 boîtes contrôles (le nombre des graines germées est considéré comme une germination à 100%). Le pourcentage d'inhibition de la germination (GI%) a été calculé suivant l'équation :

$$GI \% = 100 - \{SG_I \times 100 / SG_C\}$$

Où SG_I = nombre de graines ayant germé dans les boîtes inoculées, SG_C = nombre de graines ayant germé dans les boîtes témoins. La valeur du %GI varie de 0% (non pathogène, les graines germées \geq au témoin) à 100% (très pathogène, toutes les graines n'ayant pas germé au jour 3).

L'AUDPC a été utilisé pour illustrer les symptômes sur les graines déjà germées et donc la sensibilité à l'infection initiale par FC11. Des graines non germées ou des graines présentant des taches brunes sur les coléoptiles et/ou complètement recouvertes par le mycélium ont été identifiées sur les boîtes inoculées ont été comptées chaque jour de 3 à 6 DAI. La cinétique de progression de la maladie en pourcentage de graines symptomatiques

(PSS) a été évaluée entre la première et la dernière lecture. L'AUDPC est calculé comme indiqué ci-dessus (Titre 3.2).

4.3. Test des tubes dans la chambre de culture (test *in vivo*)

Ce test a été inspiré d'Asad et al. (2009) avec des modifications majeures. 54 tubes à essai (14 x 3cm) ont été remplis avec 4cm de coton, puis 20ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube ; qui ont été par la suite recouverts d'une feuille d'aluminium stérilisés par autoclavage à 180°C pendant 2 heures. 270 graines (30 graines/cultivar) désinfectées puis rincées comme indiqué dans le test précédent ont été placées sur le coton humide dans chaque tube (5 graines/tube). Les tubes ont été fermés et placés dans l'étuve à 28°C. Quand les plantules ont atteint le stade d'une feuille (Zadoks' GS 11: Zadoks et al. 1974), l'inoculation par les agents pathogènes a été déroulée comme suit : pour chaque cultivar 3 tubes témoins et 3 tubes inoculés par FC11 (disque de 13mm).

Après l'inoculation, les tubes ont été transférés dans la chambre de culture (25/19°C température jour/nuit, 16/8 h cycle lumière/obscurité) pendant 10 jours, ils ont été disposés selon un plan de randomisation complet. Lorsque les plantules ont atteint le stade deux feuilles (Zadoks' GS 12), elles ont été soigneusement retirées du coton. Les classes de gravité de la FCR pour la décoloration de la couronne ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4 décrite précédemment. La gravité de la maladie (DS) des plantules inoculées a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923).

Le pourcentage de réduction de la longueur (reduction coleoptile length RCL) et le poids du coléoptile (reduction coleoptile weight RCW) ont été calculés comme suit :

$$RCL = 100 - (\text{Infected CL} \times 100 / \text{Control CL})$$

$$RCW = 100 - (\text{Infected CW} \times 100 / \text{Control CW})$$

Tous les tests ont été répétés deux fois de suite. Les postulats de Koch ont été satisfaits en isolant le pathogène FC11 à partir des graines infectées.

5. Lutte biologique par *Trichoderma* spp.

5.1. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma in vitro*

Le test de l'activité antifongique des *Trichoderma* spp. consiste à rechercher leur effet antagoniste contre le développement de l'agent phytopathogène *Fusarium* sp. par deux méthodes : la confrontation par contact direct et la confrontation à distance (Madigan et al. 1997).

5.1.1. Antagonisme par confrontation directe

Les confrontations entre l'antagoniste *Trichoderma* sp. et le pathogène *F. culmorum* ont été réalisées selon Hibar et al. (2005). Un disque mycélien (5mm) de chaque champignon a été placé à des pôles opposés sur des boîtes de pétri contenant le milieu PSA, en gardant une distance de 3cm entre les deux champignons puis une incubation à 28°C pendant 5 jours. Trois répliques ont été réalisées pour chaque combinaison *Trichoderma* sp./*F. culmorum*. Les boîtes contenant uniquement les souches de *F. culmorum* ont été utilisées comme contrôle (Figure 16).

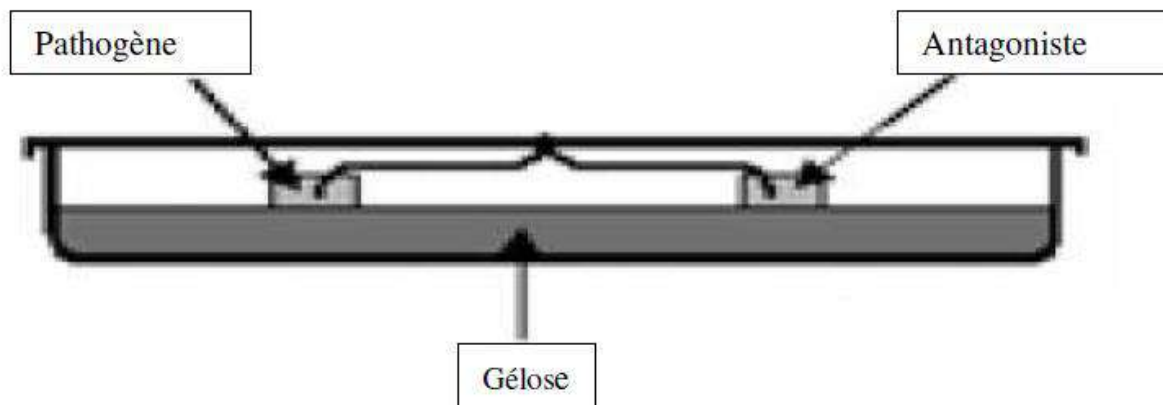


Figure 16 : Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélosé.

5.1.2. Antagonisme par confrontation indirecte

Ce test est réalisé selon Daami-Remadi and El Mahjoub (2001). Des disques de 5mm de diamètre de l'isolat antagoniste *Trichoderma* et de la souche pathogène *F. culmorum* sont déposés dans deux boîtes de pétri séparées contenant le milieu PSA. Un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, *Trichoderma* sp. en bas et *F. culmorum* en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du parafilm afin d'éviter toute perte des substances volatiles. Les boîtes sont incubées à l'obscurité à 28°C pendant 5 jours. Le témoin

a été formé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant un disque de *F. culmorum*, alors que celle du bas ne contenant que le milieu PSA.

5.1.3. Mesure de l'inhibition exercée par *Trichoderma*

Les valeurs de l'inhibition (I%) ont été estimées selon (Hmouni et al. 1996) par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de *F. culmorum* par la formule suivante :

$$I(\%) = \left(1 - \frac{C_n}{C_0}\right) \times 100$$

C_n : diamètre de la colonie de l'agent pathogène en présence de l'antagoniste (mm). C_0 : diamètre de la colonie du témoin (mm).

5.2. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma in vivo*

L'isolat T14 hautement antagoniste, sur la base de son efficacité *in vitro*, a été choisi afin de confirmer son effet de bio-contrôle *in vivo*, contre une souche de *F. culmorum* codée (FC2) utilisée comme agent pathogène.

5.2.1. Test de l'inoculation du collet dans des tubes à essai dans la chambre de culture

Ce test a été inspiré de la méthode d'Asad et al. (2009) avec des modifications majeures. 75 tubes à essai (14 x 3cm) ont été remplis par 4cm de coton, puis 20ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube, les tubes sont recouverts avec du papier aluminium, puis stérilisés par autoclavage à 180°C pendant 2h. 375 graines de blé dur (Simeto) après désinfection et rinçage ont été déposées sur le coton humide (5 graines/tube). Les tubes ont été fermés et mis dans l'étuve à 28°C. Quand les semis ont atteint le stade une feuille (Zadoks' GS 11), l'inoculation a eu lieu comme suit : 25 tubes témoins ; 25 tubes inoculés par FC2 (disque de 13mm) ; 25 tubes inoculés par FC2+T14 (disque de 13mm pour les deux).

Après inoculation, les tubes ont été transférés dans une chambre de culture (25/19°C température jour/nuit, 16/8 h cycle éclairage/obscurité) pendant 10 jours, ils ont été disposés selon un plan de randomisation complet. Les semis ayant atteint le stade deux feuilles (Zadoks' GS 12) ont été sélectionnés et les plantules ont été soigneusement retirées du coton. Les classes de gravité de la FCR en fonction de la décoloration des collets ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4 où :

Classe 0 = collet sain ; 1 = brunissement léger du collet ; 2 = brunissement de la moitié du collet ; 3 = brunissement complet du collet ; et 4 = mort des plantules.

La gravité de la maladie (DS) de chaque traitement a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923).

5.2.2. Test de l'inoculation du collet dans les pots dans la chambre de culture

Trente pots de (8 × 12cm) ont été utilisés, pour chaque pot 5 graines de blé dur (Simeto) stérilisées sont semées. Tous les pots ont été placés dans la chambre de culture (25/19°C température jour/nuit, 16/8 h cycle éclairage/obscurité). Après 3 semaines, les semis ont atteint le stade deux feuilles (Zadoks' GS 12). La terre autour des semis a été enlevée et les disques des inocula préparés comme indiqué ci-dessus, ont été déposés autour des tiges à 2 cm au-dessous du sol, un disque pour chaque tige. Les pots ont été inoculés comme suit : 10 pots témoins (non inoculés) ; 10 pots inoculés avec un disque de 13mm de FC2 ; 10 pots inoculés avec FC2+T14 (disque de 13mm pour l'agent pathogène et pour l'agent antagoniste).

La terre a ensuite été remise en place autour des tiges, les pots ont été organisés selon un plan complètement aléatoire. Trois semaines après l'inoculation, les plantes ont atteint le stade début tallage (Zadoks' GS 20), chaque plante a été retirée soigneusement du sol et lavée avec de l'eau de robinet. Les classes de gravité ont été attribuées sur la même échelle et la DS a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923). Pour mesurer l'efficacité du bio-contrôle de l'agent antagoniste *Trichoderma* (T14) contre la FCR, le pourcentage de réduction du DS est déterminé pour les deux tests comme suit :

$$\%DS \text{ réduction} = 100 - \left\{ \frac{DS_{FC2+T14} \times 100}{DS_{FC2}} \right\}$$

Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolément de FC2 à partir des taches brunes sur les coléoptiles pour les deux tests.

5.2.3. Test de l'inoculation de l'épi dans la serre

Un total de 12 pots (24 × 20cm) remplis d'une mixture de terre/fumier (1/2) stérilisée auparavant à 180°C pendant 2h (2 répétitions, 24h d'intervalle). 30 graines de chaque cultivar de blé dur (Simeto, Waha, Bousselem, Setifis) ont été stérilisées en surface par 2% NaClO pendant cinq minutes, et rincées trois fois successives. Elles ont été ensuite semées à environ 2cm de profondeur. L'inoculation de chaque cultivar par la suspension sporale se fait comme suit : 10 graines dans un pot témoin (pas d'inoculation) ; 10 graines dans un pot pour l'inoculation avec FC2 (8×10^6 macroconidies/ml) et 10 graines dans un pot pour l'inoculation avec FC2+T14 (mixture : 8×10^6 macroconidies/ml + 8×10^8 spores/ml).

Les plantes ont été cultivées dans la serre, le sol a été arrosé tous les 3 jours. L'inoculation a eu lieu au stade floraison (Zadoks' GS 60), chaque épi à part entière entre le premier et le troisième jour après la sortie des premières anthères. Chaque épi a été étiqueté à la sortie des premières anthères afin d'identifier le début de la floraison.

L'inoculation par la suspension macroconidienne (FC2 ou FC2+T14) préparée préalablement a été réalisée par pulvérisation d'environ 2ml de suspension sur les deux faces de l'épi dans une cage en plexiglas. Les épis ont ensuite été recouverts d'un sac en polyéthylène transparent pendant 72 h afin de maintenir une humidité relative maximale, nécessaire aux premières étapes de développement du champignon. Après 15 jours de l'inoculation, une évaluation visuelle de la maladie a été réalisée pour chaque épi en comptant le pourcentage d'épillets symptomatiques (PES) de chaque épi inoculé. Environ 8 à 10 épis ont été notés dans chaque pot. Ce test a été répliqué trois fois.

Vue la variabilité et la spécificité des cultivars (inter et intra-génotype), la floraison n'a pas eu lieu le même jour, même au sein du même génotype. La notation du PES des épis a été effectuée séparément. Pour chaque épi 5 lectures avec 4 jours d'intervalle ont été réalisées, permettant ainsi d'illustrer la cinétique de la maladie sur environ 20 jours. Le standard AUDPC illustre la cinétique de progression de la maladie en PES entre la première et la dernière notation. L'AUDPC pour l'incidence de la FHB a été mesuré par le nombre de jours d'observation et calculé comme décrit par Siou et al. (2015).

$$\text{AUDPC} = \left\{ \sum_0^n \left[\left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right] \right\} / \{t_n - t_0\}$$

Où Y_i le PES à la i ème notation, t_i le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la dernière notation, t_0 le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la 1ère notation et n le nombre total de notations.

À maturité, chaque épi a été récolté. Les épis ont été égrainés à la main de manière à récupérer la totalité des grains, y compris les grains momifiés qui ont été très petits et collés aux glumes. La totalité des grains ont été comptés et pesée de manière à obtenir le poids de mille grain (TKW) des épis inoculés (FC2 ou FC2+T14) et non inoculés (Témoin) de chaque cultivar, le pourcentage de réduction du AUDPC est mesuré afin d'estimer le pourcentage de perte de la sévérité de la FHB due à l'effet antagoniste (bio-contrôle) exercé par l'isolat T14.

$$\% \text{AUDPC}_{\text{réduction}} = 100 - \left\{ \frac{\text{AUDPC}_{\text{FC2+T14}} \times 100}{\text{AUDPC}_{\text{FC2}}} \right\}$$

Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolément du pathogène FC2 à partir des grains infectés.

5.3. Évaluation des propriétés physiques du grain

Afin de bien comprendre l'effet du traitement par T14 sur les propriétés physiques des grains de blé, ces derniers issus du test de l'inoculation de l'épi dans la serre (témoins, infectés par FC2, infectés par FC2 et traités par T14, et traités par T14 seulement) ont été comparés.

Les 4 types de grains pour chaque cultivar testé, ont été nettoyés manuellement. Les grains cassés et immatures ont été éliminés. Dix grains ont été pris au hasard et leurs trois dimensions linéaires ; longueur L, largeur W, et épaisseur T ; ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (Digital caliper 0-150mm) avec une précision de 0.01mm.

6. Sélection d'un traitement de bio-contrôle par une mixture de *Trichoderma* contre *Fusarium culmorum*

6.1. Matériel biologique

Le cultivar de blé dur GTAdur, connu pour sa sensibilité à la fusariose (Bouanaka et al. 2021b), a été utilisé dans tous les tests au champ et dans la serre pour la FHB, et dans la serre seulement pour la FCR afin d'évaluer l'efficacité des différents traitements utilisés dans le cadre d'un bio-contrôle par l'agent antagoniste *Trichoderma*.

Les confrontations (directe et indirecte) ont été réalisées en utilisant des agents de bio-contrôle en l'occurrence les deux souches antagonistes de *Trichoderma* T14 et T11 et l'agent pathogène *F. culmorum* selon les protocoles décrits précédemment (Bouanaka et al. (2021a) (Titre 5).

L'isolat T14 hautement antagoniste sur la base de son efficacité *in vitro* (confrontation directe), a été choisi afin de mieux évaluer son effet de bio-contrôle *in vivo*. T14 a été identifié sur le plan moléculaire comme étant *T. afroharzianum* avec des numéros d'accession attribués par NCBI GenBank comme MW171248 et MW159753. Cet agent est reconnu par son mécanisme de bio-contrôle direct (le mycoparasitisme) d'après les résultats de Bouanaka et al. (2021a). Tandis que l'isolat T11 hautement antagoniste a été choisi sur la base de son efficacité *in vitro* (confrontation indirecte). La souche T11 est reconnue par un autre mécanisme de bio-contrôle direct par voie mixte (l'antibiose et les métabolites secondaires) Bouanaka et al. (2021a). Pour cette raison, un mélange de ces deux souches a été utilisé comme agent de bio-contrôle.

6.2. L'agent pathogène *Fusarium*

Une souche de *Fusarium culmorum* codée (FC4) qui a été précédemment répertoriée dans la base de données GenBank (NCBI) sous le numéro d'accès MW165434, a été utilisée comme agent pathogène dans tous les tests. Elle a été caractérisée par son agressivité (Titre 2.3) parmi les espèces de *Fusarium* phytopathogènes du blé isolées.

6.3. Préparation des inocula

6.3.1. Inoculation par disque

Les disques fongiques d'un diamètre de 13mm du champignon pathogène *Fusarium culmorum* ont été utilisés dans le test FCR dans la serre. Ces disques proviennent des cultures jeunes âgées de 7 jours sur milieu PSA.

6.3.2. Inoculation par suspension

La suspension d'inoculation a été préparée selon le protocole de Bouanaka et al. (2021b) comme indiqué ci-dessus (Titre 3.1). La concentration du pathogène FC4 a été ajustée à 6×10^6 macroconidies/ml à l'aide de la cellule Malassez pour les deux tests d'inoculation de l'épi (Serre et champ).

Le même protocole a été suivi pour la préparation de la suspension sporale du mélange antagoniste T14+T11 sauf que la culture sur milieu PSA n'a duré qu'une semaine (sporulation rapide), avec une concentration de 10^8 spores/ml pour chaque souche (avant de les mélanger), pour les deux tests de la FHB (au champ et dans la serre) et celui de la FCR aussi. Tous les inocula ont été conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

6.4. Activité antagoniste des isolats T14+T11 contre la FCR

Pour le test de l'inoculation du collet dans les pots, 30 pots de (8 x12cm) remplis d'une mixture de terre/fumier (1/2) stérilisée auparavant à 180°C pendant 2h (2 répétitions/ 24h d'intervalle). Pour chaque pot, 5 graines de blé dur (GTAdur) stérilisées en surface par 2% d'hypochlorite de sodium (NaClO) pendant cinq minutes, et rincées trois fois successives par de l'eau distillée stérile ont été utilisées. Les graines ont été semées sous la surface du sol à environ 2cm. Les pots ont été traités et inoculés différemment comme suit :

- Cas numéro 1 : 5 pots, témoins négatifs (non inoculés).
- Cas numéro 2 : 5 pots, graines enrobées (T14+T11) + plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- Cas numéro 3 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement.

- Cas numéro 4 : 5 pots, témoins positifs (inoculés avec un disque de 13mm de FC4).
- Cas numéro 5 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- Cas numéro 6 : 5 pots, plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).

Tous les pots ont été placés dans la serre. Après 3 semaines, les semis ont atteint le stade deux feuilles (Zadoks' GS 12). La terre autour des semis a été enlevée et les disques de l'inoculum FC4 ont été déposés autour des tiges, un disque pour chaque tige à 2cm au-dessous du sol. La terre a ensuite été remise en place autour des tiges. Les pots ont été organisés selon un plan complètement aléatoire. Trois semaines après l'inoculation, les plantes ont atteint le stade début tallage (Zadoks' GS 20), chaque plante a été retirée soigneusement du sol et lavée avec de l'eau de robinet. Les classes de gravité de la FCR en fonction de la décoloration des collets ont été attribuées au laboratoire sur une échelle de 0 à 4 où :

Classe 0 = collet sain ; 1 = brunissement léger du collet ; 2 = brunissement de la moitié du collet ; 3 = brunissement complet du collet ; et 4 = mort des plantules.

La gravité de la maladie (DS) de chaque traitement a été calculée à l'aide de l'indice de McKinney (1923) comme indiqué ci-dessus (Titre 2.3.1).

Pour mesurer l'efficacité du bio-contrôle par (T14+T11) contre la FCR, le pourcentage de réduction du DS est mesuré pour les deux tests comme suit.

$$\%DS \text{ réduction} = 100 - \left\{ \frac{DS_{FC4+T14+T11} \times 100}{DS_{FC4}} \right\}$$

Le pourcentage de réduction de la longueur et le poids du coléoptile sera calculé comme suit :

$$RCL = 100 - (\text{Infected CL} \times 100 / \text{Control CL})$$

$$RCW = 100 - (\text{Infected CW} \times 100 / \text{Control CW})$$

Le test a été répété 2 fois successives. Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolement de *Fusarium* sp. à partir de petites ou grandes taches brunes sur les collets.

6.5. Activité antagoniste des isolats T14+T11 contre la FHB

6.5.1. Test de l'inoculation de l'épi dans la serre

Un total de 30 pots (24 x 20cm) remplis d'une mixture de terre/fumier (1/2) préalablement stérilisée comme indiqué dans le test précédent. 150 graines de blé dur (GTAdur) ont été stérilisées et semées comme indiqué ci-dessus (5 graines/ pot). Les pots ont été traités et inoculés différemment comme suit :

- Cas numéro 1 : 5 pots, témoins négatifs (non inoculés).
- Cas numéro 2 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + pulvérisation de l'épi (T14+T11) une semaine avant inoculation + inoculation par la suspension (FC4).
- Cas numéro 3 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement.
- Cas numéro 4 : 5 pots, témoins positifs, inoculation de l'épi par la suspension (FC4).
- Cas numéro 5 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4).
- Cas numéro 6 : 5 pots, pulvérisation de l'épi (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4).

Les plantes ont été cultivées dans la serre. Les pots ont été arrosés tous les 3 jours. L'inoculation par le pathogène (FC4) a eu lieu au stade floraison (Zadoks' GS 60) entre le premier et le troisième jour après la sortie de 50% des anthères, tandis que le traitement par pulvérisation de l'antagoniste (T14+T11) a eu lieu une semaine avant l'inoculation. Chaque épi a été étiqueté afin de poursuivre le développement de la maladie.

L'inoculation par la suspension macroconidienne du FC4 préparée préalablement comme indiqué ci-dessus, a été réalisée par pulvérisation d'environ 2ml de suspension sur les deux faces de l'épi, dans une cage en plexiglas. Ensuite les épis ont été recouverts d'un sac en polyéthylène transparent pendant 72 h afin de maintenir une humidité relative maximale nécessaire aux premières étapes de développement du champignon. Après 15 jours de l'inoculation, une évaluation visuelle de la maladie a été réalisée pour chaque épi en comptant le pourcentage d'épillets symptomatiques (PES) de chaque épi inoculée. Environ 8 à 10 épis ont été notés dans chaque pot. Ce test a été répliqué trois fois.

La notation du PES des épis a été effectuée pour chaque épi au nombre de 5 lectures avec 4 jours d'intervalle, permettant ainsi d'illustrer la cinétique de la maladie sur environ 20 jours. Le standard AUDPC illustre la cinétique de progression de la maladie en PES entre la première et la dernière notation. L'AUDPC pour l'incidence de la FHB a été mesuré par le

nombre de jours d'observation et calculé comme décrit par Bouanaka et al. (2021b) (Titre 3.4).

À maturité, chaque épi a été récolté. Les épis ont été égrainés à la main de manière à récupérer la totalité des grains, y compris les grains momifiés qui sont très petits et collés aux glumes. Tous les grains ont été comptés et pesés de manière à obtenir le TKW des épis inoculés et non inoculés (Témoin) de chaque cultivar, le pourcentage de réduction du AUDPC est mesuré afin d'estimer le pourcentage de perte de la sévérité de la FHB résultant du bio-contrôle par T14+T11.

$$\%AUDPC_{\text{réduction}} = 100 - \left\{ \frac{AUDPC_{FC4+T14} \times 100}{AUDPC_{FC4}} \right\}$$

Les postulats de Koch ont été satisfaits par le ré-isolément du pathogène FC4 à partir des grains infectés.

6.5.2. Test de l'inoculation de l'épi dans le champ

Un total de 4320 graines de blé dur (GTAdur) ont été stérilisées comme indiqué ci-dessus (240 graines/parcelle). Les semences ont été semées en lignes en maintenant un espacement de 20cm entre les rangs. La distance entre les blocs et entre les parcelles était de 50cm, respectivement. La taille de chaque parcelle unitaire était de 1 m². Il y avait donc 18 parcelles dans l'étude (**Figure 17**). L'expérience a été réalisée selon un plan en blocs aléatoires avec trois répétitions pour chaque traitement.

Les parcelles ont été tracées sur un terrain homogène, le sol a été préparé préalablement avant semis. Les différents cas de traitement sont identiques à ceux du test précédent (Test de l'inoculation de l'épi dans la serre).

La pulvérisation foliaire de la suspension de spores de (T14+T11) (10⁸ spores/ml) a été effectuée une semaine avant l'inoculation avec la souche pathogène FC4 (6×10⁶ spores/ml).

À maturité, chaque épi a été récolté. Les épis ont été égrainés à la main de manière à récupérer la totalité des grains, y compris les grains très petits et collés aux glumes. Tous les grains ont été comptés et pesés de manière à obtenir le TKW_I des épis inoculés et le TKW_T (témoin) de chaque traitement, le pourcentage %TKW_{loss} est mesuré afin d'estimer l'effet de bio-contrôle de chaque traitement et le pourcentage de perte de rendement causée par FC4.

$$\%TKW_{\text{loss}} = 100 - \left\{ \frac{TKW_I \times 100}{TKW_T} \right\}$$

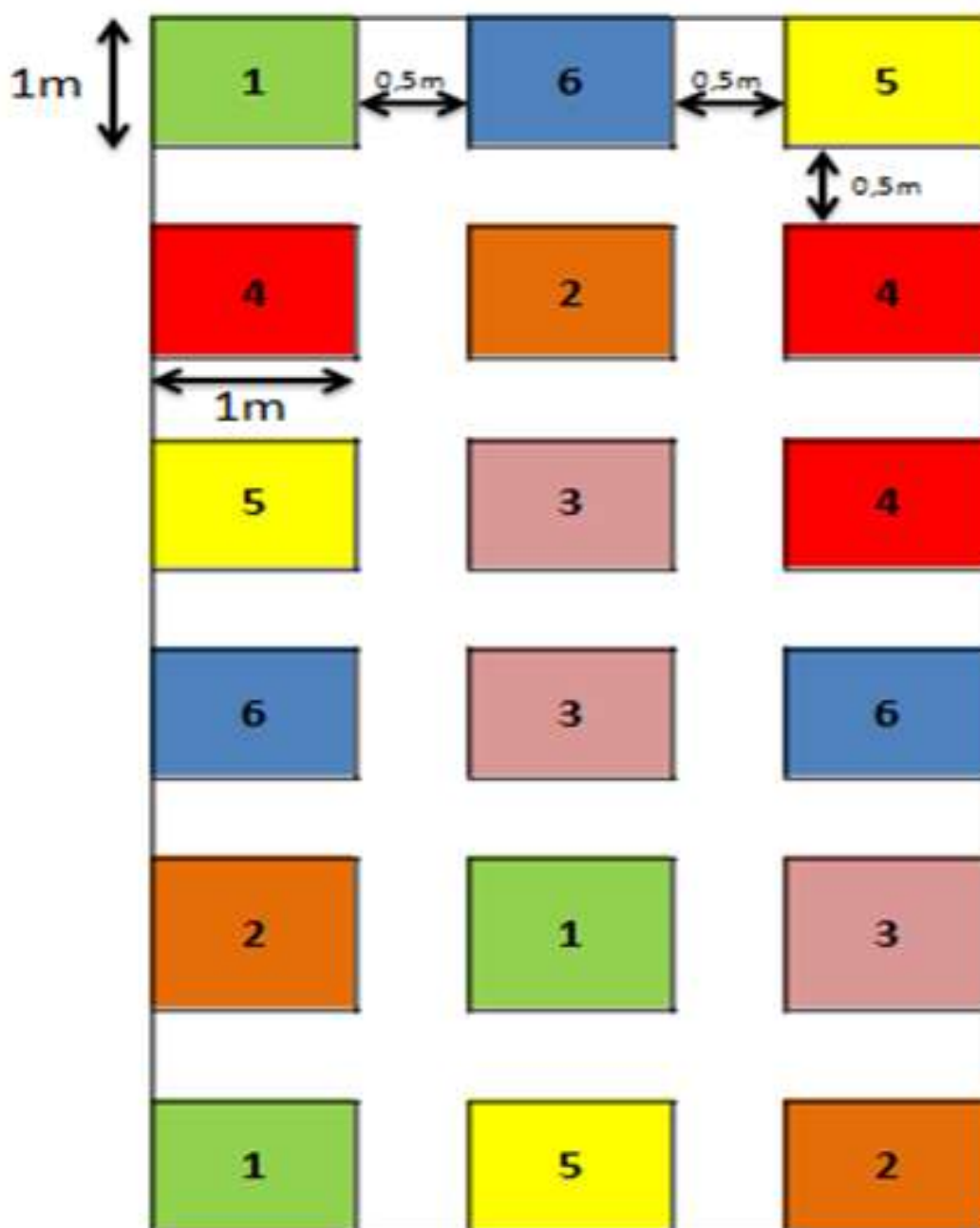


Figure 17 : Schéma illustrant les parcelles et les cas de traitement utilisés dans le test de l'inoculation de l'épi dans le champ. Cas numéro 1 : témoins négatifs (non inoculés). Cas numéro 2 : graines enrobées avant semis (T14+T11) + pulvérisation de l'épi (T14+T11) une semaine avant inoculation + inoculation par la suspension (FC4). Cas numéro 3 : graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement. Cas numéro 4 : témoins positifs, inoculation de l'épi par la suspension (FC4). Cas numéro 5 : graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4). Cas numéro 6 : pulvérisation de l'épi (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4).

Résultats et discussion

**CHAPITRE 1 : Isolement,
identification, pathogénicité des
souches de *Fusarium* et mesure de
leurs traits de vie**

CHAPITRE 1 : Isolement, identification, pathogénicité des souches de *Fusarium* et mesure de leurs traits de vie

Préambule

La fusariose du collet (FCR) est l'une des maladies fongiques destructibles du blé dans le monde. Avec les changements climatiques rapides et les conditions météorologiques, l'évolution dans la distribution et la prévalence des agents pathogènes de la FCR devient évidente en Algérie et peut être différente dans chaque région agro-écologique.

La fusariose regroupe plusieurs espèces qui ont des caractéristiques et traits de vie différents et qui peuvent potentiellement influencer sur leur développement lors d'une épidémie. La quantification des traits de vie des *Fusarium* spp. ainsi que les variables de sévérité qui leur sont associées est une étape indispensable afin de définir les liens entre les caractéristiques des souches et leur capacité à induire la FCR.

Dans cette première partie, une **revue de synthèse soumise pour publication (sous révision) dans le journal *Plant pathology* en 2021** présente une vue globale sur i) l'évaluation de la diversité actuelle des espèces de *Fusarium* associées à la FCR et à la FHB en Algérie, (ii) l'identification et la mesure *in vitro* des caractéristiques des principaux traits de vie des souches et les variables de sévérité propres à chaque souche en milieu artificiel, (iii) l'évaluation de leur pathogénicité et leur agressivité sur un blé dur sensible, (iv) la mise en évidence des liens entre les traits de vie, facilement et rapidement mesurables *in vitro*, et les mesures de sévérité *in vivo* de manière à identifier des traits de vie suffisants à la caractérisation du développement *in vivo*.

Cent dix-sept échantillons ont été collectés (2019), soixante-trois à partir du collet et cinquante-quatre à partir des grains de blé dans plusieurs régions du nord-est Algérien. Les *Fusarium* spp. ont été identifiés au niveau de l'espèce par le séquençage des régions de l'espaceur interne transcrit (ITS1) de l'ADNr, ainsi que leurs traits de vie (taux de croissance et taux de sporulation). Les tests de pathogénicité de la FCR ont été réalisés par deux méthodes *in vitro* (test des tubes) et *in vivo* (test des pots). Un total de 34 isolats représentant 10 espèces de *Fusarium* a été obtenu. Ces résultats ont montré l'existence de cinq espèces de *Fusarium* isolées des collets : *Fusarium culmorum* (16), *F. cerealis* (3), *F. acuminatum* (2), *F. graminearum* (1) et *F. oxysporum* (1), et sept espèces isolées des grains ; *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum*(1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1) et *F. brachygibbosum* (1). Les souches de *F. culmorum* ont été dominantes et plus agressives. *F. graminearum* et *F. cerealis* ont été agressives dans le test *in vitro*, cependant le reste des

espèces ont été plutôt saprophytes qu'agressives. Une corrélation significative a été enregistrée entre la vitesse de croissance et le taux de sporulation ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$) et entre le test des tubes et celui des pots ($r = 0.62$, $P = 0.007 < 0.01$). Ce résultat montre qu'un simple test *in vitro* peut prédire l'agressivité de *F. culmorum* sur la FCR du blé. Cette étude met en évidence que *F. culmorum* est l'espèce dominante associée à la FHB et FCR en Algérie. De plus, il s'agit du premier rapport concernant l'identification de *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. cerealis*, *F. asiaticum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* et *F. brachygibbosum* du blé en Algérie.

Article 1. Isolation and characterization of *Fusarium* spp. responsible for crown rot and fusarium head blight in Algerian wheat; identification of associated species and assessment of their aggressiveness

Hamza BOUANKA¹, Ines BELLIL^{1*}, Wahiba HARRAT², Douadi KHELIFI^{1,3}

Journal of Plant pathology, 2021(sous révision)

Article 1. Isolation, identification and aggressiveness characterization of *Fusarium* spp. associated with crown rot and *Fusarium* head blight in Algerian wheat

¹ Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

² Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), 25000 Constantine, Algeria.

³ École Nationale Supérieure de Biotechnologie, Pôle Universitaire, Nouvelle Ville Ali Mendjeli Constantine, Algeria.

*Correspondence: bines07@yahoo.fr

ORCIDs:

Hamza BOUANAKA: <https://orcid.org/0000-0003-0695-0157>

Ines BELLIL: <https://orcid.org/0000-0003-2718-3102>

Wahiba HARRAT: <https://orcid.org/0000-0001-6722-1033>

Douadi KHELIFI: <https://orcid.org/0000-0001-8139-5064>

Declarations

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article

Authors' contributions

HB conceived the work, designed and performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper. **IB** was a major contributor in writing the manuscript, reviewing & editing the paper. **WH** contributed to the isolation of *Fusarium* strains. **DK** supervision, project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Acknowledgement

The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria.

Abstract

Fusarium crown rot (FCR) and *Fusarium* head blight (FHB) are two destructive fungal diseases of wheat in the world. This research was conducted to study the most important species associated with these diseases in Algeria. One hundred and seventeen samples were collected. Sixty-three from the crown and fifty-four from wheat grains in several regions of northeastern Algeria. *Fusarium* spp. have been identified by sequencing internal transcribed spacer regions (ITS1-2) of the rDNA as well as their life lines (growth and sporulation rates).

FCR pathogenicity tests were performed by two methods in vitro (Tube test) and in vivo (Pot test). A total of 34 isolates representing 10 *Fusarium* species was obtained. These results showed five species isolated from crown; *Fusarium culmorum* (16), *F. cerealis* (3), *F. acuminatum* (2), *F. graminearum* (1) and *F. oxysporum* (1). And seven species from grains; *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1) and *F. brachygibbosum* (1). *F. culmorum* strains were dominant and more aggressive. Moreover *F. graminearum* and *F. cerealis* were aggressive in in-vitro test. However, the rest of species were more saprophytic than aggressive. The dendrogram showed a *Fusarium* rich diversity, in particular *F. culmorum* related to wheat FCR and FHB. A significant correlation was recorded between growth and sporulation rates ($r = 0.35$, $P = 0.012 < 0.05$). Furthermore a strong correlation was recorded between tube and pot tests ($r = 0.62$, $P = 0.007 < 0.01$). This result provides a simple in vitro test to predict *F. culmorum* FCR aggressiveness on wheat. In addition, this is the first report concerning *F. incarnatum*, *F. asiaticum*, *F. acuminatum* and *F. graminearum* identifications from Algerian wheat.

Keywords: Algeria, fungus, *Fusarium*, pathogenicity, *Triticum*.

1. Introduction

Wheat (*Triticum* spp.) being a staple food for about 40% of the world's population plays a major role in global food security (Bockus et al. 2010). Unfortunately, it can be infected by many diseases caused by microorganisms that reduce the harvest quality and quantity. Among these diseases, fusarium crown rot (FCR) and fusarium head blight (FHB). These are two of the most destructive and damaging fungal diseases, transmitted by soils and residues at the worldwide level (Tunali et al. 2008; Shikur Gebremariam et al. 2017).

The major FCR symptoms are; seedling blight, lower stems honey-brown discoloration with nodes occasional pink discoloration or stems under leaf sheaths, and may colonize the entire stem's base up to the third node and white spots at maturity (Dyer et al. 2009; Hollaway and Exell 2010; Beccari et al. 2011). Damage caused by FCR pathogens goes unnoticed until scattered white spots are observed near crop maturity (Paulitz et al. 2002). FHB symptoms include necrosis, head bleaching, shrunken kernels; while flowering is the most favorable stage for wheat infection (György et al. 2020). In addition to yield loss, a powerful mycotoxins variety that accumulate in grains during infection, produced by several *Fusarium* species cause FCR and FHB.

This *Fusarium* species complex varies according to time and geography (Xu and Nicholson 2009), including, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum* and *F. graminearum* known for their high pathogenicity and cause more severe symptoms and yield losses. They are the most common species in many countries (Smiley et al. 2005; Dyer et al. 2009). However, other low pathogenicity species including; *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. chlamydosporum* and *F. avenaceum*, are principally isolated from wheat subsoil tissue and are regularly considered secondary colonizers or saprophytes rather than primary pathogens (Fernandez and Jefferson 2004; Smiley et al. 2005; Bencheikh et al. 2020).

Morphological methods are considered as very useful and indispensable for any primary fungi identification, molecular methods have become more than necessary for accurate identification to species level (Abd-Elsalam et al. 2004). The most common sequences used to distinguish *Fusarium* spp. are portions of genomic sequences coding for translation elongation factor -1 α (Divakara et al. 2013), β -tubulin (O'Donnell et al. 1998), calmodulin (O'Donnell et al. 2000), intergeneric region (IGS) (Yli-Mattila and Gagkaeva 2010) and the internal transcribed spacer regions in the ribosomal repeat region (ITS1 and ITS2) (Gaikwad et al. 2013). The use of PCR and DNA sequence analysis of internal transcribed spacer (ITS) regions has become a diagnostic routine for the detection, identification, classification and phylogenetic analysis of many fungi at the species level (Hafizi et al. 2013; Zhao et al. 2014). ITS regions sequences are highly variable in *Fusarium*, and taxon-selective ITS amplification has been used to detect fungal pathogens such as *Fusarium* (White et al. 1990; Abd-Elsalam et al. 2004).

Fusarium include several species that have different characteristics and life lines that can potentially influence their development or toxins production during an epidemic (Picot et al. 2011). The life lines quantification of *Fusarium* spp. and the associated FCR severity variables is an essential step in order to define the links between strain characteristics and their ability to induce FCR.

In the past, only one survey has been conducted to identify associated FCR and FHB species in Algerian wheat (Abdallah-Nekache et al. 2019), whereas other studies have focused on *F. culmorum*, the main species causing wheat FCR and FHB (Laraba et al. 2017; Bouanaka et al. 2021b) and barley (Yekkour et al. 2015). To date, no study has detailed the other species associated with wheat FCR and FHB in Algeria, it is therefore necessary to deepen the information on *Fusarium* spp. pathogenicity as well as the severity variables in order to characterize the strains according to their aggressiveness.

The study's objectives were; (i) To assess the current diversity of *Fusarium* species associated with FCR and FHB in Algeria. (ii) To identify and measure (in vitro) the main strains characteristics, life lines and the severity variables. (iii) To evaluate their FCR pathogenicity and aggressiveness on a sensitive durum wheat. (iv) And to try to highlight links between these life lines, easily and rapidly measurable in vitro, and *Fusarium* spp. in vivo severity measures.

2. Material and methods

2.1. Sampling, isolation, purification and conservation of *Fusarium* spp.

Sampling was carried out in six of the most wheat-producing provinces (Constantine, Mila, Guelma, Oum elbouaghi, Sétif and Bordj Bou Arreridj), located in north-eastern Algeria (**Fig.1**) (**Table 1**). Plants symptomatic of FCR, or those suspected of being FHB symptomatic, were collected from different fields in several provinces of the regions surveyed. The samples were kept in sterile plastic bags and stored at 4°C until further use. The infected wheat crowns were cut into fragments of about 10mm, while seeds were peeled from their glumes. The samples were disinfected in 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 minutes, then rinsed in 3 successive baths of sterile distilled water. Placed to dry on sterilized filter paper for 20 to 30 min under aseptic condition, then deposited on potato sucrose agar (PSA) medium in sterile Petri dishes (5 fragments per dish), and incubated at 28°C for 7 days. The fungal colonies suspected to be *Fusarium* genus were transplanted on the same medium. All isolates were purified by the single-spore technique Noman et al. (2018) and stored in Eppendorf tubes in 20% glycerol at -80°C.

2.2. Molecular identification and Phylogenetic analysis

The identification was carried out on the basis of macroscopic data and microscopic characteristics on three culture media; Carnation Leaf-Piece Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) and PSA. These media were prepared according to Leslie and Summerell (2006).

To confirm the isolated *Fusarium* spp. identity, molecular identification was performed by the BIOfidal laboratory (CEDEX-France) as follows:

2.2.1. DNA extraction

The DNA Extraction was carried out using a commercial kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany). DNA was extracted from mycelium collected by scraping the surface of Petri dishes cultures of purified isolate. 100µl lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA, 3% SDS and 1% 2-mercaptoethanol) was added and the nucleic acids were isolated

according to the microwave mini-prep procedure described by Goodwin and Lee (1993). The final DNA pellet was supplemented into 100 µl TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA) and stored at -20 °C until used.

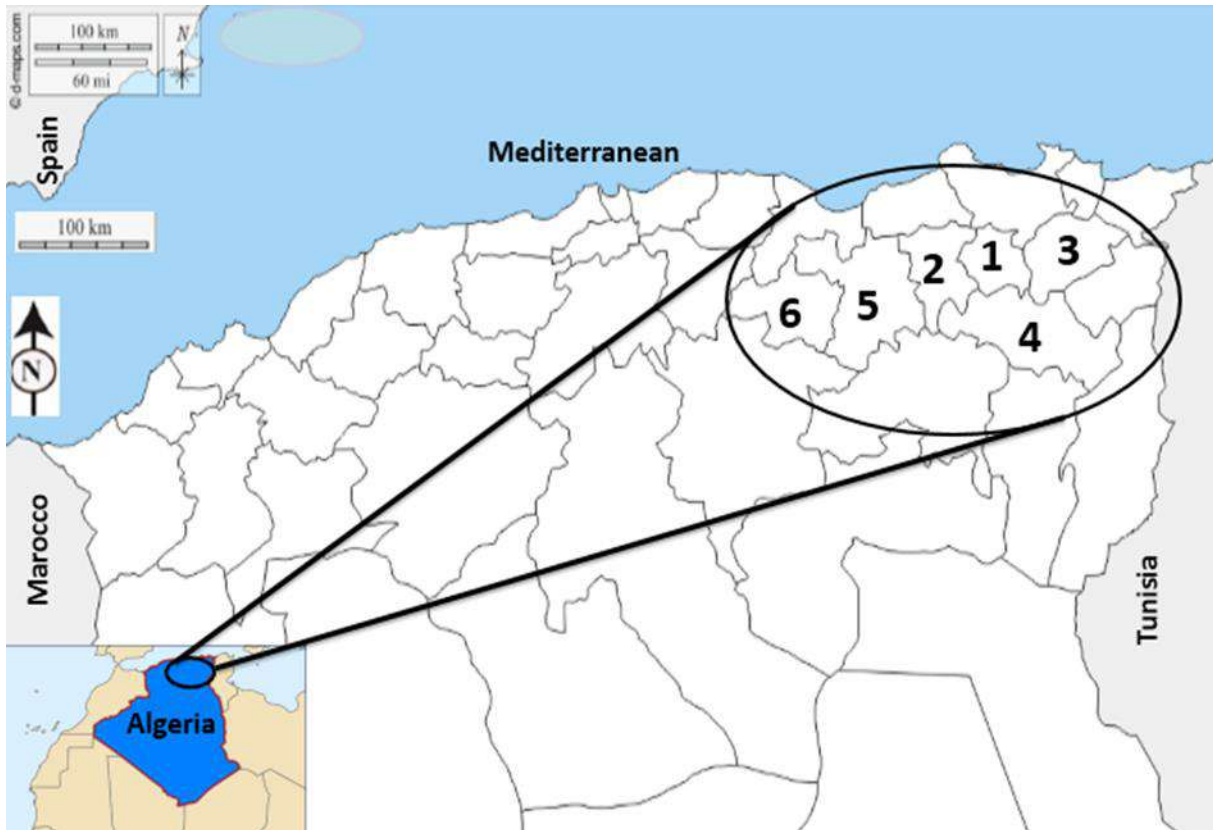


Fig.1 Map of Northern Algeria showing the sampling provinces (1; Constantine, 2; Mila, 3; Guelma, 4; Oum El Bouaghi, 5; Sétif, and 6; Bordj Bou Arreridj).

2.2.2. PCR amplifications and gel electrophoresis

Internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA were amplified using a fungal-specific primers pair ITS-1 (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A '3) and ITS-4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC '3) (Gardes and Bruns 1993). All amplification reactions were carried out in a 25 µl reaction volume containing 75mM Tris-HCl pH 9.0, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (w/v) Tween 20, 1.5 µl MgCl₂ 0.2 µl dNTP, 1 µl of each relevant oligonucleotide primer, 0.2 µl Taq polymerase Promega, 2 µl genomic DNA. The amplification products were revealed after 1.5% agarose gel electrophoresis of a 10 µl deposit of PCR products. Migration is followed by staining in an ethidium bromide bath (0.5 µg/ml). Afterwards, the DNA was visualized and photographed under UV using the Gel doc system of biorad (USA).

PCR temperature condition was as follows: Initial denaturation 95°C for 5 min, followed by 35 cycles, denaturation 95°C for 30s, hybridization 55°C for 30s, elongation 72°C for 45s, final elongation 72°C for 7min, storage before revelation 10°C until use.

Table 1 Summary table of regions, provinces, locations, and sampling period.

Isolate code	Region	Province	Wheat	Location Coordinates latitude and longitude	Year
FC1	Carrefour Djbel aougueb	Mila	Durum	36°14'56"N 6°21'08"E	2019
FC2	Oued Athmania	Constantine	Durum	36°26'03"N 6°29'12"E	2019
FC3	Messaoud	Boudjriou	Durum	36°19'43"N 7°09'31"E	2019
FC4	Oued Zenati	Guelma	Durum	36°16'52"N 7°07'00"E	2019
FC5	Bekkouche Ahmed	Guelma	Durum	36°07'28"N 6°36'07"E	2019
FC6	Ain Mlila	Oum El Bouaghi	Bread	36°13'35"N 6°36'22"E	2019
FC7	Guettar El Aich	Constantine	Bread	35°49'28"N 7°01'36"E	2019
FC8	Ain Fakroun	Oum El Bouaghi	Durum	36°03'14"N 6°49'06"E	2019
FC9	Sigus	Oum El Bouaghi	Bread	36°11'37"N 6°41'55"E	2019
FC10	El khroub	Constantine	Durum	36°13'59"N 6°26'12"E	2019
FC11	Oued Arama	Mila	Durum	36°12'37"N 6°24'15"E	2019
FC12	Bordj Lagar	Mila	Durum	36°14'21"N 6°25'05"E	2019
FC13	Oued Seguin	Mila	Durum	36°10'10"N 6°24'53"E	2019
FC14	Oued Seguen	Mila	Durum	36°14'23"N 6°19'14"E	2019
FC15	Zegrou Elarbi	Constantine	Durum	36°21'30"N 6°41'38"E	2019
FC16	Hamma Bouziane	Mila	Durum	36°26'23"N 6°33'17"E	2019
FC17 (INRAA)	Oued Athmania	Constantine	Bread	NI	2019
FC18 (INRAA)	El Mridj	Constantine	Bread	NI	2019
FC19 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2019
FC20 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2019
FC21 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2016
FC22 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2017
FC23 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2017
FE1 (INRAA)	Constantine/Nord	Constantine	Durum	NI	2016
FE2 (INRAA)	Constantine/Sud	Constantine	Bread	NI	2016
FE3 (INRAA)	Constantine/Sud	Constantine	Bread	NI	2016
FE4 (INRAA)	Constantine/Nord	Constantine	Durum	NI	2016
FE5 (INRAA)	Constantine/Sud	Constantine	Durum	NI	2017
FE6 (INRAA)	Constantine/ Nord	Constantine	Bread	NI	2017
FE7 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2017
FE8 (INRAA)	Constantine	Constantine	Durum	NI	2017
FE9 (INRAA)	Constantine	Constantine	Bread	NI	2017
FE10	El Mridj	Constantine	Durum	36°21'10"N 6°45'44"E	2019
FE11	Ain Smara	Constantine	Bread	36°15'31"N 6°28'21"E	2019

NI: Not located, FC: isolated from wheat crown, FE: isolated from wheat grain, INRAA: Isolate offered by National Institute of Agronomic Research of Algeria

2.2.3. PCR product Purification

PCR products were purified by the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit from Macherey-Nagel (Germany) following the protocol described by the supplier. DNA binds in the presence of a chaotropic salt to a silica membrane. The binding mixture was loaded directly onto NucleoSpin® Extract II columns. Contaminations were removed by a washing step with ethanolic NT3 buffer. Finally, the pure DNA was eluted under low ionic strength conditions with a slightly alkaline NE buffer (5mM Tris-Cl, pH 8.5).

2.2.4. DNA sequencing, alignment and phylogenetic analysis

The amplified and purified PCR products were sequenced using Sanger technique (Sanger et al. 1977) using the Applied Biosystems BigDye v3.1 kit and PCR primers used for the interest fragments amplification. The obtained sequences are analyzed and cleaned by the use of software SnapGene® Viewer 5.2. The final sequences are then compared with those in the GeneBank database by using the program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) of NCBI for the identification of the studied *Fusarium* spp. isolates based on % homology with the reference strains. The ITS region sequences of the resulting isolates were used for multiple sequence alignment in MEGA format using the Clustal W option of the MEGA-X software. The phylogenetic tree and distance matrix were also constructed using MEGA software, which implemented the Neighbour-Joining (NJ) dendrogram from Saitou and Nei (1987). The phylogenetic distance was based on the Kimura 2-parameter (K2P) model (Kimura 1980).

2.3. Strains characterization and their life lines measurement

2.3.1. Growth rate

From the mother strains in conservation, transplantation was carried out on PSA medium on Petri dishes (9cm diameter). After 6 days of growth, a second transplantation of 6mm diameter of the culture was performed on the same medium. The resulting Petri dishes were incubated at 28°C in the dark for 5 days. Then the radial growth diameters were measured to determine the each strain growth rate (mm per day). Three replicates were made for each strain.

2.3.2. Sporulation rate

The conserved *Fusarium* strains were previously transplanted on a Petri dish containing PSA medium and incubated for 30 days at 28°C. After microscopic confirmation that all isolates have been sporulated, an 18mm mycelium plug from the center of each dish was removed and

transferred to a 50ml Erlenmeyer flask containing 10ml of sterile distilled water. After 20 minutes of rotary agitation at a speed of 200 rpm, the suspensions obtained were filtered separately using fine cheesecloth. Then the absorbencies were measured by a spectrophotometer at 530nm. The sporal concentration was determined by the following linear formula (Concentration = $20090760 \times \text{Abs} - 100439$) (Caligiore-Gei and Valdez 2015). Spore concentrations were also confirmed by counting at the Malassez cell. Three counts were made for the same sporal suspension as well as 2 repetitions for each strain.

2.4. FCR pathogenicity tests

FCR pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium* isolates were evaluated by two methods in vitro and in vivo. The cultivar of Italian origin Simeto, known for its sensitivity to wheat *Fusarium*, was chosen as the plant material for both tests (Purahong et al. 2014).

2.4.1. In vitro test in growth chamber

This test was performed according to Bouanaka et al. (2021a). The bottoms of 105 essay tubes (14 cm \times 3 cm) were filled with 4cm of cotton. Twenty milliliters of distilled water were added to each tube and then covered with aluminum foil. Afterwards the tubes were sterilized by autoclaving at 180°C for 2 hours twice with an interval of 24 hours. The wheat (Simeto) seeds were surface disinfected with 2% NaClO for five minutes and rinsed three times in succession with sterile distilled water. After drying, the seeds were carefully placed on moist cotton in each essay tube (5 seeds/ tube).

An 8mm disc of 7-days old fungal isolate was placed adjacent to the seeds (3 discs in 3 tubes for each isolate). The tubes were closed with transparent caps and incubated at 28°C for 4 days, then transferred to the growth chamber (25/19°C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle). The tubes were arranged according to a complete randomization design. After two weeks, the disease severity (DSt) and the coleoptiles length percentage (%CL) were measured on a scale of 0 to 4 (**Fig. 4a**), FCR disease severity classes were determined in the laboratory based on symptoms including brown and necrotic discoloration of crown tissue in which: Class 0 = healthy crown; 1 = light browning of the crown; 2 = half crown browning; 3 = complete browning of the crown; and 4 = death of the seedlings (**Fig. 4a**).

The DSt of each treatment was calculated using McKinney's (1923) index, which expresses the percentage of maximum disease severity (i.e., 100) according to the formulas: $DSt = \{\sum (c \times f) / n \times N\} \times 100$.

Where c = disease class, f = frequency, n = number of observations, and N = the highest value of the empirical scale adopted (class 4).

$\%CL = (CL_t \times 100)/CL_c$. Where $\%CL$ = the percentage of coleoptiles length, CL_t = the average coleoptiles length, CL_c = the average coleoptiles length of the control.

2.4.2. In vivo test in greenhouse

This test was performed according to Bouanaka et al. (2021b). Only selected *Fusarium* spp. isolates among those that showed significant pathogenicity in in-vitro test were studied for this in vivo test. Five seeds of durum wheat (Simeto) were surface-sterilized with 2% NaClO for 8min and then rinsed six times with sterile distilled water. They were sown in a pot of (8 x 12cm height) containing a mixture of soil and compost (1/2). This mixture was previously sterilized at 180° for 2h (2 repetitions with 24h interval). For each isolate, two replicates and two non-inoculated controls (5 pots/ isolate) were used. The pots were placed in growth chamber (25/19°C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle). After 3 weeks, when the seedlings have reached the two-leaf stage (Zadoks' GS 12: Zadoks et al. 1974), the soil around the stems was removed and a PSA disc (13mm diameter) of a 7-days-old culture of the tested isolate was placed around the stems, 2cm below the soil to allow the mycelium to reach the stems base. The soil was then put back in the place around the seedlings. The pots were organized according to a completely random plan. They were watered every 3 days throughout the test. Three weeks after inoculation (Zadoks' GS 20), each plant was carefully removed from the soil and washed with tap water.

Severity classes were assigned to the laboratory on a scale of 0 to 4 (**Fig. 4b**). As well as the disease severity (DSp) of each treatment were calculated using the McKinney's (1923) index as described above (in vitro test). The DSp value ranged from 0% (non-pathogenic, absence of infected crown) to 100% (highly pathogenic, all seedlings dead). Koch's postulates were satisfied by re-isolation of *Fusarium* sp. from small or large brown spots on the crowns for both tests.

2.5. Statistical analysis

Data analyses, graphs, tables, and descriptive statistics (mean standard deviation and variance), were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics version 25). Correlations between the different parameters were determined by Pearson correlation, the correlation coefficients were considered significant at the 5% level ($P \leq 0.05$) and highly significant at the 1% level ($P \leq 0.01$). The means for the different treatments were compared using Tukey's honestly significant difference test.

3. Results

3.1. *Fusarium* spp. isolation

Out of 117 samples collected (crown + grain), sixty-three samples from wheat crown showing FCR symptoms and fifty-four samples from wheat grains suspected of being affected by FHB. A total of 34 *Fusarium* spp. isolates were the subject of this study (**Table 1**).

Among the 34 isolates obtained, a high diversity of *Fusarium* spp. was observed, 23 isolates from wheat crown and 11 from wheat grain. The majority of isolates were obtained in the 2019 crop year. And few others were obtained exclusively from wheat grain from the previous seasons 2016 and 2017 (**Table 1**).

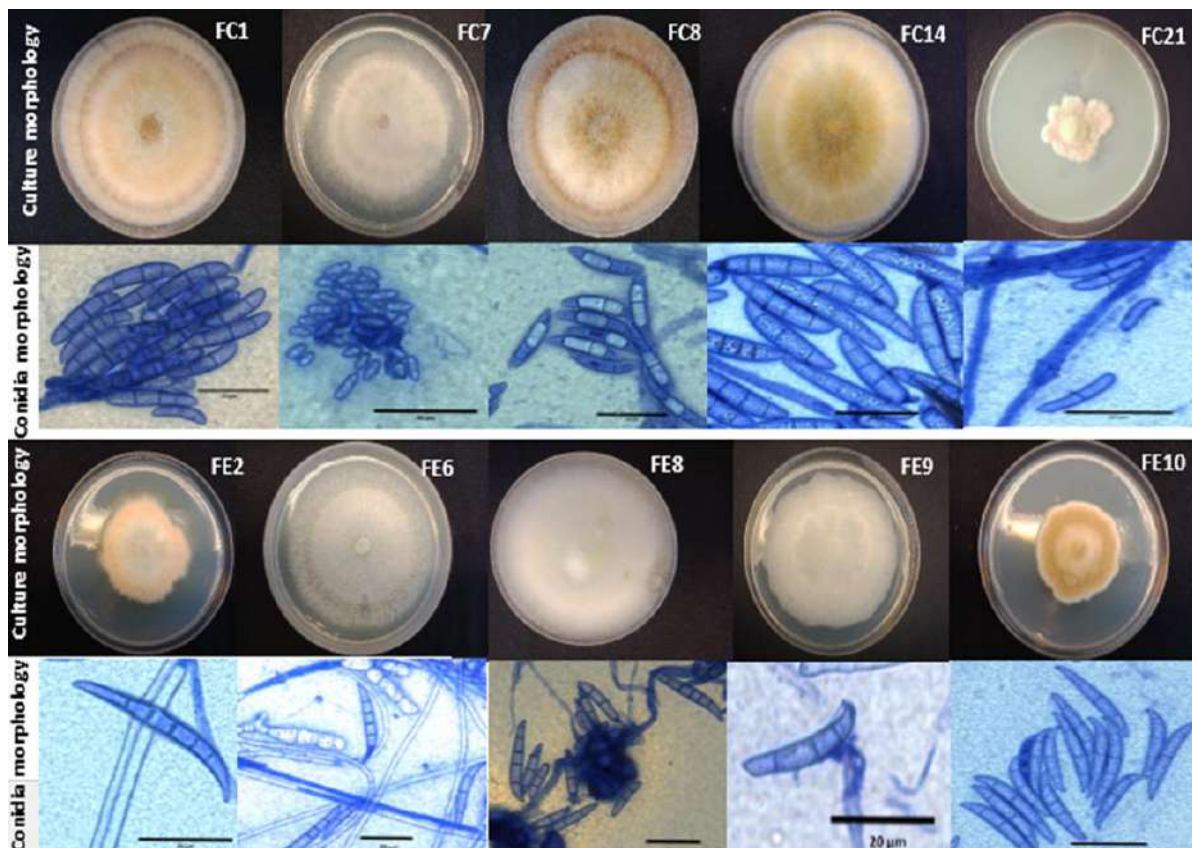


Fig.2 Photos illustrate culture morphology (10 days on PSA medium), and conidia morphology of 10 *Fusarium* isolates representing the ten species isolated (FC1; *F. culmorum*, FC7; *F. oxysporum*, FC8; *F. graminearum*, FC14; *F. cerealis* FC21; *F. acuminatum*, FE2; *F. equiseti*, FE6; *F. asiaticum*, FE8; *F. incarnatum*, FE9; *F. fujikuroi*, FE10; *F. brachygibbosum*). Scale bar 20μm.

3.2. Molecular identification and Phylogenetic analysis

Identification was performed on the basis of macroscopic data and microscopic characteristics (Leslie and Summerell 2006; Hoshino et al. 2009) and confirmed by molecular analysis. In the total of 34 isolates, ten *Fusarium* species were identified: *F. culmorum* (19), *F. cerealis* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (2), *F. acuminatum* (2), *F. oxysporum* (1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. brachygibbosum* (1) and *F. fujikuroi* (1) (**Table 2**). *F. culmorum* is the predominant species for wheat crown and a remarkable variety of species for wheat grain.

The sequence of each isolate was compared to the reference sequence collected from GenBank. Phylogenetic analysis of the ITS region showed that the strains are form several groups (**Fig. 3**). The phylogenetic analysis groups isolates into 6 distinct clades; the first group includes (FC6, FC16, FC2, FC20, FC11, FC17 and FC4), the second clade includes strains (FC12, FE9, FE1, FC14, FC9 and FE3), the third clade includes strains (FC8, FE7, FC3, FC22, FC5, FC18, FE6 and FC13), this clade is divided into two sub-clades, the fourth clade (FE2, FC1, FE8, FC15 and FE4), the fifth clade groups FC23 and FC7, the sixth clade groups the rest of the strains (**Fig. 3**). The out-group fungi other than *Fusarium*, *Aspergillus* and *Trichoderma* appeared side by side quite distinct. Moreover the sequence of *Rhizopus* seems far and incomparable with any other strains in this dendrogram (**Fig. 3**).

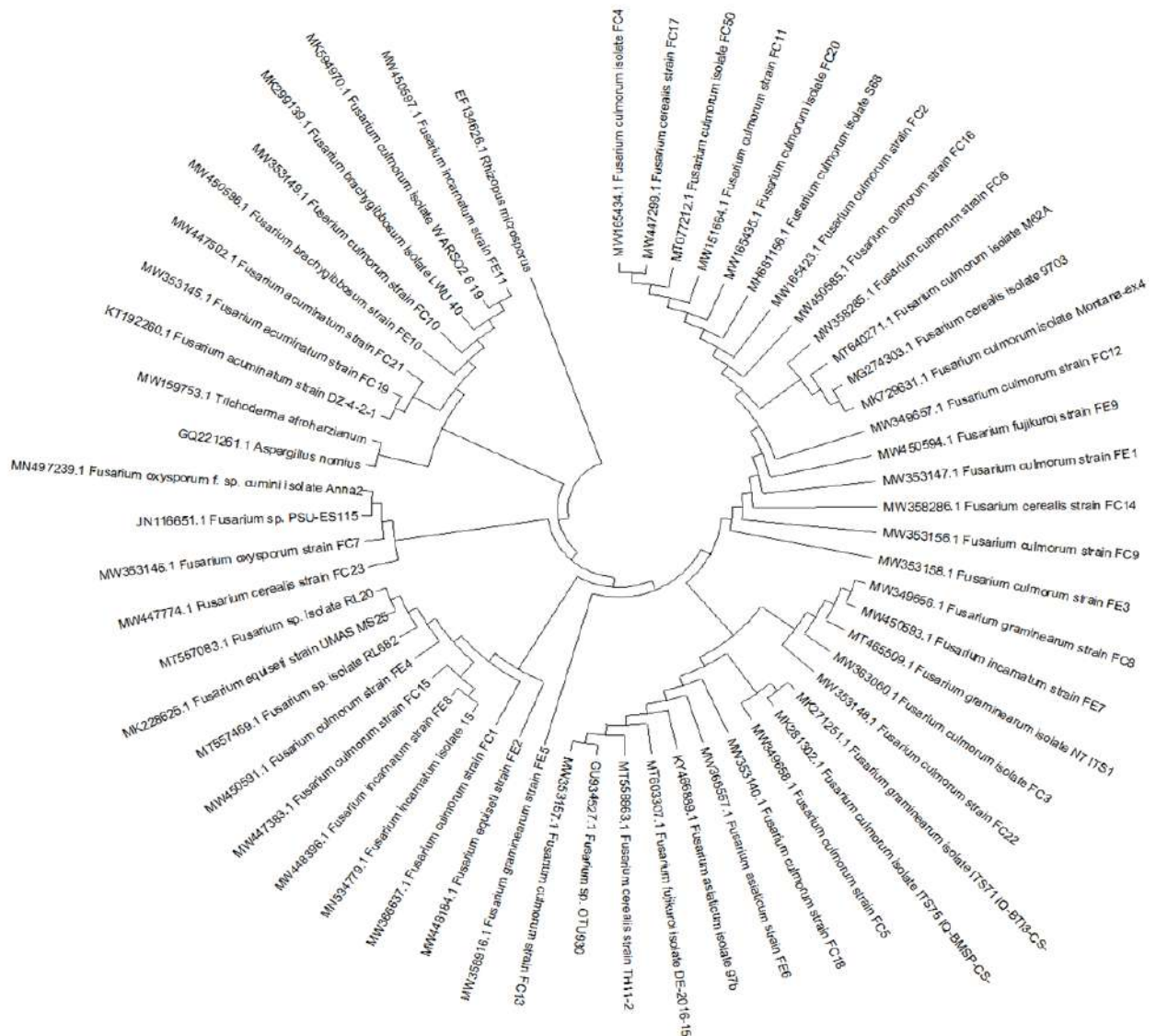


Fig. 3 Phylogenetic relationships of 34 *Fusarium* isolates inferred from ITS sequences analysis by MEGA software, with 21 type strains from the GeneBank database. In addition to out-group *Fusarium* fungi (*Trichoderma*, *Aspergillus* and *Rhizopus*).

3.3. Growth and sporulation rates

A huge variety between isolates for both life lines was noted. Also a great diversity for growth rates was noticed. *F. culmorum* strains (FC20, FC5, FC11 and FC10) recorded the fastest growth rates. While isolates FC21, FE10, FE2, FC7, FE9 and FE6 ranked in ascending order recorded low growth rates below 10mm/d (**Table 2**). The latter isolates belong to the single species isolated *F. acuminatum*, *F. brachygibbosum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. asiaticum*.

The highest sporulation rates were recorded by isolates FC20, FE3, FE4, FC10, FC7, FC14 and FC8 with values > 4000000 sp/ml. The isolates with the lowest rates were FC19 < FE7 < FC6 < FC2 < FC23 < FC13 < FE6 with values below 740000 sp/ml (**Table 2**).

3.4. FCR pathogenicity tests in vitro and in vivo

Pathogenicity test was performed on the susceptible variety Simeto to determine the isolates impact on wheat basal part (coleoptile). The in vitro test showed that all isolates were pathogenic and caused FCR symptoms. None of the strains had a zero DSt, their DSt values varied between 88.33% for FC20 and 5% for FE7 (**Table 2**). It was also clearly noticed that the DSt value is in tight significant relation with the species.

It was also clearly noticed that the DSt value is in tight significant relation with the species. *F. culmorum* with its 19 strains caused FCR with a wide range of DSt but also the highest among all other species. *F. culmorum* strains FC20, FC11 and FC2 recorded the highest aggressiveness with DSt = 88.33, 85 and 83.33%, respectively. While FC6, FC13 and FC9 recorded the lowest rates with DSt= 36.66, 56.66 and 60%), respectively (**Table 2**).

The 17 *Fusarium* spp. tested for their FCR aggressiveness in greenhouse were only those that showed the most severe pathogenicity in the tube test with a DSt > 60%. It was *F. culmorum* with 16 strains and one strain of *F. graminearum* (**Table 2**). The results of the pot test aggressiveness revealed significant differences in DSp values among *F. culmorum* strains; FC20, FC22, FC11, FC18 and FC5 recorded DSp = 71.66, 65, 61.66, 60 and 60%, respectively. FC1 and FC2 with the same value 68.33%. While the others were less aggressive such as FE1 and FC4 with a DSp of 40% and 48.33%, respectively (**Table 2**).

F. culmorum strain FC12 severely influenced coleoptile development with only a %CL=23.69, followed by the rest of the same species strains. The strains FE11 (*F. incarnatum*) and FC21 (*F. acuminatum*) did not influence at all on the %CL with values higher than the control 105.59 and 100.59 % (**Table 2**).

Table 2 Molecular identification of *Fusarium* isolates with their life lines (sporulation rate and growth rate) and pathogenicity in vitro and in vivo on FCR

Isolate code	<i>Fusarium</i> species	GenBank accession number	Sporulation Rate (sp/ml)		Growth Rate (mm/d)		Disease Severity Tube test (DSt)	the average coleoptiles length (CLt) mm ± Std. Deviation	the coleoptile length (%CL)	Disease Severity Pot test (DSp)
			Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation				
FC1	<i>F. culmorum</i>	MW366637	776420,33 ^{ab}	449168,89	13,40 ^{fg hij}	0,87	75,00	66,73±34,80 ^{abc defg}	59,58	68,33
FC2	<i>F. culmorum</i>	MW165423	555532,00 ^a	407759,70	13,46 ^{fg hij}	0,46	83,33	46,53±40,84 ^{abc de}	41,54	68,33
FC3	<i>F. culmorum</i>	MW363060	2469897,67 ^{abc def}	371900,84	14,60 ^{hij}	1,03	76,66	58,73±50,02 ^{abc defg}	52,44	56,66
FC4	<i>F. culmorum</i>	MW165434	977228,00 ^{abc}	771826,13	14,66 ^{hij}	1,10	81,66	43,60±40,80 ^{abc}	38,92	48,33
FC5	<i>F. culmorum</i>	MW349658	3721598,67 ^{bc def}	1628193,45	15,73 ^{ij}	1,33	81,66	60,20±48,40 ^{abc defg}	53,75	60,00
FC6	<i>F. culmorum</i>	MW358285	475209,33 ^a	220279,00	14,00 ^{ghij}	1,74	36,66	41,33±59,39 ^{ab}	36,90	NA
FC7	<i>F. oxysporum</i>	MW353146	4558296,67 ^{defg}	387303,58	8,93 ^{cd}	0,41	6,66	66,60±51,84 ^{abc defg}	59,46	NA
FC8	<i>F. graminearum</i>	MW349656	4404344,00 ^{defg}	573035,18	13,80 ^{ghij}	0,20	78,33	37,13±28,47 ^{ab}	33,15	58,33
FC9	<i>F. culmorum</i>	MW353156	2771109,33 ^{abc def}	362011,21	13,60 ^{fg hij}	0,52	60,00	43,67±45,79 ^{abc}	38,98	55,00
FC10	<i>F. culmorum</i>	MW353149	4765798,00 ^{efg}	801806,47	15,00 ^{hij}	0,87	76,66	44,20±37,42 ^{abc}	39,46	56,66
FC11	<i>F. culmorum</i>	MW151664	3761760,00 ^{cdef}	1164742,20	15,33 ^{ij}	0,70	85,00	30,80±32,27 ^a	27,50	61,66
FC12	<i>F. culmorum</i>	MW349657	916985,67 ^{abc}	258982,17	14,80 ^{hij}	0,20	70,00	26,53±37,70 ^a	23,69	56,66
FC13	<i>F. culmorum</i>	MW353157	676016,67 ^a	548588,23	14,66 ^{hij}	0,11	56,66	39,93±46,07 ^{ab}	35,65	NA
FC14	<i>F. cerealis</i>	MW358286	4437812,33 ^{defg}	654707,01	13,40 ^{fg hij}	0,72	25,00	65,86±55,76 ^{abc defg}	58,80	NA
FC15	<i>F. culmorum</i>	MW447383	883518,00 ^{abc}	456147,35	14,80 ^{hij}	0,52	63,33	52,33±46,56 ^{abc def}	46,72	50,00
FC16	<i>F. culmorum</i>	MW450585	896905,00 ^{abc}	206092,87	14,73 ^{hij}	1,50	66,66	59,27±54,47 ^{abc defg}	52,91	51,66
FC17	<i>F. cerealis</i>	MW447299	214159,00 ^a	101070,62	12,26 ^{efgh}	0,70	56,66	69,20±42,51 ^{abc defg}	61,78	NA
FC18	<i>F. culmorum</i>	MW353140	3768453,33 ^{cdef}	707496,50	14,00 ^{ghij}	1,21	76,66	50,40±47,68 ^{abc def}	45,00	60,00
FC19	<i>F. acuminatum</i>	MW353145	200772,00 ^a	60242,00	10,66 ^{def}	0,57	8,33	110,13±44,76 ^{defg}	98,33	NA
FC20	<i>F. culmorum</i>	MW165435	6767180,33 ^g	4052086,57	15,80 ^j	0,20	88,33	50,00±36,60 ^{abc def}	44,64	71,66
FC21	<i>F. acuminatum</i>	MW447502	2443123,33 ^{abc def}	655732,68	3,20 ^a	0,52	13,33	112,67±32,14 ^{fg}	100,59	NA
FC22	<i>F. culmorum</i>	MW353148	2777803,00 ^{abc def}	815519,40	13,66 ^{ghij}	0,83	75,00	45,40±38,30 ^{abcd}	40,53	65,00
FC23	<i>F. cerealis</i>	MW447774	649242,33 ^a	239570,21	12,80 ^{fg hi}	1,74	60,00	40,93±41,37 ^{ab}	36,54	NA
FE1	<i>F. culmorum</i>	MW353147	1144567,33 ^{abc}	278970,96	13,00 ^{fg hij}	0,34	65,00	41,27±49,07 ^{ab}	36,84	40,00

FE2	<i>F. equiseti</i>	MW448184	1104406,33 ^{abc}	313671,47	6,93 ^{bc}	0,50	10,00	110,93±39,10 ^{efg}	99,04	NA
FE3	<i>F. culmorum</i>	MW353158	5247736,00 ^{fg}	425661,64	12,13 ^{efgh}	1,13	61,66	52,80±55,01 ^{abcdef}	47,14	NA
FE4	<i>F. culmorum</i>	MW450591	4866201,67 ^{efg}	645505,90	14,40 ^{hij}	2,11	73,33	54,20±44,38 ^{abcdefg}	48,39	56,66
FE5	<i>F. graminearum</i>	MW358916	3801921,67 ^{cdef}	162310,81	14,13 ^{hij}	0,11	65,00	53,20±56,38 ^{abcdef}	47,50	NA
FE6	<i>F. asiaticum</i>	MW366557	736259,00 ^a	209007,59	9,60 ^{cde}	0,34	11,66	98,07±54,48 ^{bcdefg}	87,55	NA
FE7	<i>F. incarnatum</i>	MW450593	388192,33 ^a	258202,32	12,93 ^{fghij}	0,30	5,00	82,00±67,51 ^{bcdefg}	73,21	NA
FE8	<i>F. incarnatum</i>	MW448396	1713522,33 ^{abcd}	960173,70	14,33 ^{hij}	0,98	41,66	86,00±61,36 ^{bcdefg}	76,78	NA
FE9	<i>F. fujikuroi</i>	MW450594	1258358,33 ^{abc}	421855,34	9,06 ^{cd}	1,00	10,00	96,40±41,80 ^{bcdefg}	86,07	NA
FE10	<i>F. brachygibbosum</i>	MW450596	950453,67 ^{abc}	543418,61	4,93 ^{ab}	0,30	20,00	106,67±51,36 ^{cdefg}	95,23	NA
FE11	<i>F. incarnatum</i>	MW450597	2068282,67 ^{abcde}	348388,17	11,06 ^{defg}	1,00	30,00	118,27±35,92 ^g	105,59	NA
Control								112,00±33,47 ^{fg}	100	

For each column, the values (mean±SD) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (P < 0.05). NA : not available.

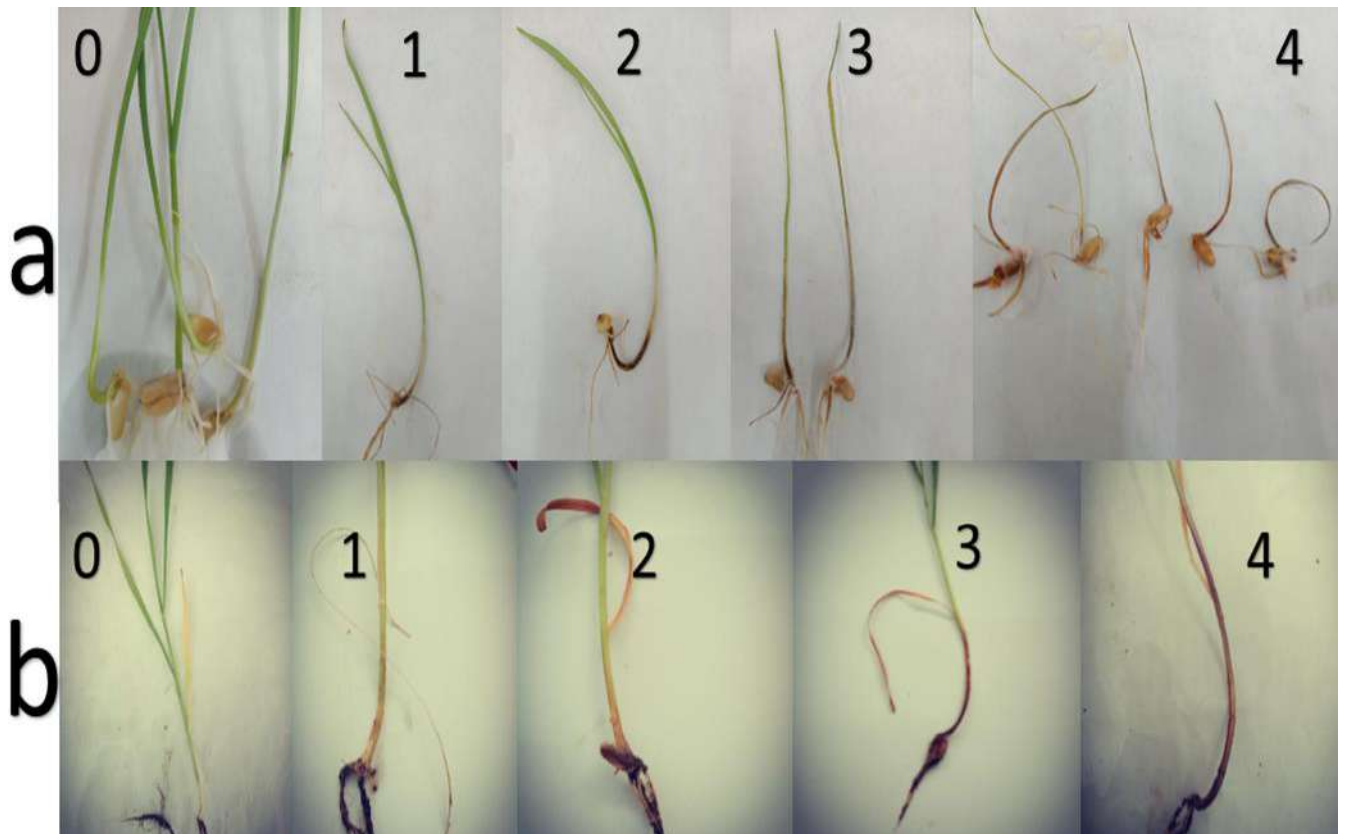


Fig. 4 Photos illustrate FCR disease severity classes for the two tests, a: in vitro and b: in vivo. Class 0 = healthy crown (control). 1 = light browning of the crown; 2 = browning of half of the crown; 3 = complete browning of the crown; and 4 = death of the seedlings.

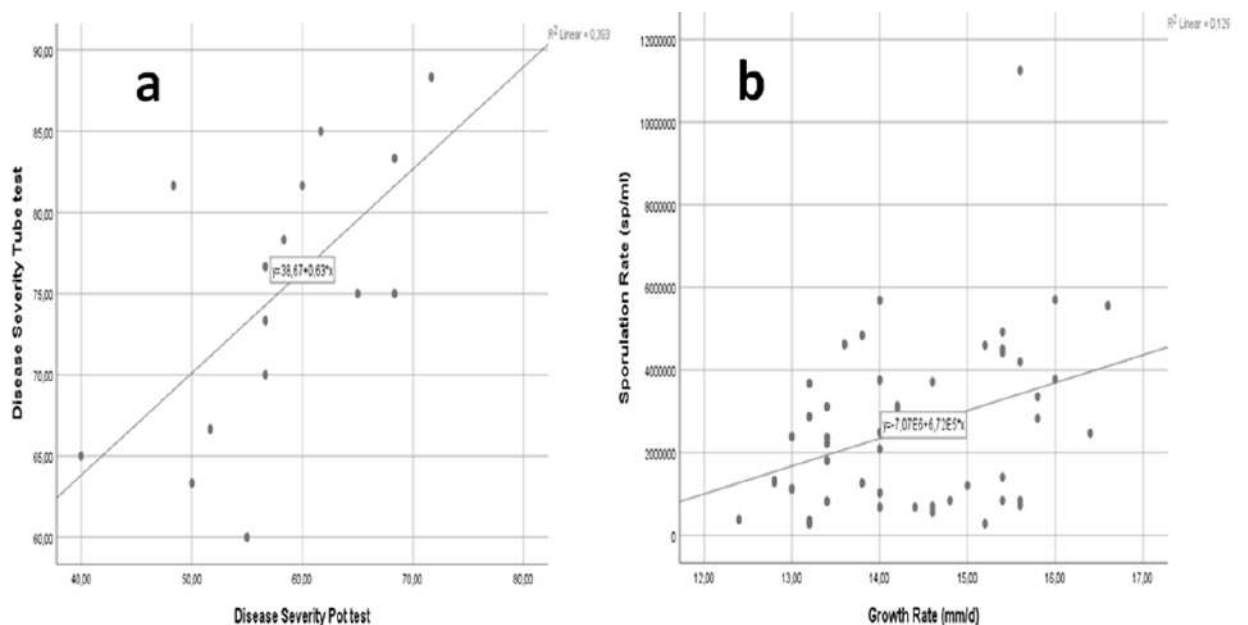


Fig. 5 Simple Scatter with fit line of Correlations between; (a) DSt by DSp test ($r = 0.627$, $P = 0.007 < 0.01$), (b) Sporulation rate (mm/d) by Growth Rate (sp/ml) $r = 0.355$, $P = 0.012 < 0.05$ determinate by Pearson correlation coefficient.

3.5. Correlation between the different parameters

After measuring the 34 strains life lines and pathogenicity (**Table 2**), the correlation study was more than necessary to figure out the links between the different standards and parameters. Results showed a strong correlation between the tube test and the pot test ($r = 0.62$ $P = 0.007 < 0.01$) (**Fig. 5.a**). Moreover another correlation between growth rate and sporulation rate ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$) (**Fig. 5.b**) (**Table 3**). While for the rest of parameters, there was no significant correlation between disease severity in both tests with the reduction in coleoptiles length ($r = -0.03$, $p = 0.90$ for DSt, and $r = 0.17$, $p = 0.50$ for DSp) (**Table 3**). No correlation between the two tests *in vitro* and *in vivo* with growth rate or sporulation rate (**Table 3**).

Table 3 The different correlations between the different parameters measured

different parameters compared	Pearson Correlation (r)	P-value	P > F
DSt X DSp	0,627**	0,007	<0.01
DSt X Sporulation Rate	0,315	0,218	>0.05
DSt X Growth Rate	0,314	0,219	>0.05
DSt X Coleoptile length	-0,030	0,908	>0.05
DSp X Sporulation Rate	0,236	0,362	>0.05
DSp X Growth Rate	0,043	0,871	>0.05
DSp X Coleoptile length	0,173	0,508	>0.05
Sporulation Rate X Growth Rate	0,355*	0,012	<0.05
Sporulation Rate X Coleoptile length	0,078	0,766	>0.05
Growth Rate X Coleoptile length	0,276	0,284	>0.05

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

4. Discussion

This study was conducted to isolate and identify *Fusarium* spp. causing wheat FCR and FHB in the north-eastern region of Algeria (**Fig.1**) (**Table 1**) and to characterize their life lines and their FCR aggressiveness (in vitro and in vivo). We also attempted to study pathogen diversity and compare our results with those published on FCR species.

Such a study has never been performed in Algeria, with the exception of Abdallah-Nekache et al. (2019), where molecular identification of fungal species was based on conventional PCR by testing isolates with species-specific primers. Whereas in our study, molecular identification was done with ITS1-2 internal transcribed spacer sequencing of the rDNA region (contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2 sequences). ITS sequencing has been used recently by many scientists in their

searches for *Fusarium* spp. identification (AL-Taae et al. 2019; Dehghanpour et al. 2019; Irom et al. 2016).

Thirty-four isolates of *Fusarium* spp. were obtained (**Table 2**), the results after identification showed a diversity of species and the presence of new species never reported in Algeria. Five *Fusarium* species of the crown have been distinguished; *F. culmorum* (16), *F. oxysporum* (1), *F. graminearum* (1), *F. cerealis* (3) and *F. acuminatum* (2) and seven species from grains distributed as follows; *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1), *F. brachygibbosum* (1), and *F. equiseti* (1) (**Table 2**). This high species diversity isolated from wheat grains appears to be quantitatively similar to that obtained by Nielsen et al. (2011), where they found up to seven different species of *Fusarium* in the grain samples, confirming the existence of a complex of diverse *Fusarium* species at the origin of FHB epidemics. Thus; Audenaert et al. (2009) recorded up to nine *Fusarium* spp. in a sample of cereals and found clear associations and direct synergy between some species, although FHB species frequently compete in the same host.

Phylogenetic analysis of the ITS region groups our isolates into 6 distinct clades, the first clade includes all *F. culmorum* species except FC17 (*F. cerealis*), the second clade include the single strain *F. fujikuroi*, the third clade was classified into two subclades where *F. graminearum* and *F. incarnatum* (FC8 and FE7) are side by side in the first subclade, the single strain of *F. asiaticum* appeared in the second subclade with only strains of *F. culmorum* (**Fig. 3**). The fourth clade includes the unique strain of *F. equiseti* (FE2), the fifth clade encompasses only two strains that are close in sequence to strains FC23 and FC7, although they belong to two morphologically different species *F. cerealis* and *F. oxysporum*, respectively (**Fig. 3**).

The sixth clade includes the two *F. acuminatum* strains (FC19 and FC21) side by side, as well as the single strain of *F. brachygibbosum* (FE10). The out-group *Fusarium* strains used in the dendrogram are quite distinct from the other strains. *Trichoderma afroharzianum* and *Aspergillus nomius* appeared side by side between the fifth and sixth clades, while *Rhizopus microsporus* alone is far from comparable with the other sequences (**Fig. 3**).

Although *F. culmorum* strains FCR pathogenicity is high overall, there is still potential for low differentiation of aggressiveness due to variation among strains. This illustrates the variability between isolates of the same species, so it is necessary to continue to monitor trends in this pathogenic species in the future. This complex variation between pathogenic isolates associated with FCR has been previously studied using various evaluation standards and inoculation techniques by Yang et al. (2010), and Poole et al. (2012). Most of these

studies showed that *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* were the most pathogenic species, and *F. avenaceum*, *F. equiseti* and *F. poae* were the least pathogenic species. While *F. pseudograminearum* and *F. graminearum* cause greater crown rot, and *F. culmorum* causes the greatest seedling blight.

Pathogenicity results in the tube assay revealed significant differences in aggressiveness among *Fusarium* isolates; FC20, FC11, FC2, FC4 and FC5, caused a DSt > 80%. While others were much less aggressive with a DSt ≤ 10% (**Table 2**).

The single species of *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. asiaticum*, *F. fujikuroi* and *F. brachygibbosum* recorded low to negligible pathogenicity values (**Table 2**). These species have not been competitive against *F. culmorum* strains. Our results seem to be compatible with the works of Eslahi (2012), Shikur Gebremariam et al. (2017) and Dehghanpour et al. (2019), where they found that *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum* and *F. flocciferum* species had medium to low levels of pathogenicity on wheat, that are rather saprophytic.

According to the study of Smiley and Patterson (1996), *F. acuminatum* includes a few isolates capable of causing brown discoloration of the wheat crown and some strains capable of even killing wheat plants in greenhouse. In contrast to our results, the two strains of *F. acuminatum* were without influence on coleoptiles growth and with very low DSt (**Table 2**).

In this study, *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum* were among the non-pathogenic species. However, Demirci and Dane (2003) also reported that *F. oxysporum* is weakly aggressive. Moreover Shikur Gebremariam et al. (2017) in their work reported that *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. brachygibbosum* and *F. acuminatum* were non-pathogenic on winter wheat.

Pathogenicity was also manifested by a large coleoptile length reduction (%CL) (**Table 2**). On the other hand, other isolates did not influence %CL at all, with values even higher than those of the control. This was the case for FE11 and FC21, which represent two strains of *F. incarnatum* and *F. acuminatum*, respectively. Three other isolates recorded almost negligible reduction in coleoptiles length, FE2, FC19 and FE10 represent *F. equiseti*, *F. acuminatum* and *F. brachygibbosum*, respectively (**Table 2**). In contrast to our single strain of *F. equiseti*, Bencheikh et al. (2020) found that *F. equiseti* had little negative effect on certain growth parameters such as length and fresh weight of the root and vegetative system.

F. culmorum was the most common species among the main pathogenic *Fusarium* species identified in this study. This result is consistent with those obtained in other countries such as Turkey (Tunali et al. 2008), Italy (Scherm et al. 2012), Morocco (El Yacoubi et al. 2012),

Tunisia (Rebib et al. 2014), and Iran (Eslahi 2012) where *F. culmorum* was the dominant species as the FCR causative agent. The other species isolated from the crown were *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. acuminatum* and *F. brachygibbosum*. Species isolated from wheat grains *F. equiseti*, *F. brachygibbosum*, *F. asiaticum*, *F. graminearum* and *F. culmorum* (**Table 2**). Nevertheless, our results appear to be slightly different from a survey conducted in five provinces of China, where *F. asiaticum* was considered the dominant species (Zhang et al. 2015).

The two isolates FE10 and FE11 belonging to *F. brachygibbosum* and *F. incarnatum* species, respectively, were characterized by very low aggressiveness (**Table 2**). Overall, *F. cerealis* isolates were more aggressive than those of *F. incarnatum*, resulting in greater DSt and a greater reduction in coleoptiles length, particularly FC23. On the other hand, *F. acuminatum* isolates were less aggressive than *F. incarnatum* isolates, and so was the reduction in %CL, where it is negligible for *F. acuminatum* (**Table 2**). Inoculations in the tube test by the single strains *F. equiseti*, *F. brachygibbosum*, *F. asiaticum* and *F. fujikuroi* had no effect on the coleoptile length. While *F. oxysporum* significantly reduced %CL, and had very low FCR aggressiveness with a DSt = 6.66% (**Table 2**).

The pot test results showed that FC20, FC1 and FC2, recorded the highest aggressiveness, while FE1, FC4 and FC15 recorded the lowest (**Table 2**). *F. graminearum* is the species globally associated with FHB worldwide (Nielson et al. 2013; Beccari et al. 2018). The only strain of *F. graminearum* (FC8) tested in vivo showed no significant pathogenicity difference from those of *F. culmorum*. Our study revealed the presence of this species for the first time in Algeria, which requires vigilant monitoring of the prevalence of this species and its geographical distribution in the future.

A strong correlation was found between the tube test and the pot test (**Fig. 5.a**) (**Table 3**). This result will allow us to predict *F. culmorum* strains aggressiveness towards wheat FCR by a simple in vitro tube test. Furthermore, another correlation between growth rate and sporulation rate was observed ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$) (**Fig. 5.b**) (**Table 3**).

Total lack of correlation between DS in both tests with the reduction in coleoptiles length was noticed ($r = -0.03$, $p = 0.90$ for DSt, and $r = 0.17$, $p = 0.50$ for DSp). This can be explained by the fact that some species did not report FCR symptoms but they did significantly reduce coleoptiles length, the case of *F. oxysporum* and some strains of *F. incarnatum* (FE7) and *F. cerealis* (FC14) (**Table 2**). Any correlation between the two tests in vitro and in vivo with growth rate or sporulation rate was observed, so these two life lines remain far from being parameters for measuring or predicting the *Fusarium* strains pathogenicity (**Table 3**). Such

pathogenicity, phylogeny and genetic diversity will be useful for monitoring trends in pathogen distribution in different regions and for wheat FCR control strategies adoption in Algeria.

5. Conclusion

This study reveals a wide range of *Fusarium* species associated with wheat FCR in Algeria. The main finding was that the different *Fusarium* spp. do not all have the same FCR aggressiveness even between strains of *F. culmorum*. This confirms the need for a vigilant surveillance strategy for infected material. The predominant species isolated was *F. culmorum*, followed by *F. cerealis* and *F. incarnatum*. Here we report the appearance of *F. acuminatum*, *F. asiaticum*, *F. incarnatum* and *F. graminearum* for the first time from wheat in Algeria. These strains collected in this research constitute a characterized fungal source for many studies in the future.

References

- Abdallah-Nekache N, Laraba I, Ducos C, Barreau C, Bouznad Z, Bouregghda 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* [https:// doi. org/10.1007/s10658-019-01673-7](https://doi.org/10.1007/s10658-019-01673-7)
- Abd-Elsalam KA, Aly IN, Abdel-Satar MA, Khalil MS, Verreet JA (2004) PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr J Biotechnol* 2(4):82-85
- AL-Taae W, Al-Taae HH, Kareem A (2019) First molecular identification of *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt of Armenian cucumber in Iraq. *IOP Conference Series: Environ Earth Sci* 388, 012005–. [https:// doi. org/10.1088/1755-1315/388/1/012005](https://doi.org/10.1088/1755-1315/388/1/012005)
- Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B et al. (2009) Fusarium head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur J Plant Pathol* 125: 445–458. [https:// doi. org/10.1007/s10658-009-9494-3](https://doi.org/10.1007/s10658-009-9494-3)
- Beccari G, Colasante V, Tini F, Senatore MT, Prodi A, Sulyok M, Covarelli L (2018) Causal agents of Fusarium head blight of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in Central Italy and their in vitro biosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiol* 70, 17–27
- Beccari G, Covarelli L, Nicholson P (2011) Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60(4), 671–684. [https:// doi. org/10.1111/j.1365-3059.2011.02425.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02425.x)
- Bencheikh A, Rouag N, Mamache W, Belabed I (2020) First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria. *Arch Phytopathol Plant Protection* 1-17. [https:// doi. org/10.1080/03235408.2020.1804303](https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303)

Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD et al. (Eds) (2010) Compendium of wheat diseases and pests (3rd ed.). St Paul: The American Phytopathological Society Press

Bouanaka H, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A et al. (2021a) 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, 68. [https:// doi. org/10.1186/s41938-021-00416-3](https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3)

Bouanaka H, Bellil I, Khelifi D (2021b) Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium Head Blight and Crown Rot in Algeria, Physiol Mol Plant Pathol 115, 101683. [https:// doi. org/10.1016/j.pmpp.2021.101683](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101683)

Caligiore-Gei PF, Valdez JG (2015) Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. Revista Argentina de Microbiología 47(2), 152–154. [https:// doi. org/10.1016/j.ram.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002)

Dehghanpour FS, Taheri P, Falahati RM (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp., the causal agent of wheat crown and root rot in Iran. J Plant Pathol [https:// doi. org/10.1007/s42161-019-00400-9](https://doi.org/10.1007/s42161-019-00400-9)

Demirci E, Dane E (2003) Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. Phytoparasitica 31, 170–173

Divakara ST, Santosh P, Aiyaz M, Venkata Ramana M, Hariprasad P, Nayaka SC, Niranjana SR (2013) Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. J Sci Food Agric 94(6), 1132–1139. [https:// doi. org/10.1002/jsfa.6380](https://doi.org/10.1002/jsfa.6380)

Dyer AT, Johnston RH, Hogg AC, Johnston JA (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. Eur J Plant Pathol 125(3), 387–395. [https:// doi. org/10.1007/s10658-009-9488-1](https://doi.org/10.1007/s10658-009-9488-1)

El Yacoubi H, Hassikou R, Badoc A, Rochdi A, Douira A (2012) Complexe fongique de la pourriture racinaire du blé tendre au nord-ouest du Maroc. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 151, 35–48

Eslahi MR (2012) Fungi associated with root and crown rot of wheat in Khuzestan province. Iran Journal of Crop Protection 1, 107–113

Fernandez MR, Jefferson PG (2004) Fungal populations in roots and crowns of common and durum wheat in Saskatchewan. Can J Plant Pathol 26(3), 325–334. [https:// doi. org/10.1080/07060660409507150](https://doi.org/10.1080/07060660409507150)

Gaikwad SC, Birla SS, Ingle P, Gade AK, Marcato PD, Rai M, Duranc N (2013) Screening of different *Fusarium* species to select potential species for the synthesis of silver nanoparticles. J Braz Chem Soc 24:1974–1982

- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- Goodwin DC, Lee SB (1993) Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15:438–444
- György A, Tóth B, Varga M, Mesterhazy A (2020) Methodical Considerations and Resistance Evaluation against *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Head Blight in Wheat. Part 3. Susceptibility Window and Resistance Expression. *Microorganisms*, 8(5), 627. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050627>
- Hafizi R, Salleh B, Latiffah Z (2013) Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Braz J Microbiol* 44(3):959-968
- Hollaway GJ, Exell GK (2010) Survey of wheat crops for white heads caused by crown rot in Victoria, 1997–2009. *Australas Plant Pathol* 39(4), 363. <https://doi.org/10.1071/ap10048>
- Hoshino T, Xiao N, Xiao N, Tkachenko OB (2009) Cold adaptation in the phytopathogenic fungi causing snow molds. *Mycoscience* 50(1), 26–38. <https://doi.org/10.1007/s10267-008-0452-2>
- Irom MS, Yelena K, Bala GU, Jayshree D, Mohan CK (2016) Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *J Genet Eng Biotechnol* 14(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.07.001>
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Laraba I, Bouregghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obonor F, Moretti A, Geiser DM, Kim HS, McCormick SP, Li XM, Liu CJ, Chakraborty S, Manners JM, Kazan K (2008) A simple method for the assessment of crown rot disease severity in wheat seedlings inoculated with *Fusarium pseudograminearum*. *J Phytopathol* 156: 751–754
- Leslie JF, Summerell AB (2006) *The Fusarium laboratory manual* p. 388. Ames: Blackwell Publishing
- McKinney HH (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res* 26, 195–217
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH et al. (2011) *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101:960–969. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-10-0188>
- Nielson LK, Justesen AF, Jensen JD, Jorgensen LN (2013) *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grains cereals. *Crop Prot* 43, 192–200

- Noman E, Al-Gheethi AA, Rahman NK, Talip B, Mohamed R, Kadir OA (2018) Single Spore Isolation as a Simple and Efficient Technique to obtain fungal pure culture. IOP Conference Series: Environ Earth Sci 140, 012055. [https:// doi. org/10.1088/1755-1315/140/1/012055](https://doi.org/10.1088/1755-1315/140/1/012055)
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465–493
- O'Donnell K, Kistler HC, Tachke BK, Casper HH (2000) *Proc. Natl Acad Sci* 97 7905–7910
- Paulitz TC, Smiley RW, Cook RJ (2002) Insights into the prevalence and management of soilborne cereal pathogens under direct seeding in the Pacific Northwest, U.S.A. *Can J Plant Pathol* 24(4), 416–428. [https:// doi. org/10.1080/07060660209507029](https://doi.org/10.1080/07060660209507029)
- Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D et al. (2011) Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol* 61(1), 140–151. [https:// doi. org/10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x)
- Poole GJ, Smiley RW, Paulitz TC, Walker CA, Carter AH et al. (2012) Identification of quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Fusarium* crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) in multiple assay environments in the Pacific Northwestern US. *Theor Appl Genet* 125(1), 91–107. [https:// doi. org/10.1007/s00122-012-1818-6](https://doi.org/10.1007/s00122-012-1818-6)
- Purahong W, Nipoti P, Pisi A, Lemmens M, Prodi A (2014) Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. *Mycoscience* 55(1), 63–69. [https:// doi. org/10.1016/j.myc.2013.05.007](https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.05.007)
- Rebib H, Bouraoui H, Rouaissi M, Brygoo Y, Boudabbous A, Hajlaoui MR, Sadfi-Zouaoui N (2014) Genetic diversity assessed by SSR markers and chemotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *Eur J Plant Pathol* 139(3), 481–495. [https:// doi. org/10.1007/s10658-014-0405-x](https://doi.org/10.1007/s10658-014-0405-x)
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* [https:// doi. org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12), 5463–5467. [https:// doi. org/10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)
- Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G et al. (2012) *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol* 14(4), 323–341. [https:// doi. org/10.1111/mpp.12011](https://doi.org/10.1111/mpp.12011)
- Shikur Gebremariam E, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC, Erginbas-Orakci G, Karakaya A et al. (2017) Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. *Eur J Plant Pathol* 150(2), 387–399. [https:// doi. org/10.1007/s10658-017-1285-7](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1285-7)

Smiley RW, Gourlie JA, Easley SA, Patterson LM (2005) Pathogenicity of Fungi Associated with the Wheat Crown Rot Complex in Oregon and Washington. *Plant Dis* 89(9), 949–957. <https://doi.org/10.1094/pd-89-0949>

Smiley RW, Patterson LM (1996) Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Dis* 80, 944–949

Tunali B, Nicol JM, Hodson D, Uçkun Z, Büyük O et al. (2008) Root and Crown Rot Fungi Associated with Spring, Facultative, and Winter Wheat in Turkey. *Plant Dis* 92(9), 1299–1306. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-9-1299>

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-22

Xu XM, Nicholson P (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Ann Rev Phytopathol* 47:83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>

Yang X, Ma J, Li H, Ma H, Yao J et al. (2010) Different genes can be responsible for crown rot resistance at different developmental stages of wheat and barley. *Eur J Plant Pathol* 128(4), 495–502. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9680-3>

Yekkour A, Toumatia O, Meklat A, Verheecke C, Sabaou N, Zitouni A, Mathieu F (2015) Deoxynivalenol-producing ability of *Fusarium culmorum* strains and their impact on infecting barley in Algeria. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 875–881

Yli-Mattila T, Gagkaeva T (2010) Molecular Chemotyping of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, and *F. cerealis* Isolates From Finland and Russia. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8_8

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A Decimal Code For The Growth Stages Of Cereals. *Weed Res* 14(6), 415–421. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3180.1974.Tb01084.X>

Zhang X, Sun H, Shen C, Li W, Yu H et al. (2015) Survey of *Fusarium* spp. Causing Wheat Crown Rot in Major Winter Wheat Growing Regions of China. *Plant Dis* 99(11), 1610–1615. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0422-re>

Zhao B, Yan J, Zhang S, Liu X, Gao Z (2014) Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. *Saudi J Biol Sci* 21(4):374- 379

Table captions

Table 1. Summary table of regions, provinces, locations, and sampling period.

Table 2. Molecular identification of *Fusarium* isolates with their life lines (sporulation rate and growth rate) and pathogenicity in vitro and in vivo on FCR

Table 3. The different correlations between the different parameters measured

Figure captions

Figure 1. Map of Northern Algeria showing the sampling provinces (1; Constantine, 2; Mila, 3; Guelma, 4; OumEl Bouaghi, 5; Sétif, and 6; Bordj Bou Arreridj).

Figure 2. Photos illustrate culture morphology (10 days on PSA medium), and conidia morphology of 10 *Fusarium* isolates representing the ten species isolated (FC1; *F. culmorum*, FC7; *F. oxysporum*, FC8; *F. graminearum*, FC14; *F. cerealis* FC21; *F. acuminatum*, FE2; *F. equiseti*, FE6; *F. asiaticum*, FE8; *F. incarnatum*, FE9; *F. fujikuroi*, FE10; *F. brachygibbosum*). Scale bar 20 μm .

Figure 3. Phylogenetic relationships of 34 *Fusarium* isolates inferred from ITS sequences analysis by MEGA software, with 21 type strains from the GeneBank database. In addition to out-group *Fusarium* fungi (*Trichoderma*, *Aspergillus* and *Rhizopus*).

Figure 4. Photos illustrate FCR disease severity classes for the two tests, a: in vitro and b: in vivo. Class 0 = healthy crown (control). 1 = light browning of the crown; 2 = browning of half of the crown; 3 = complete browning of the crown; and 4 = death of the seedlings.

Figure 5. Simple Scatter with fit line of Correlations between; (a) DSt by DSp test ($r = 0.627$, $P = 0.007 < 0.01$), (b) Sporulation rate (mm/d) by Growth Rate (sp/ml) $r = 0.355$, $P = 0.012 < 0.05$ determinate by Pearson correlation coefficient.

CHAPITRE 2 : *Fusarium cerealis* :
premier rapport, identification et
virulence en tant qu'agents
responsables de la pourriture du
collet sur le blé en Algérie

CHAPITRE 2 : *Fusarium cerealis* : premier rapport, identification et virulence en tant qu'agents responsables de la pourriture du collet sur le blé en Algérie

Préambule

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est l'une des cultures de base les plus importantes dans le monde entier et l'un des piliers de la sécurité alimentaire en Algérie. Malheureusement cette culture peut être attaquée par de nombreuses maladies cryptogamiques telles que la pourriture du collet causée par les *Fusarium*.

L'espèce *Fusarium cerealis* est connue comme un agent pathogène de diverses plantes et qui peut provoquer la pourriture des racines et la brûlure des semis des céréales. Cependant, la large distribution mondiale de *F. cerealis* et sa pathogénicité envers diverses espèces végétales devrait attirer l'attention des chercheurs. Il est à préciser également que cette espèce n'a pas été précédemment décrite dans le territoire algérien d'une part et pour le blé d'autre part.

Dans ce deuxième chapitre, l'isolement de *F. cerealis* et l'identification morphologique et moléculaire avec une étude phylogénétique **sont présentés dans un article publié en 2022 dans le journal *Archives of Phytopathology and Plant Protection***. La pathogénicité de *F. cerealis* sur les semis de blé ainsi que sa capacité à induire la FCR évaluée par deux tests en chambre de culture (*in vitro*) et dans la serre (*in vivo*) y sont présentées.

Dans cette étude soixante-trois échantillons symptomatiques de la FCR ont été prélevés dans le nord-est du pays. Les 23 isolats obtenus ont été identifiés sur la base des données macroscopiques et caractéristiques microscopiques. L'analyse morphologique a été confirmée par l'identification moléculaire. Le numéro d'accèsion MW358286 a été attribué par NCBI GenBank à l'isolat FC14 identifié comme étant *Fusarium cerealis*. Deux tests de pathogénicité ont été menés sur 9 cultivars (cv) de blé tendre dans des conditions contrôlées.

Le premier test *in vitro* a été réalisé dans la chambre de culture avec les paramètres : pourcentage d'inhibition de la germination (%IG) afin de déterminer son impact sur la germination des graines semées et le paramètre the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) pour voir l'effet sur l'infection initiale des coléoptiles germés. Le second test *in vivo* dans la serre a pour but de tester la capacité de *F. cerealis* à induire la FCR en utilisant le paramètre de l'indice de maladie (DS%) sur le blé. Aussi son impact sur la longueur et le poids du système végétatif est évalué par la mesure du pourcentage de réduction de la longueur et le poids du système végétatif (RCL% et RCW%), respectivement.

Les résultats ont montré que tous les cultivars présentent une sensibilité dès le 3 DAI vis-à-vis du pathogène *Fusarium cerealis*, avec une diminution du nombre des graines germées de chaque génotype. Les résultats de l'essai d'inoculation du collet dans la chambre de culture évalué en pourcentage d'indice de maladie DS ont montré que *F. cerealis* (FC14) a provoqué la FCR à tous les cultivars de blé tendre testés. *F. cerealis* a considérablement réduit la longueur et le poids du système végétatif.

Dans ce travail, il s'agit du **premier rapport** sur l'existence de l'espèce *F. cerealis* en Algérie comme un agent provoquant la FCR, et que cette espèce représente une sérieuse menace pour la production de blé en Algérie.

Article 2. First report on *Fusarium cerealis*, identification and virulence as causal agents of crown rot on wheat in Algeria

Hamza BOUANKA^a. Ines BELLIL^a. Douadi KHELIFI^{a,b}

Archives of Phytopathology and Plant Protection, (2022) 55:5, 597-614

RESEARCH ARTICLE



First report on *Fusarium cerealis*, identification and virulence as causal agents of crown rot on wheat in Algeria

Hamza Bouanaka^a , Ines Bellil^a  and Douadi Khelifi^{a,b} 

^aLaboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria; ^bÉcole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Pôle Universitaire, Nouvelle Ville Ali Mendjeli Constantine, Algeria

ABSTRACT

In this study, FCR-symptomatic samples from the north-east of Algeria were collected. Macroscopic data and microscopic characteristics were used to identify the 23 isolates, which were then confirmed by molecular identification. NCBI GenBank assigned the accession number MW358286 to isolate FC14, which was identified as *Fusarium cerealis*. Under controlled conditions, two pathogenicity tests were performed on nine bread wheat cultivars (cv). The first one is an *in vitro* test in the growth chamber. The second one, *in vivo* test in the greenhouse. The results revealed that all cultivars were susceptible to FC14, and that *F. cerealis* reduced germination and coleoptile emergence rates significantly, with GI% and AUDPC values of 38.09% and 49.58% for cv. Boumerzoug, respectively. With cv. Bordj Mehis, *F. cerealis* decreased the RCL% and RCW% by 50.71% and 60.70%, respectively. The presence of *F. cerealis* species as an agent causing FCR was identified for the first time in Algeria.

ARTICLE HISTORY



Received 1 September 2021
Revised 12 January 2022
Accepted 23 January 2022

KEYWORDS

Pathogenicity;
fungus;
Algeria;
Fusarium cerealis;
wheat

1. Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the world's most valuable staple crops and one of the world's food security pillars (Moore et al. 2015). In Algeria, bread wheat is widely grown in the humid and sub-humid provinces of the north, to satisfy demands of the agro-food industry, especially bakeries that produce bread which is widely consumed by the population (Fellahi et al. 2013).

CONTACT Ines Bellil  bines07@yahoo.fr  Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

Unfortunately, many fungal diseases, such as crown rot (FCR), are threatening this crop, which is caused by a variety of *Fusarium* species. Many plants, including wheat and barley are considered targets to this anamorphic genus. Furthermore, *Fusarium* genus has the potential to significantly reduce grain yield and quality (Matny 2015). FCR become an increasing constraint for the production of wheat in the world but also in Algeria (Yekkour et al. 2015).

Fusarium cerealis (syn. *Fusarium crookwellense*) is a plant pathogen that causes root rot and seedling blight in cereals, including barley seedling blight (Zhang et al. 2011) and seedling blight of corn in New Zealand and Australia (Tan et al. 2004; Schiwiek et al. 2020). *F. cerealis* also causes soybean and ginseng root rot (Gao et al. 2014; Abdelmagid et al. 2018), cotton stem rot (Wang et al. 2004), and hop cone (Pethybridge et al. 2001), as well as wheat root rot (Akinsanmi et al. 2004).

F. cerealis ubiquitous in Europe (Kwaona and Chelkowski 1988; De Nijs et al. 1996; Srobarova et al. 2008) has also been identified as widespread in Russia (Gagkaeva 2010). This pathogen has often been found within the *Fusarium* head blight complex and also causing red rot of corn (Logrieco et al. 2003) and in wheat fields in Japan and the eastern United States (Sugiura et al. 1994; Schmale et al. 2011).

In addition to yield loss, *F. cerealis* can produce many *Fusarium* mycotoxins, such as nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON) in winter wheat plots (Ichinoe et al. 1983; Amarasinghe et al. 2015). It has also been reported that *F. cerealis* can produce fusaric acid, fusarin C, nivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol, T2 toxin, beauvericin, fusarenone X, zearalenone, alpha- and beta-zearalenol and diacetoxyscirpenol (Bottalico and Perrone 2002; Amarasinghe et al. 2015).

However, the worldwide distribution of *F. cerealis* and its pathogenicity towards various plant species should draw attention to this species. Numerous first reports keep appearing including; first report on corn stalk rot caused by *F. cerealis* in Yunnan, China (Shan et al. 2017); on *Anthoxanthum aristatum* Boiss in Poland (Pieczul et al. 2018) and first report of *Fusarium* head blight caused by *F. cerealis* in barley in New York (Cummings et al. 2017).

F. culmorum, *F. pseudograminearum*, *F. verticillioides* and *F. avenaceum* are the species associated with FCR that have been recorded in Algeria so far (Abdallah-Nekache et al. 2019). Also a first report of *F. chlamydosporum* and *F. equiseti* causing crown rot and damping off on durum wheat was signaled (Bencheikh et al. 2020a, 2020b). This does not exclude the presence of other species that have not yet been reported in Algeria, as is the case in this study on *F. cerealis*.

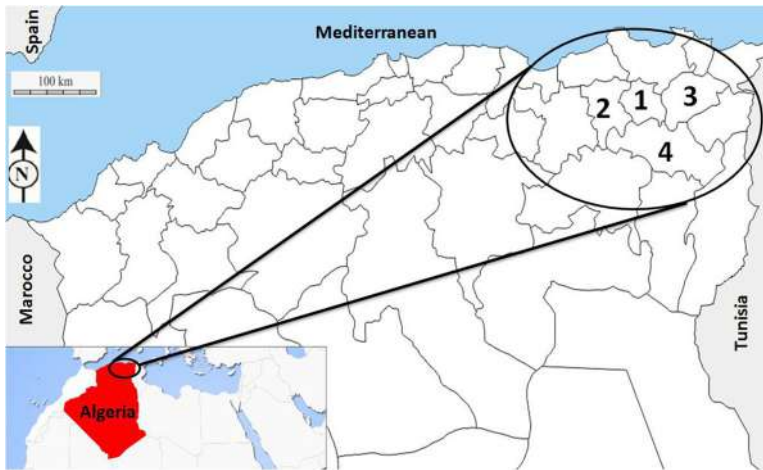


Figure 1. Map of Northern Algeria showing the provinces where the samples were obtained (1) Constantine, (2) Mila, (3) Guelma and (4) Oum El Bouaghi).

The objectives of this study were: (i) isolation of *F. cerealis* which has not been previously described in the Algerian territory especially for wheat; (ii) morphological and molecular identification with phylogenetic study; (iii) the pathogenicity of *F. cerealis* on wheat seedlings and its ability to induce FCR by two pathogenicity tests in the growth chamber (*in vitro*) and in the greenhouse (*in vivo*).

2. Materials and methods

2.1. Fungal material

2.1.1. Isolation of *F. cerealis*

During the 2018–2019 agricultural season, 63 samples of wheat plants with FCR symptoms were collected in several provinces in northeastern Algeria, including Constantine, Mila, Guelma and Oum El Bouaghi (Figure 1). Wheat samples were obtained from a variety of durum and bread wheat cultivars.

Plant crowns suspected of being contaminated were cut into 5 to 10 mm fragments, disinfected in 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 min, and then, rinsed in three baths of sterile distilled water (Benhamou and Chet 1996). They were placed on potato sucrose agar (PSA) medium in sterile Petri dishes (5 pieces/dish) and incubated at 28 °C for 7 days after drying between two sheets of sterile paper towels. The same PSA was transplanted with fungal colonies suspected of belonging to the genus *Fusarium* (white to brownish white, and pink to reddish color). The single-spore technique was used to purify all of the isolates. They were then stored at –80 °C in Eppendorf tubes in 20% glycerol water (Siou 2014).

2.1.2. Macroscopic and microscopic characterization

PSA medium was used to subculture the FC14 isolate. The colony's growth, appearance and texture, as well as the pigmentation of the Petri dish's face and reverse, were all examined macroscopically (Leslie and Summerell 2006).

A mycelial disc subculture from the pure FC14 culture was placed on two other media, Carnation Leaf-Piece Agar (CLA) and Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), for microscopic characteristics in addition to the PSA medium (Leslie and Summerell 2006). After 10-day incubation period at 28 °C, the culture was observed under a light microscope for microscopic examination (LEICA DM4000 B LED).

The presence or absence of microconidia, mesoconidia and macroconidia, as well as their shapes and sizes (if present), the form of phialides (monophialid and/or polyphialid), and the presence or absence of chlamydospores, microconidial chains and sporodochia, are all diagnostic characteristics used for species identification (Leslie and Summerell 2006).

2.2. Molecular identification and phylogenetic analysis

To confirm the identification of FC14 based on macroscopic data and microscopic characteristics, the BIOfidal laboratory carried out the molecular analysis (CEDEX-France). The DNA Extraction was carried out using a commercial kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel Germany). From the mycelium collected by scraping the surface of the culture on a Petri dish of purified isolate, 100 µL lysis buffer were added and the nucleic acids were isolated using the microwave mini-preparation procedure described by (Goodwin and Lee 1993). The last DNA pellet was completed in a TE buffer and stored at -20 °C until use. Region internal transcribed spacer (ITS) of rDNA was amplified using a fungal-specific primer ITS-1 (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A '3) (Gardes and Bruns 1993).

The PCR products were purified by the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit from Macherey-Nagel (Germany) following the protocol described by the supplier. The isolated and purified PCR products were sequenced using Sanger technique (Sanger et al. 1977) using the Applied Biosystems BigDye v3.1 kit and PCR primers used for the amplification of the fragments of interest. The obtained sequences are analyzed and cleaned by the use of software SnapGene® Viewer 5.2. The final sequences are then compared with those in the GeneBank database by using the program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) of NCBI for the identification of the studied isolates based on % homology with the reference strains.

The DNA sequence of isolate FC14 (obtained with ITS1-2) with the referenced sequences collected in Genbank (NCBI) (Table 1) were used for multiple sequence alignment in MEGA format using the Clustal W option of MEGA-X software. The phylogenetic tree and distance matrix were also constructed using the MEGA software, which implemented the Neighbour-Joining (NJ) dendrogram of Saitou and Nei (1987). The phylogenetic distance was based on Kimura's 2-parameter model (K2P) (Kimura 1980).

2.3. FCR pathogenicity test

The pathogenicity of the FC14 isolate was tested. *In vitro* and *in vivo* experiments were used to assess the isolate's aggressiveness on nine local bread wheat cultivars grown in Algeria's north-eastern region: cv. Madracen, El Hachimia, Boumerzoug, Akhamokh, Nif Encer, Arz, Ain Abid, Bordj Mehis and Hidhab. The National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA) provided these cultivars.

2.3.1. Pathogenicity of FC14 isolate on germination (Petri dish assay)

The inoculum was prepared according to the protocol of Bouanaka et al. (2021b). Isolate FC14 was cultured in six Petri dishes on PSA medium. After a period of 30 days, 10 mL of sterile distilled water was added with 0.05% (v/v) Tween-20 to the aerial mycelial part on the surface of each dish, and then scraped carefully until the entire surface part of the fungus was recovered. The mixture of macroconidia, mycelium and PSA medium was collected in a beaker, well shaken and filtered through a double layer of cheesecloth. The concentration of the macroconidial suspension was adjusted to 2×10^7 conidia/mL by Malassez cell.

The Petri dish test was performed according to the method of Bouanaka et al. (2021b), where 200 seeds for each cultivar, were surface sterilized with 2% NaClO for 8 min before being rinsed six times with sterile distilled water. Eight 9-cm-diameter Petri dishes lined with absorbent paper in a triple layer were used for each cultivar. Twenty-five healthy seeds were placed in each Petri dish. Four dishes were inoculated with 10 mL of FC14 fungal inoculum, and the other four dishes were used as controls (10 mL sterile distilled water). Petri dishes were incubated at 28 °C in total darkness. Germinated seeds in the four infected dishes of each cultivar were counted 3 days after inoculation (DAI), and similarly for the 4 control dishes (number considered as 100% germination). This test was repeated two successive times. The percentage of germination inhibition (GI%) was calculated according to the following equation (Bouanaka et al. 2021b):

Table 1. The comparison of the DNA sequence of FC14 isolate (obtained with ITS1-2) to the referred sequences collected from the Genbank (NCBI).

Description	Query length (bp)	Total score	Query cover (%)	E value	Per. ident (%)	Host	Country	Accession
<i>Fusarium cerealis</i> strain FC14 internal transcribed spacer 1	472					Crown Wheat	Algeria	MW358286
<i>Fusarium cerealis</i> strain TH11-2 internal transcribed spacer 1	518	872	100	0.0	100	Panax Ginseng	China	MT558863
<i>Fusarium cerealis</i> strain TH11-1 internal transcribed spacer 1	517	872	100	0.0	100	Panax Ginseng	China	MT558862
<i>Fusarium cerealis</i> strain AT3-6 internal transcribed spacer 1	528	872	100	0.0	100	Panax Ginseng	China	MT558728
<i>Fusarium cerealis</i> isolate A20_S20 internal transcribed spacer 1	519	872	100	0.0	100	Wheat	Mexico	MN737766
<i>Fusarium cerealis</i> clone 2014_213 internal transcribed spacer 1	518	872	100	0.0	100	Cucurbita Root	USA	MN521993
<i>Fusarium cerealis</i> strain gss215 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	558	872	100	0.0	100	Ginseng	China	MH290474
<i>Fusarium cerealis</i> strain gss213 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	559	872	100	0.0	100	Ginseng	China	MH290473
<i>Fusarium cerealis</i> strain Carm18 internal transcribed spacer 1	523	872	100	0.0	100	Soybean	Canada: Manitoba	MG979795
<i>Fusarium cerealis</i> strain Carm7 internal transcribed spacer 1	500	872	100	0.0	100	Soybean	Canada: Manitoba	MG979793
<i>Fusarium cerealis</i> strain Carm20 internal transcribed spacer 1	528	872	100	0.0	100	Soybean	Canada: Manitoba	MG881850
<i>Fusarium cerealis</i> isolate 9703 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	1611	872	100	0.0	100	not available	Switzerland	MG274303
<i>Fusarium cerealis</i> isolate UWR_103 internal transcribed spacer 1	504	872	100	0.0	100	The Cave Bear Bones	Poland	KY465757
<i>Fusarium cerealis</i> isolate EFA 20FCSH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	564	872	100	0.0	100	Maize	Spain: Silleda	KF576623
<i>Fusarium cerealis</i> genes for contains 18S rRNA, ITS1strain: MAFF 101144	1052	872	100	0.0	100	not available	Japan	AB820718

$$GI\% = 100 - \left\{ SG_i \times 100 / SG_c \right\}$$

where SG_i : number of seeds that germinated in the infected dishes, SG_c : number of seeds that germinated in the control dishes. The GI% value ranges from 0% (non-pathogenic, seeds germinated \geq the control) to 100% (highly pathogenic, all seeds not germinated by day 3).

The area under the disease progress curve (AUDPC) was used to illustrate symptoms on already germinated seeds, and thus, susceptibility to initial infection by FC14. Ungerminated seeds or seeds with brown spots on coleoptiles and/or completely covered by mycelium were identified on FC14-infected Petri dishes and counted each day from 3 to 6 DAI. The kinetics of disease progression in percentage of symptomatic seeds (PSS) was assessed between the first and last readings. AUDPC is calculated according to the following equation (Bouanaka et al. (2021b):

$$AUDPC = \left\{ \sum_0^n \left(Y_i + Y_{i+1} / 2 \right) \right\} / t$$

where Y_i is the PSS at the i th note, t : number of days elapsed between the first and last note and n : total number of notes.

AUDPC values are limited from 0 (very resistant; seedlings similar to control) to 100 (very susceptible; all seedlings diseased on day 3).

2.3.2. Pathogenicity of FC14 isolate on FCR (assay tube)

This test was performed according to Bouanaka et al. (2021a). Fifty-four assay tubes (14 cm \times 3 cm) were filled with 4 cm of cotton, then 20 mL of distilled water was added to each tube and covered with aluminum foil, then autoclaved at 180 °C for 2 h. Two hundred and seventy seeds (30 seeds/cultivar) were surface disinfected for 5 min with 2% NaClO before being rinsed three times with sterile distilled water. In each assay tube, seeds were placed on wet cotton (5 seeds/tube). The tubes were closed with transparent caps and placed in the host at 28 ± 1 °C for 4 days, where the seedlings reached the one-leaf stage (Zadoks' GS 11) (Zadoks et al. 1974), inoculation was carried out as follows: For each cultivar 3 control tubes and 3 tubes inoculated with FC14 (13 mm disk).

After inoculation, the tubes were placed in a complete randomization scheme in the culture chamber (25/19 °C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle) for 10 days. Seedlings were carefully separated from the cotton when they reached the two-leaf stage (Zadoks' GS 12). On a scale of 0 to 4, FCR severity classes for crown discoloration were assigned

in the laboratory where: Class 0 = healthy crown; 1 = light crown browning; 2 = half-crown browning; 3 = complete crown browning; and 4 = seedling death.

The McKinney (1923) index was used to measure disease severity (DS) in inoculated tubes, which expresses the percentage of disease severity (i.e., 100) 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 value of the empirical scale adopted (class 4). This test was repeated two successive times.

The following formulas were used to measure the percentage reduction in length (RCL) and weight (RCW) of coleoptiles:

$$RCL = 100 - (\text{Infected CL} \times 100 / \text{Control CL})$$

$$RCW = 100 - (\text{Infected CW} \times 100 / \text{Control CW})$$

2.4. Statistical analysis

Analyses of the data, graphs, tables and descriptive statistics (mean, standard deviation (SD) and variance), were carried out using SPSS software (IBM SPSS Statistics version 25), comparisons between the two groups (inoculated and control) were determined by Paired-Samples T -Test. Correlations between the different parameters were determined by Pearson correlation. Means of the different treatments were compared using Tukey's honestly significant difference test. Results were considered significant at the 5% level ($p \leq 0.05$) and highly significant at the 1% level ($p \leq 0.01$).

3. Results

3.1. Morphological characteristics

A total of 23 monospore isolates were analyzed. Three were probably assigned to *F. cerealis* genus. In this study, only the isolate (FC14) was investigated.

On PSA medium, the culture grew in 10 days and developed an abundance of fuzzy, airy, light and dark orange mycelium around the

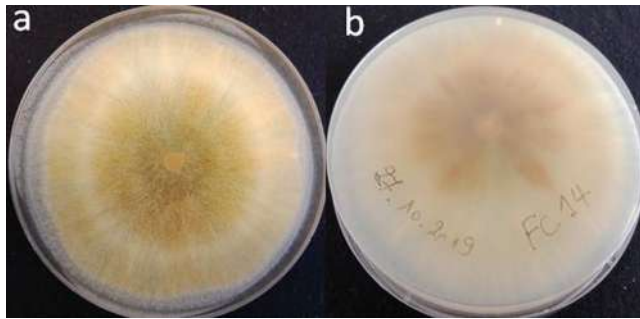


Figure 2. Macroscopic appearance of *F. cerealis* (FC14) after 10 days of incubation on PSA medium, (a) the face and (b) the reverse.

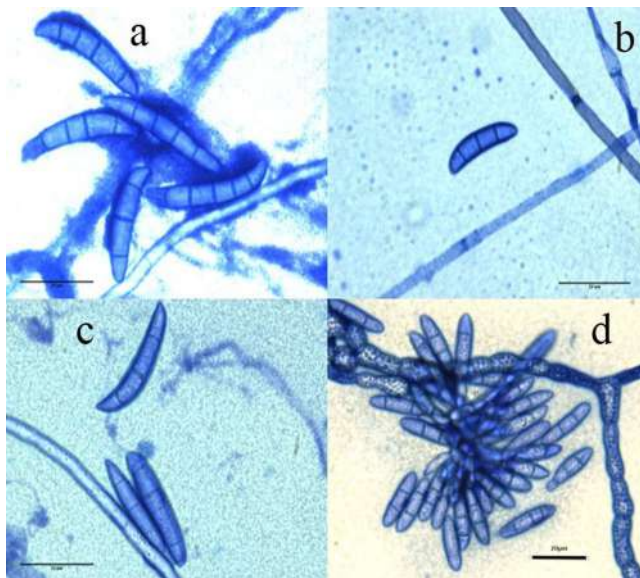


Figure 3. Different aspects of *F. cerealis* (FC14) macroconidia on medium; (a) SNA, (b) PSA, (c) CLA and (d) Sporodochial conidiophores. Scale bar 20 μ m.

middle (Figure 2(a)). Growth is fairly fast, in just 5 days, the 9 cm Petri dish was fully covered (Figure 2(a)). FC14 contains a large number of sporodochial conidiophores (Figure 3(d)), which clump together in a visible spore mass in the culture's middle. The length of robust thick-walled macroconidia is intermediate (Figure 3(b)). While microconidia were absent. The reverse side of the culture had a brown gradient running from the middle to the margins (Figure 2(b)).

On SNA medium at 28 °C for 10 days, macroconidia were robust, thick-walled, apical and basal, curved cells, usually with 5 septa (Figure 3(a)). On CLA medium, macroconidia were abundant on pieces of carnation leaves but can also form directly on agar and formed on monophialides in pale orange to dark brown sporodochia. Usually 4-septate

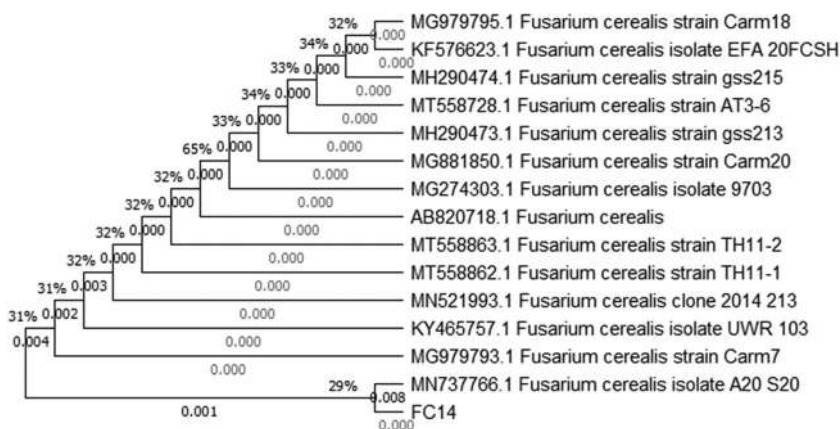


Figure 4. Phylogenetic relationships of FC14 with *F. cerealis* isolates inferred by Neighbour-Joining (NJ) analysis of ITS sequences.

Table 2. Petri dish test to evaluate the pathogenicity of FC14 on FCR for nine cultivars tested by comparison between control and infected.

Grain Cultivar	Number of germinated seeds control (SG _c)	Number of inoculated seeds germinated (SG _i)	Germination inhibition %	AUDPC
Madracen	93.66 ± 2.51 ^{ab}	74.66 ± 4.04 ^b	20.27	31.95
El Hachimia	94.66 ± 2.51 ^{ab}	82.66 ± 3.05 ^{bcd}	12.66	24.61
Boumerzoug	98.00 ± 2.00 ^b	60.66 ± 2.51 ^a	38.09	49.58
Akhamokh	94.66 ± 1.52 ^{ab}	88.33 ± 5.03 ^{cd}	06.68	22.11
Nif Encer	88.66 ± 2.51 ^a	84.66 ± 3.78 ^{bcd}	04.50	27.30
Arz	97.00 ± 3.00 ^b	76.66 ± 3.78 ^b	20.96	36.32
Ain Abid	94.00 ± 4.00 ^{ab}	90.00 ± 3.00 ^d	04.25	29.61
Bordj Mehis	95.66 ± 3.51 ^{ab}	83.66 ± 3.78 ^{bcd}	12.53	29.52
Hidhab	96.66 ± 1.52 ^b	78.33 ± 3.05 ^{bc}	18.95	30.53

For each column, the values (mean ± SD) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$).

are present and are normally wider in the middle (Figure 3(c)). No microconidia were produced.

3.2. Molecular identification and phylogenetic analysis

Macroscopic data and microscopic characteristics were used to make the identification (Leslie and Summerell 2006). The results were confirmed by molecular identification. FC14's sequence was compared to GenBank reference sequences (Table 1), and the species was identified as *F. cerealis* and the accession number MW358286 was assigned by NCBI GenBank. This is the first time that *F. cerealis* is reported on wheat in Algeria. The reference sequences collected in Genbank (NCBI) were compared to the DNA sequence of isolate FC14 (obtained with ITS 1-2; Table 1). MEGA software was used to construct the phylogenetic tree and distance matrix (Figure 4).

3.3. In vitro pathogenicity on the germination of wheat

From the 3 DAI, all of our cultivars showed sensitivity to the pathogen FC14. Each genotype had a substantial reduction in the number of germinated seeds as compared to its own control. We cannot discuss the FC14 pathogenicity without discussing the varietal resistance of our tested cultivars, given the variability of our results in this study. Boumerzoug is the genotype that showed the highest susceptibility to germination with GI%=38.09%, but also to initial infection of germinated seeds with AUDPC = 49.58%, followed by Arz with GI% = 20.96% and AUDPC = 36.32% (Table 2). The cv. Ain Abid, conversely, proved to be the most tolerant to FC14, with a GI percent of 4.25%. With an AUDPC of 22.11%, cv. Akhamokh is the most tolerant against the initial infection of germinated seeds (Table 2). The mild pathogenicity of FC14 on germination of cultivars Nif Encer and Akhamokh with very low GI% values (4.5 and 6.68%), respectively, did not last for long, and became more severe after 3 days with higher AUDPC values (27.30 and 22.11%), respectively (Table 2).

The results showed that there was a highly significant difference ($p < 0.001$) between the artificially infected plants and the uninfected control plants. This result shows that our isolate was highly pathogenic on wheat seed germination.

3.4. In vivo pathogenicity on the FCR

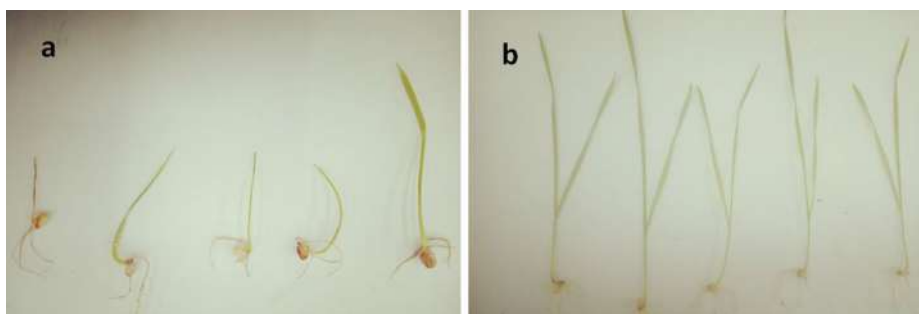
To determine the impact of this isolate on the wheat's basal part (crown), a pathogenicity test was performed on nine bread wheat varieties. The results revealed that *F. cerealis* (FC14) caused FCR in all bread wheat cultivars tested; all values were greater than 30% (Table 3). The values of the DS are very close, varying between 30% for cv. Ain Abid and 56.66% for cv. Boumerzoug. The latter was clearly more sensitive than the other cultivars, followed by cv. Arz with DS = 55%. *F. cerealis* recorded the highest aggressiveness with Boumerzoug, Arz and Akhamokh cultivars. While Ain Abid, Hidhab and Madracen recorded the lowest rates with DS = (30, 32.14 and 33.33%), respectively (Table 3).

The values of the reduction in length and weight of the coleoptiles were positive. Except for cv. Nif Encer where FC14 contamination had no effect on coleoptiles length or weight with even negative values recorded -1.89% and -1.46%, respectively (Table 3). Although it recorded a high DS equal to 48.33%. The cultivars Bordj Mehis (Figure 5), Hidhab and Arz underwent the highest length reduction rates with %RCL= (50.71%, 32.51% and 25.01%), respectively. The same three cultivars recorded the highest weight reduction rates with %RCW = (60.70%, 44.97% and 48.72%), respectively (Table 3).

Table 3. Test in assay tube to evaluate the pathogenicity of FC14 on FCR for nine cultivars tested by comparison between controls and infected.

Grain Cultivar	Disease severity (DS%)	Coleoptile length (mean \pm SD) (mm)		Coleoptile weight (mean \pm SD) (mg)		% Reduction in length and weight of the coleoptile	
		Infected CL (mm)	Control CL (mm)	Infected CW (mg)	Control CW (mg)	RCL	RCW
Madracen	33.33 \pm 1.62 ^a	139 \pm 14.10 ^{cd}	146.15 \pm 10.97 ^a	79.62 \pm 8.86 ^e	89.97 \pm 14.23 ^a	-2.79	14.62
El Hachimia	51.66 \pm 20.02 ^{bc}	117.53 \pm 8.34 ^{bc}	152.18 \pm 8.68 ^a	61.64 \pm 8.21 ^{cd}	91.63 \pm 5.36 ^a	18.66	35.21
Boumerzoug	56.66 \pm 2.96 ^c	129.80 \pm 8.60 ^{bcd}	154.84 \pm 6.17 ^a	59.32 \pm 3.52 ^c	92.10 \pm 2.70 ^a	15.96	33.66
Akhamokh	52.27 \pm 2.65 ^{bc}	127.54 \pm 5.09 ^{bcd}	149.97 \pm 11.37 ^a	60.41 \pm 2.66 ^c	90.73 \pm 9.58 ^a	18.72	40.63
Nif Encer	48.33 \pm 4.46 ^{bc}	129.33 \pm 2.76 ^{bcd}	142.67 \pm 14.89 ^a	76.42 \pm 3.09 ^{de}	83.66 \pm 9.11 ^a	-1.89	-1.46
Arz	55 \pm 7.60 ^{bc}	105.73 \pm 13.50 ^b	151.11 \pm 8.81 ^a	39.31 \pm 2.99 ^a	80.84 \pm 4.12 ^a	25.01	48.72
Ain Abid	30 \pm 1.42 ^a	147.60 \pm 7.15 ^d	161.79 \pm 17.08 ^a	62.73 \pm 6.36 ^{cd}	90.48 \pm 3.87 ^a	14.11	27.57
Bordj Mehis	45 \pm 3.02 ^b	80.00 \pm 3.46 ^a	145.65 \pm 18.78 ^a	42.12 \pm 2.22 ^{ab}	98.09 \pm 14.09 ^a	50.71	60.70
Hidhab	32.14 \pm 3.48 ^a	113.64 \pm 5.67 ^b	164.26 \pm 3.85 ^a	56.63 \pm 4.97 ^{bc}	104.79 \pm 2.65 ^a	32.51	44.97

For each column, the values (mean \pm SD) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$)

**Figure 5.** Comparison of the coleoptiles length and weight of bread wheat seedlings (cv. Bordj Mehis) between: (a) infected with FC14, (b) uninfected control.

FC14 reduces the length and weight of the seedling's vegetative system visibly (Figure 5). There was no statistically significant difference between the lengths ($p = 0.42 > 0.05$) and weights ($p = 0.18 > 0.05$) of the coleoptiles controls of the different bread wheat varieties tested. Contrary, the results showed that there was a highly significant difference ($p < 0.001$) between the artificially infected plants and the non-infected control plants. This result shows that our isolate was highly pathogenic on coleoptile length and weight (Figure 5).

4. Discussion

The genus *Fusarium* causes the most serious diseases affecting the roots, stem and spike of the wheat plant and at all stages of growth. In Algeria, some studies have been carried out on the main agent responsible of FCR and FHB of wheat which is *F. culmorum*, focusing on its

occurrence, pathogenicity and diversity (Touati-Hattab et al. 2016; Laraba et al. 2017; Abdallah-Nekache et al. 2019). However, the other pathogenic species of the genus *Fusarium*, have still not been well studied. Few researches have been conducted on the pathogenicity of *F. cerealis* on wheat in Algeria as in the rest of the world, in particular, quantitative studies on the effect on coleoptile length and weight, as well as germination and the initial infection by FCR.

Isolates of *F. cerealis* are probably often identified as *F. culmorum* or *F. graminearum*, since they are morphologically similar to these species (Sugiura et al.1994). In the most common media, *F. graminearum* are morphologically very similar and difficult to distinguish from each other, whose macroconidia have a similar shape (Gagkaeva 2010). According to Gagkaeva (2010), the shape of macroconidia provides a better distinction between these three species by macroconidial length. Agarized nutrient media with low carbohydrate content are best suited for this purpose such as SNA and CLA media. In *F. culmorum*, most macroconidia have three to four septa, whereas five septa macroconidia predominate in *F. cerealis* and *F. graminearum*; also macroconidia in *F. cerealis* are longer than those in *F. culmorum*. Therefore, molecular techniques have been more effective and essential to obtain a very accurate identification of *F. cerealis*.

The aim of this study was to isolate and identify the FC14 isolate that causes FCR in wheat and to assess their aggressiveness against FCR (*in vitro* and *in vivo*). From Algeria's north-eastern area, 23 *Fusarium* spp. isolates were obtained (Constantine, Mila, Guelma, Oum El Bouaghi). Following the identification, the findings revealed a variety of isolated species as well as the emergence of new species never before seen in Algeria. Among these species *F. cerealis*. Isolate FC14 had previously been known as *F. cerealis* morphologically, and the findings of the macroscopic and microscopic characterizations were very close to those obtained by Gagkaeva (2010). FC14 was isolated from contaminated wheat crowns collected from durum wheat plots in the Zegrou Elarbi Hamma Bouziane area of Constantine province (36°14'23"N 6°19'14"E) Algeria in 2019. To avoid confusion with other species, we used sequencing of the ITS1-2 region of the rDNA internal transcribed spacer for molecular identification (contains the sequences of internal transcribed spacer 1, ribosomal RNA 5.8S and internal transcribed spacer 2).

The comparison of the ITS1-2 region gene sequence of the rDNA of isolate FC14 to the reference sequences collected in the Genbank database (NCBI) showed 100% similarity with the *F. cerealis* strain (TH11-2). The host is *Panax Ginseng* from china with the accession number MT558863. The molecular results confirms those of the morphological identification.

The phylogenetic analysis deduced by neighbour-joining (NJ) analysis of the ITS1-2 region groups our isolates into three distinct clades. The first clade groups the two *F. cerealis* strains (Carm18 and EFA 20FCSH) (Soybean, from Canada: Manitoba and Maize from Spain: Silleda), respectively. The second clade included the remaining *F. cerealis* strains. The third clade includes the A20 S20 strain and our FC14 strain, both isolated from wheat plant, the former from Mexico (MN737766) and the latter from Algeria.

The AUDPC parameter was used to determine the pathogenicity of FC14 on germination *in vitro* on nine bread wheat varieties to determine its effect on seedlings, thus germination, but also initial infection of germinated coleoptiles. The isolated *F. cerealis* strain, regardless of the degree of resistance/susceptibility of the tested cultivars, had a negative impact on their germination abilities and the development of germinated seeds of all cultivars.

In vitro test of the FCR pathogenicity revealed that none of the cultivars had a null DS and that our pathogen FC14 induced FCR symptoms in all of the varieties studied, with DS% ranging from 30% for cv. Ain Abid to 56.66% for cv. Boumerzoug, which was at the top of the list by its sensitivity to FCR.

The pathogenicity of FC14 was also shown by a strong reduction in the length of wheat coleoptiles (%RCL). The same finding was obtained by Wakuliński (1989) where a treatment of wheat seedlings with *F. cerealis* reduced their length by 57%. In contrast, the cultivars Madracen and Nif Encer were not influenced at all by their coleoptile lengths, with still slightly higher values than the control. The pathogenicity of our strain *F. cerealis* seems far from being comparable with those obtained by Hudec (2007) who reported in his work that *F. culmorum* and *F. graminearum* were the most serious pathogens on the development of the length of coleoptiles of wheat and barley, with a reduction of 91.32% with *F. culmorum* and 78.32% with *F. graminearum*.

The results showed that there was a highly significant difference ($p < 0.001$) between inoculated and control plants. This result shows that the FC14 isolate was pathogenic on seed germination but also on coleoptiles length and weight. It was also clearly noticed that the value of RCL is very significantly related to RCW which is very logical, but cv. Madracen was the exception with negative RCL and positive RCW (-2.76 and 14.62%) respectively. The correlation between RCL and RCW of the vegetative system was highly significant with a correlation coefficient $r = 0.972$ ($p < 0.001$).

In the bibliography, many studies have shown that the pathogenicity of *F. cerealis* was less aggressive than the two similar species *F. culmorum* and *F. graminearum*; Miller (1994) indicated that the pathogenicity

of the species of the FHB complex varies from *F. graminearum* (highest aggressiveness) > *F. culmorum* > *F. avenaceum* > *F. cerealis* (lowest aggressiveness). A similar lower virulence of *F. cerealis* isolates in wheat FHB has been reported in other studies (Sugiura et al. 1994; Desjardins et al. 2004). The same conclusion was found by Prończuk et al. (1991) where a strain of *F. cerealis* isolated from maize stalks was less aggressive to maize plants than *F. graminearum* and *F. culmorum*. Mielniczuk et al. (2004) showed that the inoculation of four oat rows with a suspension of *F. cerealis* under field conditions resulted in a 24% decrease in grain yield.

In this work, we cannot speak only about the pathogenicity of the isolate without taking into account the varietal resistance of the tested bread wheat cultivars. This parameter plays a very important role and influences a lot on the results. *F. cerealis* being the most aggressive towards cv. Bordj Mehis (Figure 5), while cv. Nif Encer and Madracen showed higher resistance, this useful information will benefit breeding programs aimed at increasing resistance of cultivars to reduce the devastating effects of FCR in bread wheat in Algeria and worldwide. Our findings highlight the importance of searching for new *Fusarium* species in FCR-infected wheat samples, as well as the need for further research into other *Fusarium* species that may pose a threat to wheat cultivation in Algeria.

5. Conclusion

For the first time *F. cerealis* was found on wheat in Algeria and its pathogenicity was demonstrated on nine bread wheat varieties. Seed germination and coleoptile length were both reduced. *F. cerealis* had a negative impact on the vegetative system's fresh weight. In addition, cvs Akhamokh, Nif Encer and Ain Abid showed important FCR tolerance among the cultivars tested. They can be a very promising source of genetic resistance to Fusarium wilt in breeding programs, and an alternative for Algerian farmers to replace susceptible cultivars. The prevalence of *F. cerealis* in wheat fields and their effects on crop productivity should receive particular attention in the study of wheat FCR.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria.

Disclosure statement

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

ORCID

Hamza Bouanaka  <http://orcid.org/0000-0003-0695-0157>

Ines Bellil  <http://orcid.org/0000-0003-2718-3102>

Douadi Khelifi  <http://orcid.org/0000-0001-8139-5064>

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.
- Abdelmagid A, Hafez M, Lawley Y, Adam LR, Daayf F. 2018. First report of *Fusarium cerealis* causing root rot on soybean. *Plant Dis.* 102(12):2638.
- Akinsanmi OA, Mitter V, Simpfendorfer S, Backhouse D, Chakraborty S. 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Aust J Agric Res.* 55(1):97–107.
- Amarasinghe CC, Tittlemier SA, Fernando WGD. 2015. Nivalenol-producing *Fusarium cerealis* associated with *Fusarium* head blight in winter wheat in Manitoba. *Plant Pathol.* 64(4):988–995.
- Bencheikh A, Rouag N, Boutalbi W, Belabed I. 2020a. First report of *Fusarium chlamydosporum* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria. *Plant Prot J.* 9(4):309–324.
- Bencheikh A, Rouag N, Mamache W, Belabed I. 2020b. 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. doi:10.1080/03235408.2020.1804303.
- Benhamou N, Chet I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology.* 86(4):405–416.
- Bottalico A, Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 108(7):611–624.
- Bouanaka H, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A, Khelifi D. 2021a. 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):68.
- Bouanaka H, Bellil I, Khelifi D. 2021b. Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of *Fusarium* Head Blight and Crown Rot in Algeria. *Physiol Mol Plant Pathol.* 115:101683.
- Cummings JA, Myers K, Blachez AF, Bergstrom GC. 2017. First report of *Fusarium* head blight caused by *Fusarium cerealis* in Barley in New York. *Plant Dis.* 101:11, 1955. doi:10.1094/PDIS-05-17-0752-PDN
- DE Nijs M, Soentoro POP, Asch ED-V, Kamphuis H, Rombouts FM, Notermans SHW. 1996. Fungal infection and presence of DON and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. *J Food Prot.* 59(7):772–777.

- Desjardins AE, Jarosz AM, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW, Jurgenson JE. 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from small holder farms in Nepal. *J Agric Food Chem.* 52(20):6341–6346.
- Fellahi Z, Hannachi A, Bouzerzour H, Boutekrabi A. 2013. Line × tester mating design analysis for grain yield and yield related traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int J Agron.* 2013:Article ID 201851.
- Gagkaeva TY. 2010. Phytopathogenic fungus *Fusarium cerealis* in Russia. *Microbiology.* 79(4):553–560.
- Gao J, Wang Y, Guan Y, Chen C. 2014. *Fusarium cerealis*, a new pathogen causing ginseng (*Panax ginseng*) root rot in China. *Plant Dis.* 98(10):1433.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 2(2):113–118.
- Goodwin DC, Lee SB. 1993. Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques.* 15:438–444.
- Hudec K. 2007. Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. *Biologia.* 62(3):287–291.
- Ichinoe M, Kurata H, Sugiura Y, Ueno Y. 1983. Chemotaxonomy of Gibberellazae with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl Environ Microbiol.* 46(6):1364–1369.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16(2):111–120.
- Kwaona H, Chelkowski J. 1988. Occurrence of *Fusarium crookwellense* in Poland. *Acta Mycol.* 24:173–177.
- Laraba I, Boureghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obanor F, Moretti A, Geiser DM, Kim H-S, McCormick SP, Proctor RH, et al. 2017. Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol.* 103:34–41.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell Publishing Ltd 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470278376.fmatter/pdf>.
- Shan L, Zhang J, Ma1 N, Dai X, Guo W. 2017. First report of maize stalk rot disease caused by *Fusarium cerealis* in Yunnan, China. *Plant Dis.* 102:2, 444. doi:10.1094/PDIS-07-17-0967-PDN
- Logrieco A, Bottalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur J Plant Pathol.* 109(7):645–667.
- Matny ON. 2015. *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. *Adv Plants Agric Res.* 2(1):38–43.
- McKinney HH. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res.* 26:195–217.
- Mielniczuk E, Kicana I, Perkowski J. 2004. Susceptibility of Oat Genotypes to *Fusarium crookwellense* burgess, nelson and toussoun infection and mycotoxin accumulation in kernels. *Biologia.* 59(6):809–816.
- Miller JD. 1994. Epidemiology of *F. graminearum* diseases of wheat and corn. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin.* St Paul, MN: Eagan Press; p. 19–36.
- Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, Lillemo M, Viccars L, Milne R, Periyannan S, et al. 2015. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nat Genet.* 47(12):1494–1498.

- Pethybridge SJ, Hay FS, Wilson CR, Sherriff LJ, Leggett GW. 2001. First report of *Fusarium crookwellense* causing tip blight on cones of hop. *Plant Dis.* 85(11):1208.
- Pieczul K, Świerczyńska I, Byczkowska K, Perek A, Drapikowska M. 2018. First report of *Fusarium cerealis* on *Anthoxanthum aristatum* Boiss in Poland. *J Plant Pathol.* 100(3):601–601.
- Prończuk M, Prończuk S, Messyasz M. 1991. Pathogenicity of *Fusarium* spp. contributing to the stalk rot of maize in Poland. *Mycotox Res.* 7(S2):97–101.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74(12):5463–5467.
- Schiwek S, Beule L, Vinas M, Pfordt A, von Tiedemann A, Karlovsky P. 2020. High-resolution melting (HRM) curve assay for the identification of eight *Fusarium* species causing ear rot in maize. *Pathogens.* 9(4):270.
- Schmale DG, Wood-Jones AK, Cowger C, Bergstrom GC, Arellano C. 2011. Trichothecene genotypes of Gibberellazae from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathol.* 60(5):909–917.
- Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Canalès R, Suffert F, Lannou C. 2014. Effect of wheat spike infection timing on fusarium head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol.* 63(2):390–399.
- Srobarova A, Slikova S, Sudyova V. 2008. Diversity of the *Fusarium* species associated with head and seedling blight on wheat in Slovakia. *Biologia.* 63:332–337.
- Sugiura Y, Saito H, Tanaka T, Tanaka T, Ichinoe M, Ueno Y. 1994. *Fusarium crookwellense*, a newly isolated fungus from wheat in Japan: its mycotoxin production and pathogenicity to wheat and barley. *Mycoscience.* 35(1):77–82.
- Tan MK, Simpfendorfer S, Backhouse D, Murray GM. 2004. Occurrence of Fusarium head blight (FHB) in southern NSW in 2000: identification of causal fungi and determination of putative chemotype of *Fusarium graminearum* isolates by PCR. *Austral Plant Pathol.* 33(3):385–392.
- Touati-Hattab S, Barreau C, Verdal-Bonnin M-N, 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.
- Wakuliński W. 1989. Phytotoxicity of *Fusarium* metabolites in relation to pathogenicity. In: *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelkowski J, ed.). Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam; p. 257–269.
- Wang B, Brubaker CL, Burdon JJ. 2004. *Fusarium* species and *Fusarium* Wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia. *Mycol Res.* 108(Pt 1):35–44.
- Yekkour A, Toumatia O, Meklat A, Verheecke C, Sabaou N, Zitouni A, Mathieu F. 2015. Deoxynivalenol-producing ability of *Fusarium culmorum* strains and their impact on infecting barley in Algeria. *World J Microbiol Biotechnol.* 31(6):875–881.
- Yli-Mattila T, Gagkaeva T. 2010. Molecular chemotyping of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. In: Gherbawy Y, Voigt K, editors. *Molecular Identification of Fungi*. Berlin, Germany: Springer Verlag; p. 159–177.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14(6):415–421.
- Zhang H, Chen W, Xu J, Xu J, Feng J. 2011. First report of *Fusarium cerealis* causing Fusarium head blight on barley in China. *Plant Dis.* 95(6):774.

CHAPITRE 3 : Test de la résistance variétale chez le blé dur

CHAPITRE 3 : Test de la résistance variétale chez le blé dur

Préambule

La pourriture fusarienne du collet (FCR) et la brûlure de l'épi (FHB) sont deux maladies fongiques graves du blé dur dans le monde mais aussi en Algérie, où des quantités énormes de blé sont cultivées et consommées traditionnellement sous forme de semoule et de pain.

L'absence de fongicides totalement efficaces pour lutter contre ces deux maladies nous oblige à chercher d'autres mesures d'atténuation, telles que l'utilisation de cultivars résistants. Le défi majeur des sélectionneurs des cultivars de blé est de développer des produits à la fois résistants à la fusariose mais aussi productifs. Bien qu'il n'existe pas de variétés de blé totalement résistantes, l'utilisation de variétés présentant un certain degré de résistance reste la méthode la plus fiable et la plus rentable pour lutter contre cette maladie.

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'utilisation de plusieurs méthodes et paramètres pour l'évaluation de la résistance variétale des variétés de blé dur largement cultivés en Algérie contre la fusariose du collet et la brûlure de l'épi.

Dans ce troisième chapitre, les mesures des différents standards principaux (AUDPC1, DS, AUDPC2) et des paramètres supplémentaires (%GI, %TKWloss, %FDK) dérivés de trois essais de résistance/ susceptibilité de 8 géotypes de blé dur largement cultivés en Algérie contre la FCR et la FHB, la corrélation et comparaison des résultats de ces deux maladies ainsi que le classement des 8 cultivars en fonction de leur sensibilité à la FCR et à la FHB et les deux à la fois sont présentés dans **un article publié en 2021 dans le journal « *Physiological and Molecular Plant Pathology* ».**

Une souche hautement pathogène de *Fusarium culmorum* (FC11 : MW151664/MW149489), reconnue comme agent causal commun des deux maladies en Algérie a été utilisée dans trois tests de sensibilité. Plusieurs paramètres phénotypiques ont été mesurés, le test en boîte de Pétri avec le paramètre du pourcentage d'inhibition de la germination (%GI) pour la résistance à la germination, et la norme AUDPC1 pour la résistance à l'infection initiale des graines germées, le second test a été l'inoculation du collet dans la chambre de culture avec la norme de DS pour la résistance à la FCR, et l'inoculation de l'épi dans la serre avec la norme AUDPC2 pour mesurer la résistance à la fusariose. D'autres paramètres supplémentaires ont été mesurés après la récolte.

Les résultats ont montré que tous les cultivars ont une sensibilité dès le 3 DAI vis-à-vis du pathogène FC11, avec une diminution du nombre des graines germées. Les résultats de l'essai d'inoculation du collet dans la chambre de culture évalué en pourcentage de l'indice de maladie ont montré que tous les cultivars ont été sensibles vis-à-vis de *F. culmorum* (FC11). Pour la sensibilité à la FHB, tous les cultivars ont montré une sensibilité envers FC11, Bousselem et Simeto sont les premiers géotypes qui ont atteints le stade floraison, alors que Cirta et Sétifis sont les plus tardives, le cv. Hogar avec son caractère phénotypique a montré un échouage rapide et complet de l'épi, mais par conséquent une augmentation inattendue du TKW.

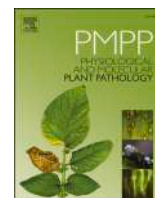
Concernant l'effet du FC11 sur les propriétés physiques du grain, une différence remarquable dans les moyennes arithmétiques et géométriques a été enregistrée dans tous les cultivars testés. Cette diminution de D_a et D_g est due principalement à la diminution de leurs deux dimensions linéaires à savoir la largeur W et l'épaisseur T du grain.

Les résultats ont révélé qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les différents paramètres, sauf le %GI et l'AUDPC1 avec une corrélation hautement significative ($r=0.972$, $P < 0.001$). Ce résultat indique qu'un test *in vitro* simple, facile et reproductible en boîte de Petri peut être utilisé pour prédire la résistance variétale de différents cultivars de blé dur contre l'infection initiale des semences par *F. culmorum*. D'autre part, le cv. Setifis a montré les plus hauts niveaux de résistance avec les valeurs de sensibilité les plus basses dans tous les tests AUDPC1=25.61%, DS=48.75%, et AUDPC2=11.97%, donc il peut être une source très prometteuse de résistance génétique au FCR et au FHB dans les programmes de sélection, et une alternative pour les agriculteurs. Cette étude a mis en évidence la complexité des tests de résistance au FCR et au FHB et a démontré la nécessité d'utiliser autant de protocoles et de tests pour l'évaluation de la résistance variétale.

Article 3. Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium head blight and crown rot in Algeria

Hamza Bouanaka^a, Ines Bellil^{a,*}, Douadi Khelifi^{a,b}

Physiological and Molecular Plant Pathology 115 (2021) 101683



Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium head blight and crown rot in Algeria

Hamza Bouanaka^a, Ines Bellil^{a,*}, Douadi Khelifi^{a,b}

^a Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000, Constantine, Algeria

^b École Nationale Supérieure de Biotechnologie, Pôle Universitaire, Nouvelle Ville Ali Mendjeli Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Triticum durum
Fusarium culmorum
Resistance
Cultivar
Test

ABSTRACT

This research was conducted to evaluate multiple methods and parameters for assessment of varietal resistance of durum wheat against FCR and FHB. *Fusarium culmorum* was used in three susceptibility tests. Several phenotypic parameters (%GI, AUDPC1, DS, AUDPC2, %TKWloss, %FDK) were measured. Results revealed no significant correlation between the different parameters, except %GI and AUDPC1. This result indicates that *in vitro* Petri dish test can be used to predict the varietal resistance against the initial seed infection by *F. culmorum*. This study highlighted the complexity of resistance testing for FCR and FHB, and demonstrated the need to use as many resistance testing protocols as possible.

1. Introduction

FCR and FHB are two serious fungal diseases of wheat (*Triticum durum* Desf) in the world but also in Algeria, where huge quantities of durum wheat are grown and traditionally consumed in the form of semolina and bread [1]. FCR is a serious disease characterized by necrosis and dry rot of the crown, basal tissue of the stem and root, colonization of vascular tissue by hyphae, abortion of the tillers, and formation of white spots with shriveled kernels. Initial infection of seedlings is characterized by brown lesions, which become apparent in the crown, as well as an increased degree of stem discoloration and extends within the leaf and stem sheaths [2,3].

FHB is a complex and damaging disease of wheat and other cereals such as barley and corn, symptoms include necrosis, head bleaching and shriveled kernels. Flowering is the most suitable stage for wheat infection, known as the susceptibility window [4]. During FHB infection, the plant rachis become blocked, preventing the supply of water and nutrients as a defense mechanism, and causing sudden wilting of the spikelets [5,6].

Fusarium species are among the dangerous cereal pathogens with a high toxicity potential. The secondary metabolites of these fungi, such as

deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and fumonisin B1, are among the five most important mycotoxins in Europe and worldwide [7]. In Algeria, the investigations have revealed that strains of *F. culmorum* in addition to yield losses cause the accumulation of various mycotoxins such as 3-acetyl deoxynivalenol (3ADON) or nivalenol (NIV) [8–10]. Products made from mycotoxin contaminated crops will be cheaper than healthy products, resulting in a significant loss to the producer. FCR and FHB mycotoxins can cause many illnesses to consumers, whether human or animal, such as cancer, immunosuppression, fertilization troubles, abortion, etc ... [11].

F. pseudograminearum is the dominant pathogen associated with FCR in Jiangsu and Shandong provinces in China [12], but *F. culmorum* is the most common causal agent of FCR in Turkey [13]. It is also one of the most important species present in soil and residues in Tunisia [14]. *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* and *Microdochium nivale* are among the most common FHB species in Europe and China. The selective pressure exerted by the extensive use of *Fusarium* specific fungicides may influence the population dynamics of *Fusarium* species due to their different susceptibility [15,16]. Studies on the species associated with these two diseases in Algeria, showed the existence of six fungal species isolated from crowns: *Fusarium culmorum* (68%),

Abbreviations: FCR, Fusarium Crown Rot; FHB, Fusarium Head Blight; %GI, the Germination Inhibition percentage; AUDPC, the Area Under the Disease Progress Curve; DS, Disease Severity; %TKWloss, the percentage of Thousand Kernel Weight loss; %FDK, the percentage of Fusarium-Damaged Kernels.

* Corresponding author.

E-mail address: bines07@yahoo.fr (I. Bellil).

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101683>

Received 19 December 2020; Received in revised form 15 June 2021; Accepted 18 June 2021

Available online 19 June 2021

0885-5765/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

Microdochium majus (13%), *F. pseudograminearum* (10%), *F. verticillioides* (3%), and *F. avenaceum* (2%), *Microdochium nivale* (4%), and two species, *F. culmorum* (94,1%) and *F. pseudograminearum* (5,9%), were obtained from the spikes. *F. culmorum* is the dominant and most aggressive species on wheat seedlings associated with FHB and FCR [8].

Although there are no wheat varieties that are fully resistant to FCR, the use of varieties with some degree of resistance is the most reliable and cost-effective method of controlling the disease [17]. New knowledge on gene discovery and development of new cultivars with desirable alleles to improve wheat resistance to FCR [18], are the objectives of many studies. The selection of various sources of varietal resistance requires effective and reproducible screening methods, which should not have negative effects or interaction with other agronomic traits. Significant progress in the identification of Quantitative Trait Locus (QTL) conferring resistance to FCR and in understanding the relationship between FCR and other traits of agronomic importance is being made from wheat and barley. Also, resistance comes from wild relatives, and the effective introgression of useful QTLs of resistance against both FHB and FCR from wild relatives into bread and durum wheat [19,20]. Two parent mapping studies have detected FCR resistance loci on 13 of 21 possible wheat chromosomes of those that are partially resistant genotypes [21].

The lack of fully effective fungicides to control FHB forces us to seek other mitigation measures, such as the use of resistant cultivars. Although breeding for resistance to FHB is one of the most promising strategies for minimizing crop damage, attempts to obtain resistant lines of durum wheat remains a challenge due to its extreme susceptibility to the disease and the low genetic variability available for this trait [22]. These resistant lines are considered essential for integrated fight management of *Fusarium* and the most effective and economical level to control and reduce the damage associated with the disease [23,24].

In Algeria, the cereals and phytosanitary agricultural departments are making a lot of efforts towards the development of profitable varieties, but few of them focus on varietal resistance to diseases. Genotypes already exist and are widely commercialized and can be an important source of resistance genes to both FCR and FHB. The purposes of this study were to: (i) measure the different main standards (AUDPC1, DS, AUDPC2) and additional parameters (%GI, %TKWloss, %FDK), derived from the three resistance/susceptibility trials, of 8 genotypes of durum wheat widely grown in Algeria against FCR and FHB, (ii) correlate and compare the results of both diseases, (iii) classify the 8 cultivars according to their susceptibility to FCR and FHB, each one separately, and both at the same time, based on the results obtained.

2. Material and methods

2.1. Plant material

For the varietal resistance tests, eight durum wheat cultivars were selected, listed in order to their relative importance of use by farmers, over the last 5 years (2014–2019), GTAdur, Cirta, Waha, Simeto, Hogar and Bousselem have been the most cultivated varieties in the province of Constantine, Algeria (Table 1). Ammar6 and Setifis which are widely cultivated in Guelma and Setif (Algerian provinces), respectively, were also evaluated.

Table 1

Durum wheat varieties cultivated in Constantine during 5 companions between 2014 and 2019 expressed by « Quintals » (Algerian Interprofessional Cereals Office 2019).

Durum wheat cultivars	2014–2015	2015–2016	2016–2017	2017–2018	2018–2019	Mean of the 5 companions	Ranking
GTAdur	39087	38035	33115.5	27988.5	30816	33808.4	1
Cirta	22095.5	26484	21587.5	19786	23615.5	22713.7	2
Waha	7347	2850	5427.5	2733	4108	4493.1	3
Simeto	1659	1749	5582	2994	6945	3785.8	4
Hogar	1305	2232.5	678.5	1312	2054.5	1516.5	5
Bousselem	295.5	23.5	335.5	2442.5	3327.5	1284.9	6

2.2. Fungal material and inoculum preparation

All tests were performed using a *Fusarium culmorum* strain FC11 from the laboratory of Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnologies, University of Constantine 1, Algeria. This strain had previously been isolated and morphologically identified [25] and confirmed by molecular analysis using two DNA sequences obtained with internal transcribed spacer 1 (ITS1) and translation elongation factor 1-alpha- (TEF1), submitted to GenBank (NCBI) under accession numbers: MW151664 and MW149489, respectively. For wheat, the FC11 strain has been characterized as highly pathogenic and aggressive.

The inoculum preparation was prepared according to the protocol of Stein et al. [26]. For two months, the FC11 strain was grown on Potato Sucrose Agar (PSA) medium in six Petri dishes. Ten milliliters of sterile distilled water with 0.05% (v/v) Tween-20 were added to the mycelial aerial section on the surface of each dish, and carefully scraped until the entire surface part of the fungus was recovered. The mixture of macroconidia, mycelium and PSA medium was collected in a beaker and stirred with a magnetic rod, then filtered through a double layer of cheesecloth. The concentration of the macroconidial suspension was adjusted to 2×10^7 conidia/ml for the Petri dish test, and 10^7 conidia/ml for the spike inoculation test in greenhouse.

2.3. Petri dish test

The Petri dish test was inspired by the method of Purahong et al. [27] with major modifications. Two hundred and fifty durum wheat seeds from each cultivar were surface sterilized for 8 min with 2% sodium hypochlorite, then rinsed six times with sterile distilled water. For each cultivar, ten 9 cm of diameter Petri dishes with three layers of absorbent paper were used. In each Petri dish, Twenty five healthy seeds have been deposited. Five dishes were inoculated with 10 ml of fungal inoculum FC11, while the other 5 dishes served as controls with 10 ml of sterile distilled water inoculated. Petri dishes were incubated at 25 °C in total darkness. Three days after inoculation (DAI), the germinated seeds in each cultivar's control dishes were counted, and this number was considered 100% germination, as was the same for the five infected dishes of each cultivar, and the number obtained was used to calculate the germination inhibition percentage (GI%) following the equation: $GI \% = 100 - \{(SG_I \times 100) / SG_C\}$ Where SG_I = number of seeds germinated in the infected dishes, SG_C = number of seeds germinated in the control dishes. The GI % value varies from 0% (very resistant, the germinated seeds \geq the control) to 100% (very susceptible, all seeds not germinated at day 3).

The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC1) was used to illustrate the symptoms on already germinated seeds, as well as susceptibility to FC11 initial infection. On Petri dishes infected with FC11 ungerminated seeds or seeds with brown spots on the coleoptiles and/or seeds fully covered by the mycelium were detected and counted every day from 3 to 6 DAI. Disease progression kinetics as percentage of symptomatic seeds (PSS) was evaluated between the first and last scoring. AUDPC1 is calculated following the equation: $AUDPC1 = \left\{ \sum_0^n ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) \right\} / t$, where Y_i is the PSS at the first day of scoring, t

= number of days elapsed between the first and last scoring, and n = total number of scorings. AUDPC1 values are limited from 0 (very resistant, seedlings similar to control) to 100 (very susceptible, all diseased seedlings on day 3). The test will last six days.

2.4. Crown inoculation test in growth chamber

Five surface-sterilized wheat seeds were sown in (8 × 12) cm pots containing a mixture of soil/compost (1/2), which had been sterilized at 180° for 2 h previously (2 repetitions, 24 h apart). Three replicates and two controls (5 pots) were used for each cultivar, and the pots were then placed in the growth chamber (25/19 °C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle). After 3 weeks, when seedlings had reached the two-leaf stage: (Zadoks' GS 12) [28], the soil around the seedlings was removed, and a 7-day-old FC11 PSA plug with a diameter of 13 mm was placed around the stems, 2 cm below the soil, to allow the mycelium to reach the stems' base. The soil was then put back in place around the seedlings; the pots were arranged in a completely random pattern. Three weeks after inoculation (Zadoks' GS 20), each plant was carefully removed from the soil and washed. Severity classes were assigned to the laboratory on a scale of 0–4 (Fig. 1), based on disease symptoms that included brown and necrotic discoloration of crown tissue where: Class 0 = healthy crown; 1 = slight browning of the crown; 2 = browning of half the crown; 3 = complete browning of the crown; and 4 = death of the seedling. The disease severity (DS) for each treatment was calculated using McKinney's index [29], which expresses the percentage of disease severity (i.e., 100) according to the formula: $DS = \{ \sum (c \times f) / n \times N \} \times 100$. Where c = disease class, f = frequency, n = number of observations, and N = the highest value of the empirical scale adopted (class 4). The DS value varies from 0% (very resistant, absence of infected crown) to 100% (very susceptible, all seedlings are dead). Koch's postulates were satisfied by the isolation of FC11 from small or large brown spots on coleoptiles.

2.5. Spike inoculation in greenhouse

AUDPC2 for the incidence of FHB was evaluated by the number of days of observation and calculated as described by Bouanaka et al. [30]. A total of 16 pots (24 × 20 cm) were filled with a sterile soil/compost (1/2), and 20 sterilized seeds of each cultivar were sown (10 seeds in the test pot and 10 in the control pot) below the soil surface at about 2 cm. The plants were grown under controlled environmental conditions in the greenhouse. To prevent water stress, the soil was watered every 3 days until harvest. The spikes are inoculated between 1 and 3 days after the emergence of the first anthers at the flowering stage (Zadoks' GS 60) of each whole spike. Thus FC11 macroconidial suspension with a concentration of 2×10^7 macroconidia/ml was prepared as indicated in fungal material and inoculum preparation, and stored at 4 °C until inoculation. To recognize the start of flowering each spike was labeled at the exit of the first anthers. A sprayer was used to inoculate the spikes; about 1 ml of suspension was used on either side of the spike in a Plexiglas cage to avoid cross contamination. Spikes were then wrapped in a clear covered with a transparent polyethylene bag for 72 h to preserve optimum

relative humidity, which is critical for fungal growth in the early stages. Fifteen days after inoculation, a visual disease assessment was performed on each spike by counting the percentage of symptomatic spikelets (PSS) of each inoculated spike; approximately 8–10 spikes were noted in each pot. Within the same genotype, flowering did not occur at the same time due to the variability and specificity of cultivars (inter and intra-genotype). Spike PSS scoring was performed separately for each spike, with 5 readings separated by 4 days, showing of the disease's kinetics over a period of around 20 days. AUDPC2 illustrates the kinetics of disease progression in PSS between the first and last scoring. $AUDPC2 = \{ \sum_0^n [(Y_i + Y_{i+1})/2] \times (t_{i+1} - t_i) \} / \{ t_n - t_0 \}$. Where Y_i is the PSS at the first day of scoring, t_i is the number of days elapsed between inoculation and the last scoring, t_0 number of days elapsed between inoculation and the 1st scoring and n is the total number of scoring.

2.6. Physical properties of the grain

The Percentage of Thousand Kernel Weight loss (%TKW_{loss}) and the percentage of Fusarium-Damaged Kernels (%FDK) were measured. Each spike was harvested when it reached maturity. The spikes were manually shelled to retrieve all of the kernels, including the mummified kernels which are very small and adhere to the husks (Fig. 2). To calculate the thousand kernel weight inoculated (TKW_I) of the inoculated spikes and the thousand kernel weight control (TKW_C) of each genotype, all kernels were counted and weighed. The number of kernels per genotype ranged between 300 and 400. To estimate the yield loss percentage caused by FC11, the percentage of thousand kernel weight loss (%TKW_{loss}) was calculated using the following equation: $TKW_{loss} = 100 - \{ (TKW_I \times 100) / TKW_C \}$

Then the healthy and Fusarium-damaged kernels of each genotype were identified and counted to define the Fusarium-Damaged Kernels Percentage (%FDK). Koch's postulates were satisfied by re-isolating the pathogen FC11 from the infected kernels. The impact of *Fusarium* on the grain's physical properties was also investigated. Each cultivar's grains (control and infected) were manually washed, broken and shriveled kernels were removed. To calculate the average grain size, ten grains were chosen at random and their three linear dimensions, length L, width W, and thickness T, were measured using digital caliper 0–150 mm with a precision of 0.01 mm. The mean grain diameter was calculated using the arithmetic mean (Da) and the geometric mean (Dg) of the three axial dimensions according to the following relationships [31]: $Da = (L + W + T) / 3$ and $Dg = (LWT)^{1/3}$.

2.7. Statistical analysis

Data analyses, graphs, tables, and descriptive statistics (mean, standard deviation and variance) of the AUDPC2 were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics version 25), the correlations between the different parameters were determined by Pearson correlation, and the coefficients of the correlations were found to be significant at the 5% level ($P \leq 0.05$).



Fig. 1. The different disease classes observed on the wheat crown in crown inoculation test with *F. culmorum* in growth chamber after 21 DAI (0: control).



Fig. 2. Photos illustrate (a) Healthy spike control. (b) Spike infected by *Fusarium*. (c) Seeds shelled manually. (d) Control kernels on top, *Fusarium* kernels on bottom. (e) Wheat kernels classified according to their Fusarios appearance after inoculation with *Fusarium culmorum*, (e1*) Healthy kernel of the control, (e6*) Very small kernel well stuck to the glume.

3. Results

3.1. Germination susceptibility

All cultivars were susceptible to the pathogen FC11 as early as the 3 DAI, with a decrease in the number of germinated seeds; each genotype was compared to its own control. Setifis was the genotype that demonstrated the most significant tolerance not only in germination but also to the initial infection of the germinated seeds with a susceptibility of 18.94% and 25.61% for GI and AUDPC1, respectively. The cv. Hogar was the most susceptible with GI% = 52.17% and AUDPC1 = 63.21% (Table 2).

3.2. Susceptibility to FCR

The results of the crown inoculation test in growth chamber, which were expressed as a percentage of disease index, revealed that all cultivars were susceptible to *F. culmorum* (FC11), with no seedlings having disease class 0 (Fig. 1). Susceptibility values were very similar ranging

Table 2
Standards and parameters obtained from the three tests on eight durum wheat varieties.

Wheat cultivars	Standards and parameters of the 3 tests by wheat cultivars					
	GI%	AUDPC1	DS	AUDPC2	TKW _{loss} %	FDK %
Ammar6	37.37	44.27	71.25	46.31	24.86	19.90
Bousselem	33.98	38.50	62.50	14.54	11.17	14.75
Cirta	25.51	33.16	56.25	68.39	32.98	29.94
GTAdur	29.16	36.10	57.50	46.01	-13.98	44.54
Setifis	18.94	25.61	48.75	11.97	32.96	27.91
Simeto	28.72	41.84	55.00	54.23	49.81	71.23
Hogar	52.17	63.21	58.75	72.58	-20.50	9.28
Waha	38.00	46.50	62.50	69.25	7.04	1.56

%GI: the Germination Inhibition percentage; AUDPC: the Area Under the Disease Progress Curve; DS: Disease Severity; TKW_{loss}%; the percentage of Thousand Kernel Weight loss; FDK%: the percentage of Fusarium-Damaged Kernels.

from 48.75% for cv. Setifis to 71.25% for cv. Ammar6. Three of the eight cultivars (Ammar6, Waha and Bousselem) were found to be substantially more susceptible than cv. Simeto which was used as a positive control to evaluate sensitivity accuracy.

Setifis, Cirta and GTAdur cultivars were tolerant with an AUDPC1 of 25.61%, 33.16%, and 36.10%, respectively, Bousselem and Simeto showed moderate tolerance (MT) with values of 38.5% and 41.84%, respectively, while Ammar6 and Waha were moderately sensitive (MS), with AUDPC1 of 44.27%, and 46.5%, respectively. The cultivar Hogar was sensitive (S) with the highest score of 63.21% (Table 2).

3.3. Susceptibility to FHB

All cultivars showed sensitivity towards FC11. Bousselem and Simeto were the first genotypes reaching the flowering stage, while Cirta and Setifis were the latest ones. The cv.Hogar with its phenotypic character (short and inapparent anthers at flowering stage), showed a rapid and complete scalding of the spike (Table 2).

Setifis and Bousselem genotypes were tolerant with an AUDPC2 of 11.97% and 14.54%, respectively. The two cultivars GTAdur and Ammar6 were classified moderately sensitive with very close values (46.01% and 46.31%, respectively). Hogar, Waha and Cirta genotypes

Table 3
Mean, standard deviation and variance of the Area under the Disease Progress Curve 2 (AUDPC2 determined by greenhouse spike inoculation test) of 8 durum wheat cultivars after inoculation with *Fusarium culmorum* (FC11).

Genotypes	Mean	Standard deviation	Variance	Maximum	Minimum
Ammar6	46.31	33.97	1153.78	91.56	16.25
Bousselem	14.54	12.13	147.07	45.00	1.88
Cirta	68.39	20.64	426.14	93.75	43.04
GTA dur	46.01	12.69	161.15	65.00	31.25
Setifis	11.97	19.72	388.99	60.07	.00
Simeto	54.23	16.79	281.94	76.63	30.63
Hogar	72.58	7.99	63.82	90.29	63.75
Waha	69.25	6.24	38.96	82.35	63.60

were classified sensitive with an AUDPC2 of 72.58%, 69.25% and 68.39% (Table 3).

3.4. Correlation between the different parameters

A correlation study is important to know the links between the different parameters. The results in Fig. 3 and Table 4 showed a very significant correlation ($P < 0.001$) determined by Pearson correlation coefficient, between Germination Inhibition percentage and AUDPC1.

3.5. Susceptibility to FCR and FHB

The average of the main susceptibility standards (AUDPC1, DS, AUDPC2) resulting from the three previous tests was used to rank tested durum wheat cultivars according to their susceptibility to the *F. culmorum* pathogen. The result is shown in Fig. 4. According to the classification in increasing order of pathogen susceptibility, the cultivar Setifis is the most resistant to the pathogen, followed by Bousselem, GTAdur, Ammar6, Simeto, Cirta, Waha, and Hogar cultivar is the most sensitive.

3.6. Effect of *Fusarium culmorum* on grain's physical properties

The cv. Simeto records the highest $TKW_{loss}\%$ (49.81), and the highest FDK% (71.23) which seems logical. It is the same for the cultivars Cirta, Setifis, Ammar6 and Bousselem. An unexpected increase in TKW was registered for GTAdur and Hogar with a negative $TKW_{loss}\%$ (-13.98, -20.50, respectively). So kernel weight was not affected by the FHB (Table 2).

A remarkable and general difference in the arithmetic and geometric means is recorded in all cultivars tested, Da control \bar{D} a infected and Dg control \bar{D} g infected (Table 5). This decrease in Da and Dg is mainly due to the decrease of their two linear dimensions. The difference in length is not statistically significant (Table 5).

4. Discussion

A major and continuing challenge for durum wheat breeders in wheat producing countries, including Algeria, is to provide cultivars with a high level of resistance to both FCR and FHB, which significantly reduces yield loss and mycotoxin accumulation. Most of durum wheat varieties currently grown in Algeria do not have enough data concerning their level of resistance/sensitivity against Fusarium wilt. This lack of information is due to the fact that few studies have been carried out on

this subject. The objective of this study was to identify the resistance of 8 durum wheat genotypes, mostly grown in eastern Algeria, to *F. culmorum*, the common pathogen and the main cause of FCR and FHB, using different measurement parameters, and to compare their efficacy.

FCR is much more frequent in Algeria than FHB, at least for the wheat producing inland regions, far from the Mediterranean. This situation is far from being fixed since Sutton [32], Jelinek et al. [33] and Xu and Nicholson [34] confirmed that the risks of infection are associated with hot and humid conditions. The severity of FHB generally varies from year to year and from region to region.

The climate changes with the increase in rainfall and temperature during flowering make Algeria exposed to FHB invasions, and oblige us to do more experiments on the susceptibility of the different cultivars for more control and to promote this struggle against FHB before it is too late.

In Algeria, few studies have been published on Fusarium affecting wheat. Hadjout et al. [22], in their experiments on the varietal resistance to FHB of two lines obtained from a breeding programme, based on crosses involving cultivars from Europe and Syria tested in Algeria, four different strains of *F. culmorum* were inoculated by spraying. The results showed that both lines were significantly less affected by FHB than commercial cultivar set. They demonstrated significant resistance to *Fusarium* both to initial infection and disease spread, and to mycotoxin accumulation. Touati-Hattab et al. [9] analyzed a panel of four durum wheat and four bread wheat varieties grown in Algeria, and two new durum wheat lines. Results showed a correlation between the level of kernel invasion and the amount of toxins accumulated with a high diversity according to cultivars. Interestingly, the two new durum wheat lines showed a promising level of resistance to FHB with significantly lower trichothecene accumulation.

In this study, we also used *F. culmorum* as a pathogen to assess the susceptibility of 8 durum wheat genotypes widely cultivated in north-east Algeria, among them, one genotype of Italian origin "Simeto" recognized for its susceptibility to Fusarium head blight, is used as a point of comparison for the 7 other local genotypes, whose their sensitivity to FHB is poorly known. All standards and parameters used in this study were estimated in percentages order to compare them (%GI, AUDPC1, DS, AUDPC2, %TKW_{loss}, %FDK), and to facilitate reading, where (0% = total resistance, 100% = total sensitivity). All tests have been performed under controllable conditions in laboratory, growth chamber or greenhouse, in order to reduce the variability associated with environmental factors that can distort the results, as proven by Wallwork et al. [35]. Field trials are often unreliable due to uneven natural infection, contamination by other pathogens or adverse environmental conditions that affect results.

There is no significant correlation between the different parameters, except %GI and AUDPC1 ($r = 0.972$, $P < 0.001$) (Table 4), (Fig. 3). This correlation allows us to minimize the time and calculations in only 3 days instead of 6. The %GI parameter can be used as an alternative to the AUDPC1 standard, and confirms that the reduction of the germination rate is strongly involved in varietal sensitivity of durum wheat against *F. culmorum*. The Petri dish test can be used both for the evaluation of the varietal resistance of durum wheat but also for the quantification of the aggressiveness of the pathogen. It was originally described by Meserhazy [36] and modified by Purahong et al. [27]. The latter disclosed that this test is rapid, reliable and stable with different durum wheat cultivars and gives very significant correlation coefficients with those obtained using adult plants in the growth chamber and in the field ($r = 0.94$, $P < 0.001$ and $r = 0.65$, $P < 0.001$, respectively).

Nevertheless, our results for resistance to initial infection (%GI, AUDPC1) were in complete agreement with those found by Bencheikh et al. [37], where they found that Bousselem and Waha varieties were more susceptible to infection with *Fusarium equiseti* as a pathogen, with a rate of reduction in coleoptile length of 48.99% and 41.59%, respectively compared to GTAdur variety which had a reduction rate of 34.99%.

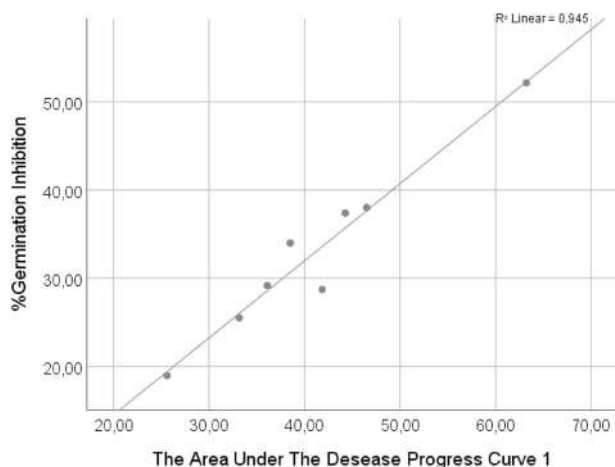


Fig. 3. Simple Scatter represents correlations between Germination Inhibition (GI %) and The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC1). $n = 8$, $r = 0.972$, $P < 0.001$, determined by Pearson correlation coefficient.

Table 4
The different correlations between the parameters measured using Pearson correlation.

		AUDPC1	DS	AUDPC2	% TKW _{loss}	% FDK	% GI
AUDPC1	Pearson Correlation	1	.444	.624	-.549	-.356	.972**
	Sig. (2-tailed)		.270	.098	.159	.387	.000
DS	Pearson Correlation	.444	1	.202	-.215	-.425	.557
	Sig. (2-tailed)	.270		.631	.610	.294	.152
AUDPC2	Pearson Correlation	.624	.202	1	-.232	-.078	.526
	Sig. (2-tailed)	.098	.631		.580	.855	.181
% TKW _{loss}	Pearson Correlation	-.549	-.215	-.232	1	.506	-.651
	Sig. (2-tailed)	.159	.610	.580		.200	.081
% FDK	Pearson Correlation	-.356	-.425	-.078	.506	1	-.517
	Sig. (2-tailed)	.387	.294	.855	.200		.189
% GI	Pearson Correlation	.972**	.557	.526	-.651	-.517	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.152	.181	.081	.189	

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

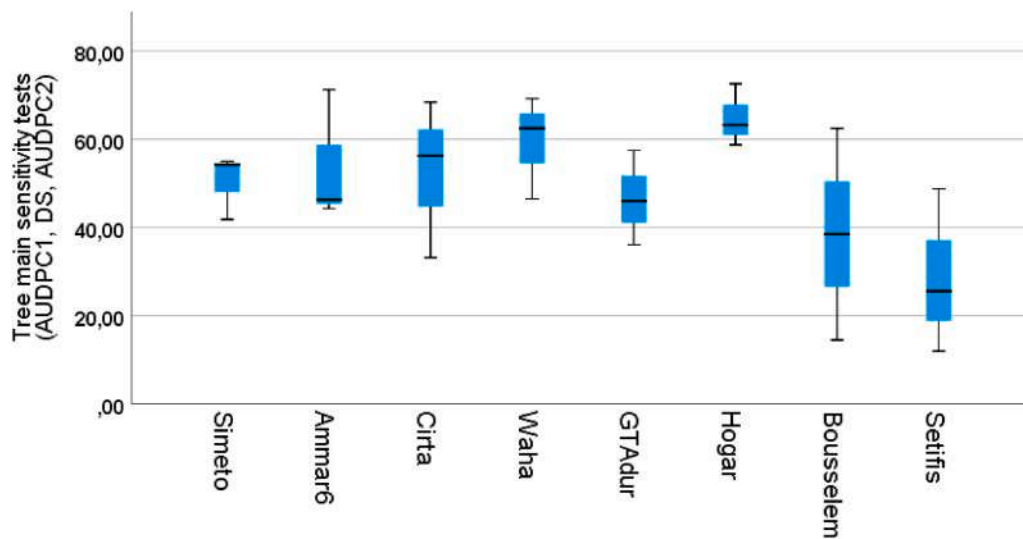


Fig. 4. Simple Boxplot of three main susceptibility tests (AUDPC1, DS, and AUDPC2) per the 8 wheat genotypes. Statistical analyzes were performed at a confidence level of 0.95 ($P < 0.05$).

Table 5
Comparison between control and FC11 infected kernels of the mean physical properties of the grains of the 8 cultivars tested.

State	Length \pm Std Deviation (mm)		Width \pm Std Deviation (mm)		Thickness \pm Std Deviation (mm)		Arithmetic mean Da		Geometric mean Dg	
	Infected	Control	Infected	Control	Infected	Control	Infected	Control	Infected	Control
Simeto	8.11 \pm 0.52 ^{ab}	8.58 \pm 0.30 ^b	1.89 \pm 0.42 ^a	3.19 \pm 0.17 ^{bcd}	2.28 \pm 0.35 ^a	3.56 \pm 0.13 ^d	4.09	5.11	3.26	4.60
Ammar6	7.37 \pm 0.63 ^a	7.57 \pm 0.40 ^a	2.30 \pm 0.22 ^{abc}	3.05 \pm 0.17 ^{bc}	2.37 \pm 0.24 ^a	2.97 \pm 0.20 ^a	4.01	4.53	3.42	4.09
Cirta	7.75 \pm 0.41 ^{ab}	7.92 \pm 0.31 ^a	2.05 \pm 0.18 ^{ab}	3.06 \pm 0.21 ^{bc}	2.44 \pm 0.24 ^a	3.01 \pm 0.13 ^a	4.08	4.66	3.38	4.17
Waha	7.94 \pm 0.26 ^{ab}	7.88 \pm 0.25 ^a	2.66 \pm 0.18 ^{cd}	3.32 \pm 0.12 ^d	3.02 \pm 0.18 ^{bc}	3.42 \pm 0.17 ^{bcd}	4.54	4.87	3.99	4.47
GTAdur	8.03 \pm 0.77 ^{ab}	8.07 \pm 0.33 ^{ab}	2.29 \pm 0.55 ^{abc}	2.96 \pm 0.12 ^b	2.55 \pm 0.49 ^{ab}	3.12 \pm 0.22 ^{ab}	4.29	4.71	3.60	4.20
Hogar	7.82 \pm 0.22 ^{ab}	7.55 \pm 0.47 ^a	2.89 \pm 0.19 ^d	3.39 \pm 0.11 ^d	3.21 \pm 0.25 ^c	3.45 \pm 0.25 ^{cd}	4.64	4.79	4.17	4.45
Bousselem	8.28 \pm 0.37 ^b	7.99 \pm 0.17 ^a	2.52 \pm 0.32 ^{bcd}	3.23 \pm 0.10 ^{cd}	2.57 \pm 0.34 ^{ab}	3.39 \pm 0.18 ^{bcd}	4.45	4.87	3.77	4.43
Setifis	7.67 \pm 0.22 ^{ab}	7.88 \pm 0.54 ^a	1.85 \pm 0.13 ^a	2.56 \pm 0.16 ^a	2.54 \pm 0.34 ^{ab}	3.16 \pm 0.23 ^{abc}	4.02	4.53	3.30	3.99

The values (mean \pm Std. Deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$).

We note that there are no remarkable differences between the cultivars, since DS values are very close although cv. Setifis recorded the lowest rate of susceptibility to FCR but not far from the other genotypes (Table 2). The results can be explained by the type of inoculation where the mycelial mass was in direct contact with the crown, and the fungus is inoculated with its growth medium PSA, far from environmental constraints. Dhingra and Sinclair [38] found that the addition of adhesive agents such as gelatin, agar, or methylcellulose is advantageous for inoculation in greenhouse and field, to prevent spore drying and to provide nutrients for spore germination. On the other hand, the attack is extremely strong and does not allow differentiation of resistance levels between cultivars, this situation can be avoided by an earlier than

expected reading, the second week instead of the third. Erginbas-Orakci et al. [13] tested three different crown inoculation techniques for FCR (seedling drench, stem base droplet and colonized seed). Disease severity was most significant in the case of seedling drench in conidial inoculum and the method resulted in an adequate level of severity for consistent classification of cultivars in the two experiments for the detection of FCR resistant wheat genotypes in breeding programs.

Contrary to many studies [4,39,40], where the inoculation is done once the spikes reach the flowering stage (Zadoks' GS 65) between 30 and 50% of anthesis with a spore suspension of a concentration of 3×10^4 and 1×10^5 macroconidia/ml, in our study, we use spray inoculation on each spike, taking into consideration the flowering stage of each

individual spike within the same genotype, for more equal and maximum chances of infection and with higher macroconidial concentrations than those usually used ($\geq 10^7$ macroconidia/ml). The effect of different conidial concentrations in inocula was the subject of a study conducted by Francesconi et al. [23] to assess the incidence and severity of FHB. The differences observed were not statistically significant. According to Stein et al. [26] an increase in disease development could be observed with an increasing concentration of conidia until the maximum has been reached and there, the additional inoculum makes no difference. According to Miedaner et al. [41] and Martin et al. [42], spray inoculation is a reliable and desirable method for routine screening for FHB resistance and more likely to mimic natural infection conditions, compared to single floret inoculation.

The analyzed genotypes of durum wheat showed differential responses of FCR and FHB. To our knowledge, there are no published studies on the responses to FCR or FHB of the wheat cultivars studied, except for the cultivar Simeto which was used to assess the aggressivity of *Fusarium* isolates [40,43]. No genotype in the present study was completely resistant to FCR or FHB. Probably, most genotypes quantitatively combine different levels of resistance to both diseases. This supports the hypothesis of Liu et al. [21], that resistance types to FCR and FHB are likely governed by different loci which result in different resistances, despite the fact that the same pathogen is present in the same host. In contrast to this hypothesis, Ceoloni et al. [19] found that a major locus for *Fusarium* diseases resistance can be mapped to the most distal end of Th. elongatum 7 EL and pyramided with Th. Ponticum beneficial genes onto wheat 7DL. According to Canci et al. [44] and Mesterhazy et al. [45], TKW was generally neglected in early wheat breeding programs for FHB resistance; therefore the severity of infection has a strong impact on yield. It is therefore necessary to take TKW into account in the screening protocols for resistance to FHB. Our result revealed the opposite where the AUDPC2 standard is not correlated to % TGW_{loss} with $r = 0.047$ close to zero. This may explain the high variability of FHB symptoms on glumes and kernels, and that yield loss is not always related to the severity of FHB disease, at least for trials conducted on small areas like the pots and on a limited number of the spikes. According to Tundo et al. [46], the same defense gene is able to increase resistance when expressed in floral tissues but not when expressed in kernels.

The genotypes Setifis, Cirta, GTAdur and Bousselem showed the highest levels of tolerance against initial seed infection. The lowest levels of sensitivity to FCR were detected in the cultivars Setifis, Simeto, Cirta and GTAdur (Table 2). The highest tolerance to the spread of FHB was observed in Setifis, Bousselem, GTAdur and Ammar6 genotypes (Table 3).

Gebrerariam et al. [17] assessed the severity of FCR of 165 bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines using an aggressive isolate of *F. culmorum* and using a scale from 1 to 5. These lines were divided into 4 resistance/sensitivity classes. Our genotypes tested for resistance to initial infection of germinated seeds showed that they can be divided into 4 classes also. Three cultivars were tolerant (T) with an AUDPC1 ranging from 25.61% to 36.10%, two cultivars showed moderate tolerance (MT) with values of 38.5% and 41.84%, while two cultivars were moderately sensitive (MS), with AUDPC1 of 44.27% and 46.5%. One cultivar was sensitive (S) with the highest score of 63.21% (Table 2).

Concerning FHB resistance, three classes of tolerance/sensitivity were observed. Two genotypes were T with an AUDPC2 of 11.97% and 14.54%, respectively. Two others cultivars were classified MS with very close values (46.01% and 46.31%, respectively). Three genotypes were classified S (Hogar, Waha and Cirta) and are proposed as a better alternative for their use to evaluate the aggressivity of *F.culmorum* isolates, because they showed a higher sensitivity than cv. Simeto known to be sensitive to FHB (Table 3).

In this work, we have also dealt with the relationship between the two diseases. The results highlight the absence of a link between

sensitivity to FCR and FHB, expressed by the non-significant correlation ($r = 0.202$ and $P = 0.631 > 0.05$). The Comparison of the physical properties (L, W, T) of *Fusarium*-damaged kernels with the control, eliminating the environmental condition factor, shows the negative effect of FC11 on the two linear dimensions; width, W and thickness T. On the other hand, length L was not really affected by FC11 infection (Table 5), knowing that shrunken and immature kernels were eliminated.

Our results highlight the possibility to select a new durum wheat material which is adapted to Algerian climatic constraints and which exhibits a better tolerance to FCR and FHB. However, the stability of this improved tolerance needs to be confirmed by the repetition of inoculation experiments in the environment (years and locations).

5. Conclusion

In conclusion, Petri-Dish Test (easy and fast) allows predicting varietal resistance of different durum wheat cultivars against initial seed infection by *Fusarium culmorum* with an absence of a link between sensitivity to FCR and FHB. In addition, the cultivar Setifis shows very remarkable tolerance in almost all tests and gives the lowest sensitivity rates, thus could be a very promising source of genetic resistance to FCR and FHB in breeding programs, and an alternative for farmers to *Fusarium* sensitive cultivars.

Author contributions

Hamza BOUANAKA : Conceptualization, methodology, Validation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Ines BELLIL** : Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision. **Douadi KHELIFI**: Supervision.

Formatting of funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria.

References

- [1] R. Kezih, F. Bekhouche, A. Merazka, Some traditional Algerian products from durum wheat, *Afr. J. Food Sci.* 8 (2014) 30–34.
- [2] S. Chakraborty, C.J. Liu, V. Mitter, J.B. Scott, O.A. Akinsanmi, S. Ali, S. Simpfordorfer, Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight Management, *Australas. Plant Pathol.* 35 (6) (2006) 643, <https://doi.org/10.1071/AP06068>.
- [3] B. Scherm, V. Balmas, F. Spanu, G. Pani, G. Delogu, M. Pasquali, Q. Migheli, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Mol. Plant Pathol.* 14 (4) (2012) 323–341, <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>.
- [4] A. György, B. Tóth, M. Varga, A. Mesterhazy, Methodical considerations and resistance evaluation against *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* head blight in wheat, Part 3. Susceptibility window and resistance expression, *Microorganisms* 8 (5) (2020) 627, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050627>.
- [5] Z. Kang, H. Buchenauer, Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57 (6) (2000) 255–268, <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0305>.
- [6] A. Kheiri, S.A. Moosawi Jorf, A. Malhipour, Infection process and wheat response to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*, *Eur. J. Plant Pathol.* 153 (2) (2019) 489–502, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1576-7>.

- [7] E. Mielniczuk, B. Skwaryło-Bednarz, *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction, *Agronomy* 10 (4) (2020) 509, <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>.
- [8] N. Abdallah-Nekache, I. Laraba, C. Ducos, C. Barreau, Z. Bouznad, H. Bouregghda, Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness, *Eur. J. Plant Pathol.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01673-7>.
- [9] S. Touati-Hattab, C. Barreau, M.N. Verdal-Bonnin, S. Chereau, F. Richard-Forget, S. Hadjout, Z. Bouznad, 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) (2016) 797–814, <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0869-y>.
- [10] I. Laraba, H. Bouregghda, N. Abdallah, O. Bouaicha, F. Obanor, A. Moretti, K. O'Donnell, Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria, *Fungal Genet. Biol.* 103 (2017) 34–41, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.04.001>.
- [11] O.N. Matny, *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks, *Adv. Plants. Agric. Res.* 2 (1) (2015) 38–43, <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00039>.
- [12] Y.Y. Deng, W. Li, P. Zhang, H.Y. Sun, X.X. Zhang, A.X. Zhang, H.G. Chen, *Fusarium pseudograminearum* as an emerging pathogen of crown rot of wheat in eastern China, *Plant. Pathol.* (2019), <https://doi.org/10.1111/ppa.13122>.
- [13] G. Erginbas-Orakci, G. Poole, J.M. Nicol, T. Paulitz, A.A. Dababat, K. Campbell, Assessment of inoculation methods to identify resistance to *Fusarium* crown rot in wheat, *J. Plant Dis. Prot.* 123 (1) (2016) 19–27, <https://doi.org/10.1007/S41348-016-0001-8>.
- [14] E. Khemir, S. Chekali, A. Moretti, M.S. Gharbi, M.B. Allagui, S. Gargouri, Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia, *Phytopathol. Mediterr.* 59 (1) (2020) 187–201, <https://doi.org/10.14601/Phyto-10827>.
- [15] D. Siou, S. Gélisse, V. Laval, F. Suffert, C. Lannou, Mutual exclusion between fungal species of the *Fusarium* head blight complex in a wheat spike, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 4682–4689, <https://doi.org/10.1128/AEM.00525-15>.
- [16] F. Tini, G. Beccari, A. Onofri, E. Ciavatta, D.M. Gardiner, L. Covarelli, Fungicides may have differential efficacies towards the main causal agents of *Fusarium* head blight of wheat, *Pest Manag. Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1002/ps.5923>.
- [17] E.S. Gebremariam, A. Karakaya, G. Erginbas-Orakci, A.A. Dababat, T.C. Paulitz, Assessment of the seedling resistance of spring wheat lines to *Fusarium culmorum*, *J. Agric. Sci.* (2019), <https://doi.org/10.15832/Ankutbd.466442>.
- [18] J. Jin, S. Duan, Y. Qi, S. Yan, W. Li, B. Li, J. Ma, Identification of a novel genomic region associated with resistance to *Fusarium* crown rot in wheat, *Theor. Appl. Genet.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03577-1>.
- [19] C. Ceoloni, P. Forte, L. Kuzmanović, et al., Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to *Fusarium* head blight and crown rot of wheat on Thinopyrum elongatum 7EL and its pyramiding with valuable genes from a Th. ponticum homoeologous arm onto bread wheat 7DL, *Theor. Appl. Genet.* 130 (2017) 2005–2024, <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2939-8>.
- [20] L. Kuzmanović, G. Mandalá, et al., Equipping durum wheat—thinopyrum ponticum recombinant lines with a thinopyrum elongatum major QTL for resistance to *Fusarium* diseases through a cytogenetic strategy, *Front. Plant Sci.* 10 (2019) 1–17, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01324>.
- [21] C. Liu, F.C. Ogonnaya, Resistance to *Fusarium* crown rot in wheat and barley: a review, *Plant Breed.* 134 (4) (2015) 365–372, <https://doi.org/10.1111/pbr.12274>.
- [22] S. Hadjout, S. Chereau, V. Atanasova-Pénichon, G. Marchegay, L. Mekliche, H. Bouregghda, C. Barreau, S. Touati-Hattab, Z. Bouznad, F. Richard-Forget, Phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* head blight and to mycotoxin accumulation, *J. Plant Pathol.* 99 (3) (2017) 671–680, <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3954>.
- [23] S. Francesconi, A. Mazzaglia, G.M. Balestra, Different inoculation methods affect components of *Fusarium* head blight resistance in wheat, *Phytopathol. Mediterr.* 58 (3) (2019) 679–691, <https://doi.org/10.13128/Phyto-10942>.
- [24] J. Gilbert, S. Haber, Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat, *J. Indian Dent. Assoc.* 35 (2013) 149–174.
- [25] J.F. Leslie, A.B. Summerell, *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing, USA, Ames, 2006, pp. 158–159.
- [26] J.M. Stein, L.E. Osborne, K.D. Bondalapati, K.D. Glover, C.A. Nelson, *Fusarium* head blight severity and deoxynivalenol concentration in wheat in response to *Gibberella zeae* inoculum concentration, *Phytopathology* 99 (6) (2009) 759–764, <https://doi.org/10.1094/phyto-99-6-0759>.
- [27] W. Purahong, D. Alkadri, P. Nipoti, A. Pisi, M. Lemmens, A. Prodi, Validation of a modified Petri-dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat, *Eur. J. Plant Pathol.* 132 (3) (2011) 381–391, <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9883-2>.
- [28] J.C. Zadoks, T.T. Chang, C.F. Konzak, A decimal code for the growth stages of cereals, *Weed Res.* 14 (6) (1974) 415–421, <https://doi.org/10.1111/J.1365-3180.1974.Tb01084.X>.
- [29] H.H. McKinney, Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*, *J. Agric. Res.* 26 (1923) 195–217.
- [30] H. Bouanaka, I. Bellil, W. Harrat, S. Boussaha, A. Benbelkacem, D. Khelifi, 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 (2021) 68, <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3>.
- [31] N.N. Mohsenin, Physical properties of plant and animal materials, *J. Agric. Eng. Res.* 13 (4) (1968) 379, [https://doi.org/10.1016/0021-8634\(68\)90151-0](https://doi.org/10.1016/0021-8634(68)90151-0). Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- [32] J.C. Sutton, Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*, *J. Indian Dent. Assoc.* 4 (2) (1982) 195–209, <https://doi.org/10.1080/07060668209501326>.
- [33] C.F. Jelinek, A.E. Pohland, E. Wg, Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds—update, *J. Assoc. Official. Anal. Chem.* 72 (1989) 223–230.
- [34] X. Xu, P. Nicholson, Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight, *Annu. Rev. Phytopathol.* 47 (1) (2009) 83–103, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>.
- [35] H. Wallwork, M. Butt, J.P.E. Cheong, K.J. Williams, Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants, *Australas. Plant Pathol.* 33 (2004) 1–7.
- [36] A. Mesterhazy, Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties, *Phytopathol. Z.* 93 (1978) 12–25.
- [37] A. Bencheikh, N. Rouag, W. Mamache, I. Belabed, First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria, *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* (2020) 1–17, <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303>.
- [38] O.D. Dhingra, J.B. Sinclair, Basic plant pathology methods, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985, p. 355, <https://doi.org/10.1201/9781315138138>.
- [39] M.R. Fernandez, Y. Chen, Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions, *Plant Dis.* 89 (2) (2005) 164–169, <https://doi.org/10.1094/pd-89-0164>.
- [40] W. Purahong, P. Nipoti, A. Pisi, M. Lemmens, A. Prodi, Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy, *Mycoscience* 55 (1) (2014) 63–69, <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.05.007>.
- [41] T. Miedaner, M. Moldovan, M. Ittu, Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to *Fusarium* head blight in a multi-environment wheat trial, *Phytopathology* 93 (9) (2003) 1068–1072, <https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.9.1068>.
- [42] F. Martin, T. Schoneberg, S. Vogelgsang, J. Vincenti, M. Bertossa, F. Mascher, Factors of wheat grain resistance to *Fusarium* head blight, *Phytopathol. Mediterr.* 56 (2017) 154–166.
- [43] B.S.S. Al-Tovi, R.A. Haleem, Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with crown and root rot of wheat under different conditions, *Innovaciencia* 7 (1) (2019) 1–9, <https://doi.org/10.15649/2346075X.659>.
- [44] P.C. Canci, L.M. Nduulu, G.J. Muehlbauer, R. Dill-Macky, D.C. Rasmusson, K. P. Smith, Validation of quantitative trait loci for *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley, *Mol. Breed.* 14 (2) (2004) 91–104, <https://doi.org/10.1023/b:molb.0000037998.27661.58>.
- [45] A. Mesterhazy, S. Lehoczki-Krsjak, M. Varga, A. Szabo-Hever, B. Toth, M. Lemmens, Breeding for FHB resistance via *Fusarium* damaged kernels and deoxynivalenol accumulation as well as inoculation methods in winter wheat, *Agric. Sci. B.* (2015) 970–1002.
- [46] S. Tundo, M. Janni, I. Moscetti, G. Mandalá, D. Savatin, A. Blechl, R. D'Ovidio, PVP22 accumulation in specific floral tissues but not in the endosperm limits *Fusarium graminearum* infection in wheat, *Mol. Plant Microbe Interact.* 29 (2016) 815–821, <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-16-0148-R>.

CHAPITRE 4 : La résistance variétale chez le blé tendre

CHAPITRE 4 : La résistance variétale chez le blé tendre

Préambule

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est une des plus importantes cultures de base dans le monde entier. En Algérie le blé tendre est cultivé de manière extensive dans les provinces humides et subhumides du nord du pays, afin de satisfaire le besoin de la population. La pourriture fusarienne du collet (FCR) est une maladie grave qui devient une contrainte croissante pour cette culture.

L'absence de fongicides totalement efficaces pour lutter contre la FCR nous oblige à chercher d'autres mesures d'atténuation, telles que l'utilisation de cultivars résistants. Les tentatives d'obtenir des lignées résistantes de blé tendre demeure un défi du fait de son extrême sensibilité à la maladie et de la faible variabilité génétique disponible pour ce caractère. Les lignées résistantes sont considérées comme essentielles en matière de lutte intégrée contre la fusariose et comme le levier le plus efficace et le plus économique pour contrôler et réduire les dommages liés à la maladie.

Dans ce quatrième chapitre, une **revue de synthèse soumise pour publication (sous révision) dans le journal *Annals of Agricultural Sciences* en 2021** présente une vue globale sur l'évaluation de la résistance variétale de 9 cultivars locaux de blé tendre contre *F. culmorum* par l'usage de deux tests *in vitro* (dans l'étuve) et *in vivo* (dans la chambre de culture).

Fusarium culmorum (FC11) identifiée comme souche hautement pathogène avec le numéro d'accèsion MW151664 attribué par GenBank a été utilisé comme agent pathogène dans cette étude. Deux tests de résistance/sensibilité ont été menés sur 9 cultivars (cv) de blé tendre : le test *in vitro* dans l'hôte avec les paramètres suivants : pourcentage d'inhibition de la germination (%GI) pour déterminer la tolérance à la germination des semences et l'AUDPC pour tester la tolérance à l'infection initiale des coléoptiles germés. Dans le test *in-vivo* dans la chambre de culture, le paramètre de sévérité de la maladie (DS) a été utilisé pour tester la capacité des cultivars à tolérer la FCR induite par *F. culmorum*. Les résultats ont montré que tous les cultivars étaient sensibles à FC11 avec une diminution significative du taux de germination et d'émergence des coléoptiles avec des valeurs GI% et AUDPC atteignant 68.35 et 68.98% pour les cv. Boumerzoug et Hidhab, respectivement. Les cv. Bordj Mehis et Ain Abid ont montré une sensibilité significative à *F. culmorum* où la longueur et le poids frais du système végétatif (RCL% et RCW%) ont été négativement affectés jusqu'à 28.66 et 56.66%,

respectivement. Dans ce travail, le cv. Akhamokh a montré un niveau intéressant de tolérance à la FCR parmi les cultivars testés.

**Article 4. Varietal resistance of bread wheat against *Fusarium culmorum*,
the main agent of crown rot.**

Hamza BOUANAKA¹. Ines BELLIL¹. Douadi Khelifi^{1,2}

Annals of Agricultural Sciences, 2021(sous révision)

Article 4. Varietal resistance of bread wheat against *Fusarium culmorum*, the main agent of crown rot

Hamza BOUANKA¹. Ines BELLIL¹. Douadi Khelifi^{1,2}

¹Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria.

²École Nationale Supérieure de Biotechnologie, Pôle Universitaire, Nouvelle Ville Ali Mendjeli Constantine, Algeria.

bouanakahamza@gmail.com, bines07@yahoo.fr, dkhelifi@yahoo.fr

***corresponding author:**

Dr. Ines BELLIL. Email: bines07@yahoo.fr / Tel/Fax: 00213666510247/0021331811523

Abstract

Fusarium crown rot (FCR) is one of the serious wheat diseases. FC11 is one strain among 34 isolates obtained in a previous study, and identified as *Fusarium culmorum* strain highly pathogenic. FC11 was assigned the accession number MW151664 by NCBI GenBank. Two resistance/sensitivity tests were conducted on 9 cultivars (cv) of bread wheat. The *In vitro* test in the oven with the parameters; percentage of germination inhibition (%GI), to determine the tolerance of seedlings germination, and the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) to test the tolerance to the initial infection of germinated coleoptiles. In *in-vivo* test in the growth chamber, the disease severity (DS) parameter used to test the cultivars ability to tolerate FCR induced by *F. culmorum*. The results showed that all cultivars were susceptible to FC11 with a significant decrease in germination and coleoptile emergence rate with GI% and AUDPC values reached up to 68.35, and 68.98% for cv. Boumerzoug and Hidhab, respectively. The cv. Bordj Mehis and Ain Abid showed significant susceptibility to *F. culmorum* where length of vegetative system and fresh weight (RCL% and RCW%) were negatively affected up to 28.66 and 56.66%, respectively. In this work, the cv. Akhamokh showed an interesting level of FCR tolerance among other cultivars tested.

Keywords: *Triticum aestivum*, fungus, phytopathology, wheat, *Fusarium culmorum*

1. Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important staple crops in the world and one of the pillars of global food security (Moore et al. 2015). In Algeria, bread wheat is cultivated extensively in the humid and sub-humid provinces of the north of the country, in order to satisfy the growing needs of the agro-food industries and especially the bakeries producing bread widely consumed by the population.

Fusarium crown rot (FCR) is a serious disease characterized by necrosis and dry rot of the crown, basal stem and root tissue, colonization of vascular tissues by hyphae, abortion of tillers, and formation of white spots with shriveled kernels. The initial infection of seedlings is characterized by brown lesions, which become apparent in the crown, as well as an increased degree of stems discoloration and extends to the interior of the leaf sheaths and stems (Scherm et al. 2013). This disease has become an increasing constraint for wheat production in the world as well as in Algeria (Yekkour et al. 2015).

The lack of fully effective fungicides to control FCR forces us to look for other mitigation measures, such as the use of resistant cultivars. Attempts to obtain resistant lines of bread wheat remain a challenge because of its extreme susceptibility to the disease and the low genetic variability available for this trait (Hadjout et al. 2017). Although there are no wheat varieties that are completely resistant to FCR, the use of varieties with some degree of resistance is the most reliable and cost-effective method of controlling this disease (Francesconi et al. 2019; Gebremariam et al. 2019).

In Algeria, the agricultural departments of cereals and phytosanitary makes a lot of efforts that are oriented towards the development of profitable varieties, but few of them focus on the varietal resistance to diseases (Bouanaka et al. 2021b). The main objective of this study was the evaluation of the varietal resistance of 9 bread wheat local cultivars, using two tests *in vitro* (In oven) and *in vivo* (In growth chamber).

2. Material and Methods

2.1 Fungal material

A coded *Fusarium culmorum* strain (FC11) submitted to the Genbank database (NCBI) under the accession number (MW151664), characterized as the most aggressive among a collection of *Fusarium* phytopathogens of wheat, was selected to perform our tests.

2.2 Inocula preparation

Fungal discs (13mm diameter) of the strain FC11, used in the tube test, was obtained from 7-day-old young cultures on PSA medium. However, the inoculation suspension was prepared according to the protocol of Bouanaka et al. (2021a). Strains FC11 was grown on 6 Petri dishes on PSA medium over a period of 30 days. 10ml of sterile distilled water with 0.05% (v/v) Tween-20 were added to the mycelium aerial part on the surface of each dish, and scraped carefully until all the fungus surface part was recovered. The mixture of macroconidia, mycelium and PSA medium was collected in a beaker and shaken well with a magnetic bar to release the macroconidia from the mycelium and homogenize their

dispersion, then filtered through a cheesecloth double layer. The macroconidial suspension concentration was adjusted to 7×10^6 conidia/ml by Malassez cell.

2.3 FCR varietal tolerance test

Two methods (*in vitro* and *in vivo*) were used to evaluate the varietal tolerance of 9 local bread wheat cultivars; cv. Medracen, El Hachimia, Boumerzoug, Akhamokh, Nif Encer, Arz, Ain Abid, Bordj Mehis and Hidhab, the most commonly grown in the northeast region of Algeria. These cultivars were donated by the National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA).

2.3.1 Germination tolerance test in Petri dishes (*in vitro*)

The petri dish test was performed according to the method of Bouanaka et al. (2021b), 200 bread wheat seeds of each cultivar were surface sterilized with 2% NaClO for 8 min, and then rinsed six times with sterile distilled water. For each cultivar, 8 Petri dishes lined with absorbent paper in a triple layer were used, 25 healthy seeds were placed in each Petri dish, 4 dishes were inoculated with 10ml of the FC11 inoculation suspension (7×10^6 conidia/ml), similarly to the other 4 dishes used as control (10ml sterile distilled water). All dishes were incubated at 28°C in total darkness (in host). Germinated seeds in the 4 inoculated dishes of each cultivar were counted 3 days after inoculation (DAI), and similarly for the 4 control dishes (number considered as 100% germination) (**Figure 1.a**). The percentage of germination inhibition (%GI) was calculated according to the equation:

$$\%GI = 100 - \{SG_I \times 100 / SG_C\}$$

Where SG_I = number of seeds that germinated in the inoculated dishes, SG_C = number of seeds that germinated in the control dishes. The GI value ranges from 0% (highly tolerant cultivar, seeds germinated \geq the control) to 100% (highly susceptible cultivar, all seeds not germinated by day 3).

The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was used to illustrate symptoms on already germinated seeds and thus susceptibility to initial infection by FC11. Ungerminated seeds or seeds with brown spots on the coleoptiles and/or completely covered by mycelium (**Figure 1.b**) were identified on FC11 inoculated Petri dishes counted each day from 3 to 6 DAI. The kinetics of disease progression in percentage of symptomatic seeds (PSS) was assessed between the first and last readings. AUDPC is calculated according to the equation: $AUDPC = \left\{ \sum_0^n \left(Y_i + Y_{i+1} / 2 \right) \right\} / t$

Where Y_i is the PSS at the i th score, t = number of days elapsed between the first and last scores, and n = total number of scores. AUDPCs values are limited from 0 (very resistant, seedlings similar to control) to 100 (very susceptible, all seedlings diseased on day 3).

2.3.2 FCR tolerance test in tube (*in vivo*)

This test was performed according to the method of Bouanaka et al. (2021a). 54 test tubes (14 x 3cm) were filled with 4 cm of cotton. 20ml of distilled water was added to each tube and covered with aluminum foil, then sterilized by autoclaving at 180°C for 2 hours. 270 seeds (30 seeds/ cultivar) were disinfected and rinsed as described in the previous test. Seeds were placed on the wet cotton swab in each test tube (5 seeds/tube). The tubes were closed with clear caps and placed in the host at 28°C for 4 days, where the seedlings reached the one-leaf stage (Zadoks' GS 11: Zadoks et al, 1974). Inoculation was carried out as follows:

For each cultivar, 3 control tubes and 3 inoculated tubes with FC11 (13mm disc).

After inoculation, the tubes were transferred to the growth chamber (25/19°C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle) for 10 days, they were arranged in a complete randomization plan. When seedlings reached the two-leaf stage (Zadoks' GS 12), they were carefully removed from the cotton. FCR severity classes for crown discoloration were assigned in the laboratory on a scale of 0 to 4:

Where Class 0 = healthy crown (**Figure 1.c**); 1 = light crown browning; 2 = half-crown browning; 3 = complete crown browning (**Figure 1.d**); and 4 = seedling death.

Disease severity (DS) of inoculated tubes was calculated using the McKinney's (1923) index, which expresses the percentage of disease severity 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 value of the adopted empirical scale (class 4).

The percentage reduction in length and weight of the coleoptile will be calculated as follows:

$$\%RCL = 100 - (\text{Infected CL} \times 100 / \text{Control CL})$$

$$\%RCW = 100 - (\text{Infected CW} \times 100 / \text{Control CW})$$

All tests were repeated twice in a row. Koch's postulates were satisfied by re-isolating the FC11 pathogen from the infected kernels.

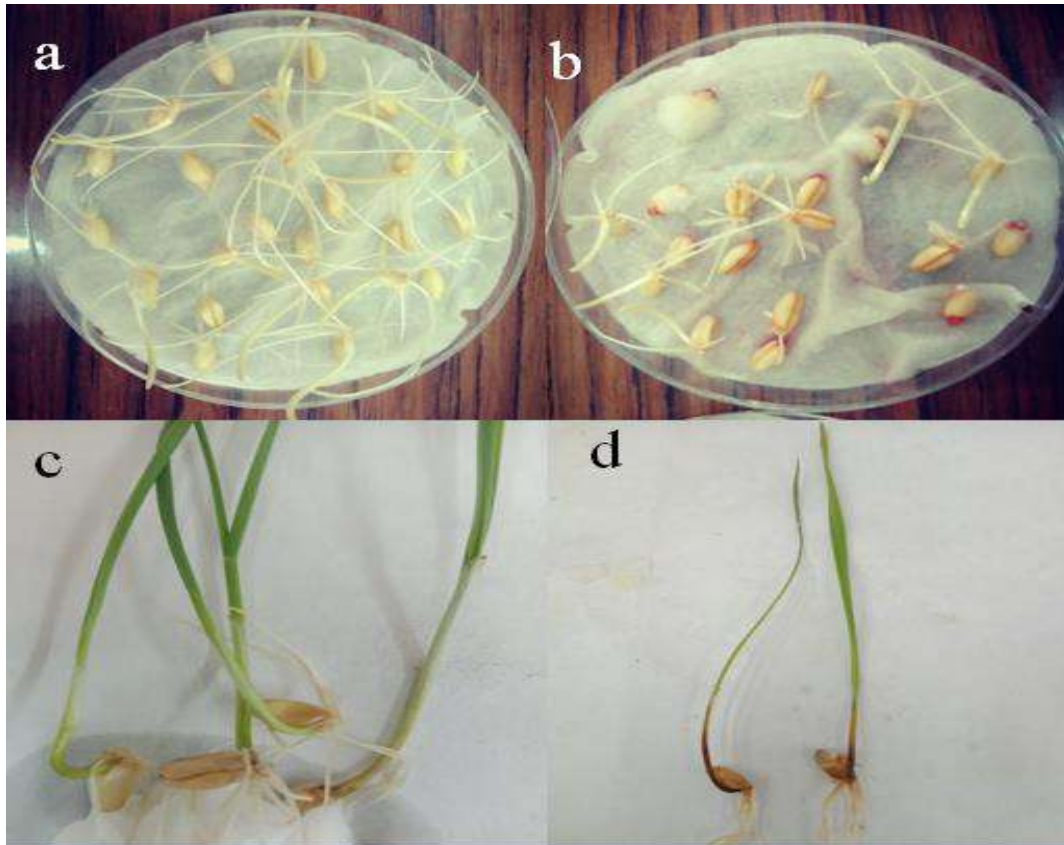


Figure 1. Photos illustrate, on top Petri dish test (a) Healthy seeds control. (b) Seeds infected by FC11. On bottom tube test; (c) Healthy crown control, (d) Crown infected with FC11.

2.5 Statistical analysis

Analyses of the data, graphs, tables and descriptive statistics (mean, standard deviation), were carried out using SPSS software (IBM SPSS Statistics version 25), comparisons between groups (inoculated FC11 and control) were determined by Paired-Samples T-Test. Correlations between the different parameters were determined by Pearson correlation. Means of the different treatments were compared using Tukey's honestly significant difference test. Results were considered significant at the 5% level ($P \leq 0.05$) and highly significant at the 1% level ($P \leq 0.01$).

3. Results

3.1 Varietal tolerance on germination (*in vitro* test)

The tolerance tests of germination and initial infection of seeds, as well as infection of wheat were carried out on 9 varieties of bread wheat to evaluate the FCR varietal resistance of these cultivars.

cv. El Hachimia recorded the lowest values of GI% and AUDPC = 22.15 and 42.62%, respectively, thus the highest tolerance of germination as well as initial infection, among all tested varieties.

The cv. Ain Abid showed extreme susceptibility to *F. culmorum* with GI=68.35%, and Hidhab with AUDPC= 68.98% (**Table 1**).

All our cultivars showed FC11 sensitivity from the 3 DAI and even more towards FC11, with a decrease in the germinated seeds number, each variety in comparison with its own control. El Hachimia the genotype that showed the most important germination resistance (GI=22.15 %), also with the germinated seeds initial infection with an AUDPC=42.62% (**Table 1**).

Table 1. The percentage of germination inhibition %GI and the AUDPC obtained by the Petri dish test, conducted on 9 bread wheat cultivars.

Parameters Grain Cultivar	Germination Inhibition GI%	AUDPC
	By <i>F. culmorum</i> (FC11)	By <i>F. culmorum</i> (FC11)
Medracen	40.53±2.63 ^{cde}	64.40±8.68 ^{bc}
El Hachimia	22.15±3.65 ^a	42.62±4.94 ^a
Boumerzoug	67.22±6.17 ^f	67.58±7.90 ^{bc}
Akhamokh	27.97±4.76 ^{ab}	43.80±5.04 ^a
NifEncer	30.57±3.23 ^{abc}	56.04±3.51 ^{abc}
Arz	47.42±5.18 ^{de}	60.90±3.24 ^{bc}
Ain Abid	68.35±4.03 ^f	61.34±2.98 ^{bc}
Bordj Mehis	38.00±3.13 ^{bcd}	53.37±5.40 ^{ab}
Hidhab	52.14±3.52 ^e	68.98±2.36 ^c

For each column, the values (mean± Std. Deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (P < 0.05)

3.2 Varietal tolerance on FCR (*In vivo* test)

FC11 strain induced FCR at all tested bread wheat cultivars ($DS_{culmorum} > 19.68\%$).

F. culmorum recorded the highest aggressiveness against the cultivars Bordj Mehis, Hidhab, and Ain Abid with DS = (77.13, 74.51 and 74.32%), respectively (**Table 2**).

The pathogenicity of FC11 was also manifested by a significant reduction in wheat coleoptile length (%RCL). The cultivars Arz, Nif Encer and Ain Abid showed high susceptibility with the highest reduction rates %RCL= (34.49, 29.58 and 29.41%), respectively. The same three cultivars had the highest reduction rates with %RCW= (48.43, 49.09 and 34.59%), respectively (**Table 2**).

The cv. Akhamokh showed a high tolerance to FC11 pathogen with the lowest whole collection DS, despite this tolerance a clearer disease pattern on the vegetative system length and weight of the seedling (coleoptiles) (**Table 2**).

Cv. Medracen was not influenced by length with RCL=0% and much less affected by coleoptile weight with WCL=22.30% (**Table 2**).

Table 2. The disease severity (DS), and the percentage reduction in coleoptile length and weight (%RCL and %RCW) obtained by the tube test.

Parameters Grain Cultivar	Disease Severity (DS%) DS <i>F.culmorum</i>	Coleoptile Length (mean±Std. Dev)(mm)		Coleoptile Weight (mean± Std. Dev)(mg)		% Reduction in coleoptiles Length and Weight	
		Infected CL (mm) <i>F. culmorum</i>	Control CL (mm)	Infected CW (mg) <i>F.culmorum</i>	Control CW (mg)	<i>F. culmorum</i>	
						RCL	RCW
Medracen	37.56±3.36 ^b	166.14±13.76 ^b	166.15±10.97 ^a	85.44±5.82 ^d	109.97±14.23 ^a	0.00	22.30
El Hachimia	49.66±30.5 ^{cd}	170.01±6.50 ^b	172.18±8.68 ^a	82.02±2.67 ^d	111.63±5.36 ^a	1.26	26.52
Boumerzoug	44.67±2.24 ^{bc}	147.84±10.22 ^{ab}	174.84±6.17 ^a	74.94±4.64 ^{cd}	112.10±2.70 ^a	15.44	33.14
Akhamokh	19.68±3.56 ^a	145.62±12.60 ^{ab}	169.97±11.37 ^a	71.94±2.88 ^{cd}	110.73±9.58 ^a	14.32	35.03
Nif Encer	56.57±2.75 ^d	131.30±5.38 ^a	162.67±14.89 ^a	57.11±2.85 ^{ab}	103.66±9.11 ^a	19.28	44.90
Arz	45.90±5.02 ^{bcd}	146.36±14.91 ^{ab}	171.11±8.81 ^a	64.20±3.36 ^{bc}	100.84±4.12 ^a	14.46	36.33
Ain Abid	74.32±7.25 ^e	139.08±8.72 ^{ab}	181.79±17.08 ^a	47.88±7.43 ^a	110.48±3.87 ^a	23.49	56.66
Bordj Mehis	77.13±2.93 ^e	118.17±7.57 ^a	165.65±18.78 ^a	53.59±6.33 ^{ab}	118.09±14.09 ^a	28.66	54.61
Hidhab	74.51±1.74 ^e	163.10±13.58 ^b	184.26±3.85 ^a	77.31±4.11 ^{cd}	124.79±2.65 ^a	11.48	38.04

For each column, the values (mean± Std. Deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (P < 0.05)

In order to classify our cultivars by increasing sensitivity order, the average of the main sensitivity parameters of our results (GI, AUDPC, DS) were used. The result was as follows; Akhamokh, El Hachimia, Medracen, Nif Encer, Arz, Bordj Mehis, Boumerzoug, Hidhab and Ain Abid (**Figure 3**).

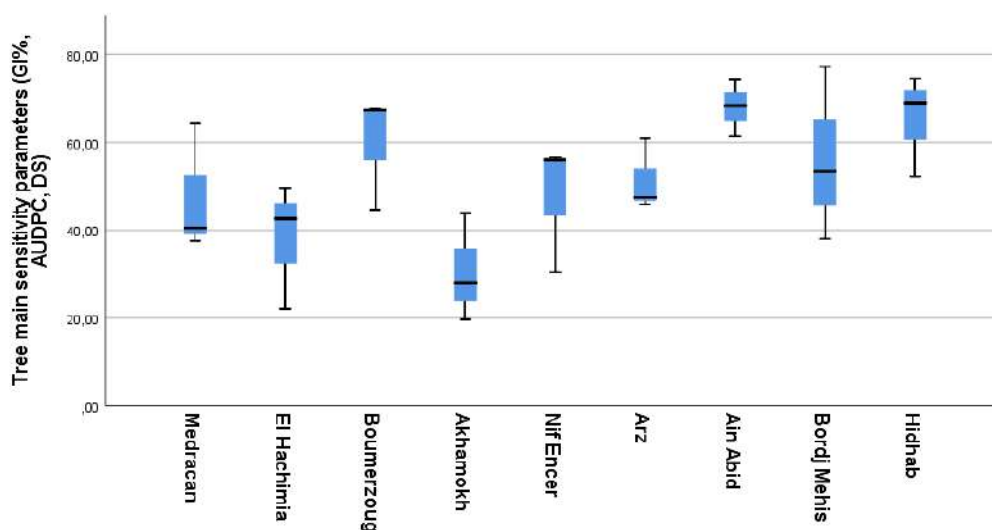


Figure 2. Simple Boxplot of tree main sensitivity parameters (GI%, AUDPC, DS) per the wheat genotype. Statistical analyzes were performed at a confidence level of 0.95 (P < 0.05).

4. Discussion

The genus *Fusarium* causes the most serious diseases affecting the roots, stem and spike of wheat and at all stages of growth. In Algeria, some studies have been carried out on the main agent responsible for FCR and FHB of wheat which is *F. culmorum*, focusing on its occurrence, pathogenicity and diversity (Abdallah-Nekache et al. 2019; Laraba et al 2017). However, other *Fusarium* pathogenic species have not yet been well studied.

In this work, providing cultivars with a high level of FCR resistance is a major and permanent challenge for bread wheat breeders in wheat producing countries, including Algeria. Few works address this topic as was done by Bouanaka et al (2021b) in their study, where 8 durum wheat cultivars were classified according to their FCR resistance/susceptibility. While this work had the additional aim of evaluating the susceptibility of 9 bread wheat genotypes to *F. culmorum*, the common and primary FCR pathogen in Algeria.

According to Haile et al. (2019), bread wheat is naturally more resistant than durum wheat due to its hexaploid nature. Nevertheless for our work, El Hachimia, Akhamokh genotypes showed the highest levels of resistance against initial seed infection with very close AUDPC values (**Table 1**).

All tests were performed under controllable conditions in the laboratory, or in the growth chamber, in order to reduce the variability associated with environmental factors, and that can distort our results, and as proven by Wallwork et al. (2004), field trials are often unreliable due to uneven natural infection of contamination by other pathogens or adverse environmental conditions that affect the results.

The results showed that there was a statistically significant difference ($p < 0.001$) between the artificially infected plants and the uninfected control plants. This result confirms that FC11 isolate was the cause of the seed germination disease. Although the level of resistance/susceptibility of our tested cultivars. *F. culmorum* negatively affected germination capacity and growth of germinated seeds of all cultivars (**Table 1**).

In vivo test of varietal tolerance on FCR showed that none of the cultivars had a null DS and that FC11 caused FCR symptoms on all tested varieties.

No statistically significant differences between the lengths and weights of the control coleoptiles of the different varieties tested.

The pathogenicity of *F. culmorum* (FC11) seems far from comparable to the results obtained by Hudec (2007), who reported in his work that *F. culmorum* and *F. graminearum* were the

most severe pathogens on the development of wheat coleoptile length, with a reduction of 91.32% for *F. culmorum* and 78.32% for *F. graminearum*.

The value of RCL is statistically significantly related to RCW with a correlation coefficient $r=0.859$, $P < 0.001$, which is very logical.

The infection risk is associated with climate change with increasing rainfall and temperature (Xu and Nicholson, 2009). This makes the crops exposed to FCR invasions, and forces us to do more and more experimentation on the different cultivars sensitivity for more control and promotion of *Fusarium* disease control.

The most interesting FCR tolerances were observed for cv. Akhamokh followed by Medracen with not very close DS (19.68 and 37.56%), respectively (**Table 2**). Three of our cultivars; Bordj Mehis, Hidhab and Ain Abid, will be excellent candidates for future tests of *F. culmorum* strains aggressiveness against FCR, they were found to be very sensitive and can be considered as positive control with very high values (77.13, 74.51, and 74.32%), respectively. We also notice that there are no remarkable differences between the cultivars rest since our DS values are very close and vary between 44.67 and 77.13% (**Table 2**), two reasons can be at the origin of these results. Firstly the inoculation type with the mycelial mass adjacent to the plant crown with PSA medium, away from environmental stresses, we took into consideration the work of Dhingra and Sinclair (1985) which found that the adhesive agents addition such as gelatin, agar, or methylcellulose is advantageous for the greenhouse inoculation and in the field, to avoid the drying of the spores and to provide spore germination nutrients. Second, the attack is extremely strong and does not allow for differentiation of cultivar resistance levels.

5. Conclusion

In this study, cv. Akhamokh shows the highest tolerance against *F. culmorum*, so it can be a very promising source of FCR genetic resistance for breeding programs, and an alternative for Algerian farmers to susceptible cultivars.

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. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01673-7>

Bouanaka H, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A, Khelifi D (2021a) 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 31:68. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3>

Bouanaka H, Bellil I, Khelifi D (2021b). Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium Head Blight and Crown Rot in Algeria. PhysiolMol Plant Path 115:101683. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101683>

Dhingra OD, Sinclair JB (1985) Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida 355. <https://doi.org/10.1201/9781315138138>

Francesconi S, Mazzaglia A, Balestra GM (2019) Different inoculation methods affect components of *Fusarium* head blight resistance in wheat. Phytopathol Mediterr 58(3):679-691. <https://doi.org/10.13128/Phyto-10942>

Gebremariam ES, Karakaya A, Erginbas-Orakci G, Dababat AA, Paulitz TC (2019) Assessment Of The Seedling Resistance Of Spring Wheat Lines To *Fusarium Culmorum*. J Agri Sci. <https://doi.org/10.15832/Ankutbd.466442>

Hadjout S, Chéreau S, Atanasova-Pénichon V, Marchegay G, Mekliche L, Boureghda H, Barreau C, Touati-Hattab S, Bouznad Z and Richard-Forget F (2017) phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* head blight and to mycotoxin accumulation. J Plant Pathol 99 (3):671-680. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3954>

Haile JK, N'Diaye A, Walkowiak S, Nilsen KT, Clarke JM, Kutcher HR, ... Pozniak CJ (2019) *Fusarium* Head Blight in Durum Wheat: Recent Status, Breeding Directions, and Future Research Prospects. Phytopathology. <https://doi.org/10.1094/phyto-03-19-0095-rvw>

Hudec K (2007) Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. Biologia 62(3):287–291

Laraba I, Boureghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obanor F, Moretti A, O'Donnell K (2017) Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. Fungal Genet Biol 103:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.04.001>

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford, UK. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470278376.fmatter/pdf>

McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. J Agric Res 26:195–217

Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, Kong X (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. Nat Genet 47, 1494

Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M, Migheli Q (2013) *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol* 14(4):323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>

Wallwork H, Butt M, Cheong JPE, Williams KJ (2004) Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants. *Australas Plant Path* 33:1–7

Xu X, Nicholson P (2009) Community Ecology of Fungal Pathogens Causing Wheat Head Blight. *Annu Rev Phytopathol* 47(1):83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>

Yekkour A, Toumatia O, Meklat A, Verheecke C, Sabaou N, Zitouni A, Mathieu F (2015) Deoxynivalenol-producing ability of *Fusarium culmorum* strains and their impact on infecting barley in Algeria. *World J Microbiol Biotechnol* 31:875–881

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A Decimal Code For The Growth Stages Of Cereals. *Weed Res* 14(6):415–421. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3180.1974.Tb01084.X>

CHAPITRE 5 : La lutte biologique
par *Trichoderma* spp.

CHAPITRE 5 : La lutte biologique par *Trichoderma* spp.

Préambule

Le blé dur est l'une des céréales les plus importantes au monde. Malheureusement, cette plante est la cible de plusieurs espèces du genre *Fusarium*. Ce genre provoque deux maladies graves ; la fusariose du collet et la fusariose de l'épi.

Il n'existe pas de mesures de contrôle efficaces et constantes contre les *Fusarium*. En outre, la résistance chez certains cultivars commerciaux n'est que partielle. Le contrôle de la maladie est basé principalement sur l'utilisation de fongicides, ces traitements chimiques constituent un risque potentiel pour la santé humaine et animale et augmentent la pollution de l'environnement entre autre l'altération des fonctions bénéfiques des micro-organismes vivant dans l'écosystème du sol et de la rhizosphère. Ces derniers temps, les contrôles biologiques ont été acceptés comme une alternative écologique, c'est l'un des outils les plus prometteurs pour maintenir le niveau actuel de la production agricole et contrôler les *Fusarium* spp. à la fois.

Les espèces de *Trichoderma* sont apparues comme les plus puissantes des bio-protecteurs pour la gestion d'un certain nombre de maladies des plantes. La recherche de nouvelles souches indigènes de *Trichoderma* ayant un fort potentiel de bio-contrôle contre ces deux maladies est devenue plus qu'indispensable.

Ce chapitre est conçu pour présenter une vue globale sur i) l'isolement de *Trichoderma* spp. et évaluation *in vitro* du pouvoir antagoniste contre quatre souches de *F. culmorum*, agent causal de la FCR et FHB en Algérie, (ii) l'évaluation de *Trichoderma afroharzianum* comme agent de bio-contrôle contre la FCR par deux tests *in vivo* dans la chambre de culture et contre la FHB dans les essais des pots dans la serre. Les résultats de cette investigation font l'objet d'un article scientifique publié en 2021 dans le journal *Egyptian Journal of Biological Pest Control*.

Le potentiel de bio-contrôle de 15 isolats de *Trichoderma* (T1 à T15), isolés de différents sols de la rhizosphère et d'écosystèmes algériens a été évalué contre 4 souches de *F. culmorum* (FC11, FC2, FC4, et FC20), le principal agent causal de la FCR et la FHB. L'efficacité de la lutte biologique par *Trichoderma* spp. a été évaluée par des tests *in vitro* (confrontation directe *CD*, et indirecte *CI*), et a été confirmée par des tests biologiques *in vivo*. Les résultats *in vitro* ont montré une inhibition significative de la croissance mycélienne des espèces de *F. culmorum* par rapport au contrôle.

L'effet antagoniste dans la confrontation directe des isolats de *Trichoderma* contre *F. culmorum* varie d'un isolat à un autre. Trois isolats T9, T12 et T14 ont montré les taux d'inhibitions les plus élevés et les plus stables avec toutes les souches de *F. culmorum*.

L'isolat T14 a été sélectionné pour le bio-contrôle dans les tests *in vivo*. Une diminution significative de l'agressivité de la maladie par T14 avec des taux considérables de pourcentages de réduction de la FCR arrivant jusqu'à 50% et 63.63%. Aussi l'effet de T14 dans la réduction du FHB *in vivo* a été noté où certains cultivars traités avec cette agent antagoniste ont montré une certaine résistance à la FHB. Aussi, l'effet antagoniste du T14 dans l'inoculum mixte (FC2+T14) a réduit de manière significative le pourcentage de gravité de la FHB pour tous les cultivars avec des taux de réduction très importants (jusqu'à 74,60%). Les rendements ont également augmenté de manière significative pour presque tous les cultivars traités avec le T14.

L'antagoniste T14 a été caractérisé sur le plan moléculaire en utilisant le facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF1- α) et l'Internal Transcribed Spacer DNA (ITS). Les résultats ont identifié le T14 comme étant *T. afroharzianum* avec des numéros d'accès attribués par NCBI GenBank comme MW171248 et MW159753. *Trichoderma afroharzianum*, évalué pour la première fois en Algérie en tant qu'agent de bio-contrôle, est une approche de lutte biologique prometteuse contre la FCR et la FHB.

Article 5. On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria

Hamza Bouanaka¹, Ines Bellil^{1*}, Wahiba Harrat², Saoussene Boussaha², Abdelkader Benbelkacem² and Douadi Khelifi^{1,3}

Egyptian Journal of Biological Pest Control (2021) 31:68

RESEARCH

Open Access



On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of fusarium head blight and crown rot of wheat in Algeria

Hamza Bouanaka¹, Ines Bellil^{1*} , Wahiba Harrat², Saoussene Boussaha², Abdelkader Benbelkacem² and Douadi Khelifi^{1,3}

Abstract

Background: Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) is one of the most important cereals in the world. Unfortunately, the wheat plant is a target of several species of the genus *Fusarium*. This genus causes two serious diseases: fusarium crown rot (FCR) and fusarium head blight (FHB). The search for new indigenous strains of *Trichoderma* with a high potential for biocontrol against these two diseases was the purpose of this study.

Results: Biocontrol potential of 15 isolates of *Trichoderma* (T1 to T15), isolated from different rhizosphere soils and Algerian ecosystems, was evaluated against 4 strains of *Fusarium culmorum* (FC11, FC2, FC4, and FC20); the main causative agent of FCR and FHB. The efficacy of biological control by *Trichoderma* spp., evaluated by in vitro tests (direct and indirect confrontation), was confirmed by in vivo bioassays. The in vitro results showed a significant inhibition of mycelial growth of *F. culmorum* species than the control. The highest percentages of inhibition were obtained by T9, T12, and T14 isolates causing a maximum inhibition percentage of 81.81, 77.27, and 80.68%, respectively. T14 was selected for biocontrol in in vivo testing. A tube and pot experiments for FCR against *F. culmorum* showed that T14 decreased the disease severity with 50 and 63.63% reduction, respectively. FHB infection was significantly reduced by T14 in all durum wheat cultivars tested, where %AUDPC (area under the disease progress curve) reduction was 49.77, 43.43, 48.25, and 74.60% for Simeto, Waha, Bousselem, and Setifis genotypes, respectively. Yields also increased significantly for almost all cultivars. The antagonistic T14 was characterized based on molecular tools, using translation elongation factor1-alpha (TEF1- α) and internal transcribed spacers rDNA (ITS1). The results identified T14 as *T. afroharzianum* with accession numbers attributed by NCBI GenBank as MW171248 and MW159753.

Conclusions: *Trichoderma afroharzianum*, evaluated for the first time in Algeria as biocontrol agent, is a promising biocontrol approach against FCR and FHB.

Keywords: *Triticum durum*, *Trichoderma afroharzianum*, *Fusarium*, Biocontrol, Pathogenicity, Algeria

* Correspondence: bines07@yahoo.fr

¹Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) is the main staple food crop in Algeria, where huge quantities are grown and traditionally consumed in the form of semolina and bread. However, it is affected by several abiotic and biotic stresses. Among the latter, fusarium crown rot (FCR) and fusarium head blight (FHB), which are considered two serious fungal diseases of wheat in the world, leading to significant yield losses and reduced market prices due to the poor quality of infected grains (Moya-Elizondo 2013). FCR in wheat causes the invasion of crown and root tissues by *Fusarium* spp. mycelia, which induces their decay and reduces the efficiency of nutrient and water absorption, while FHB is manifested by the bleaching of spikelets (Xu and Nicholson 2009).

Some *Fusarium* species are among the dangerous cereal pathogens with its secondary metabolites such as deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), and fumonisin B1, that are among the five most important mycotoxins (Mielniczuk and Skwaryło-Bednarz 2020). Investigations carried out revealed that strains of *F. culmorum* was the dominant and most aggressive species on wheat seedlings associated with FCR and FHB in Algeria (Abdallah-Nekache et al. 2019). In addition to yield losses, *F. culmorum* causes the accumulation of various mycotoxins such as 3-acetyl deoxynivalenol (3ADON) or nivalenol (NIV) (Laraba et al. 2017).

There are no effective and consistent control measures against *Fusarium*. In addition, resistance in commercial cultivars is only partial. Disease control is based primarily on the use of fungicides, and crop techniques such as rotation to reduce the occurrence of the disease (Wegulo et al. 2015). The chemical treatments pose a potential risk to human and animal health and increase environmental pollution, such as altering the beneficial functions of microorganisms living in the soil and rhizosphere ecosystem, and their effectiveness differs according to the fungal species concerned. Recently, biological control agents have been accepted as an ecological alternative (Akrami and Yousefi 2015). It is one of the most promising tools to maintain the current level of agricultural production and to control *Fusarium* spp. (Wegulo et al. 2015; Tian et al. 2016).

Trichoderma species have emerged as the most powerful bioprotectors for the management of a number of plant diseases due to their broad-spectrum action (Mukhopadhyay 2005). *Trichoderma* spp., is a cosmopolitan fungus common in different biotopes. It involves different types of interaction with other microorganisms in the rhizosphere. Some *Trichoderma* spp. are opportunistic and show a parasitic lifestyle such as *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, and *T. atroviride*, which live in the soil, without adverse effects on the environment and non-toxic to human health (Ghazalibiglar et al. 2016). The ability to produce volatile and

non-volatile fungitoxic substances vary from one species to another and even between strains of the same species. The production of antibiotics is the most important antagonistic capacity. However, mycoparasitism has been proposed as the primary antagonistic mechanism exhibited by *Trichoderma* spp. (Zeilinger et al. 2016).

In vitro methods are considered among the easiest and fastest screening techniques, by using double culture plates, commonly used to select *Trichoderma* strains with potential antagonistic effects and omitting those with no biological activity (Matarese et al. 2011). *Trichoderma* is easily obtained by the multi-tube dilution technique due to its chlamydospore formation and colonization of organic substrates (Khandelwal et al. 2012). Conidia have been commonly used for biological control and conidial biomass can be grown by the submerged culture method or on solid substrate (Harman and Kubicek 1998).

The objectives of the present investigation were (i) isolation of *Trichoderma* spp. and *in vitro* evaluation of the antagonistic power against four strains of *F. culmorum*, the causal agent of FCR and FHB in Algeria; (ii) evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent against FCR by two *in vivo* tests in the growth chamber; (iii) evaluation of the biocontrol potential against FHB in the pot test in the greenhouse; and (iv) identification of the most antagonistic species by molecular characterization.

Methods

Fungal material

For the isolation of the antagonistic agents, 68 soil samples were collected at a depth of 20 to 30 cm, in different provinces of Algeria (Table 1). They were collected at random from the rhizosphere of different wheat fields and also from soils of different ecosystems. They were placed in sterile plastic bags. Fifteen isolates of *Trichoderma* (Table 1) were isolated using the suspension-dilution method (flat dilutions) (Davet and Rouxel 1997); they were purified by monospore culture, then stored as mycelium discs on agar in eppendorf tubes in 20% glycerol at -80°C (Siou et al. 2013).

Four *Fusarium culmorum* strains coded (FC11, FC2, FC4, and FC20) were submitted to GenBank (NCBI) under accessions numbers MW151664, MW165423, MW165434, and MW165435, respectively, were used. They are characterized by their aggressiveness among a collection of phytopathogenic wheat *Fusarium* species belonging to the fungal library of our laboratory. *Fusarium* strains were used as a pathogen in *in vitro* test. For *in vivo* tests, only FC2 was used.

Plant material

Durum wheat cultivar Simeto, known for its susceptibility to *Fusarium*, was used for both *in vivo* tests in

Table 1 Code of *Trichoderma* isolates, with the soil type, region, and province of their isolation

<i>Trichoderma</i> isolate code	Type of soil	Town and region	Provinces
T1	Sand	Tahir plage bazoul	Jijel
T2	Mountainous soil	El akhdaria	Bouira
T3	Mountainous soil	El akhdaria	Bouira
T4	Agricultural sand (potato)	El meghaier	Oued Souf
T5	Forest soil	Oued athmania Barrage grouz	Mila
T6	Agricultural soil	El harrouch	Skikda
T7	Agricultural soil	El harrouch	Skikda
T8	Mountainous soil	Ain zouit	Skikda
T9	Mountainous soil	Ain bouziane	Skikda
T10	Mountainous soil	Ain bouziane	Skikda
T11	Mountainous soil	Ain bouziane	Skikda
T12	Mountainous soil	Khmis meliana	Ain Defla
T13	Agricultural soil (wheat)	Oum tboul	Skikda
T14	Agricultural soil (wheat)	Ouled Rahmoune	Constantine
T15	Forest soil	Lazharia	Tissemsilt

growth chamber (tubes and pots tests) to evaluate the antagonistic effect of *Trichoderma* isolates on the severity of FCR. Three other local durum wheat cultivars (Setifis, Waha, and Bousselem), widely grown in Algeria, were also used for the last test in greenhouse to evaluate the biocontrol effect of *Trichoderma* isolate on FHB. All cultivars used in this study were kindly provided by the National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA).

In vitro antagonistic activity of *Trichoderma* isolates

Antagonism by direct confrontation (DC)

Confrontations between the antagonist *Trichoderma* sp. and the pathogen *F. culmorum* were carried out according to Hibar et al. (2004). A mycelial disc (5 mm) of each fungus was placed at opposite poles on boxes containing

the potato sucrose agar (PSA) medium, keeping a distance of 30 mm between the two fungi and incubated at 28 °C for 5 days. Three replicates were done for each *Trichoderma* sp./*F. culmorum* combination. Boxes containing only *F. culmorum* strains were used as controls (Fig. 1).

Antagonism by indirect confrontation (IC)

It was realized according to Daami-Remadi and El Mahgoub (2001). Discs of the antagonistic isolate *Trichoderma* sp. and the pathogenic strain *F. culmorum* (5 mm of diameter) were deposited in two separate dishes containing the PSA medium. An assembly was carried out by superimposing the two dishes, *Trichoderma* sp. at the bottom and *F. culmorum* at the top. The junction between the two dishes was ensured by parafilm in order

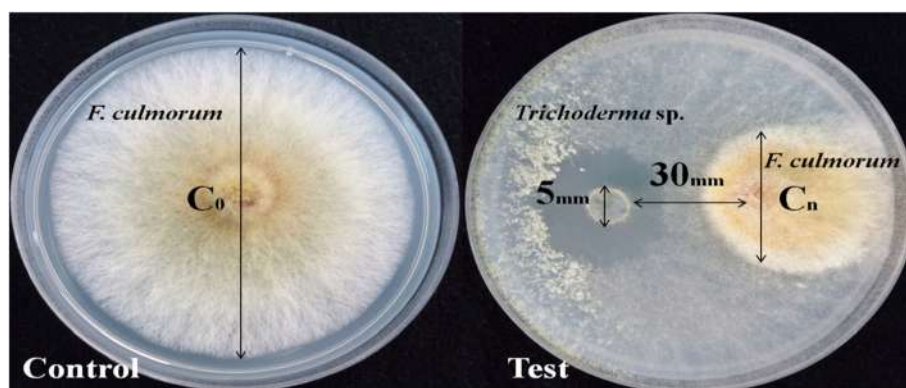


Fig. 1 Demonstrative schema of the different measurements used to calculate the percentage of mycelial growth inhibition for in vitro confrontation *Trichoderma*/*F. culmorum*

to avoid any loss of volatile substances. The dishes were incubated in the dark at 28 °C for 5 days. The control was formed by superimposing two dishes, the upper one containing a *Fusarium* disc, while the lower one contained only the PSA medium.

Measurement of the inhibition exerted by *Trichoderma* spp. I (%)

It was estimated according to Hmouni et al. (1996) by calculating the percentage inhibition of mycelial growth of *F. culmorum* strains as follows: $I(\%) = (1 - (C_n/C_0)) \times 100$

Where C_n : diameter of the colony of the pathogen (*F. culmorum*) in the presence of the antagonist (*Trichoderma* sp.) (mm) and C_0 : diameter of the control colony (mm) (Fig. 1).

In vivo antagonistic activity of *Trichoderma* isolates

The highly antagonistic T14 isolate, on the basis of its in vitro efficacy, was chosen to evaluate its biocontrol effect in vivo.

Inocula preparation

Fungal discs (13 mm of diameter) of the 2 fungi (*Fusarium* and *Trichoderma*), used in the tests, were obtained from 7-day-old young cultures on PSA medium. The inoculation suspension was prepared according to the protocol of Stein et al. (2009). The FC2 strain was grown on 6 Petri dishes on PSA medium for 45 days. Ten milliliter sterile of distilled water with 0.05% (v/v) Tween 20 was added to the mycelial aerial part on the surface of each plate, and then carefully scraped off until the surface part of the fungus was recovered. The mixture of macroconidia, mycelium, and PSA medium was recovered in a beaker and then filtered through a double layer of cheesecloth. The concentration of the macroconidial suspension 8×10^6 macroconidia/ml was adjusted, using Malassez cell, for the inoculation test of the spike in greenhouse. The same protocol was followed for the preparation of the spore suspension of the T14 isolate, except that the culture on PSA medium lasted only 1 week (rapid sporulation), with a concentration of 8×10^8 spores/ml, for the spike inoculation test in greenhouse. All inocula were stored at 4 °C until use.

Crown inoculation test in assay tubes

This test was inspired by the method of Asad et al. (2009) with major modifications. Seventy-five assay tubes (14 cm × 3 cm) were filled with 4 cm of cotton, and then 20 ml of distilled water was added to each tube and covered with aluminum foil, then sterilized by autoclaving at 180 °C for 2 h. Three hundred seventy-five seeds of Simeto durum wheat, surface disinfected with 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 min and rinsed 3

times with sterile distilled water, were placed on the wet cotton swab in each test tube (5 seeds/tube). The tubes were closed with transparent caps and placed in the oven at 28 ± 1 °C for 4 days, where the seedlings reached the one-leaf stage (Zadoks' GS 11), the inoculation took place as follows: 25 control tubes; 25 tubes inoculated by FC2 (13 mm disc); 25 tubes inoculated by FC2 + T14 (13 mm disc for both).

After inoculation, the tubes were transferred to a growth chamber (25/19 °C day/night temperature, 16/8-h light/dark cycle) for 10 days; they were arranged according to a complete randomization plan. When the seedlings reached the two-leaf stage (Zadoks' GS 12), the seedlings were carefully removed from the cotton with water. The FCR severity classes for crown discoloration were assigned to the laboratory on a scale of 0 to 4 where class 0 = healthy crown; 1 = light browning of crown; 2 = half browning of crown; 3 = full browning of crown; and 4 = death of seedlings.

The disease severity (DS) of each treatment was calculated using McKinney's (1923) index, which expresses the percentage of disease severity (i.e., 100) according to the formula:

$$DS = \left\{ \frac{\sum (c \times f)}{n \times N} \right\} \times 100$$

Where c = disease class, f = frequency, n = number of observations, and N = the highest value of the empirical scale adopted (class 4). The whole test was repeated twice in succession.

Crown inoculation test in pots

Thirty pots of (8 × 12 cm) were used. For each pot, 5 durum wheat (Simeto) seeds were sterilized and sown as indicated in the previous test. All the pots were placed in the growth chamber (25/19 °C day/night temperature, 16/8-h light/dark cycle). After 3 weeks, the seedlings reached the two-leaf stage (Zadoks' GS 12). The soil around the seedlings was removed, and the inocula discs prepared as mentioned above were placed around the stems, one disc for each stem 2 cm below the soil; the pots were inoculated as follows:

Ten control pots (uninoculated); 10 inoculated pots with FC2 with 13 mm disc; 10 inoculated pots with FC2 + T14 (13 mm disc versus 13 mm disc).

The soil was then placed back around the stems, and the pots were organized according to a completely random plan. Three weeks after inoculation, the plants reached the early tillering stage (Zadoks' GS 20), each plant was carefully removed from the soil and washed with tap water. Severity classes were assigned on the same scale and the DS was calculated using McKinney's (1923) index, as shown above. Koch's postulates were satisfied by re-isolating FC2 from brown spots on the

coleoptiles for both tests. The whole test was repeated twice in succession. To measure the efficacy of T14 bio-control against FC2, the reduction percentage in DS is measured for both tests as follows:

$$\%DS \text{ reduction} = 100 - \left\{ \frac{DS_{FC2+T14} \times 100}{DS_{FC2}} \right\}$$

Test of spike inoculation in greenhouse

A total of 48 pots (24 × 20 cm) filled with a mixture of soil/compost (1/2) previously sterilized at 180° for 2 h (2 repetitions 24 h apart) were used. One hundred twenty seeds of each of the 4 cultivars (Simeto, Waha, Bousselem, Setifis) were surface-sterilized with 2% NaClO for 5 min, and rinsed 3 times with sterile distilled water, were sown (10 seeds/pot) under the soil surface at about 2 cm. The plants were grown in the greenhouse. The soil was watered every 3 days. The inoculation took place at the flowering stage (Zadoks' GS 60) and each spike between the first and the third day after the first anthers emergence was labeled.

The inoculation suspension for each cultivar was done as follows: 10 seeds in a control pot (no inoculation); 10 seeds in a pot for inoculation with FC2 (8 × 10⁶ macroconidia/ml); 10 seeds in a pot for inoculation with FC2 + T14 (mixture: 8 × 10⁶ macroconidia/ml + 8 × 10⁸ spores/ml); and 10 seeds in a pot for inoculation with T14 only, with 2 repetitions of each case for each cultivar (12 pots/cultivar).

The inoculation with the FC2 macroconidial suspension prepared previously as indicated above was carried out by spraying about 2 ml of suspension on both sides of the spike, in a Plexiglas cage. The spikes were then covered with a transparent polyethylene bag for 72 h in order to maintain maximum relative humidity, necessary for the early stages of fungal development. After 15 days of inoculation, a visual disease assessment was performed for each spike by counting the percentage of symptomatic spikelets (PSS) of each inoculated spike. Approximately 8 to 10 heads were noted in each pot.

Because of the variability and specificity of each cultivar (inter and intra-genotype), flowering did not take place on the same day, even within the same genotype. Spike PSS scoring was done separately. For each spike, 5 readings with 4 days interval were done, thus illustrating the kinetics of the disease over approximately 20 days. The area under the disease progress curve (AUDPC) standard illustrated the kinetics of disease progression in PSS between the first and last scoring. AUDPC for FHB incidence was measured by the number of days of observation and calculated as described by Siou et al. (2015):

$$AUDPC = \left\{ \sum_0^n \left[\left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right] \right\} / \{t_n - t_0\}$$

Where Y_i the PSS at the i th scoring, t_i the number of days elapsed between inoculation and the last scoring, t_0 the number of days elapsed between inoculation and the 1st scoring and n the total number of scoring.

At maturity, each spike was harvested. The spikes were deseeded by hand in order to recover all the grains. All the grains were counted and weighed in order to obtain thousand kernel weight (TKW) of inoculated and uninoculated spikes (control) of each cultivar, the reduction percentage of AUDPC is measured in order to estimate the loss percentage of FHB severity resulting from bio-control by T14.

$$\%AUDPC \text{ reduction} = 100 - \left\{ \frac{AUDPC_{FC2+T14} \times 100}{AUDPC_{FC2}} \right\}$$

Koch's postulates were satisfied by re-isolating the FC2 pathogen from the infected grains.

Physical properties of the grain

In order to fully understand the effect of T14 treatment on the physical properties of the grains, the different grains from the greenhouse spike inoculation test (control, FC2 infected, FC2 infected and treated with T14, and treated with T14 only) were compared. The four types of grain for each cultivar tested were cleaned manually. Broken and immature kernels were removed. Ten grains were taken at random and their three linear dimensions: length L , width W , and thickness T ; were measured, using a digital caliper (0–150 mm) with an accuracy of 0.01 mm.

Molecular characterization of T14 isolate

To identify the isolate T14, which presented the best biocontrol efficiency, molecular identification was performed by the BIOfidal laboratory (CEDEX-France).

DNA extraction

DNA was extracted from mycelium collected by scraping the surface of Petri dishes cultures of purified isolate. One hundred microliters of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA, 3% SDS and 1% 2-mercaptoethanol) was added and the nucleic acids were isolated according to the microwave mini-prep procedure described by Goodwin and Lee (1993). The final DNA pellet was supplemented into 100 μ l TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) and stored at –20 °C until used.

PCR amplifications and DNA sequencing

The internal transcribed spacer (ITS1) and the translation elongation factor (TEF1- α) were amplified using primer pairs ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G '3) (White et al. 1990) and EF1-728F (5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3') (Carbone and Kohn 1999). All amplification reactions were performed in a 50- μ l reaction volume containing 75 mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (w/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M each dNTP, 1 unit of thermostable DNA polymerase (GoTaq, Promega), and 400 nM of each relevant oligonucleotide primer. After electrophoresis in 1.2% agarose gels in 0.5 \times TAE buffer (20 mM Tris-acetate pH 8, 0.5 mM EDTA), DNA was visualized by Ethidium bromide staining and UV illumination.

PCR products (amplified DNA) were purified by mini-column centrifugation (NucleoSpinVR Extract II) and the DNA binds in the presence of a chaotropic salt to a

silica membrane. The binding mixture was loaded directly onto NucleoSpinVR Extract II columns. Contaminations were removed by a washing step with ethanolic NT3 buffer. Finally, the pure DNA was eluted under low ionic strength conditions with a slightly alkaline NE buffer (5 mM Tris-Cl, pH 8.5). The sequences of EF1 and ITS region thus obtained were submitted to GenBank database through Submission Portal (a World Wide Web sequence submission server available at NCBI home page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical analysis

Data from in vitro and in vivo assays were subjected to analysis of variance (ANOVA). The histograms were made, using Software SPSS (IBM SPSS Statistics version 25), and means compared by Tukey's test ($P < 0.05$). The correlation between AUDPC_{FC2} and AUDPC_{FC2 + T14} was determined by Pearson correlation. The

Table 2 The percentage of inhibition of *Trichoderma* isolates on *Fusarium culmorum* strains in both cases of confrontation (direct and indirect) after 5 days incubation

Mean inhibition I%	FC11		FC2		FC4		FC20	
	Direct	Indirect	Direct	Indirect	Direct	Indirect	Direct	Indirect
T1	30.46 \pm 2.51 ^a	10.00 \pm 1.08 ^a	14.77 \pm 1.37 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	18.18 \pm 1.74 ^a	6.97 \pm 2.40 ^a	11.49 \pm 1.51 ^a	9.52 \pm 1.50 ^{abc}
T2	63.57 \pm 4.51 ^{de}	17.50 \pm 2.40 ^{ab}	31.81 \pm 2.97 ^b	0.00 \pm 0.00 ^a	67.04 \pm 3.05 ^c	30.23 \pm 1.29 ^e	41.37 \pm 1.62 ^c	13.09 \pm 2.34 ^{cd}
T3	63.57 \pm 6.64 ^{de}	36.25 \pm 4.21 ^{cde}	29.54 \pm 2.8 ^b	0.00 \pm 0.00 ^a	76.13 \pm 3.66 ^{def}	17.44 \pm 0.93 ^c	49.42 \pm 1.98 ^{cd}	20.23 \pm 1.95 ^{ef}
T4	51.65 \pm 4.19 ^{bcd}	28.75 \pm 4.54 ^c	57.95 \pm 6.54 ^c	0.00 \pm 0.00 ^a	73.86 \pm 2.84 ^{cdef}	23.25 \pm 1.58 ^d	49.42 \pm 7.02 ^{cd}	5.95 \pm .95 ^{ab}
T5	47.68 \pm 5.13 ^b	27.50 \pm 4.51 ^{bc}	48.86 \pm 1.83 ^c	17.07 \pm 2.25 ^b	70.45 \pm 1.63 ^{cd}	16.27 \pm 1.26 ^c	49.42 \pm 5.28 ^{cd}	14.28 \pm 2.38 ^{cd}
T6	48.34 \pm 3.68 ^{bc}	32.50 \pm 2.38 ^{cde}	47.72 \pm 2.97 ^c	18.29 \pm 2.96 ^b	65.90 \pm 5.87 ^c	38.37 \pm 2.03 ^f	43.67 \pm 1.32 ^c	15.47 \pm 1.80 ^{de}
T7	39.07 \pm 3.31 ^{ab}	30.00 \pm 2.32 ^c	54.54 \pm 2.74 ^c	0.00 \pm 0.00 ^a	85.22 \pm 2.29 ^g	46.51 \pm 0.78 ^g	48.27 \pm 2.58 ^{cd}	4.76 \pm 1.22 ^a
T8	48.34 \pm 4.62 ^{bc}	42.50 \pm 4.84 ^{ef}	14.77 \pm 2.74 ^a	19.51 \pm 2.61 ^{bc}	72.72 \pm 2.32 ^{cde}	30.23 \pm 1.07 ^e	52.87 \pm 2.06 ^{de}	13.09 \pm 1.64 ^{cd}
T9	67.54 \pm 1.82 ^e	48.75 \pm 4.30 ^{fg}	70.45 \pm 2.71 ^d	29.26 \pm 1.96 ^{de}	81.81 \pm 2.43 ^{fg}	27.90 \pm 3.14 ^{de}	67.81 \pm 1.71 ^h	25.00 \pm 1.42 ^f
T10	50.99 \pm 7.87 ^{bcd}	30.00 \pm 2.61 ^c	54.54 \pm 5.10 ^c	0.00 \pm 0.00 ^a	73.86 \pm 3.18 ^{cdef}	32.55 \pm 2.20 ^e	56.32 \pm 1.94 ^{def}	10.71 \pm 1.87 ^{cde}
T11	44.37 \pm 7.26 ^{ab}	35.00 \pm 2.95 ^{cde}	13.63 \pm 3.01 ^a	24.39 \pm 2.32 ^{cd}	39.77 \pm 2.72 ^b	48.83 \pm 1.64 ^g	25.28 \pm 1.82 ^b	47.61 \pm 3.86 ^h
T12	67.54 \pm 7.51 ^e	50.00 \pm 3.73 ^{fg}	77.27 \pm 6.53 ^d	32.92 \pm 1.23 ^e	71.59 \pm 1.76 ^{cd}	55.81 \pm 2.85 ^h	62.06 \pm 2.35 ^{gh}	48.80 \pm 1.95 ^h
T13	45.69 \pm 2.31 ^b	31.25 \pm 4.39 ^{cd}	34.09 \pm 2.19 ^b	2.43 \pm 1.00 ^a	73.86 \pm 1.69 ^{cdef}	12.79 \pm 1.02 ^{bc}	42.52 \pm 1.26 ^c	30.95 \pm 1.04 ^g
T14	62.91 \pm 2.52 ^{cde}	56.25 \pm 4.18 ^g	79.54 \pm 4.65 ^d	21.95 \pm 2.91 ^{bc}	80.68 \pm 2.12 ^{efg}	44.18 \pm 1.45 ^g	65.51 \pm 1.61 ^{gh}	13.09 \pm 2.31 ^{cd}
T15	46.35 \pm 4.13 ^b	41.25 \pm 3.81 ^{def}	57.95 \pm 1.86 ^c	17.07 \pm 2.11 ^b	72.72 \pm 2.20 ^{cde}	10.46 \pm .79 ^{ab}	58.62 \pm 1.58 ^{efg}	5.95 \pm 0.86 ^{ab}

The values (mean \pm Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$)

coefficient of correlation was found to be significant at the 5% level ($P \leq 5\%$).

Results

In vitro effect of *Trichoderma* isolates on *F. culmorum* strains

The antagonistic effect in direct confrontation (DC) of *Trichoderma* isolates against *F. culmorum* varies widely from isolate to isolate. Three isolates T9, T12, and T14 had the highest and most stable levels of inhibition with all strains of *F. culmorum*. Inhibition values ranged from 62.06 to 81.81% (Table 2, Fig. 2). The antagonistic effect in indirect confrontation (IC) is less important for all *Trichoderma* spp., except T11 against FC2, FC4, and FC20 where IC is greater than DC (24.39% and 48.83%, 47.61%), respectively (Table 2, Fig. 3b–d). T9, T12, and T14 were also the most reliable in the IC with maximum values of 48.75%, 55.81%, and 56.25%, respectively.

The T1 isolate recorded the lowest rates in both confrontations (DC and IC), and with all strains of *F. culmorum*. It is therefore far from being chosen for a biocontrol role against FCR and FHB. On the other hand, maximum growth inhibition (85.22%) was obtained by T7 against FC4 in DC. Some *Trichoderma* isolates had a very low inhibition percentage with null

values for T1, T2, T3, T4, T7, and T10 for IC with FC2 (Table 2). A graphical presentation summarizes the DC and IC results of the in vitro test, to better compare the effect of *Trichoderma* isolates on each strain of *F. culmorum* separately was shown in Fig. 3).

In vivo effect of T14 in reducing FCR in both tube and pot tests

FC2 induced FCR for the cultivar Simeto with 68 and 60.5%, respectively. A significant decrease in the aggressiveness of DS disease per T14 with considerable %DS reduction rates of 50 and 63.63% was observed (Table 3).

In vivo effect of T14 in the reduction of FHB

All cultivars were affected by FHB due to FC2 inoculation (Table 4 and Fig. 4). The highest disease severity recorded by the AUDPC standard was in Simeto and Waha cultivars with 63.37 and 56.27%, respectively, while cultivars Bousselem and Setifis showed some resistance to FHB with AUDPC = 18.94% and 16.38%, respectively (Table 4 and Fig. 5a).

A remarkable improvement for the thousand kernel weight (TKW) inoculated and treated with FC2 + T14 was observed, compared to the one inoculated with FC2

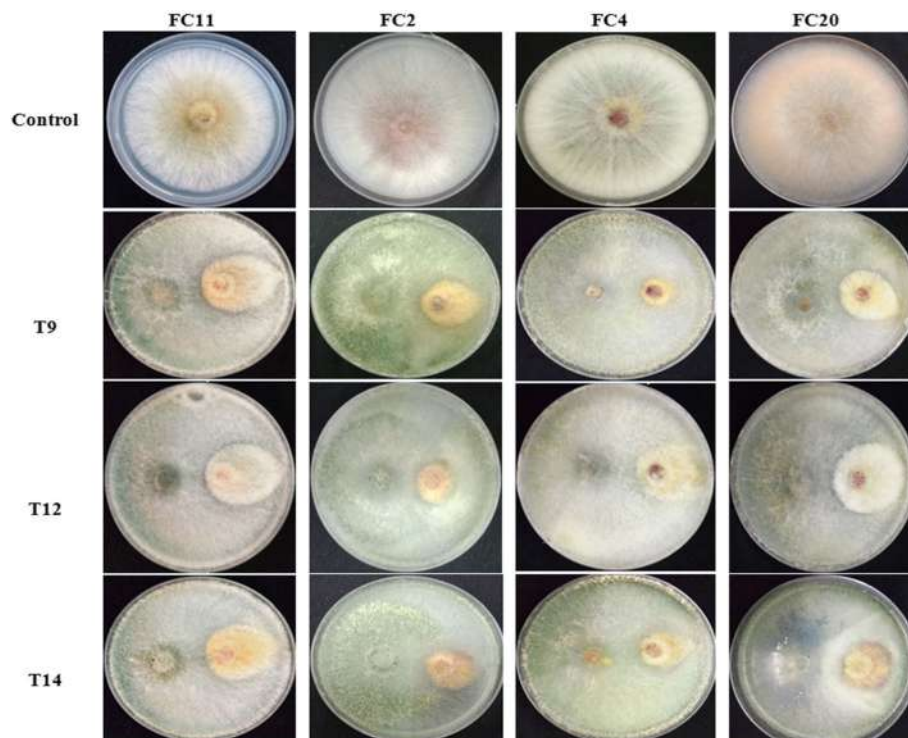
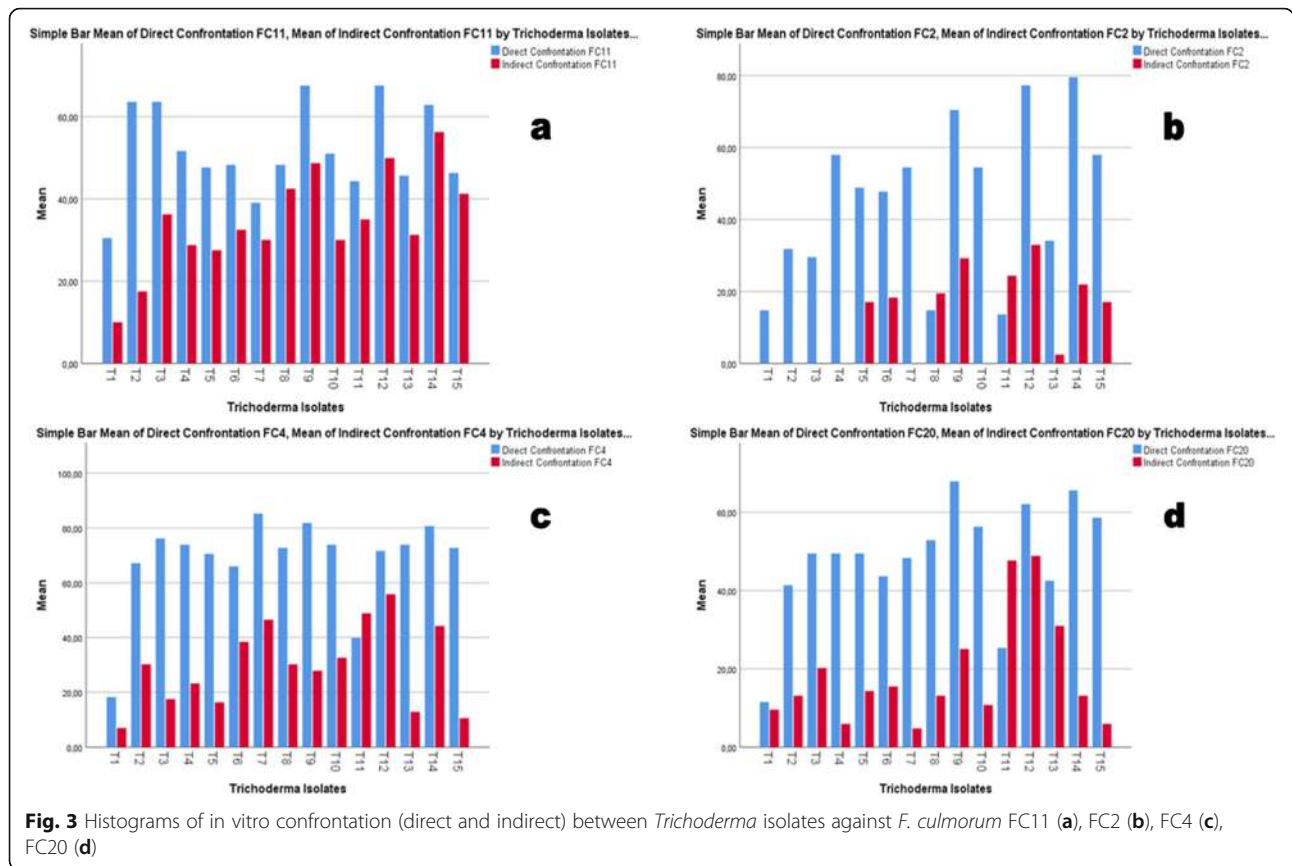


Fig. 2 Direct in vitro confrontation between *Trichoderma* isolates (T9, T12, and T14) against strains of *F. culmorum* (FC11, FC2, FC4, FC20)



in two cultivars, but a slight decrease was observed for Setifis and Waha, where $TKW_{FC2 + T14} < TKW_{FC2}$. The antagonistic effect of T14 in the FC2 + T14 mixed inoculum significantly reduced the percent severity of FHB disease for all cultivars with very high reduction rates (74.60% for Setifis) (Table 4 and Fig. 5b). A slight decrease of TKW_{T14} than the control ($TKW_{T14} < TKW_{control}$), was recorded for all tested cultivars. This decrease remained negligible and significantly better than the *Fusarium*-treated $TKW_{T14} > TKW_{FC2 + T14} > TKW_{FC2}$, only the cv. Setifis was the exception (Table 4).

Effect of T14 on physical properties of grain

Results showed that for the length parameter L, the difference among the four grain types was not statistically significant, even for the four cultivars. On the other hand, the parameters width W and thickness T

show a very significant variation, the measurements of grains infected with FC2 are the smallest, followed by grains infected with FC2 and treated with T14, due to the antagonistic effect of T14 used as biocontrol agent, the values of the control grains and the one treated only with T14 are almost similar (Table 5).

Molecular identification of T14

The amplification of DNA regions with primers TEF1- α and ITS1 was successfully used to identify T14. The final sequences size used for identification analysis were 565 and 533 bp, respectively (Fig. 6). TEF1- α and ITS 1 sequences were submitted to NCBI GenBank and accession numbers were given as MW171248 and MW159753, respectively. The isolate T14 was identified as *Trichoderma afroharzianum*.

Table 3 Severity of FCR inoculated by FC2 and reduction percentage induced by T14, in both in vivo tube and pot tests

Inoculum	Tubes test		Pots test	
	DS (mean \pm Std. Dev)	%DS reduction	DS (mean \pm Std. Dev)	%DS reduction
FC2 (disc 13 mm)	68 \pm 2.35	0	60.5 \pm 7.08	0
FC2 (disc) + T14 (disc)	34 \pm 6.62	50	22 \pm 3.08	63.63
Control	0	/	0	/

Table 4 Biocontrol of T14 on FHB tested on 4 durum wheat cultivars, by the AUDPC standard (FC2, FC2 + T14, %reduction), and TKW (control, FC2, FC2 + T14, T14)

Cultivars	AUDPC			TKW (gram)			
	FC2	FC2 + T14	Reduction%	Control	FC2	FC2 + T14	T14
Simeto	63.37 ± 4.52 ^b	31.83 ± 3.16 ^b	49.77	60.38 ± 3.26 ^b	21.93 ± 2.31 ^a	34.15 ± 1.33 ^a	57.60 ± 3.52 ^b
Waha	56.27 ± 3.43 ^b	31.83 ± 3.84 ^b	43.43	58.65 ± 3.59 ^b	39.25 ± 1.73 ^b	32.77 ± 3.15 ^a	40.64 ± 2.22 ^a
Bousselem	18.94 ± 2.10 ^a	9.80 ± 1.34 ^a	48.25	56.91 ± 3.77 ^b	37.38 ± 1.60 ^b	44.18 ± 2.35 ^b	50.99 ± 2.35 ^b
Setifis	16.38 ± 1.37 ^a	4.16 ± 1.28 ^a	74.60	41.92 ± 2.37 ^a	39.62 ± 3.23 ^b	37.81 ± 5.08 ^{ab}	35.87 ± 4.93 ^a

The values (mean ± Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$)

Discussion

In this study, the antagonistic activity of 15 unidentified *Trichoderma* isolates was evaluated in vitro and in vivo against 4 strains of *F. culmorum*, common causative agents of FCR and FHB in wheat. *Trichoderma* is a non-pathogenic fungus that provides protection to many crops against fungal diseases caused by the genus *Fusarium* (Tsegaye Redda et al. 2018). It is used as a biocontrol agent, avoiding the adverse effects that accompany chemical control.

Double culture techniques, as described by many previous studies, have been widely used in tests of antagonistic activities (Srivastava et al. 2010). The direct confrontation experiment showed that all *Trichoderma* isolates were capable of inhibiting mycelial growth of all four pathogenic strains, with rates differing from isolate to isolate and strain to strain as found by Khan et al. (2006). Differences between strains can reach an interval of more than 50%, either in vitro or in vivo.

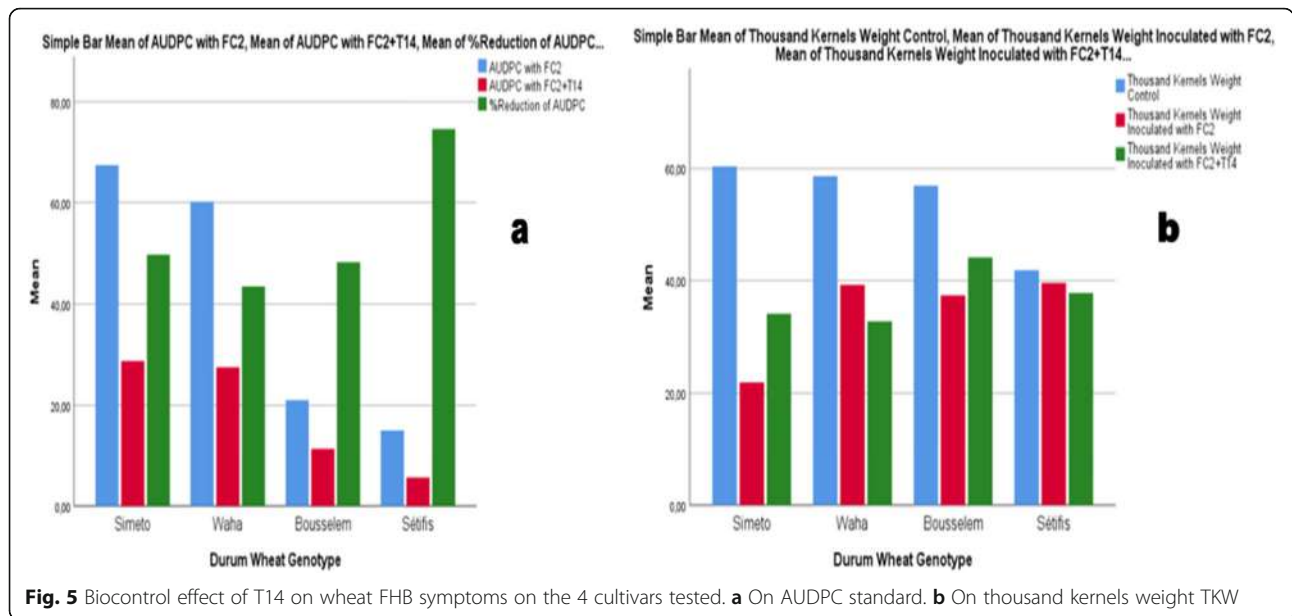
Isolates T9 (67.54, 70.45, 81.81, and 67.81%), T12 (67.54, 77.27, 71.59, and 62.06%), and T14 (62.91, 79.54,

80.68, and 65.51%) showed the most significant rates of reduction than the controls against FC11, FC2, FC4, and FC20, respectively (Table 2 and Figs. 2 and 3). These results are significantly better than those obtained by Ann et al. (2017), where inhibition of mycelial growth of *F. verticillioides* by *Trichoderma* sp. was only 32% compared to control in an in vitro bi-culture test. They were similar to the result obtained by Dendouga et al. (2016), where the rate of growth reduction was 70.68%, representing the efficacy of biological control of *T. harzianum* against *F. culmorum* by in vitro assays. We suppose therefore that T9, T12, and T14 are part of the same species, according to some reports in the literature showing that there are no or slight differences among strains of the same species, for the control of *Fusarium* spp. (Khan et al. 2006).

The T7 isolate recorded the highest rate (85.22%) against FC4, but this high score was not generalized against other strains of *F. culmorum*. The T7 isolate was excluded from in vivo testing due to its specificity as an FC4 antagonist only (Table 2 and Fig. 3c). In contrast,



Fig. 4 Photos illustrate the different stages of FHB infection, after inoculation with FC2. **a** Healthy spike (control). **b** Start of FHB. **c** Spread. **d** 50% fusarium spike. **e** 100% fusarium spike. **f** Different stages of *Fusarium* disease in the same cultivar. **g** Healthy kernels. **h** Fusarium kernels



T1 recorded the lowest rates among all isolates with 30.46, 14.77, 18.18, and 11.49% against FC11, FC2, FC4, and FC20, respectively (Table 2 and Fig. 3).

Trichoderma species are known to produce many volatile organic compounds (Stoppacher et al. 2010), and they also play a major role in inhibiting the growth of the pathogen. Indirect (remote) confrontation experiments showed a reduction in pathogen growth that differs from strain to strain. The T9, T12, and T14 isolates were again more effective than the other isolates studied, the reduction in growth of all 4 strains of *F. culmorum* was stable and balanced with T9 (48.75, 29.26, 27.90, and 25%), T12 (50, 32.92, 55.81, and 48.80%), and T14 (56.25, 21.95%, 44.18, and 13.09%) versus FC11, FC2, FC4, and FC20, respectively (Table 2 and Fig. 3). Behzad et al. (2008) showed similar results with volatile inhibitory substances produced by

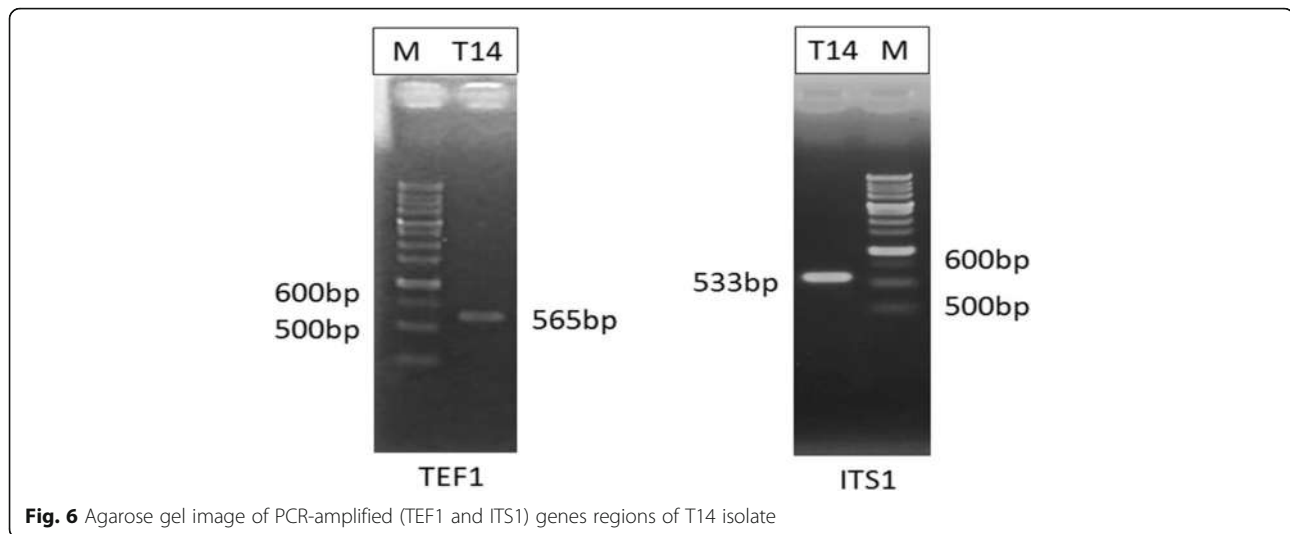
Trichoderma isolates against *F. graminearum*. The major advantage of antibiosis via volatile substances is that these substances can remain close to the spikes, thus controlling the inoculum of airborne pathogens without even establishing actual physical contact with them.

In addition, the *I*% recorded for DC is significantly higher than that recorded for IC, with the exception of the T11 isolate with FC2, FC4, and FC20, where the indirect inhibition rates were better than the direct ones, which can be explained by the volatile substances that characterize T11 compared to the others (Table 2 and Fig. 3b–d). The T1 isolate always remained in last place with non-significant and almost negligible rates (10, 0, 6.97%, and 9.52%) versus FC11, FC2, FC4, and FC20, respectively (Table 2 and Fig. 3). These results indicated

Table 5 Comparison of physical properties (length, width, thickness) of the grains of the 4 cultivars tested (control, FC2 infected, FC2 infected and treated with T14, and treated with T14 only)

Physical properties of grain	Length ± Std deviation(mm)				Width ± Std deviation(mm)				Thickness ± Std deviation(mm)			
	Control	Infected FC2	Treated FC2 + T14	Treated T14	Control	Infected FC2	Treated FC2 + T14	Treated T14	Control	Infected FC2	Treated FC2+T14	Treated T14
Simeto	8.58 ± 0.30 ^b	7.97 ± 0.39 ^{ab}	8.39 ± 0.42 ^b	8.54 ± 0.22 ^b	3.19 ± 0.17 ^b	1.69 ± 0.42 ^a	2.60 ± 0.26 ^{ab}	2.97 ± 0.37 ^{ab}	3.56 ± 0.13 ^b	2.55 ± 0.34 ^{ab}	3.37 ± 0.12 ^b	3.48 ± 0.16 ^b
Waha	7.99 ± 0.17 ^a	6.90 ± 0.23 ^a	7.27 ± 0.32 ^a	7.63 ± 0.40 ^a	3.23 ± 0.10 ^b	2.14 ± 0.07 ^b	2.39 ± 0.35 ^a	3.15 ± 0.17 ^b	3.39 ± 0.18 ^{ab}	2.48 ± 0.38 ^{ab}	2.84 ± 0.31 ^a	3.36 ± 0.22 ^{ab}
Bousselem	7.88 ± 0.54 ^a	8.13 ± 0.25 ^b	8.23 ± 0.31 ^b	8.31 ± 0.25 ^b	2.56 ± 0.16 ^a	2.08 ± 0.26 ^{ab}	2.86 ± 0.14 ^b	3.11 ± 0.12 ^{ab}	3.16 ± 0.23 ^a	2.44 ± 0.24 ^a	3.21 ± 0.12 ^b	3.17 ± 0.06 ^a
Setifs	7.88 ± 0.25 ^a	7.73 ± 0.16 ^b	7.99 ± 0.19 ^b	7.38 ± 0.23 ^a	3.32 ± 0.12 ^b	2.34 ± 0.29 ^b	2.44 ± 0.19 ^a	2.84 ± 0.16 ^a	3.42 ± 0.17 ^b	2.84 ± 0.25 ^b	3.16 ± 0.14 ^b	3.41 ± 0.19 ^{ab}

The values (mean ± Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (*P* < 0.05)



that not all antagonist isolates are equally effective against the pathogen.

A rapid neutralization of the pathogen was observed. All *Trichoderma* isolates were fast growing, with the mycelial mass invading the Petri dish in only 3 days, while the strains of the pathogen require 6 days. Rapid germination was a decisive element for the competitiveness of *Trichoderma* spp. in antagonism. The same observation was made by El-Komy et al. (2015). In addition to the rapid development of *Trichoderma* strains, they are naturally resistant to many toxic compounds, including herbicides, fungicides and pesticides, and phenolic compounds, and recover very quickly after sub-lethal doses of some of these compounds are added (Harman et al. 2004).

In the in vivo tests, in growth chamber or in greenhouse, T14 isolate was selected to be applied in vitro. This choice was supported by three reasons; firstly, the highest and most stable inhibition rates recorded against the four strains of *F. culmorum*; secondly, T14 recorded the best inhibition score against the pathogen FC2 in in vitro tests (79.54%) (Table 2); and thirdly, the fact that it came from wheat rhizosphere. So, it is already adapted to the environment where it was to be applied. However, the choice of FC2 as a pathogen was random. These experiments were very useful in evaluating the in vivo efficacy of *Trichoderma* biocontrol in reducing FCR and FHB.

According to Erginbas-Orakci et al. (2016), there are several collar inoculation techniques for FCR (seedling dipping, droplet at the base of the stem and colonized grain). The disc technique used in this study was new and used for the first time in this study, taking into consideration the work of Dhingra and Sinclair (1985) who found that the addition of adhesive agents such as gelatin, agar, or methylcellulose is advantageous for inoculation in greenhouse and in field. The inoculation with

FC2 was performed by a mycelial disc around the stems, and the treatment is also applied in the same way for more equality in competitiveness, and more targeting of the crown.

The results obtained in growth chamber showed that FC2 strain induced FCR in all tubes and pots, with a DS% of 68 and 60.5%, respectively. While a very significant decrease in DS% was recorded in tubes and pots treated with T14 strain, with a reduction rate of 50 and 63.63%, respectively (Table 3). Results close to those obtained by Lu et al. (2020) with an in vivo inhibition rate of more than 50% by a strain of *Trichoderma* against *F. graminearum*, and *F. verticillioides* agents responsible for corn stem rot in China. Also, obtained results appeared much more interesting compared to the one obtained by Ghanbarzadeh et al. (2016), where a strain of *T. harzianum* reduced the incidence of basal rot disease in onions by only 25% against *F. proliferatum*. Nevertheless, the fungicidal seed treatment was inferior to that with *Trichoderma*.

In in vivo tests in the greenhouse, the application of the T14 isolate (highly antagonistic in the in vitro test) against the FC2 strain, led to a significant reduction in the AUDPC standard of FHB than the untreated inoculated control. The highest rate of reduction was achieved by the cultivar Setifis (74.60%), followed by Simeto (49.77%) (Table 4 and Fig. 5a). Obtained results are in agreement with those of Saharan et al. (2008), in which, *Trichoderma* spp. had confirmed as the most potent agents against *Fusarium* spp. and induce inhibitory effects on the mycelial growth of *F. graminearum* and *F. semitectum*, the causative agent of FHB in wheat. Other results obtained by Mahmoud (2016) revealed that *T. harzianum* significantly reduced the severity of FHB caused by *F. graminearum* and *F. culmorum*. A highly

significant Pearson correlation between $AUDPC_{FC2}$ and $AUDPC_{FC2+T14}$ with $r = 0.955$, $p < 0.001$, for the 4 wheat cultivars tested, confirming the positive role induced by the treatment with T14.

The lowest FHB severity was achieved by the cultivar Setifis with $AUDPC_{FC2} = 16.38\%$, followed by Bousselem (18.94%), compared to the other cultivars tested (Table 4 and Fig. 5a). This confirms the varietal resistance of these two cultivars to FHB. It is also observed that there was a clear improvement in TKW between the diseased grain and that treated with T14, except Waha and Setifis, where the $TKW_{FC2 + T14} < TKW_{FC2}$ for unknown reasons (Table 4 and Fig. 5b). The decrease in TKW_{T14} compared to the control ($TKW_{T14} < TKW_{control}$) was very small and negligible, which encouraged the use of T14 as a preventive treatment without affecting yield.

Study of the physical parameters of the grains from the spike inoculation test in the greenhouse (control, FC2 infected, FC2 infected and treated with T14, and treated with T14 only) revealed that the length parameter L was not at all influenced by FC2 infection; on the other hand, the width parameter W and thickness parameter T showed that the measurements of FC2-infected grains were smaller than those infected by FC2 and treated with T14, which confirmed the biocontrol effect of T14. The difference between control and T14-treated grains were almost similar, which encourage the use of T14 as a preventive treatment without influencing the physical properties of the grains (Table 5).

The identification of microscopic characteristics, as well as the sequences of ITS and TEF1- α (Fig. 6), allowed to identify T14 isolate as *T. afroharzianum*, recently declared as the first report in Algeria (Benttoui et al. 2020; Haouhach et al. 2020). Therefore, the present work was the first to use *T. afroharzianum* as a biocontrol agent in Algeria.

Species identification using molecular characterization tools is very useful in answering the question of whether a particular taxon is present on particular hosts or plants (Abd-Elsalam et al. 2010). This will reduce the severity of FCR and FHB diseases in wheat by using the appropriate biocontrol agent.

Conclusion

In conclusion, biocontrol agents could play an important role in the protection of wheat. Among the 15 *Trichoderma* spp. isolated in this study, *T. afroharzianum* showed promising results for the control of FCR and FHB in wheat. *Trichoderma afroharzianum* evaluated for the first time in Algeria as a biocontrol agent is recommended as a preventive treatment without affecting yield and without influencing the physical properties of the grains. Additionally, it comes from agricultural soil of wheat, so it is already adapted to the environment where it is to be applied.

Abbreviations

FCR: Fusarium crown rot; FHB: Fusarium head blight; %GI: Germination inhibition percentage; AUDPC: Area under the disease progress curve; ANOVA: Analysis of variance; TEF1- α : Translation elongation factor1-alpha; ITS1: Internal transcribed spacers; DC: Direct confrontation; IC: Indirect confrontation; PSA: Potato sucrose agar; DS: Disease severity; NaClO: Sodium hypochlorite; PSS: The percentage of symptomatic spikelets; TKW: Thousand kernel weight

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria.

Authors' contributions

HB conceived the work, designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. IB was a major contributor in writing the manuscript, reviewing, and editing the paper. WH contributed to the isolation of *Trichoderma* strains. SB contributed to the isolation of *Trichoderma* strains. AB offered the durum wheat cultivars tested. DK was responsible for the supervision and project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Author details

¹Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria. ²Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), 25000 Constantine, Algeria. ³École Nationale Supérieure de Biotechnologie, Pôle Universitaire, Nouvelle Ville Ali Mendjeli, Constantine, Algeria.

Received: 30 December 2020 Accepted: 11 April 2021

Published online: 20 April 2021

References

- Abdallah-Nekache N, Laraba I, Ducos C, Barreau C, Bouznad Z, Bouregghda 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01673-7>
- Abd-Elsalam KA, Almohimeed I, Moslem MA, Bahkali AH (2010) M13-microsatellite PCR and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) species in Saudi Arabian soil. *Genet Mol Res* 9:2016–2024. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr908>
- Akrami M, Yusefi Z (2015) Biological control of Fusarium wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as Antagonist fungi. *Biol Forum* 7:887–892
- Ann J, Cynthia C, Federico G, Lani L (2017) *In vitro* Evaluation of the Antagonistic Activity of *Trichoderma* sp. against *Fusarium verticillioides*. *Int J Agric Technol* 13(7.3):2539–2548

- Asad SI, Shamim A, Iftikhar A (2009) Characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in Pakistan. *Pak J Bot* 41(1):301–308
- Behzad H, Mousa T, Mohammad R, Mahdi D (2008) Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *Afr J Biotechnol* 7(8):967–972
- Benttoui N, Colagiero M, Sellami S, Bouregghda H, Keddad A, Ciancio A (2020) Diversity of Nematode Microbial Antagonists from Algeria Shows Occurrence of Nematotoxic *Trichoderma* spp. *Plants*. 9(8):941. <https://doi.org/10.3390/plants9080941>
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553–556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Daami-Remadi M, El Mahjoub (2001) Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann L'INRAT* 74:167–186
- Davet P, Rouxel F (1997) Detection et isolation des champignons du sol. INRA, Paris
- Dendouga W, Bouregghda H, Belhamra M (2016) Biocontrol Of Wheat Fusarium Crown And Root Rot By *Trichoderma* Spp. And Evaluation Of Their Cell Wall Degrading Enzymes Activities. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 51(1):1–12. <https://doi.org/10.1556/038.51.2016.1.1>
- Dhingra OD, Sinclair JB (1985) Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc, Boca Raton, p 355. <https://doi.org/10.1201/9781315138138>
- El-Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY (2015) Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium Wilt. *Plant Pathol J* 31(1):50–60. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087>
- Erginbas-Orakci G, Poole G, Nicol JM, Paulitz T, Dababat AA, Campbell K (2016) Assessment of inoculation methods to identify resistance to Fusarium crown rot in wheat. *J Plant Dis Protect* 123(1):19–27. <https://doi.org/10.1007/S41348-016-0001-8>
- Ghanbarzadeh B, Safaie N, Goltapeh EM, Danesh YR, Khelghatibana F (2016) Biological control of *Fusarium* basal rot of onion using *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae*. *J Crop Prot* 5(3):359–368. <https://doi.org/10.18869/modares.jcp.5.3.359>
- Ghazalibiglar H, Hampton JG, Van ZijldeJong E, Holyoake A (2016) Evaluation of *Paenibacillus spp.* isolates for the biological control of black rot in *Brassica oleracea var. capitata* (cabbage). *Biocontrol Sci Tech* 26:504–515. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1129052>
- Goodwin DC, Lee SB (1993) Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*. 15:438–444
- Haouhach S, Karkachi N, Ouguiba B, Sidaoui A, Chamorro I, Kihal M, Monte E (2020) Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). *Microorganisms* 8(10):1455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101455>
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma species* — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2(1):43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman GE, Kubicek CP (eds) (1998) *Trichoderma and Gliocladium* (Vol 2). Taylor and Francis Ltd, UK. <https://doi.org/10.1201/9781482267945>
- Hibar K, Daami-Remadi M, Khiareddine H, El Mahjoub M (2004) Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Biotechnol Agron Soc Environ* 2005 9(3):163–171
- Hmouni A, Hajlaoui MR, Mlaiki A (1996) Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPP Bull* 26(3-4):697–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1996.tb01513.x>
- Khan MR, Fischer S, Egan D, Doohan FM (2006) Biological Control of Fusarium Seedling Blight Disease of Wheat and Barley. *Phytopathol.* 96(4):386–394. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0386>
- Khandelwal M, Datta S, Mehta J, Naruka R, Makhijani K, Sharma G, Kumar R, Chandra S (2012) Isolation, characterization and biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products-A biocontrol agent. *Adv Appl Sci Res* 3:3950–3955
- Laraba I, Bouregghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obanon F, Moretti A, O'Donnell K (2017) Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol* 103:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.04.001>
- Lu Z, Tu G, Zhang T, Li Y, Wang X, Zhang Q, Song W, Chen J (2020) Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. *J Integr Agric* 19(1):145–152. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62734-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62734-6)
- Mahmoud AF (2016) Genetic Variation and Biological Control of *Fusarium graminearum* Isolated from Wheat in Assiut-Egypt. *Plant Pathol J* 32(2):145–156. <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.09.2015.0201>
- Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, Seidl-Seiboth V, Vannacci G (2011) Biocontrol of Fusarium head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiol.* 158(1):98–106. <https://doi.org/10.1099/mic.0052639-0>
- McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res* 26:195–217
- Mielniczuk E, Skwaryło-Bednarz B (2020) Fusarium Head Blight, Mycotoxins and Strategies for Their Reduction. *Agron* 10(4):509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
- Moya-Elizondo EA (2013) Fusarium crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Cienc Investig Agrar* 40(2):235–252. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202013000200001>
- Mukhopadhyay AN (2005) *Trichoderma*-Promises and pitfalls. *J Mycol Plant Pathol* 35:533–534
- Saharan MS, Sharma AK, Singh S (2008) Management of head scab (*Fusarium spp.*) of wheat (*Triticum aestivum*) with bioagents. *Indian J Agric Sci* 78(4):328–332
- Siou D, Gélisse S, Laval V, Elbelt S, Repinçay C, Bourdat-Deschamps M, Suffert F, Lannou C (2015) Interactions between head blight pathogens: consequences for disease development and toxin production in wheat spikes. *Appl Environ Microbiol* 81(3):957–965. <https://doi.org/10.1128/AEM.02879-14>
- Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Canalès R, Suffert F, Lannou C (2013) Effect of wheat spike infection timing on fusarium head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol* 63(2):390–399. <https://doi.org/10.1111/ppa.12106>
- Srivastava RK, Singh RK, Kumar N, Singh S (2010) Management of macrophomina disease complex in jute (*Corchorus olitorius*) by *Trichoderma viride*. *J Biol Control* 24:77–79. <https://doi.org/10.18311/JBC/2010/3578>
- Stein JM, Osborne LE, Bondalapati KD, Glover KD, Nelson CA (2009) Fusarium head blight severity and deoxynivalenol concentration in wheat in response to *Gibberella zeae* inoculum concentration. *Phytopathol* 99(6):759–764. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-6-0759>
- Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, Krška R, Schuhmacher R (2010) Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J Microbiol Methods* 81(2):187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>
- Tian Y, Tan Y, Liu N, Liao Y, Sun C, Wang S, Wu A (2016) Functional Agents to Biologically Control Deoxynivalenol Contamination in Cereal Grains. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00395>
- Tsegaye Redda E, Ma J, Mei J, Li M, Wu B, Jiang X (2018) Antagonistic potential of different isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *Eur J Exp Biol* 08:212. <https://doi.org/10.21767/2248-9215.100053>
- Wegulo SN, Baenziger PS, Hernandez Nopsa J, Bockus WW, Hallen-Adams H (2015) Management of Fusarium head blight of wheat and barley. *Crop Prot* 73:100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Xu X, Nicholson P (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol* 47(1):83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>
- Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK (2016) Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biol Rev* 30(2):74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**CHAPITRE 6 : Sélection d'un
traitement de bio-contrôle par une
mixture de *Trichoderma* contre
Fusarium culmorum agent causal de
la fusariose de l'épi et de la
pourriture du collet**

CHAPITRE 6 : Sélection d'un traitement de bio-contrôle par une mixture de *Trichoderma* contre *Fusarium culmorum* agent causal de la fusariose de l'épi et de la pourriture du collet

Préambule

Le blé dur (*Triticum durum* Desf) est la principale culture vivrière de base en Algérie. Cependant, il est affecté par plusieurs stress biotiques. Parmi ces stress, la FCR et la FHB, deux graves maladies fongiques du blé dans le monde entraînant des pertes importantes de rendement.

L'intérêt mondial a été donné aux recherches liées à *Trichoderma* grâce à ses applications dans le domaine de l'agriculture et de la biotechnologie. Ce champignon a été utilisé comme un agent de bio-contrôle efficace contre les phytopathogènes. Cependant il existe plusieurs formes, modes et techniques d'usage de cet antagoniste, citons comme exemple ; la forme solide (poudre) appliquée sur le sol, les graines enrobées avec la poudre, ou sous forme liquide (suspension sporale) appliquée comme traitement foliaire.

Dans le chapitre précédent et après l'aboutissement à de nouvelles souches indigènes de *Trichoderma* ayant un fort potentiel de bio-contrôle contre les deux maladies, il a été plus qu'indispensable d'exploiter et d'appliquer ces résultats sur le terrain.

Dans ce dernier chapitre sont présentés les résultats supplémentaires obtenus concernant l'application directe de *Trichoderma* comme agent de bio-contrôle où l'évaluation *in vivo* de son effet antagoniste vis-à-vis de l'agent pathogène *Fusarium culmorum* sous des conditions environnementales contrôlées (en serre) et non contrôlées (dans le champ) est estimée. L'objectif principal est de sélectionner un type de traitement adéquat qui donne plus d'efficacité de bio-contrôle ainsi qu'un rendement élevé.

6.1. Effet de la mixture T14+T11 dans la réduction de la FCR *in vivo*

Le cas N°3 a donné des résultats meilleurs que ceux du témoin (cas N°1) (**Figure 20, a**) avec une nette amélioration des paramètres CL et CW (**Figure 18**) avec des valeurs de %RCL et %RCW négatives de -10.37% et -32.59%, respectivement (**Tableau 5**). Donc la mixture T14+T11 joue un rôle de bio-fertilisant avec excellence (**Figure 20, c**). Parmi les cas inoculés avec la mixture, le cas N°5 a donné les meilleurs résultats avec un pourcentage de réduction de la maladie %DS le plus important (52.44%) et des %RCL et %RCW les plus faibles avec -1.50 et 11.41%, respectivement (**Tableau 5**) (**Figure 20, e**).

Le cas N°4 représente le témoin positif où le pathogène FC4 a bien causé la FCR avec un %DS élevé (51.11%).

Il ressort de ces résultats que la méthode de bio-contrôle utilisant les graines enrobées avant semis par la mixture (T14+T11) est la plus recommandée car elle a montré une efficacité significative plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement.

Tableau 5 la sévérité de la FCR (inoculation par FC4) et l'effet de bio-contrôle de (T14+T11) sur les paramètres (DS, CL et CW) dans le test d'inoculation du collet dans les pots.

Traitement	DS±Std. deviation	CL±Std. deviation (mm)	CW±Std. deviation (mg)	%DS réduction	%RCL	%RCW
Cas Numéro 1	00.00±00.00 ^a	339.62±28.84 ^{ab}	705.13±121.04 ^b		0	0
Cas Numéro 2	57.22±12.94 ^c	279.48±3.16 ^a	399.85±46.31 ^a	0	17.70	43.29
Cas Numéro 3	00.00±00.00 ^a	374.86±35.67 ^b	934.96±205.75 ^c		-10.37	-32.59
Cas Numéro 4	51.11±5.85 ^c	288.09±21.46 ^a	389.70±33.14 ^a	10.67	15.17	44.73
Cas Numéro 5	27.21±7.69 ^b	344.73±43.76 ^{ab}	624.67±23.00 ^{ab}	52.44	-1.50	11.41
Cas Numéro 6	51.64±11.00 ^c	268.75±26.98 ^a	455.91±98.83 ^{ab}	9.75	20.86	35.34

For each column, the values (mean ± Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (P < 0.05)

- Cas numéro 1 : 5 pots, témoins négatifs (non inoculés).
- Cas numéro 2 : 5 pots, graines enrobées avec la mixture (T14+T11) + plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- Cas numéro 3 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement.
- Cas numéro 4 : 5 pots, témoins positifs (inoculés avec un disque de 13 mm de FC4).
- Cas numéro 5 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- Cas numéro 6 : 5 pots, plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).

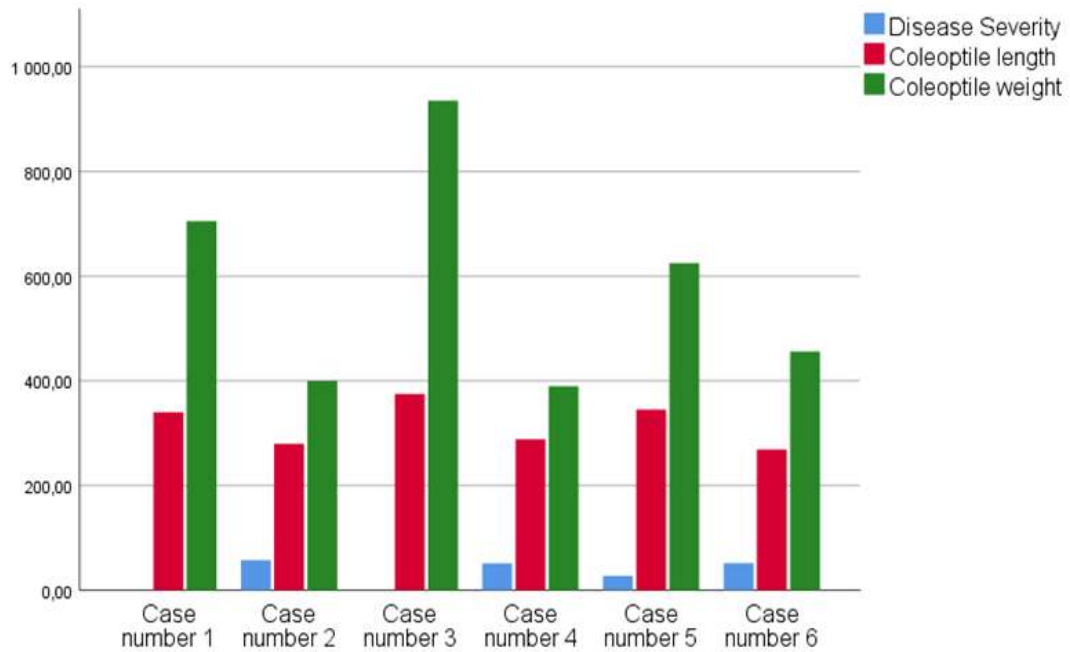


Figure 18. Histogramme montrant l'effet de bio-contrôle de T14+T11 sur les symptômes de la FCR (DS, CL et CW) du blé dur GTAdur, dans les 6 cas testés.

6.2. Effet de la mixture T14+T11 dans la réduction de la FHB *in vivo*

6.2.1. Test des pots dans la serre

Dans le cas N°4 représentant le témoin positif, le pathogène FC4 a bien causé la FHB avec un $AUDPC_{pot} = 45.44\%$ qui est le plus élevé.

Dans le cas N°2, les résultats ne sont pas encourageants car ils sont semblables à ceux du témoin positif (cas N°4), montrant que le double traitement semble inefficace (**Tableau 6**).

Le cas N°3 a donné des résultats meilleurs que ceux du témoin négatif (cas N°1) (**Tableau 6**) avec une valeur de $\% TKW_{potloss}$ négative de -7.21% (**Tableau 6**). Une amélioration du rendement est observée dans ce cas montrant que la méthode des graines enrobées avant semis par la mixture sans provocation de la maladie utilisée comme traitement préventif est très efficace pour la productivité (**Tableau 6**).

Parmi les cas inoculés, le cas N°5 a donné les meilleurs résultats avec une nette diminution du paramètre $AUDPC_{pot}$ (4.83%) qui est d'ailleurs le plus bas parmi les différents traitements (**Figure 19, a**).

Là encore une fois, il ressort que la méthode de bio-contrôle avec des graines enrobées avant semis avec la mixture (T14+T11) montre une efficacité significative plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement.

Tableau 6 la sévérité de la FHB (inoculation par FC4) et l'effet antagoniste induit par le mélange T14+T11 dans les deux tests *in vivo* (inoculation de l'épi dans la serre et le champ).

Test de traitement	Test du FHB dans le champ			Test du FHB dans la serre		
	AUDPC _{field} ±Std. deviation	TKW _{field} ±Std. deviation (g)	% TKW _{fieldloss}	AUDPC _{pot} ±Std. deviation	TKW _{pot} ±Std. deviation (g)	% TKW _{potloss}
Cas Numéro 1	00.00±00.00 ^a	40.25±3.81 ^b	0	00.00±00.00 ^a	46.68±1.28 ^a	0
Cas Numéro 2	31.63±11.53 ^b	29.42±1.95 ^a	26.90	39.47±9.03 ^b	38.38±2.53 ^a	17.78
Cas Numéro 3	00.00±00.00 ^a	43.02±0.99 ^b	-6.88	00.00±00.00 ^a	50.05±4.53 ^a	-7.21
Cas Numéro 4	47.84±11.48 ^b	29.82±0.51 ^a	25.91	45.44±23.32 ^b	38.35±5.25 ^a	17.84
Cas Numéro 5	29.60±9.99 ^b	31.92±3.16 ^a	20.69	4.83±1.08 ^a	50.00±7.42 ^a	-7.11
Cas Numéro 6	44.87±14.20	29.18±2.28 ^a	27.50	24.83±10.37 ^{ab}	38.54±1.29 ^a	17.43

For each column, the values (mean ± Std. deviation) with different letters denote the statistical significance determined by ANOVA followed by Tukey test (P < 0.05)

- Cas numéro 1 : 5 pots, témoins négatifs (non inoculés).
- Cas numéro 2 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + pulvérisation de l'épi (T14+T11) une semaine avant inoculation + inoculation par la suspension (FC4).
- Cas numéro 3 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement.
- Cas numéro 4 : 5 pots, témoins positifs, inoculation de l'épi par la suspension (FC4).
- Cas numéro 5 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4).
- Cas numéro 6 : 5 pots, pulvérisation de l'épi (T14+T11) + inoculation par la suspension (FC4).

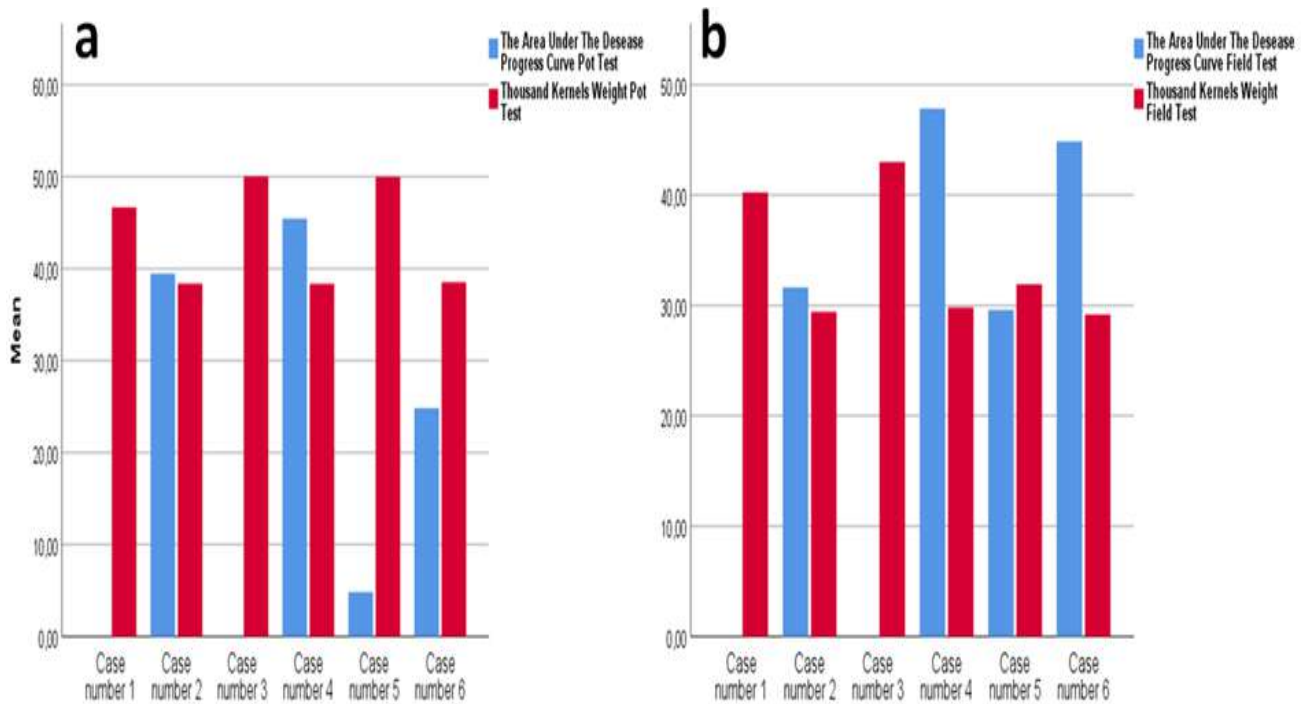


Figure 19. Histogrammes montrant l'effet de bio-contrôle de T14+T11 sur les symptômes de la FHB (AUDPC et TKW) du blé dur GTAdur, dans les 6 cas testés. **a** : Test de la serre. **b** : Test du champ.

6.2.2. Test du champ

Le cas N°4 représente le témoin positif, le pathogène FC4 a bien causé la FHB avec un $AUDPC_{\text{field}} = 47.84\%$ qui est le plus élevé. Le cas N°3 a donné des résultats meilleurs que ceux du témoin (cas N°1, témoins négatifs) (**Tableau 6**) avec une valeur de $\% TKW_{\text{fieldloss}}$ négative de -6.88% (**Tableau 6**). Une amélioration du rendement est remarquée quand les graines sont enrobées avant semis par la mixture utilisée comme traitement préventif sans provocation de la maladie (**Tableau 6**). Parmi les cas inoculés, le cas N°5 a donné les meilleurs résultats avec une nette diminution du paramètre $AUDPC_{\text{field}}$ (29.60%) qui est le plus bas parmi les différents traitements (**Figure 19, b**).

Donc le traitement de bio-contrôle avec graines enrobées avant semis (T14+T11) a montré une efficacité significative plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement.

Tous les cultivars ont été touchés par la FHB due à l'inoculation par FC4 (**Tableau 6**).

Tandis que le cas 05 a montré une certaine résistance à la FHB avec des $AUDPC=29.60\%$ et 4.83% , champ et serre, respectivement (**Tableau 6**). Une nette amélioration du TKW par rapport au témoin positif est observée. Ces améliorations remarquables sont dues au mode de traitement (graines enrobées avant semis) avec T14+T11.

Le $TKW_{\text{cas3}} < TKW_{\text{cas1}}$ (Témoin négatif) dans les deux tests, ce résultat confirme que le bio-contrôle par la méthode des graines enrobées avant semis avec le mélange *Trichoderma* (T14+T11), semble jouer le rôle de bio-fertilisant et permet aussi d'améliorer le rendement du blé.

6.2.3. Corrélation entre les paramètres des deux tests *in vivo* dans la serre et le champ

Une corrélation de Pearson très significative entre le paramètre TKW_{field} et TKW_{pot} , avec ($r=0.642$, $P=0.004 < 0.01$) est observée. Il en est de même entre les standards $AUDPC_{\text{field}}$ et $AUDPC_{\text{pot}}$, avec ($r=0.670$, $P=0.002 < 0.01$). Cette corrélation significative entre les tests réalisés dans la serre et dans le champ nous permet de dire qu'il serait possible d'évaluer l'effet de bio-contrôle sur la FHB en utilisant des tests simples faciles et moins coûteux seulement dans la serre à la place des tests dans le champ qui sont plus difficiles à réaliser.

Une corrélation de Pearson hautement significative a été remarquée entre le paramètre $AUDPC_{\text{field}}$ du FHB et DS du test FCR *in vitro* avec ($r=0.797$, $P < 0.001$) et aussi entre les standards $AUDPC_{\text{pot}}$ du FHB et le DS du FCR *in vitro* avec ($r=0.845$, $P < 0.001$).

Cette corrélation significative entre les tests de la FHB (dans la serre et dans le champ) et celui de la FCR nous permet de dire qu'il serait possible d'évaluer l'effet de bio-contrôle sur

la FHB en utilisant des tests simples rapide et moins coûteux seulement par l'évaluation de l'effet de bio-contrôle sur la FCR dans la serre.

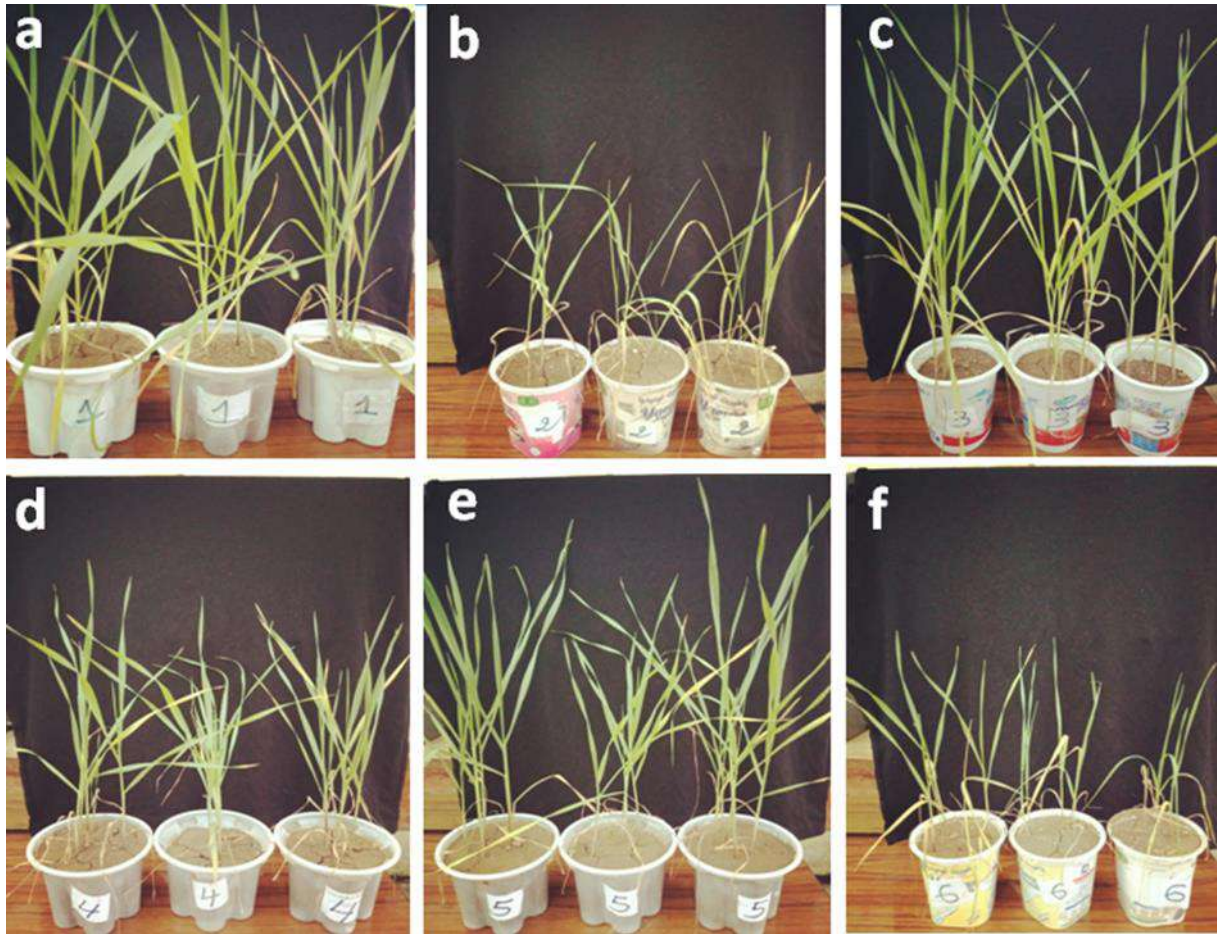


Figure 20. Images illustrant les résultats des différents cas de traitement utilisé dans le bio-contrôle.

- a : Cas numéro 1 : 5 pots, témoins négatifs (non inoculés).
- b : Cas numéro 2 : 5 pots, graines enrobées (T14+T11) + plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- c : Cas numéro 3 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) seulement.
- d : Cas numéro 4 : 5 pots, témoins positifs (inoculés avec un disque de 13mm de FC4).
- e : Cas numéro 5 : 5 pots, graines enrobées avant semis (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).
- f : Cas numéro 6 : 5 pots, plantules pulvérisées une semaine avant inoculation (T14+T11) + inoculation par FC4 (disque de 13mm).

Discussion générale

Discussion générale

La première partie de cette étude a été menée pour isoler et identifier les *Fusarium* spp. causant la FCR et la FHB du blé dans la région nord-est de l'Algérie, tout en mettant l'accent sur la caractérisation de leurs traits de vie et leurs agressivités (*in vitro* et *in vivo*). La diversité des agents pathogènes a été appréciée au niveau de l'espèce et même au niveau de la souche pour certaines espèces. L'identification moléculaire des espèces du genre *Fusarium* correspond au séquençage de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADNr et la comparaison des séquences finales avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI. Nous signalons ici qu'une telle étude n'a jamais été entreprise en Algérie.

Un total de 34 isolats de *Fusarium* spp. obtenu à partir de soixante-trois échantillons de blé symptomatiques de la FCR et cinquante-quatre épis de blé atteints de la FHB, durant la saison agricole 2019. Nous avons révélé une diversité importante des espèces de *Fusarium* isolées et nous avons répertorié de nouvelles espèces jamais déclarées en Algérie. Cinq espèces de *Fusarium* ont été isolées à partir du collet : *F. culmorum* (16), *F. oxysporum* (1), *F. graminearum* (1), *F. cerealis*(3) et *F. acuminatum* (2). Seulement 11 isolats à partir des grains ont été répertoriés répartis comme suit : *F. culmorum* (3), *F. graminearum* (1), *F. asiaticum* (1), *F. incarnatum* (3), *F. fujikuroi* (1), *F. brachygibbosum* (1) et *F. equiseti* (1). Cette grande diversité des espèces isolées à partir des grains de blé semble similaire à celle obtenue par Nielsen et al. (2011), où ils ont trouvé jusqu'à sept espèces différentes de *Fusarium* dans les échantillons des grains, confirmant l'existence d'un complexe d'espèces diverses de *Fusarium* à l'origine des épidémies de FHB. Audenaert et al. (2009) ont enregistré jusqu'à neuf *Fusarium* spp. dans un échantillon de céréale et ont trouvé des associations claires et une synergie directe entre certaines espèces.

Les champignons responsables de la fusariose montrent une grande diversité des traits de vie et des espèces. Les traits de vie de chaque isolat ont été mesurés à savoir le taux de sporulation et la vitesse de croissance. Une différence remarquable entre les isolats pour les deux traits de vie a été enregistrée. Bien que le pouvoir pathogène des souches de *F. culmorum* pour la FCR soit fort, il existe un potentiel de variation assez faible entre les souches dans l'agressivité, ceci illustre la variabilité entre les souches d'une même espèce, il est donc nécessaire de continuer à surveiller les tendances de cette espèce pathogène dans le futur.

Cette variation entre les isolats pathogènes associés au complexe FCR a été étudiée par l'utilisation de diverses méthodes d'évaluation et techniques d'inoculation par Dyer et al. (2009), Gargouri-Kammoun et al. (2009), Yang et al. (2010) et Poole et al. (2012). La plupart de ces études ont montré que *F. pseudograminearum* et *F. culmorum* étaient les espèces les plus pathogènes, et que *F. avenaceum*, *F. equiseti* et *F. poae* étaient les espèces les moins pathogènes. Tandis que *F. pseudograminearum* et *F. graminearum* causent beaucoup plus la pourriture du collet, et *F. culmorum* ont été dominants dans la brûlure des semis (Dyer et al. 2009).

Les espèces uniques de *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. asiaticum*, *F. fujikuroi* et *F. brachygibbosum* ont enregistré des valeurs de pathogénicité faibles à négligeables. Ces espèces n'ont pas été compétitives comme les souches de *F. culmorum*. Nos résultats semblent être compatibles avec les travaux de Safaee et al. (2012), Eslahi (2012), Shikur Gebremariam et al. (2017) et Dehghanpour et al. (2019), qui ont constaté que les espèces de *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum* et *F. flocciferum* avait des niveaux de pathogénicité moyens à faibles sur le blé, elles ont été plutôt saprophytes. Selon l'étude menée par Smiley and Patterson (1996), *F. acuminatum* comprend quelques isolats capables de provoquer une décoloration brune du collet du blé et que certaines souches sont capables même de tuer les plantes de blé dans la serre, contrairement à nos résultats avec les deux souches de *F. acuminatum* qui ont été sans influence sur la croissance du coléoptile.

F. culmorum était l'espèce la plus répandue parmi les principales espèces de *Fusarium* pathogènes identifiées dans la présente étude. Ce résultat correspond à ceux obtenus dans d'autres pays comme le Maroc (El Yacoubi et al. 2012), la Tunisie (Rebib et al. 2014), l'Italie (Scherm et al. 2012), la Turquie (Tunali et al. 2008), l'Irak (Matny et al. 2017) et l'Iran (Eslahi 2012) où *F. culmorum* était l'espèce dominante et l'agent causal de la FCR. Cependant, nos résultats semblent être légèrement différents de ceux d'une enquête menée dans cinq provinces de Chine, où *F. asiaticum* était considéré comme l'espèce dominante (Zheng et al. 2014).

La pathogénicité s'est manifestée aussi par une grande réduction de la longueur du coléoptile du blé, en revanche d'autres isolats n'ont pas influé sur ce paramètre où les longueurs du coléoptile étaient supérieures même à celle du témoin, il s'agit des deux souches de *F. incarnatum* et *F. acuminatum*. Trois autres isolats ont enregistré des réductions de la longueur du coléoptile mais la différence par rapport au témoin était presque négligeable, il s'agit des espèces *F. equiseti*, *F. acuminatum* et *F. brachygibbosum*. Contrairement à notre souche unique de *F. equiseti*, Bencheikh et al. (2020) ont trouvé que *F. equiseti* peut affecter

négalement certains paramètres de croissance comme la longueur et le poids du système racinaire et végétatif.

Une fortes corrélation a été constatée entre le test des tubes et celui des pots ($r = 0,62$ $P = 0,007 < 0,01$). Ce résultat nous a permis de prédire l'agressivité des souches de *F. culmorum* dans la FCR du blé par un simple test *in vitro* dans des tubes. Aussi une autre corrélation entre la vitesse de croissance et le taux de sporulation ($r = 0,35$ $P = 0,012 < 0,05$) a été enregistrée.

Le défi majeur et permanent pour les sélectionneurs de blé dans les pays producteurs de blé y compris l'Algérie est de fournir des cultivars présentant une meilleure tolérance à la FCR ainsi qu'à la FHB, des cultivars résistants productifs et adaptés aux contraintes climatiques. En Algérie, nous ne disposons pas d'informations sur les niveaux de résistance/sensibilité à la fusariose des variétés de blé cultivées, ce manque d'information résulte du fait que peu d'études abordent ce sujet. Les changements climatiques avec l'augmentation de la pluviométrie et la température durant la floraison du blé exposent l'agriculture algérienne à des invasions de la FHB et nous obligent à étudier la sensibilité et/ou la résistance des différents cultivars pour plus de maîtrise et pour promouvoir la lutte contre la fusariose. La tolérance à la fusariose et aux maladies cryptogamiques fera partie des critères de choix pour les agriculteurs car aujourd'hui, peu de variétés de blé sont tolérantes à la fusariose.

Ce travail qui constitue le deuxième volet de la thèse avait pour but également d'identifier la résistance des 8 cultivars de blé dur et 9 de blé tendre les plus cultivés dans l'Est Algérien contre le *F. culmorum*, l'agent pathogène commun et le premier responsable de la fusariose du blé en Algérie. Toutes les normes et les paramètres utilisés dans cette étude ont été estimés en pourcentage pour pouvoir les comparer. Tous les tests ont été réalisés dans des conditions contrôlables ; au laboratoire, dans la chambre de culture ou la serre afin de réduire la variabilité associée aux facteurs environnementaux et qui peut affecter les résultats. Wallwork et al. (2004) ont montré que l'essai en plein champ est souvent peu fiable en raison d'une infection naturelle inégale de la contamination par d'autres agents pathogènes ou des conditions environnementales défavorables qui affectent les résultats.

Aucun cultivar dans la présente étude n'a été complètement résistant à la FCR ni à la FHB, aussi les cultivars présentent des niveaux différents de résistance aux deux maladies, cela permet de soutenir l'hypothèse de Liu et al. (2015), selon laquelle les types de résistance à la FCR et la FHB sont probablement régis par des loci différents et mesurent des tolérances différentes, malgré qu'il s'agit du même agent pathogène dans la même plante hôte. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence la possibilité de sélectionner un blé qui est adapté

aux contraintes climatiques et qui expose une meilleure tolérance à la fusariose. La stabilité de cette tolérance améliorée exige toutefois qu'elle soit confirmée par la répétition d'expériences d'inoculation dans l'environnement (Années et lieux).

Trichoderma est un champignon non pathogène qui fournit une protection à de nombreuses cultures contre les maladies fongiques causées par le genre *Fusarium* (Tsegaye et al. 2018). Il est généralement utilisé comme agent de bio-contrôle pour éviter les effets néfastes qui accompagnent la lutte chimique (Kareem et al. 2016). Le bio-contrôle par les *Trichoderma* constitue le troisième volet de cette thèse. L'activité antagoniste de quinze isolats de *Trichoderma* spp. a été évaluée *in vitro* et *in vivo* contre quatre souches de *F. culmorum*. Les techniques de double culture telles que décrites par de nombreuses études antérieures (Nakkeeran et al. 2005; Srivastava et al. 2010) ont été utilisées dans les tests d'antagonisme. L'expérience de la confrontation directe a montré que tous les isolats de *Trichoderma* étaient capables d'inhiber la croissance mycélienne des quatre souches de *F. culmorum* avec des taux qui diffèrent d'un isolat à un autre, et d'une souche à l'autre, conformément à ce qui a été constaté par Khan et al. (2006), Harman (2006), et Luongo et al. (2005). Les différences entre les souches peuvent atteindre un intervalle de plus de 50%, soit *in vitro* ou *in vivo*.

Nos résultats sont nettement meilleurs que ceux obtenus par Ann et al. (2017) où l'inhibition de la croissance mycélienne de *F. verticillioides* par *Trichoderma* sp. a été de 32% seulement par rapport au contrôle dans un test *in vitro* de bi-culture, mais similaires au résultat obtenu par Dendouga et al. (2016) où le taux de réduction de la croissance a été de 70.68%. Ces résultats montrent l'efficacité de la lutte biologique par *T. harzianum* contre *F. culmorum* de la FCR évaluée par des essais *in vitro*.

Parmi les *Trichoderma* spp. étudiées, plusieurs ont été capables d'inhiber la croissance mycélienne avant le contact mycélien par la formation de zones claires, ce qui indique une production éventuelle de composants diffusibles par les antagonistes, tels que les enzymes lytiques extracellulaires ou des métabolites hydrosolubles (Benhamou and Chet 1993; Haran et al. 1996; Grondona et al. 1997; Anees et al. 2010). Dans ce travail et après 6 à 7 jours d'incubation des boîtes de la confrontation, les isolats de *Trichoderma* ont montré leur plus grande capacité mycoparasitique par l'envahissement total de la boîte de Pétri et la sporulation sur les colonies de *F. culmorum*. Un phénomène similaire a été décrit par Benhamou and Chet (1996) lors de la confrontation entre *T. harzianum* et le champignon du sol *Pythium ultimum*.

Selon Erginbas-Orakci et al. (2016), il existe plusieurs techniques d'inoculation du collet pour la FCR (trempage des semis, gouttelette à la base de la tige et grain colonisé). La technique de disque utilisée dans la présente étude est nouvelle, le travail de Dhingra and Sinclair (1985) a été pris en considération, il a constaté que l'ajout des agents adhésifs tels que la gélatine, l'agar, ou la méthylcellulose est avantageux pour l'inoculation dans la serre et sur le terrain. L'inoculation avec *F. culmorum* (FC2) a été réalisée avec un disque mycélien autour des tiges, le traitement avec T14 a été appliqué aussi de la même façon pour plus d'égalité dans la compétitivité, et le ciblage du collet.

Les résultats obtenus dans la chambre de culture ont montré que la souche FC2 a provoqué la FCR du blé dans tous les tubes et les pots, tandis qu'une diminution très significative de la DS% a été enregistrée dans les tubes et pots traités avec T14 (50 et 63.63%, respectivement). Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Lu et al. (2020) avec un taux d'inhibition *in vivo* de plus de 50% par une souche de *Trichoderma* contre *F. graminearum*, et *F. verticillioides* agents responsables de la pourriture de la tige du maïs en Chine. Aussi notre résultat est nettement plus intéressant que celui obtenu par Ghanbarzadeh et al. (2016), où une souche de *Trichoderma harzianum* a réduit l'incidence de la maladie de la pourriture basale de l'oignon à seulement 25% contre *F. proliferatum*. Néanmoins, le traitement fongicide des semences était inférieur à celui avec *Trichoderma*. Une corrélation de Pearson très significative entre $AUDPC_{FC2}$ et $AUDPC_{FC2+T14}$ avec $r=0.955$, $p<0.001$, pour les 4 cultivars du blé testés a été observée, ce qui confirme l'effet positif induit par le traitement avec T14.

Parfois, l'activité antifongique de *Trichoderma* peut être différente entre l'essai *in vitro* et *in vivo*, due à de nombreux autres facteurs, tels que les espèces végétales, le type de sol, la température, l'humidité et la disponibilité des nutriments (Mayo et al. 2015). En plus, la capacité d'une souche à produire des métabolites secondaires sur les boîtes de pétri ou sur les plantes peut être différente et pourrait expliquer la différence d'efficacité entre les deux conditions *in vitro* et *in vivo* (Kusari et al. 2012; Nihorimbere et al. 2012).

L'intérêt mondial a été donné aux recherches liées à *Trichoderma* grâce à ses applications dans le domaine de l'agriculture et de la biotechnologie. Cependant il existe plusieurs formes, modes et techniques d'usage de cet antagoniste, sous une forme liquide (suspension sporale) citons comme exemple ; pulvérisée sur le sol ou enrobées les graines avec suspension sporale ou appliquée comme traitement foliaire.

Après l'aboutissement à de nouvelles souches indigènes de *Trichoderma* ayant un fort potentiel de bio-contrôle contre les deux maladies. Un dernier travail présentera l'application

directe de *Trichoderma* comme agent de bio-contrôle où l'évaluation *in vivo* de son effet antagoniste est estimée avec un objectif principal de sélectionner un type de traitement adéquat qui donne plus d'efficacité de bio-contrôle ainsi qu'un rendement élevé.

Les résultats ont montrés que l'inoculation par la souche FC4 a provoqué la FCR et la FHB dans les trois tests. Le cas N°3 a donné des résultats meilleurs que ceux du témoin (cas N°1) pour les deux tests FCR *in vivo* avec une nette amélioration des paramètres CL et CW et test de la FHB dans la serre et dans le champ avec une valeur de % $TKW_{fieldloss}$ négative. Il ressort de ces résultats que la méthode de bio-contrôle utilisant les graines enrobées avant semis par l'antagoniste est la plus recommandée car elle a montré une efficacité significative plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement testés.

Une corrélation de Pearson très significative entre le paramètre TKW_{field} et TKW_{pot} est enregistrée. Il en est de même entre les standards $AUDPC_{field}$ et $AUDPC_{pot}$. Cette corrélation significative entre les tests réalisés dans la serre et dans le champ nous permet de dire qu'il serait possible d'évaluer l'effet de bio-contrôle sur la FHB en utilisant des tests simples faciles et moins coûteux seulement dans la serre à la place des tests dans le champ qui sont plus difficiles à réaliser.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Cette étude révèle l'existence d'une large gamme d'espèces de *Fusarium* associées à la fusariose du blé en Algérie. Le principal résultat est que les différents *Fusarium* spp. isolés et identifiés ne présentent pas la même pathogénicité dans la FCR d'une part et même entre les souches de la même espèce d'autre part, le cas de l'espèce *F. culmorum*. Ce constat confirme la nécessité d'une stratégie de surveillance vigilante du matériel végétal infecté.

L'espèce prédominante isolée dans cette étude est *F. culmorum*, suivie de *F. cerealis* et *F. incarnatum*. Ici, nous rapportons l'apparition de *F. cerealis*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. asiaticum*, *F. fujikuroi*, *F. brachygibbosum*, *F. incarnatum* et *F. graminearum* pour la première fois dans le blé en Algérie. Ces espèces ont été faiblement pathogènes (saprophytes). Ces résultats susciteront une attention particulière dans les futures études de la FCR du blé, notamment en ce qui concerne la prévalence de ces pathogènes dans les champs de blé et leurs effets sur la productivité des cultures.

Les cultivars Sétifis et Akhamokh montrent une tolérance très intéressante à la maladie, ils peuvent être une source de résistance génétique à la fusariose très prometteuse dans les programmes de sélection et une alternative pour les agriculteurs algériens aux cultivars sensibles.

Parmi les 15 *Trichoderma* spp. isolés dans cette étude, *Trichoderma afroharzianum* évalué pour la première fois en Algérie comme un agent de bio-contrôle a montré des résultats prometteurs pour le contrôle de la FCR et de la FHB du blé, sans affecter le rendement ni les propriétés physiques des grains. De plus, cet agent provient d'un sol agricole de blé, donc il est mieux adapté à l'environnement où il doit être appliqué. En outre la méthode de bio-contrôle utilisant les graines enrobées avant semis a montré une efficacité significative et plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement testés.

Les perspectives de ce travail peuvent être résumées dans les points suivants :

- Les souches collectées dans cette recherche constituent une source fongique caractérisée pour de nombreuses études dans le futur.
- La confirmation du potentiel de bio-contrôle à grande échelle sur champs avec la collaboration des services agricoles et les agriculteurs.
- La production et l'industrialisation d'un produit de bio-contrôle à base de *Trichoderma* qui constituera un bio-fongicide et bio fertilisant bénéfique à l'agriculture nationale sans effets

néfastes sur l'environnement, l'animal, le végétal et l'humain, par rapport à leurs analogues les fongicides chimiques.

Références bibliographiques

1. Abbasi PA, Lazarovits G (2006) Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses *Pythium* damping-off of cucumber seedlings. *Plant Dis* 90 459–464, <https://doi.org/10.1094/PD-90-0459>
2. 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.* doi:10.1007/s10658-019-01673-7
3. Adnan M, Islam W, Shabbir A, Ali Khan K, Ghramh HA, Huang Z, Chen HYH, Lu GD (2019) Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus, *Microbial Pathogenesis*, Volume 129, Pages 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>
4. Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J (2011) *Microbes and Microbial Technology, Agricultural and environmental applications.* <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5>
5. Ahmad P, Hashem A, Abd-Allah EF, Alqarawi AA, John R, Egamberdieva D, Gucel S (2015) Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. *Front Plant Sci*6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00868>
6. Akrami M, Yousefi Z (2015) Biological control of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as Antagonist fungi. *Biol. Forum.* 7:887–892
7. Alfano G, Ivey MLL, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ (2007) Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382, *Phytopathology* 97, 429–437. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0429>
8. Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, Zamioudis C, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2013) Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control* 65, 14-23
9. Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V (2010) Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* 158, 173–181
10. Alvarez CL, Somma S, Proctor RH, Stea G, Mulè G, Logrieco AF, Fernandez Pinto V, Moretti A (2011) Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* 3, 1294-1309
11. Alwathnani HA, Perveen K (2012) Biological control of *fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. *African Journal of Biotechnology* 11, 1100-1105
12. Anees M, Tronsmo A, Edel-Hermann V, Hjeljord LG, Heraud C, Steinberg C (2010) Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.* 114, 691–701. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.05.007>

13. Ann J, Cynthia C, Federico G, Lani L (2017) *In vitro* Evaluation of the Antagonistic Activity of *Trichoderma* sp. against *Fusarium verticillioides*. Inter J Agric Technol 2017 Vol. 13(7.3):2539-2548
14. Arriagada C, Aranda E, Sampedro I, Garcia-Romera I, Ocampo JA (2009) Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. Bioresour Technol 100:6250–6257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.010>
15. Arsan MR, Eraky Amal MI (2011) Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. Plant Pathology 10(1), 36-41
16. Asad SI, Shamim A, Iftikhar A (2009) Characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in Pakistan. Pakistan. J. Bot. 41(1): 301-308.
17. Asran-Amal A, Moustafa-Mahmoud SM, Sabet KK, El Banna OH (2010) *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. Saudi Journal of Biological Sciences 17, 153-157
18. Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G (2009) *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. European Journal of Plant Pathology 125, 445–458
19. Aung T (1998) Development and use of doubled haploids in oats. In Proceedings American Oat Workers Conference, 26-29 July 1998, Winnipeg, Man. pp. 1-2
20. Bai G, Kolb FL, Shaner G, Domier LL (1999) Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. Phytopathology 89: 343-348
21. Bai G, Shaner G (1994) Scab of wheat: Prospects for control. Plant Disease 78, 760–766
22. Bencheikh A, Rouag N, Mamache W, Belabed I (2020) First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria. Arch Phytopathol Plant Protect 1-17. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303>
23. Benhamou N, Chet I (1993) Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83, 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-1062>
24. Benhamou N, Chet I (1996) Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology 86, 405–416. <https://doi.org/10.1094/phyto-86-405>

25. Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7 249–260 doi:1139-6709
26. Benttoui N, Colagiero M, Sellami S, Bouregghda H, Keddad A, Ciancio A (2020) Diversity of Nematode Microbial Antagonists from Algeria Shows Occurrence of Nematotoxic *Trichoderma* spp. *Plants*9(8), 941. doi:10.3390/plants9080941
27. Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
28. Bimenya GS, Olico-Okui Kaviri D, Mbona N, Byarugaba W (2002) Monitoring the severity of iodine deficiency disorders in Uganda. *Afr Health Sci* 2 63–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
29. Bissett JA (1991) revision of the genus *Trichoderma* .II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69 2357–2372. <https://doi.org/10.1139/b91-297>
30. Bissett J, Gams W, Samuels GJ (2015) Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6:263–295
31. Bissett J, Szakacs G, Nolan CA, Druzhinina I, Gradinger C, Kubicek CP (2003) Newspecies of *Trichoderma* from Asia. *Can J Bot* 81 570–586. <https://doi.org/10.1139/b03-051>
32. Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD, Smiley RW (2010) *Compendium of Wheat Diseases and Pests, Third Edition* eds. The American Phytopathological Society. ISBN: 978-0-89054-660-4
33. Bongiorno VA, Rhoden SA, Garcia A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO, Pamphile JA (2016) Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. *Ann Microbiol* 66 855–865. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1168-0>
34. Bostock RM, Karban R, Thaler JS, Weyman PD, Gilchrist D (2001) Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107, 103-111
35. Botton B, Bretton A, Fever M, Gautier S, Guy Ph, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P (1990) *Moisissures utiles et nuisibles, importance industriels*. Edn. Masson. Paris
36. Bouanaka H, Bellil I, Harrat W, Boussaha S, Benbelkacem A, Khelifi D (2021a) 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, 68. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3>

37. Bouanaka H, Bellil I, Khelifi D (2021b). Multiple methods for varietal resistance assessment of durum wheat cultivars against *Fusarium culmorum* the causal agent of Fusarium Head Blight and Crown Rot in Algeria, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 115, 101683. doi:10.1016/j.pmpp.2021.101683.
38. Bouregghda H, Bouznad Z (2009) Biological control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hungarica.* 44:25–38. <https://doi.org/10.1556/APhyt.44.2009.1.4>
39. Boyacioglu D, Hettiarachchy NS, Stack RW (1992) Effects of three systemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Can J Plant Sci* 72: 93-101
40. Brewer D, Mason FG, Taylor A (1987) The production of alamethicins by *Trichoderma* spp.. *Can J Microbiol* 33:619–625. <https://doi.org/10.1139/m87-108>
41. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008) Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147 779–789. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116293>.
42. Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza Á, Takayuki T, Fernie AR, Chet I, ... Willmitzer L (2013) *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLoS Pathogens* 9(3), e1003221. doi:10.1371/journal.ppat.1003221
43. Brown NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE (2010) The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* **114**,555-571
44. Buerstmayr H, Lemmens M, Fedak G, Ruckenbauer P (1999) Back-cross reciprocal analysis of Fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 98: 76-85
45. Burgess LW, Backhouse D, Summerell BA, Swan LJ (2001) Crown rot of wheat. In *Fusarium: Paul E Nelson Memorial Symposium*, BA Summerell, J.L., Backhouse, D., Bryden, W.L., and Burgess, L.W. (eds). St Paul, MN: The American Phytopathological Society, pp. 271–294
46. Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia
47. Burlakoti RR, Estrada R, Rivera VV, Boddada A, Secor GA, Adhikari TB (2007) Real-time PCR Quantification and Mycotoxin Production of *Fusarium graminearum* in Wheat Inoculated with Isolates Collected from Potato, Sugar Beet, and Wheat. *Phytopathology* 97(7), 835–841. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-7-0835>

48. Caligiore-Gei PF, Valdez JG (2015) Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 152–154. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>
49. Caron D(1993) Les Fusarioses. Dans *Maladies des blés et orges* : ITCF, ed., 30-39
50. Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH (2012) *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158:3–16. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052688-0>
51. Chakraborty S, Liu CJ, Mitter V, Scott JB, Akinsanmi OA, Ali S, ... Simpfendorfer S (2006) Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight Management. *Australas Plant Path* 35(6), 643. doi:10.1071/Ap06068
52. Champeil A, Doré T, Fourbet JF (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*166, 1389-1415
53. Chase MW, Reveal JL (2009) « A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III », *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, octobre 2009 p. 122-127 .doi10.1111/j.1095-8339.2009.01002.x
54. Chaverri P, Gazis RO, Samuels GJ (2011) *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia* 103, 139-151.
55. Chacón MR, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J (2007) Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* 10 19–27. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.4>
56. Chaparro AP, Carvajal LH, Orduz S (2011) Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strain, *Agric. Sci.* 02 301–307, <https://doi.org/10.4236/as.2011.23040>
57. Cheng CH, Shen BN, Shang QW, Liu LYD, Peng KC, Chen YH, Chen FF, Hu SF, Wang YT, Wang HC, Wu HY, Lo CT, Lin SS (2018) Gene-to-gene network analysis of the mediation of plant innate immunity by the eliciting plant response-like 1 (Epl1) elicitor of *Trichoderma formosa*. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:683. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-18-0002-TA>
58. Chet I, Inbar J (1994) Biological control of fungal pathogens, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48 37–43, <https://doi.org/10.1007/BF02825358>
59. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814

60. Chung KR, Shilts T, Esturk U, Timmer LW, Ueng P (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol Lett* 226:23–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00605-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00605-0)
61. Clayton WD, Vorontsova M, Harman KT, Williamson H (2018) « *Triticum aestivum* », sur GrassBase - The Online World Grass Flora (consulté le 7 mars 2018)
62. Colla. G, Roupshael. Y, Di Mattia. E, El-Nakhel. C, Cardarelli. M (2015) Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J Sci Food Agric* 95 1706–1715, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
63. Contreras-Cornejo HA, López-Bucio JS, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ramos-Vega M, Guevara-García AA, López-Bucio J (2015a) Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:701–710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0005-R>
64. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J (2014a) *Trichoderma* improves growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:503–514. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0265-R>
65. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Beltrán-Peña E, Herrera-Estrella A, López-Bucio J (2011) *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal Behav* 6:1554–1563. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>
66. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
67. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J (2016) Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
68. Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., del-Val E., Larsen J. (2019) Interactions of *Trichoderma* with Plants, Insects, and Plant Pathogen Microorganisms: Chemical and Molecular Bases. In: Merillon JM, Ramawat K. (eds) *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_23-1

69. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Garnica-Vergara A, López-Bucio J (2015b) *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism. *J Plant Growth Regul* 34:425. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9471-8>
70. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2014b) Enhanced plant immunity using *Trichoderma*. In: Gupta VK (ed) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, Oxford, pp 495–504
71. Cuervo-Parra JA, Sánchez-Lpez V, Romero-Cortes T, Ramírez-Lepe M (2014) *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research* 8, 1704-1712
72. Daami-Remadi M, El Mahgoub M (2001) Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. L'INRAT* 74 :167-186.
73. Davet P, Rouxel F (1997) *Detection Et Isolation Des Champignons Du Sol.*, (Edn) Inra .Paris
74. Debbi A, Bouregghda H, Monte E, Hermosa R (2018) Distribution and Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* Associated with Tomato Diseases in Algeria and a Biocontrol Strategy with Indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00282
75. Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brückner H, von Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ (2008) The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptabiotics, and mycotoxins. *Mycol Prog* 7:177–219. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>
76. De los Santos-Villalobos S, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Sánchez-García P, Peña-Cabriaes JJ (2013) Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biol Control* 64, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
77. Dehghanpour-FS, Taheri P, Falahati-RM (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp., the causal agent of wheat crown and root rot in Iran. *J Plant Pathol* <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00400-9>
78. Dendouga W, Bouregghda H, Belhamra M (2016) Biocontrol Of Wheat Fusarium Crown And Root Rot By *Trichoderma* Spp. And Evaluation Of Their Cell Wall Degrading Enzymes Activities. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 51(1):1–12. <https://doi.org/10.1556/038.51.2016.1.1>

79. Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans Br Mycol Soc.* 57. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5) 363-IN2
80. Devys M, Barbier M (1991) Indole-3-carboxaldehyde in the cabbage *Brassica oleracea*: a systematic determination. *Phytochemistry* 30:389–391. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83690-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83690-M)
81. DeWolf ED, Madden LV, Lipps PE (2003) Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology* 93, 428-435
82. Dhingra OD, Sinclair JB (1985) Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida 355. <https://doi.org/10.1201/9781315138138>
83. Dill-Macky R, Jones RK (1999) Effects of previous crop and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Phytopathology* 89: S21 (abstr.)
84. Distefano G, La Malfa S, Vitale A, Lorito M, Deng Z, Gentile A (2008) Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res* 17:873–879. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9172-9>
85. Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM (2006) Sm1, a proteinaceous elicitor by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:838–853
86. Doohan FM, Brennan J, Cooke BM (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755–768
87. Druzhinina IS, Komoń M, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Belayneh T, Kubicek CP (2008) Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable to cause invasive mycoses of humans. *Microbiol SGM* 154:3447–3459
88. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9:749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
89. Dubcovsky J, Dvorak J (2007) « Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat under Domestication ». *Science (New York, N.Y.)* 316 (5833): 1862-66. <https://doi.org/10.1126/science.1143986>
90. Dubey SC, Suresh M, Singh B (2007) Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control* 40, 118-127

91. Dyer AT, Johnston RH, Hogg AC, Johnston JA (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. *Eur J Plant Pathol* 125(3), 387–395. doi:10.1007/s10658-009-9488-1
92. Eisendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P, Haas H (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 3, 561-563
93. Elad Y (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protect* 19 709–714. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00094-6)
94. El-Hasan A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H (2009) Detection of viridiofungin A and another antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* 124:457–470
95. El-Hassan SA, Gowen SR, Pembroke B (2013) Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. *Journal of Plant Protection Research* 53, 12-26
96. Ellis D (2013) Mycology Online Method ,*Trichoderma*, 2013
97. El-Mohamedy RSR, Alla MA (2013) Bio-priming seed treatment for biological control of soil borne fungi causing root rot of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agri Technol* 9, 589-599
98. El Yacoubi H, Hassikou R, Badoc A, Rochdi A, Douira A (2012) Complexe fongique de la pourriture racinaire du blé tendre au nord-ouest du Maroc. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 151, 35–48
99. Emani C, Garcia JM, Lopata-Finch E, Pozo MJ, Uribe P, Kim DJ, Sunilkumar G, Cook DR, Kenerley CM, Rathore KS (2003) Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma viridens*. *Plant Biotechnol J* 1 321–336. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00029.x>
100. Erginbas-Orakci G, Poole G, Nicol JM, Paulitz T, Dababat AA, Campbell K (2016) Assessment of inoculation methods to identify resistance to Fusarium crown rot in wheat. *J Plant Dis Protect*, 123(1), 19–27. <https://doi.org/10.1007/S41348-016-0001-8>
101. Eslahi MR (2012) Fungi associated with root and crown rot of wheat in Khuzestan province. *Iran Journal of Crop Protection*, 1, 107–113
102. Feldman M, Lupton FGH, Miller TE (1995) Wheats. In J. Smartt NW Simmonds: *Evolution of crop plants*. Longman Group Ltd., London, 184-192

103. Fernandez MR, Jefferson PG (2004) Fungal populations in roots and crowns of common and durum wheat in Saskatchewan. *Can J Plant Pathol* 26(3), 325–334. doi:10.1080/07060660409507150
104. Fernando WGD, Paulitz TC, Seaman WL, Dutilleul P, Miller JD (1997) Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology* 87, 414-421
105. Ferrigo D, Raiola A, Piccolo E, Scopel C, Causin R (2014) *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. *J Plant Pathol* 96, 133-142.
106. Fiorini L, Guglielminetti L, Mariotti L, Curadi M, Picciarelli P, Scartazza A, Sarrocco S, Vannacci G (2016) *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant Soil* 400:351–366. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2736-6>
107. Flandrin F (1949) Les blés de semences. Guy le Prat ed, 118p
108. Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275–296
109. Francesconi S, Mazzaglia A, Balestra GM (2019) Different inoculation methods affect components of *Fusarium* head blight resistance in wheat, *Phytopathol. Mediterr.* 58 (3) 679–691, <https://doi.org/10.13128/Phyto-10942>
110. Frankenberger WT, Poth M (1987) Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl Environ Microbiol* 53:2908–2913
111. Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, Dag. A, Shafir S, Elad Y (2004) *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *Eur J Plant Pathol.* 110 (2004) 361–370. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021057.93305.d9>
112. Fujita T, Wada S, Iida A, Nishimura T, Kanai M, Toyama N (1994) Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and II, from *Trichoderma viride*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42:489–494. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.489>
113. Gagkaeva TY (2010) Phytopathogenic fungus *Fusarium cerealis* in Russia. *Microbiology* 79(4), 553–560. doi:10.1134/s0026261710040211
114. Galarza L, Akagi Y, Takao K et al. (2015) Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *J. Gen Plant Pathol.* 81:201–210. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0587-x>
115. Gams W, Haekstra ES, Aptroot A (1998) CBS. Course of mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultuur Baarns. The Netherland

116. Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. doi:10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x
117. Gargouri-Kammoun L, Gargouri S, Rezgui S, Trifi M, Bahri N, Hajlaoui MR (2009) Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium* and *Microdochium* on wheat seedlings under controlled conditions. *Tunis J Plant Prot* 4: 135–144
118. Gebremariam ES, Karakaya A, Erginbas-Orakci G, Dababat AA, Paulitz TC (2019) Assessment Of The Seedling Resistance Of Spring Wheat Lines To *Fusarium Culmorum*. *J Agri Sci* doi: 10.15832/Ankutbd.466442
119. Ghanbarzadeh B, Safaie N, Goltapeh EM, Danesh YR, Khelghatibana F (2016) Biological control of *Fusarium* basal rot of onion using *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae*. *J Crop Prot.* 2016, 5 (3): 359-368. <https://doi.org/10.18869/modares.jcp.5.3.359>
120. Ghazalibiglar, H., Hampton, J.G., Van ZijlldeJong, E., Holyoake, A (2016) Evaluation of *Paenibacillus* spp. isolates for the biological control of black rot in *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage). *Biocontrol. Sci. Technol.* 26:504–515. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1129052>
121. Gilbert J, Conner RL, Fernandez MR, McLaren D, Woods SM (2003) Role of spring wheat seed infested with *Fusarium graminearum* in spread and development of *Fusarium* head blight and effects on agronomic performance. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 73-81
122. Gilbert J, Haber S (2013) Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat, *J. Indian Dent. Assoc.* 35 (2013) 149–174
123. Gilbert J, Tekauz A (1995) Effects of *Fusarium* head blight and seed treatment on germination, emergence, and seedling vigour of spring wheat. *Can J Plant Pathol* 17: 252-259
124. Gokil-Prasad G, Sinha AP (2012) Comparative antagonistic potential of fungal and bacterial bioagents against isolates of *Xanthomonas oryzae pvoryzae*. *Ann Plant Prot Sci* 20(1):154–159
125. Goodwin DC, Lee SB (1993) Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques.* 15:438–444
126. Goswami RS, Kistler HC (2005) Pathogenicity and *in planta* mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95, 1397-1404
127. Grondona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD, Monte E, Garcia-Acha I (1997) Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 63(8):3189-98 <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3189-3198.1997>

128. Gupta KJ, Mur LAJ, Brotman Y (2014) *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis* roots. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:307–314. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-13-0160-R>
129. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG (2014) Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>
130. Gwa VI, Nwankiti AO (2017) In Vitro Antagonistic Potential of *Trichoderma harzianum* for Biological Control of *Fusarium moniliforme* Isolated from *Dioscorea rotundata* Tubers. *Viol. Mycol.* 06(02). <https://doi.org/10.4172/2161-0517.1000166>
131. György A, Tóth B, Varga M, Mesterhazy A (2020) Methodical Considerations and Resistance Evaluation against *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Head Blight in Wheat. Part 3. Susceptibility Window and Resistance Expression. *Microorganisms* 8(5), 627. doi:10.3390/microorganisms8050627
132. Hadjout S, Chéreau S, Atanasova-Pénichon V, Marchegay G, Mekliche L, Boureghda H, Barreau C, Touati-Hattab S, Bouznad Z, Richard-Forget F (2017) Phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* head blight and to mycotoxin accumulation. *J Plant Pathol.* 99 (3) (2017) 671–680, <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3954>.
133. Haggag KHE, El-Gamal NG (2012) In vitro study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the damping off and root rot diseases in tomatoes. *Nature and Science* 10, 16-25
134. Hajieghrari B, Torabi-Giglou M, Mohammadi MR, Davari M (2008) Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology* 7, 967-972
135. Haouhach S, Karkachi N, Oguiba B, Sidaoui A, Chamorro I, Kihal M, Monte E (2020) Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). *Microorganisms* 8(10), 1455. doi:10.3390/microorganisms8101455
136. Haran S, Schickler H, Chet I (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142(9), 2321–2331. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-9-2321>
137. Harleen K, Chander M (2011) *In vitro* and *in vivo* evaluation of antagonistic potentiality of *Trichoderma* spp. against *Fusarium moniliforme* Sheld. causing stalk rot of maize. *Plant Dis Res* 26, 173
138. Harman GE (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol* 189 647–649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03614.x>

139. Harman GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp.. *Phytopathology* 96:190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
140. Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M (2012) Special issue: *Trichoderma*- from basic biology to biotechnology. *Microbiology* 158 1–2. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056424-0>
141. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004a) *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
142. Harman GE, Kubicek CP (eds) (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* (Vol.2). Taylor and Francis Ltd. U.K. <https://doi.org/10.1201/9781482267945>
143. Harman GE, Lorito M, Lynch JM (2004b) Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Advances in Applied Microbiology* 56, 313–330
144. Hart P, Ward R (1997) Efficacy of fungicides on Fusarium head blight severity and levels of vomitoxin. *In* Proceedings of National Fusarium Head Blight Forum 10-12 Nov 1997, St. Paul, Minn. pp. 40-41
145. Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1994) Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8th ed. International Mycological Institute, Egham. United Kingdom
146. Hermosa MR, Inturriaga GEA, Diaz-Minguez J, Castro C, Monte E, Garcia-Acha I (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.. *Appl Environ Microbiol* 66 1890–1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>
147. Hermosa R, Viterbo A, Chet E, Monte I (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158 17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
148. Hibar K, Daami-Remadi M, Khiareddine H, El Mahjoub M (2005) Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2005 9 (3), 163–171
149. Hmouni A, Hajlaoui MR, Mlaiki A (1996) Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, p. 697–705
150. Howell CR (2002) Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp.. *Phytopathology* 92 177–180. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.2.177>
151. Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 874–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>

152. Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J (2009) Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet Biol* 46: 615–631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
153. Jackowiak H, Packa D, Wiwart M, Perkowski J (2005) Scanning electron microscopy of *Fusarium*-damaged kernels of spring wheat. *Inter J Food Microbiol* 98: 113-123
154. Jaklitsch WM, Voglmayr H (2015) Biodiversity of *Trichoderma* (hypocreaceae) in southern Europe and macaronesia, *Stud. Mycol* 80: 1–87. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>
155. Jenkinson P, Parry DW (1994) Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research* 98: 506-510
156. Jin J, Duan S, Qi Y, Yan S, Li W, Li B, ... Ma J (2020) Identification of a novel genomic region associated with resistance to *Fusarium* crown rot in wheat. *Theor Appl Genet* .doi:10.1007/s00122-020-03577-1
157. Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329
158. John PR, Tyagi RD, Prévost D, Brar SK, Pouleur S, Surampalli RY (2010) Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29, 1452-1459
159. Kamala T, Devi SI (2012) Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-East India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Afr J Biotechnol* 11, 8491-8499
160. Kang Z, Buchenauer H (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiol Mol Plant P* 57(6), 255–268. doi:10.1006/pmpp.2000.0305
161. Kang Z, Buchenauer H (2002) « Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue ». *Eur J Plant Pathol* Vol. 108, n°7, p. 653–660
162. Kareem, T., Ugoji, O., Aboaba, O. (2016) Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber with *Trichoderma longibrachiatum* NGJ167 (Rifai). *Br Microbiol Res J* 16:1–11. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/28208>
163. Kellou R (2008) : Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréaliers français dans le cadre du pôle de compétitivité qualité-méditerranéen le cas coopérative sud céréales, groupe coopératif accitan et Auecoop. Thèse master en science IAAMM n°93 .CIHEMM Montpellier .160 pages.

164. Kerényi Z, Hornok L (2002) Structure and function of mating type genes in *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 313-314
165. Kezih R, Bekhouche F, Merazka A (2014) Some traditional Algerian products from durum wheat. *Afr J Food Sci* 8 30–34
166. Khandelwal M, Datta S, Mehta J, Naruka R, Makhijani K, Sharma G, Kumar R, Chandra S (2012) Isolation, characterization and biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products-A biocontrol agent. *Adv. Appl. Sci. Res.* 3, 3950-3955
167. Khan MR, Fischer S, Egan D, Doohan FM (2006) Biological Control of *Fusarium* Seedling Blight Disease of Wheat and Barley. *Phytopathology*, 96(4), 386–394. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0386>
168. Kheiri A, Moosawi Jorf SA, Malhipour A (2018) Infection process and wheat response to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Eur J Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1576-7>
169. Khemir E, Chekali S, Moretti A, Gharbi MS, Allagui MB, Gargouri S (2020) Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopathol Mediterr* 59(1): 187-201. doi: 10.14601/Phyto-10827
170. Kilmer VJ, Hanson AA (2018) Handbook of soils and climate in agriculture, *Handb. Soils Clim Agric* pp. 1–445. <https://doi.org/10.1201/9781351073073>
171. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
172. Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J (2007) Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *J Gen Plant Pathol* 73:35–37. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0314-8>
173. Klyce SD (1984) Computer-assisted corneal topography. High-resolution graphic presentation and analysis of keratometry, *Investig. Ophthalmol Vis Sci* 25 1426–1435. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
174. Koch N, Huth W (1997) Interaction of barley yellow dwarf virus and *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. in winter wheat. *J Phytopathol* 145: 425-428
175. Kour D, Rana KL, Yadav N, Yadav AN, Singh J, Rastegari AA, Saxena AK (2019) Agriculturally and industrially important fungi: current developments and potential biotechnological applications. In: Yadav AN, Singh S, Mishra S, Gupta A (eds) *Recent advancement in white biotechnology through fungi, volume 2: perspective for value-added products and environments.* Springer, Cham, pp 1–64. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_1

176. Kthiri Z, Jabeur MB, Machraoui M et al. (2020) Coating seeds with *Trichoderma* strains promotes plant growth and enhance the systemic resistance against *Fusarium* crown rot in durum wheat. *Egypt J Biol Pest Control* 30, 139. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00338-6>
177. Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* 38 310–319. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00583-2)
178. Kubicek CP, Druzhinina IS (2013) *Trichoderma*: Genomic aspects of mycoparasitism and biomass degradation. Springer Berlin Heidelberg.
179. Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M. et al. (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
180. Kullnig C, Szakacs G, Kubicek CP (2000) Molecular identification of trichoderma species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol Res* 104 1117–1125. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002604>
181. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
182. Lapin D, Van den Ackerveken G (2013) Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends Plant Sci.* 18: 546-54
183. Laraba I, Bouregghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obanor F, Moretti A, O'Donnell K (2017) Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol* 103, 34–41. doi:10.1016/j.fgb.2017.04.001
184. Lefèvre T, Lebarbenchon C, Gauthier-Clerc M, Missé D, Poulin R, Thomas F (2009) The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol Evol* 24: 41–48
185. Leonard KJ, Bushnell WR (2003) *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press
186. Leslie JF, Summerell AB (2006) *The Fusarium laboratory manual* (p. 388). Ames: Blackwell Publishing
187. Liang C, Li B, Lu G (2004) *Gliocladium* and *Trichoderma* in agricultural soil. *J Zhejiang Univ Agric Life Sci* 30:415–424
188. Lieckfeldt E, Kullnig CM, Kubicek CP, Samuels GJ, Börner T (2001) *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycol Res* 105 313–322. <https://doi.org/10.1017/S0953756201003616>

189. Li CY, Li WH, Lee B, Laroche A, Cao LP, Lu ZX (2011) Morphological characterization of triticale starch granules during endosperm development and seed germination. *Can J Plant Sci* 91: 57–67
190. Liu C, Ogonnaya FC (2015) Resistance to *Fusarium* crown rot in wheat and barley: a review. *Plant Breed* 134(4), 365–372. doi:10.1111/pbr.12274
191. Lombardi N, Vitale S, Turrà D, Reverberi M, Fanelli C, Vinale F, Marra R, Ruocco M, Pascale A, d’Errico G, Woo SL, Lorito M (2018) Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:982. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0310-R>
192. López-Bucio J, Pelagio-Flores R, Herrera-Estrella A (2015) *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci Hortic*. 196 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
193. López-Coria M, Hernández-Mendoza JL, Sánchez-Nieto S (2016) *Trichoderma asperellum* induces maize seedling growth by activating the plasma membrane H⁺-ATPase. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:797–806. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-16-0138-R>
194. Lu Z, Tu G, Zhang T, Li Y, Wang X, Zhang Q, Song W, Chen J (2020) Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. *Journal of Integrative Agriculture* 2020, 19(1): 145–152. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62734-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62734-6)
195. Luongo L, Galli M, Corazza L, Meekes E, Haas LD, Van Der Plas CL, Köhl J (2005) Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci and Technol*, 15(3), 229–242. <https://doi.org/10.1080/09583150400016852>
196. Maaløe S (2002) Physical behavior of the plume source during intermittent eruptions of Hawaiian basalts, *Contrib. Mineral. Petrol.* 142 653–665. <https://doi.org/10.1007/s00410-0010323-8>
197. Macías-Rodríguez L, Guzmán-Gómez A, García-Juárez P, Contreras-Cornejo HA (2018) *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiol Ecol*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy137>
198. Madigan MT, Matinko JM, Parker J (1997) *Brok biology of microorganisms*, 8 th edn. USA
199. Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, et al. (2011) Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63
200. Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, Mc Cormick SP, Collado IG, Hermosa R, Monte E, Gutiérrez S (2013) Relevance of trichothecenes in fungal physiology:

- Disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet Biol* 53:22–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.001>
201. Malmierca MG, McCormick SP, Cardoza RE, Monte E, Alexander NJ, Gutiérrez S (2015) Trichodiene production in a *Trichoderma harzianum* *erg1*-silenced strain provides evidence of the importance of the sterol biosynthetic pathway in inducing plant defense-related gene expression. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:1181–1197. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-15-0127-R>
202. Marc-andré Selosse (2000) *La Symbiose : Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*, Vuibert, Vuibert Sup Biologie Écologie, 160p
203. Marfori EC, Kajiyama S, Fukusaki E, Kobayashi A (2003) Phytotoxicity of the tetramic acid metabolite trichosetin. *Phytochemistry* 62:715–721. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00629-5)
204. Martin A, Bovill WD, Percy CD, Herde D, Fletcher S, Kelly A, ... Sutherland M W (2015) Markers for seedling and adult plant crown rot resistance in four partially resistant bread wheat sources. *Theor Appl Genet* 128(3), 377–385. [doi:10.1007/s00122-014-2437-1](https://doi.org/10.1007/s00122-014-2437-1)
205. Martínez-Medina A, Del Mar Alguacil M, Pascual JA, Van Wees SC (2014) Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth promoting activity on melon plants. *J Chem Ecol* 40:804–815. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0478-1>
206. Martínez-Medina A, Fernández I, Sánchez-Guzmán MJ, Jung SC, Pascual JA, Pozo MJ (2013) Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Front Plant Sci* 4:206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00206>
207. Martínez-Medina A, Pascual JA, Pérez-Alfocea F, Albacete A, Roldán A (2010) *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology* 100:682–688. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-7-0682>
208. Martínez-Medina A, Roldán A, Albacete A, Pascual JA (2011) The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry* 72:223–229. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.008>
209. Martínez-Medina A, Van Wees SCM, Pieterse CMJ (2017) Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ* 40:2691–2705. <https://doi.org/10.1111/pce.13016>
210. Mastouri F, Björkman T, Harman GE (2010) Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100 1213–1221. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0091>

211. Mastouri F, Björkman T, Harman GE (2012) *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:1264–1271. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0240>
212. Mathys J, De Cremer K, Timmermans P, Van Kerckhove S, Lievens B, Vanhaecke M, Cammue BPA, De Coninck B (2012) Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Front Plant Sci* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00108>
213. Matny ON (2015) *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. *Adv Plants Agric Res*;2(1):38-43. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00039>
214. Mayo S, Gutiérrez S, Malmierca MG, et al. (2015) Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense related genes. *Front Plant Sci* 6:685. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00685>
215. McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.*26, 195–217
216. Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81(12), 1340-1348
217. Mendoza-Mendoza A (2018) The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. *Front Plant Sci* 9:409. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00409>
218. Mendoza-Mendoza A, Zaid R, Lawry R, Hermosa R, Monte E, Horwitz BA, Mukherjee PK (2018) Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biol Rev* 32:62–85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>
219. Mesterhazy A (1995) Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* 114: 377-386
220. Mesterhazy A, Bartok T & Lamper C (2003) Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium*, and Isolate Aggressiveness on the Efficacy of Fungicides for Control of *Fusarium* Head Blight. *Plant Dis* 87(9), 1107–1115. doi:10.1094/pdis.2003.87.9.1107
221. Mesterhazy A, Bartók T (1996) Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*49: 181-198
222. Miedaner T (1997) Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breed* 116: 201-220

223. Mielniczuk E, Skwaryło-Bednarz B (2020) Fusarium Head Blight, Mycotoxins and Strategies for Their Reduction. *Agronomy* 10(4), 509. doi:10.3390/agronomy10040509
224. Migahed FF (2003) Distribution of fungi in the sandy soil of Egyptian beaches. *Mycobiology* 31 61–67, <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.860.866>
225. Migheli Q, Balmas V, Komoń-Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy AG, Kubicek CP, Druzhinina IS (2009) Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environ Microbiol* 1135–46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01736.x>
226. Miller JD, Culley J, Fraser K, Hubbard S, Meloche R, Ouellet T, Seaman WL, Turkington, K, Voldeng H (1998) Effect of tillage practice on fusarium head blight of wheat. *Can J Plant Pathol* 20: 95-103
227. Mohamed-Benkada M, Montagu M, Biard JF, Mondeguer F, Verite P, Dalgarrondo M, Bissett J, Pouchus YF (2006) New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:1176–1180. <https://doi.org/10.1002/rcm.2430>
228. Mohsenin NN (1968) Physical properties of plant and animal materials, Gordon and Breach Science Publishers, New York. *J. Agric. Eng. Res.* 13 (4) 379, [https://doi.org/10.1016/0021-8634\(68\)90151-0](https://doi.org/10.1016/0021-8634(68)90151-0)
229. Monte E (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4, 1-4
230. Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Nicolás C, Monte E (2010) Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases Arabidopsis resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* 167 (2010) 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.012>
231. Moore GF, Audrey S, Barker M, Bond L, Bonell C, Hardeman W, Moore L, O’Cathain A, Tinati T, Wight D, Baird J (2015) Process evaluation of complex interventions: Medical Research Council guidance. *BMJ*, 350(mar19 6), h1258–h1258. <https://doi.org/10.1136/bmj.h1258>
232. Morán-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M, Monte E (2009) The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:1021–1031. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1021>
233. Moya-Elizondo EA (2013) Fusarium crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Cienc Investig Agrar* 40(2):235–252. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202013000200001>

234. Muhammad UG, Mubashar R, Waqas R, Misbah IQ (2018) *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection* 02 (03) 2018. 109-135
235. Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM (2013) *Trichoderma* research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol.* 51:105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
236. Mukherjee PK, Wiest A, Ruiz N, Keightley A, Moran-Diez ME, McCluskey K, François-Pouchus Y, Kenerley CM (2011) Two classes of new peptaibols are synthesized by a singlenon-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J Biol Chem* 286:4544–4554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159723>
237. Mukhopadhyay AN (2005) *Trichoderma*-Promises and pitfalls. *J Mycol Plant Pathol.* 35:533-534.
238. Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502
239. Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *J Exp Bot* 59: 501–520
240. Nakkeeran S, Renukadevi P, Marimuthu T (2005) Antagonistic potentiality of *Trichoderma viride* and assessment of its efficacy for the management of cotton root rot. *Arch Phytopathol Plant Prot* 38:209–225. <https://doi.org/10.1080/03235400500094472>
241. Nawrocka J, Małolepsza U (2013) Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biol Control* 67 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.005>
242. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA
243. Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN (2011) *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101:960–969. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-10-0188>
244. Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, Brunelle A, Thonart P, Ongena M (2012) Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 176–191
245. Nogueira-López G, Greenwood DR, Middleditch M, Winefield C, Eaton C, Steyaert JM, Mendoza-Mendoza A (2018) The apoplasmic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00409>

246. Okigbo RN, Emeka AN (2010) Biological control of rot-inducing fungi of water yam (*Dioscorea alata*) with *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas chlororaphis*. *Journal of Stored Products and Postharvest Research* 1, 18-23
247. Oldroyd GE, Mitra RM, Wais RJ, Long SR (2001) Evidence for structurally specific negative feedback in the Nod factor signal transduction pathway. *Plant J Cell Mol Biol* 28: 191–199
248. Olsen OA (2001) Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *AnnuRev Plant Physiol. Plant MolBiol* 52: 233–267
249. Omann M, Zeilinger S (2010) How a mycoparasite employs G-protein signaling: using the example of *Trichoderma*. *Journal of Signal Transduction* doi:10.1155/2010/123126
250. Osborne LE, Stein JM (2007) Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 103– 108
251. Packer HL, Thomas CR (1990) Microbiological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol-Bioenerg.* 35:870-881
252. Pal KK, Gardener BM (2006) Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
253. Pandeya R, Sinha RC, Seaman WL, Miller JD, Bevis E, Matthew P (1996) Progress in selection for resistance to fusarium head blight in winter wheat. *In Proceedings of the 1996 Regional Fusarium/Scab Forum*. Winnipeg, Man. pp. 58-62
254. Parniske M (2008) *Arbuscular mycorrhiza*: the mother of plant root endosymbioses. *NatRev Microbiol* 6: 763–775
255. Papavizas GC (1985) *Trichoderma* and gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 23 23–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
256. Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Plant Pathology* 44, 207–238
257. Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S Iaccarino M (2004) Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234: 201–262
258. Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL (2004) Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* 88, 724-730
259. Petre B, Kamoun S (2014) How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol* 12: e1001801

260. Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C (2012) Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol* 61(1), 140–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x>
261. Poole GJ, Smiley RW, Paulitz TC, Walker CA, Carter AH, See DR, Garland-Campbell K (2012) Identification of quantitative trait loci (QTL) for resistance to Fusarium crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) in multiple assay environments in the Pacific Northwestern US. *Theor Appl Genet*, 125(1), 91–107. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1818-6>
262. Poosapati S, Ravulapalli PD, Tippirishetty N, Vishwanathaswamy DK, Chunduri S (2014) Selection of high temperature and salinity tolerant *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Sclerotium rolfsii*, SpringerPlus 3.<https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-641>
263. Poulin R (2011) The many roads to parasitism: a tale of convergence. *Adv Parasitol* 74: 1–40
264. Prasad RD, Rangeshwaran R, Hegde SV, Anuroop CP (2002) Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. *Crop Protection* 21, 293-297
265. Prodi A, Salomoni D, Bertacchini E, Alkadri D, Pisi A, Tonti S, Alberti I, Dal Prà M, Pancaldi D, Covarelli L, Nipoti P (2011) Determination Of Deoxynivalenol And Nivalenol Producing Chemotypes Of *Fusarium Graminearum* Isolated From Durum Wheat In Different Italian Regions. *Plant Breed Seed Sci Volume* 64, 75-80. <https://doi.org/10.2478/V10129-011-0030-1>
266. Prats M (1966) The effect of horizontal fluid flow on thermally induced convection currents in porous mediums. *J GeophysRes* 71 (20), 4835-4838
267. Prats J, et al., (1971) Les céréales. Tome II. J.B. Baillere et fils. 351p
268. Purahong W, Alkadri D, Nipoti P, Pisi A, Lemmens M, Prodi A (2011) Validation of a modified Petri-dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat. *Eur J Plant Pathol* 132(3), 381–391. doi:10.1007/s10658-011-9883-2
269. Purahong W, Nipoti P, Pisi A, Lemmens M, Prodi A (2014) Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. *Mycoscience* 55(1), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.05.007>
270. Qualhato TF, Lopes FAC, Steindorff AS, Brandão RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ(2013) Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 35, 1461-1468
271. Rana KL, Kour D, Sheikh I, Dhiman A, Yadav N, Yadav AN, Rastegari AA, Singh K, Saxena AK (2019) Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance and

- potential industrial applications. In: Yadav AN, Mishra S, Singh S, Gupta A (eds) Recent advancement in white biotechnology through fungi, Diversity and enzymes perspectives, vol 1. Springer, Cham, pp 1–62
272. Ramírez-Valdespino CA, Porras-Troncoso MD, Corrales-Escobosa AR, Wrobel K, Martínez-Hernández P, Olmedo-Monfil V (2018) Functional characterization of TvCyt2, a member of the p450 monooxygenases from *Trichoderma virens* relevant during the association with plants and mycoparasitism. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:289–298. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0015-R>
273. Räsänen LA, Lindström K (2003) Effects of biotic and abiotic constraints on the symbiosis between rhizobia and the tropical leguminous trees *Acacia* and *Prosopis*. *Indian J Exp Biol* 41: 1142–1159
274. Rasool Azarmi (2011) Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr J Biotechnol.* 10. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1600>
275. Rebib H, Bouraoui H, Rouaissi M, Brygoo Y, Boudabbous A, Hajlaoui MR, Sadfi-Zouaoui N (2014) Genetic diversity assessed by SSR markers and chemotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *Eur J Plant Pathol*, 139(3), 481–495. doi:10.1007/s10658-014-0405-x
276. Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, ... Schaafsma AW (1999) Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. Moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. *Phytopathology*, 89(11), 1028–1037. doi:10.1094/phyto.1999.89.11.1028
277. Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 7:89–123
278. Rinaldi C, Sutton A, Fothergill SR (1998) The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:123-129
279. Rodríguez-zaragoza S, Maylish E, Steinberger Y (2005) Vertical distribution of the free-living *Amoeba* population in soil under desert shrubs in the Negev. *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 2053-2069
280. Rojo FG, Reynoso MM, Ferez M, Chulze SN, Torres AM (2007) Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* 26, 549-555
281. Rossi V, Ravanetti A, Patteri E, Giosuè S (2001) Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing *Fusarium* head blight. *J Plant Pathol* 83(3), 189-198
282. Ruocco M, Lanzuise S, Lombardi N, Woo SL, Vinale F, Marra R, Varlese R, Manganiello G, Pascale A, Scala V, Turrà D, Scala F, Lorito M (2015) Multiple roles

- and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:167–179. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0194-R>
283. Ru Z, Di W (2012) *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *Afr J Biotechnol* 11, 4180-4186
284. Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui MR, Rubio MB, Monte E, Boudabous A, Hermosa MR, Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can J Microbiol* 55 (2009) 154–162. <https://doi.org/10.1139/W08-101>
285. Safae D, Younesi H, Sheikholeslami M (2012) *Fusarium* species that cause root and crown rot of wheat in Kermanshah province. *Iran J Plant Pathol* 48:89–91
286. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
287. Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S (2011) Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol* 131:15–26
288. Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyssöne E, Bathia A, Ward M, Pentilla M (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* 269:4202–4211
289. Samuels G (2004) Changes in Taxonomy, Occurrence of the Sexual Stage and Ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 195–206
290. Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
291. Samuels GJ (2006) *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96 195–206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>
292. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
293. Sanjeev K, Manibhushan T, Archana R (2014) *Trichoderma*: mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Afr J Agric Res* 9 3838–3852, <https://doi.org/10.5897/AJAR2014>

294. Scheler C, Durner J, Astier J (2013) Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr Opin Plant Biol* 16:534–539. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.020>
295. Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M & Migheli Q (2012) *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol* 14(4), 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
296. Scott JK (1995) Classical biological control of plant pathogens, *Adv. plant pathol* 11 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0736-4539\(06\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S0736-4539(06)80009-7)
297. Shikur Gebremariam E, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC, Erginbas-Orakci G, Karakaya A, Dababat AA (2017) Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. *Eur J Plant Pathol*, 150(2), 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1285-7>
298. Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I (2007) Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7:3943–3952. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700173>
299. Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM (1993) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol Lett* 14:1019–1024. <https://doi.org/10.1007/BF01021051>
300. Setter TL, Carlton G (2000) « Germination, vegetative and reproductive growth ». In *The wheat book: Principles and practice*, Department of Agriculture and Food, 37-54.
301. Shahid M, Srivastava M, Singh A, Kumar V, Rastogi S, Pathak N, Srivastava A (2014) Comparative study of biological agents, *Trichoderma harzianum* (Th-Azad) and *Trichoderma viride* (01PP) for controlling wilt disease in pigeon pea. *J Microb and Biochem Technol* 6, 110-115
302. Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol Control* 50 (2009) 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
303. Sharma S, Kour D, Rana KL, Dhiman A, Thakur S, Thakur P, Thakur S, Thakur N, Sudheer S, Yadav N, Yadav AN, Rastegari AA, Singh K (2019) *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In: Yadav AN, Mishra S, Singh S, Gupta A (eds) *Recent advancement in white biotechnology through fungi, Diversity and enzymes perspectives*, vol 1. Springer, Cham, pp 85–120. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_3
304. Shewry PR (2009) Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 1537–1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
305. Shikur Gebremariam E, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC, Erginbas-Orakci G, Karakaya A, Dababat AA (2017) Identity and pathogenicity of *Fusarium* species

- associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. Eur J Plant Pathol 150(2), 387–399. doi:10.1007/s10658-017-1285-7
306. Shores M, Harman GE (2008) The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. Plant Physiol 147:2147–2163. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123810>
307. Shores M, Harman GE, Mastouri F (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annu Rev Phytopathol 48 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
308. Shrivastava P, Kumar R (2015) Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation, Saudi J Biol Sci 22 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
309. Singh BN, Dwivedi P, Sarma BK, Singh GS, Singh HB (2018) *Trichoderma asperellum* T42 reprograms tobacco for enhanced nitrogen utilization efficiency and plant growth when fed with N nutrients. Front Plant Sci 9:163. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00163>
310. Siou D, Gélisse S, Laval V, Elbelt S, Repinçay C, Bourdat-Deschamps M, Suffert F, Lannou C (2015) Interactions between head blight pathogens: consequences for disease development and toxin production in wheat spikes. Appl Environ Microbiol 81:957–965. <https://doi.org/10.1128/AEM.02879-14>
311. Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Canalès R, Suffert F, Lannou C (2013) Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. Plant Pathol 63(2), 390–399. <https://doi.org/10.1111/ppa.12106>
312. Skov J, Lemmens M, Giese H (2004) Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley. Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 245-254
313. Smiley RW, Gourlie JA, Easley SA, Patterson L-M, Whittaker RG (2005) Crop Damage Estimates for Crown Rot of Wheat and Barley in the Pacific Northwest. Plant Dis 89(6), 595–604. <https://doi.org/10.1094/pd-89-0595>
314. Smiley RW, Patterson LM (1996) Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. Plant Dis, 80, 944–949
315. Soltner D (2005) Les grandes productions végétales .Ed. Collection sciences et techniques agricoles, 472p

316. Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Fewsnier I, Petr K (2009) Truffles regulate root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* 150:2018–2019. [https://doi.org/ 10.1104/pp.109.141325](https://doi.org/10.1104/pp.109.141325)
317. Sriram S, Savitha, MJ, Ramanujam B (2010) *Trichoderma*-enriched coco-peat for the management of *Phytophthora* and *Fusarium* diseases of chilli and tomato in nurseries. *J Biol Control* 24, 311-316
318. Srivastava RK, Singh RK, Kumar N, Singh S (2010) Management of macrophomina disease complex in jute (*Corchorus olitorius*) by *Trichoderma viride*. *J Biol Control* 24:77–79. <https://doi.org/10.18311/JBC/2010/3578>
319. Staskawicz BJ, Dahlbeck D, Keen NT (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr *Proc Natl Acad Sci* 81: 6024–6028
320. Stein JM, Osborne LE, Bondalapati KD, Glover K D, Nelson CA (2009) *Fusarium* Head Blight Severity and Deoxynivalenol Concentration in Wheat in Response to *Gibberella zeae* Inoculum Concentration. *Phytopathology* 99(6), 759–764. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-6-0759>
321. Sturz AV, Johnston HW (1985) Characterization of *Fusarium* colonization of spring barley and wheat produced stubble and fallow soil. *Can J Plant Pathol* 7: 270-276
322. Suárez-Estrella F, Ros M, Vargas-García MC, López MJ, Moreno J (2014) Control of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* using agroindustrial wasted-based compost. *J Plant Pathol* 96(2):243–248
323. Summerell BA, Salleh B, Leslie JF (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis* Vol. 87, n°2, p. 117–128
324. Surget A, Barron C (2005) Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales* 145, 4-7
325. Tekauz A, Gilbert J, McCallum B (1998) Efficacy of foliar fungicides for control of fusarium head blight and leaf spots in wheat in Manitoba in 1997. *Pest Manage. Res Rep* 137: 388-389
326. Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R (2004) Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. *Agric Ecosyst Environ*. 103 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.026>
327. Thrane U (1990) Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *J Microbiol Methods* 12: 23-40

328. Tian Y, Tan Y, Liu N, Liao Y, Sun C, Wang S, Wu A (2016) Functional Agents to Biologically Control Deoxynivalenol Contamination in Cereal Grains. *Front Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00395>
329. Touati-Hattab S, Barreau C, Verdal-Bonnin MN, Chereau S, Richard-Forget F, Hadjout S, ... 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0869-y>
330. Trail F (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology* 149(1), 103-110
331. Tsegaye RE, Ma J, Mei J, et al. (2018) Antagonistic potential of different isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *Eur J Exp Biol* 08:212. <https://doi.org/10.21767/2248-9215.100053>
332. Tunalı B, Nicol JM, Hodson D, Uçkun Z, Büyük O, Erdurmuş D, ... Bağcı SA (2008) Root and Crown Rot Fungi Associated with Spring, Facultative, and Winter Wheat in Turkey. *Plant Dis*, 92(9), 1299–1306. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-9-1299>
333. Utkhede R, Koch C (2004) Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol* 49:305–313
334. Van Kan JA, van den Ackerveken GF, de Wit PJ (1991) Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol Plant-Microbe Interact* 4: 52–59
335. Vargas WA, Djonović S, Sukno SA, Kenerley CM (2008) Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem* 283:19804–19815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802724200>
336. Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM (2009) Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* 151:792–808. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141291>
337. Velázquez-Robledo R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Hernández-Morales A, Aguirre J, Casas-Flores S, López-Bucio J, Herrera-Estrella A (2011) Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism, and induction of plant defense responses. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:1459–1471. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0045>
338. Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Jaiswal DK (2014) Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry* 70, 33-37
339. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem Eng J* 37 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>

340. Verma P, Yadav AN, Kumar V, Singh DP, Saxena AK (2017) Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds) Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives: volume 2: microbial interactions and agro-ecological impacts. Springer, Singapore, pp 543–580. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_22
341. Viljoen BC (2006) Yeast ecological interactions. Yeast' Yeast, Yeast' Bacteria, Yeast' Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. Yeasts Food Beverages 83–110. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_4
342. Vinale F, Nigro M, Sivasithamparam K, Flematti G, Ghisalberti EL, Ruocco M, Varlese R, Marra R, Lanzuise S, Eid A, Woo SL, Lorito M (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett 347:123–129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
343. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M (2008) *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biol Biochem 40:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
344. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. Open Mycol J 8:127–139. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010127>
345. Vishnevetsky J, White TL, Palmateer AJ, Flaishman M, Cohen Y, Elad Y, Velcheva M, Hanania U, Sahar N, Dgani O, Perl A (2011) Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. Transgenic Res 20:61–72. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9392-7>
346. Waalwijk C, Kastelein P, de-Vries I, Kerenyi Z, van der Lee T, Hesselink T, Kohl J, Kema G (2003) Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. Eur J Plant Pathology 109:743–754
347. Waldron BL, Moreno-Sevilla B, Anderson JA, Stack RW, Froberg RC (1999) RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. Crop Sci 39:805–811
348. Wallwork H, Butt M, Cheong JPE, Williams KJ (2004) Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants. Australas Plant Path 33:1–7
349. Walter S, Nicholson P, Doohan FM (2010) Research review: Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. New Phytologist 185, 54–66
350. Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J Exp Bot 52:487–511. https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl_1.487
351. Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot 95:707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>

352. Woo S.L, Scala. F, Ruocco. M, Lorito. M, (2006) The molecular biology of the interactions between trichoderma spp., phytopathogenic fungi, and plants, *Phytopathology* 96 181–185, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
353. Wu B, Oesker V, Wiese J, Schmaljohann R, Imhoff J (2014) Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. *Marine Drugs* 12, 1208-1219
354. Xie Q, Li N, Yang Y, Lv Y, Yao H, Wei R, Sparkes DL, Ma Z (2018) Pleiotropic effects of the wheat domestication gene Q on yield and grain morphology. *Planta* 247, 1089–1098. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2847-4>
355. Xu XM, Nicholson P (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Ann Rev Phytopathol* 47, 83–103
356. Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, Edwards SG (2008) Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* 98, 69-78
357. Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J (2005) Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *Eur J Plant Pathol* 112, 143-154
358. Yadav AN, Mishra S, Kour D, Yadav N, Kumar A (2000) *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture Volume 2: Functional Annotation for Crop Protection*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48474-3>
359. Yadav AN, Rastegari AA, Yadav N, Kour D (2020) *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture: diversity and biotechnological applications*. Springer, Singapore
360. Yang X, Ma J, Li H, Ma H, Yao J, Liu C (2010) Different genes can be responsible for crown rot resistance at different developmental stages of wheat and barley. *Eur J Plant Pathol*, 128(4), 495–502. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9680-3>
361. Zachow C, Berg C, Müller H, Monk J, Berg G (2016) Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *J Biotechnol* 235:162–170. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.049>
362. Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* 14, 415-421
363. Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK (2016) Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biol Rev* 30:74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

364. Zhang CL, Druzhinina IS, Kubicek CP, Xu T (2005) *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to south distribution of species in east Asia. *FEMS Microbiol Lett* 251:251–257. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.034>
365. Zheng Z, Kilian A, Yan GJ, Liu CJ (2014) QTL conferring *Fusarium* crown rot resistance in the elite bread wheat variety EGA Wylie. *PLOS ONE* 9:e9601
366. Zook M, Hammerschmidt R (1997) Origin of the thiazole ring of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113:463–468. <https://doi.org/10.1104/pp.113.2.46>
367. Zwart RS, Muylle H, Van Bockstaele E, Roldán-Ruiz I (2008) Evaluation of genetic diversity of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat. *Theor Appl Genet* 117(5), 813–828. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0822-3>

Annexes

Annexe 1

Tableau récapitulatif des variétés, sites et période d'échantillonnage de *Fusarium*. N.i (Non identifié)

Partie d'Échantillonnage	N	Plante source	Variété	Localisation Coordonnés latitude et longitude	Site et wilaya d'échantillonnage	Année
Collet	1	Blé dur	CIRTA	36°31'07"N 6°42'46"E	Zighoud Youcef Eal n02 Mihoubi Constantine	avril 2019
	2	Blé dur	N.i	36°14'56"N 6°21'08"E	Carrefour Djbel aougueb Oued Athmania Mila	Mai 2019
	3	Orge	N.i	36°18'22"N 6°20'37"E	Mechri salah Oued athmania Mila	Mai 2019
	4	Orge	N.i	36°19'22"N 6°21'24"E	El Ghirane Oued athmania Mila	Mai 2019
	5	Blé tendre	Anapo	36°25'10"N 6°28'29"E	Messaoud Boudjriou Elmina Constantine	Mai 2019
	6	blé dur	Simeto	36°20'02"N 6°38'47"E	Onama Constantine	Mai 2019
	7	blé dur	Cirta	36°26'03"N 6°29'12"E	Messaoud Boudjriou Constantine	Mai 2019
	8	Blé tendre	N.i	36°19'19"N 6°33'00"E	Boussouf Constantine	Mai 2019
	9	Blé dur	N.i	36°20'06"N 6°31'56"E	Chettaba Constantine	Mai 2019
	10	Blé dur	N.i	36°18'35"N 6°32'29"E	Ain Smara Constantine	Mai 2019
	11	Blé dur	N.i	36°19'43"N 7°09'31"E	Oued Zenati Guelma	Mai 2019
	12	Blé dur	N.i	36°14'50"N 7°03'08"E	Ain Abid Constantine	Mai 2019
	13	Blé dur	N.i	36°17'31"N 6°42'55"E	Ain Nehass El Khroub Constantine	Mai 2019
	14	Blé tendre	N.i	36°22'14"N 6°52'25"E	Ibn Badis Constantine	Mai 2019
	15	Blé tendre	N.i	36°14'17"N 7°08'01"E	Ain Trab Guelma	Mai 2019
	16	Blé tendre	N.i	36°16'13"N 7°05'45"E	Ain Regada Guelma	Mai 2019
	17	Blé dur	N.i	36°16'52"N 7°07'00"E	Bekkouche Ahmed Guelma	Mai 2019
	18	Blé dur	N.i	36°02'25"N 6°38'22"E	Meaaz Ain Mlila Oum el Bouaghi	Mai 2019
	19	Blé dur	N.i	36°07'28"N 6°36'07"E	Ain Mlila Oum El Bouaghi	Mai 2019

Collet	20	Blé tendre	N.i	36°13'55"N 6°31'08"E	Ain Smara Constantine	Mai 2019
	21	Blé tendre	N.i	36°13'35"N 6°36'22"E	Guettar El Aich Constantine	Mai 2019
	22	Blé dur	N.i	36°16'23"N 6°30'37"E	Ain Smara Constantine	Mai 2019
	23	Orge	N.i	36°02'31"N 6°37'57"E	Ouled Guecem Ain Mlila Oum El Bouaghi	Mai 2019
	24	Blé dur	Bousselem	36°20'00"N 6°38'49"E	Onama Constantine	Mai 2019
	25	Blé dur	N.i	36°30'23"N 6°21'56"E	Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	26	Blé dur	N.i	36°30'06"N 6°23'15"E	Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	27	Blé dur	N.i	36°30'35"N 6°21'20"E	Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	28	Blé dur	N.i	36°30'16"N 6°20'22"E	Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	29	Blé dur	CIRTA	36°21'18"N 6°45'48"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	30	Blé dur	CIRTA	36°21'10"N 6°45'44"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	31	Blé dur	CIRTA	36°21'11"N 6°44'23"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	32	Blé dur	CIRTA	36°28'41"N 6°31'42"E	Beni Hamidene Tidis Constantine	Mai 2019
	33	Blé dur	CIRTA	36°16'39"N 6°43'08"E	Massinissa El Khroub Constantine	Mai 2019
	34	Blé dur	CIRTA	36°22'41"N 6°28'43"E	Ibn Ziad Constantine	Mai 2019
	35	Blé dur	CIRTA	36°15'41"N 6°43'34"E	Massinissa El Khroub Constantine	Mai 2019
	36	Blé dur	CIRTA	36°21'04"N 6°42'52"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	37	Blé dur	N.i	35°58'05"N 6°50'54"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	38	Blé tendre	N.i	35°51'21"N 7°04'58"E	Guelif Oum el Bouaghi	Mai 2019
	39	Blé dur	N.i	36°01'10"N 6°50'52"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	40	Blé tendre	N.i	36°53'53"N 7°01'47"E	Oum el Bouaghi	Mai 2019
	41	Blé tendre	N.i	35°49'28"N 7°01'36"E	Ain Fakroun Oum El Bouaghi	Mai 2019
	42	Blé dur	N.i	35°57'42"N 6°53'28"E	Ain Fakroun Oum El Bouaghi	Mai 2019
	43	Blé dur	N.i	35°52'06"N 7°05'02"E	Oum el Bouaghi	Mai 2019
	44	Orge	N.i	35°48'22"N 7°02'47"E	Guelif Oum El Bouaghi	Mai 2019
45	Blé dur	N.i	36°15'46"N 6°40'06"E	Allouk Abdellah El khroub Constantine	Mai 2019	

Collet	46	Blé dur	N.i	36°13'11"N 6°55'08"E	Ouled Rahmoune Constantine	Mai 2019
	47	Blé dur	N.i	36°03'14"N 6°49'06"E	Sigus Oum El Bouaghi	Mai 2019
	48	Blé tendre	N.i	36°11'37"N 6°41'55"E	El khroub Constantine	Mai 2019
	49	Blé dur	N.i	36°13'59"N 6°26'12"E	Oued Arama Mila	Mai 2019
	50	Blé dur	N.i	36°07'59"N 6°21'56"E	Teleghma Mila	Mai 2019
	51	Blé dur	N.i	36°10'10"N 6°24'53"E	Oued Seguen Mila	Mai 2019
	52	Blé dur	N.i	36°12'37"N 6°24'15"E	Bordj Lagar Mila	Mai 2019
	53	Blé dur	N.i	36°08'35"N 6°19'43"E	Teleghma Mila	Mai 2019
	54	Blé dur	Waha	36°14'21"N 6°25'05"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	55	Blé dur	Waha	36°13'31"N 6°25'00"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	56	Blé tendre	ARZ	36°10'32"N 6°25'21"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	57	Blé dur	N.i	36°26'23"N 6°33'17"E	Zegrou Elarbi Hamma Bouziane Constantine	Juin 2019
	58	Blé dur	N.i	36°30'05"N 6°23'22"E	Mechta Torba Grarem Gouga Mila	Juin 2019
	59	Blé dur	GTA	36°14'23"N 6°19'14"E	Oued Athmania Mila	Juin 2019
	60	Blé dur	N.i	36°11'51"N 6°56'49"E	Ain Abid Constantine	Juin 2019
	61	Blé dur	N.i	36°21'30"N 6°41'38"E	El Mridj Constantine	Juin 2019
62	Blé dur	N.i	36°20'23"N 6°41'26"E	El Mridj Constantine	Juin 2019	
63	Blé dur	N.i	36°19'19"N 6°41'29"E	El Mridj Constantine	Juin 2019	
Épi	1	Blé dur	Simeto	36°20'02"N 6°38'47"E	Onama Constantine	Mai2019
	2	Blé dur	Simeto	36°20'09"N 6°38'49"E	Onama Constantine	Mai 2019
	3	Blé dur	Cirta	36°26'08"N 6°28'17"E	Messaoud Boudjriou Constantine	Mai 2019
	4	Blé dur	Bousselem	36°20'00"N 6°38'49"E	Onama Constantine	Mai 2019
	5	Blé dur	N.i	36°30'23"N 6°21'56"E	Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	6	Blé dur	CIRTA	36°21'18"N 6°45'48"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	7	Blé dur	CIRTA	36°21'10"N 6°45'44"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	8	Blé dur	CIRTA	36°22'33"N 6°27'45"E	Ibn Ziad Constantine	Mai 2019

Épi	9	Blé dur	CIRTA	36°21'04"N 6°42'52"E	El Mridj Constantine	Mai 2019
	10	Blé dur	CIRTA	36°15'35"N 6°43'33"E	Massinissa El Khroub Constantine	Mai 2019
	11	Orge	N.i	35°48'22"N 7°02'47"E	Guelif Oum el Bouaghi	Mai 2019
	12	Blé dur	N.i	35°52'06"N 7°05'02"E	Oum el Bouaghi	Mai 2019
	13	Blé dur	N.i	35°57'42"N 6°53'28"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	14	Blé tendre	N.i	35°49'28"N 7°01'36"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	15	Blé tendre	N.i	35°53'53"N 7°01'47"E	Oum el Bouaghi	Mai 2019
	16	Blé dur	N.i	36°01'10"N 6°50'52"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	17	Blé tendre	N.i	35°51'21"N 7°04'58"E	Guelif Oum el Bouaghi	Mai 2019
	18	Blé dur	N.i	35°58'05"N 6°50'54"E	Ain Fakroun Oum el Bouaghi	Mai 2019
	19	Blé dur	N.i	36°15'46"N 6°40'06"E	Allouk Abdellah El khroub Constantine	Mai 2019
	20	Blé dur	N.i	36°13'11"N 6°55'08"E	Ouled Rahmoune Constantine	Mai 2019
	21	Blé dur	N.i	36°03'14"N 6°49'06"E	Sigus Oum el Bouaghi	Mai 2019
	22	Blé tendre	N.i	36°15'31"N 6°28'21"E	Ain Smara Constantine	Mai 2019
	23	Blé dur	N.i	36°13'59"N 6°26'12"E	Oued Arama Mila	Mai 2019
	24	Blé dur	N.i	36°08'27"N 6°22'29"E	Teleghma Mila	Mai 2019
	25	Blé dur	N.i	36°09'02"N 6°20'31"E	Teleghma Mila	Mai 2019
	26	Blé dur	N.i	36°10'12"N 6°24'36"E	Oued Seguen Mila	Mai 2019
	27	Blé dur	N.i	36°12'21"N 6°23'58"E	Bordj Lagar Mila	Mai 2019
	28	Blé dur	Waha	36°14'21"N 6°25'05"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	29	Blé dur	Waha	36°13'31"N 6°25'00"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	30	Blé tendre	ARZ	36°10'32"N 6°25'21"E	Oued Seguin Mila	Mai 2019
	31	Blé dur	N.i	36°30'06"N 6°23'15"E	Ghar Slim Grarem Gouga Mila	Mai 2019
	32	Blé tendre	N.i	36°11'37"N 6°41'55"E	El Khroub Constantine	Mai 2019
	33	Blé dur	N.i	36°07'34"N 5°12'11"E	Ain Zada Sétif	Juin 2019
	34	Blé dur	N.i	36°06'19"N 4°57'28"E	Sidi Embarek Bordj Bou Arreridj	Juin 2019
	35	Blé dur	GTA	36°16'40"N 6°30'48"E	Ain Smara Constantine	Juin 2019
	36	Blé dur	N.i	36°04'42"N 4°51'14"E	Ain Trab Bordj Bou Arreridj	Juin 2019

Épi	37	Blé dur	N.i	36°10'43"N 5°17'46"E	Ain Arnet Sétif	Juin 2019
	38	Blé dur	N.i	36°05'26"N 5°04'35"E	Bordj Bou Arreridj	Juin 2019
	39	Orge	N.i	36°05'41"N 6°08'44"E	Oueled Morsali Bordj Bou Arreridj	Juin 2019
	40	Blé dur	N.i	36°10'19"N 5°31'01"E	Sétif	Juin 2019
	41	Blé dur	N.i	36°11'19"N 5°20'18"E	Ain Arnet Sétif	Juin 2019
	42	Blé tendre	N.i	36°09'46"N 5°36'34"E	El Eulma Sétif	Juin 2019
	43	Blé dur	N.i	36°08'27"N 6°05'11"E	Chelghoum Laid Mila	Juin 2019
	44	Blé tendre	N.i	36°09'15"N 5°23'33"E	Sétif	Juin 2019
	45	Blé tendre	N.i	36°08'12"N 5°40'06"E	El Eulma Sétif	Juin 2019
	46	Blé dur	N.i	36°08'39"N 5°51'66"E	Bir Elarch Sétif	Juin 2019
	47	Blé dur	N.i	36°02'43"N 4°52'16"E	Forêt Chahba Bordj Bou Arreridj	Juin 2019
	48	Blé dur	N.i	36°26'23"N 6°33'17"E	Zegrou Elarbi Hamma Bouziane Constantine	Juin 2019
	49	Blé dur	N.i	36°30'05"N 6°23'22"E	Mechta Torba Grarem Gouga Mila	Juin 2019
	50	Blé dur	GTA dur	36°14'23"N 6°19'14"E	Oued Athmania Mila	Juin 2019
	51	Blé dur	N.i	36°11'51"N 6°56'49"E	Ain Abid Constantine	Juin 2019
52	Blé dur	N.i	36°21'30"N 6°41'38"E	El Mridj Constantine	Juin 2019	
53	Blé dur	N.i	36°20'23"N 6°41'26"E	El Mridj Constantine	Juin 2019	
54	Blé dur	N.i	36°19'19"N 6°41'29"E	El Mridj Constantine	Juin 2019	

Annexe2

Tableau récapitulatif de commune, Wilaya et type de sol d'échantillonnage de *Trichoderma*

	Numéro final	Numéro d'échantillon	Commune et région	Wilaya	Type de sol
T1	01	01	Tahir plage bazoul	Jijel	Sable
	02	02	Oued zhour	Skikda	Sable
	03	03	El aouana plage rocher noir	Jijel	Sable
	04	04	Khmis meliana jendel	Ain Defla	Sol agricole montagneux
	05	05	Sallah bey elmaafar	Sétif	Sol semi aride
T2 T3	06	06	El akhdaria	Bouira	Sol montagneux
	07	07	Bechloul	Bouira	Sol agricole
	08	08	Oued sly	Chlef	Sol forestier
	09	09	Sig	Mascara	Sol arbre olivier
	10	10	Tamezyafet	Bouira	Sol montagneux
	11	11	Boumedfaa zone elhassaniya	Ain Defla	Sol agricole
	12	12	elarbaatache	Boumerdas	Sol agricole
T4	13	13	El meghaier	Oued Souf	Sable agricole pomme de terre
	14	14	Ain arnet	Sétif	Sol agricole blé
	15	15	Bir aissa	Bordj Bou Arreridj	Sol agricole blé
	16	16	Sidi emmbarek	Bordj Bou Arreridj	Sol agricole blé
	17	17	Ain zada	Sétif	Sol agricole blé
	18	18	Sigus	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé
	19	19	Oued seguin	Mila	Sol agricole blé
	20	20	El khroub zone allouk abdallah	Constantine	Sol agricole blé
	21	21	Filfila zone el alia	Skikda	Sol montagneux
	22	22	Sidi rghis	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé
T5	23	23	Oued athmania Barrage grouz	Mila	Sol forestier
	24	24	Meskiana	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé
	25	25	Hammamet	Tebessa	Sol agricole blé
	26	26	Errorg zone Ain chejra	Oum El Bouaghi	Sol montagneux
	27	27	Hammamet Zone ain elfada	Tebessa	Sol montagneux

	28	28	Djbel aougueb	Mila	Sol agricole blé
T6 T7	29	29	El harrouch	Skikda	Sol agricole
T8	30	30	Ain zouit	Skikda	Sol montagneux
T9 T10 T11	31	31	Ain bouziane	Skikda	Sol montagneux
	32	32	Djbel elouahch	Constantine	Sol forestier
	33	33	Zighoud youcef	Constantine	Sol agricole blé
	34	34	Sendjas forêt harhar	Chlef	Sol forestier
	35	35	Sendjas forêt eterachi	Chlef	Sol forestier
T12	36	36	Khmis Miliana	Ain Defla	Sol montagneux
	37	37	Beni Bradja beni bouateb	Chlef	Sol montagneux
	38	38	Sendjas Oued ghadia	Chlef	Sol d'oued
T13	39	39	Oum tboul	Skikda	Sol agricole blé
	40	40	Oum tboul	Skikda	Sol forestier
	41	41	Hachem	Mascara	Sol forestier
	42	42	Hachem	Mascara	Sol agricole blé
	43	43	Mediouna oued ain zerka	Relizane	Sol de oued
	44	44	Mediouna foret sidi said	Relizane	Sol forestier
	45	45	Mediouna montagne elkaf	Relizane	Sol montagneux
	46	46	chlef	Chlef	Sol montagneux
	47	47	bouche gouf	Guelma	Sol agricole
	48	48	merahna	Souk-Ahras	Sol agricole
	49	49	Ain- Temouchent	Ain-Temouchent	Sol montagneux
	50	50	Boutlelis	Oran	Sol agricole
	51	51	Mostaganem	Mostaganem	Sol agricole
	52	52	Sidi Ben Adda	Ain-Temouchent	Sol d'oued
	53	53	Ain Turk	Oran	Sol montagneux
	54	54	Ouargla	Ouargla	Sable
	55	55	Touggourt	Ouargla	Sable
	56	56	Hassi Messaoud	Ouargla	Sable
	57	57	Djelfa	Djelfa	Sol agricole
	58	58	Jijel	Jijel	Sol montagneux
	59	59	M'sila	M'sila	Sol agricole
	60	60	Sigus	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé

			Alaamiriya		
	61	61	Ain Fakroun	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé
	62	62	Ali Mendjeli	Constantine	Sol agricole blé
T14	63	63	Ouled Rahmoune	Constantine	Sol agricole blé
	64	64	Oum El Bouaghi	Oum El Bouaghi	Sol agricole blé
	65	65	Guettar el aich	Constantine	Sol agricole blé
	66	66	Wazra	Médéa	Sol agricole blé
	67	67	Lazharia	Tissemsilt	Sol d'oued
T15	68	68	Lazharia	Tissemsilt	Sol forestier
	69	101	Bejaïa	Bejaïa	Rhizosphère d'olives
	70	102	Sidi Embarek	Bordj Bou Arreridj	Rhizosphère de blé
T16	71	103	Didouche mourad	Constantine	Rhizosphère de blé
T17	72	104	Chelghoum Laïd	Mila	Rhizosphère d'haricot
	73	105	El Eulma	Sétif	Rhizosphère blé
	74	106	Ain Touta	Batna	Rhizosphère d'orge
	75	107	Ouled arama	Mila	Rhizosphère de lentilles
T18	76	108	Ouled zouai	Oum el bouaghi	Rhizosphère de blé
	77	109	El oudja	Mila	Rhizosphère d'orge
	78	110	Ain tedles	Mostaganem	Rhizosphère de pomme de terre
	79	111	Zighoud yousef	Constantine	Rhizosphère de blé
	80	112	Batna	Batna	Rhizosphère d'abricot
T19	81	113	Ain Mlila	Oum el bouaghi	Rhizosphère de blé
	82	114	El ghadir	Skikda	Rhizosphère
	83	115	El kantara	Biskra	Rhizosphère des dattes
	84	116	Didouche mourad	Constantine	Rhizosphère
T20	85	117	Ain zada	Borj Bou arreridj	Rhizosphère blé
	86	118	Ttadjenanet	Mila	Rhizosphère de blé
	87	119	Beni bchir	Skikda	Rhizosphère de farine
	88	120	Oulad aouf	Batna	Rhizosphère de salade
T21	89	121	Ain touta	Batna	Rhizosphère

	90	122	Hamla	Batna	Rhizosphère de farine
	91	123	El ghedjati	Batna	Rhizosphère de farine
	92	124	Teleghma	Mila	Rhizosphère de farine
	93	125	Oulad hamla	Oum el bouaghi	Rhizosphère de blé
	94	126	Bejaïa	Bejaïa	Rhizosphère d'Olive
T22	95	127	Bouira	Bouira	Rhizosphère de pomme de terre
	96	128	Ait yahia	Tizi ousou	Rhizosphère d'Olive
T35	97	129	Tolga	Biskra	Rhizosphère
	98	130	Lakhdaria	Bouira	Rhizosphère
T23	99	131	Adrar	Adrar	Rhizosphère
	100	132	Chlef	Chlef	Rhizosphère
	101	133	Ouad seguen	Mila	Rhizosphère
	102	134	Didouche mourad	Constantine	Rhizosphère de poivre
	103	135	Ain lasel	El Tarf	Rhizosphère de blé
	104	136	bounaouara	Constantine	Rhizosphère de pomme terre
T24	105	137	Teleghma	Mila	Rhizosphère d'ail
	106	138	Ain Abid	Constantine	Rhizosphère d'orge
	107	139	Guelma	Guelma	Rhizosphère d'Olive
	108	140	El henchir toumghani	Oum el bouaghi	Rhizosphère de blé
	109	141	Berrahal	Annaba	Rhizosphère de blé
	110	142	El hadjar	Annaba	Rhizosphère d'oignon
	111	143	Ain smara	Constantine	Rhizosphère pastèque
	112	144	Salah boucheour	Skikda	Rhizosphère d'orge
T25	113	145	Ali mendjeli	Constantine	Rhizosphère
	114	146	berrahal	Annaba	Rhizosphère pomme de terre
	115	147	El harrouch	Skikda	Rhizosphère de blé
T26	116	148	Alger centre	Alger	Rhizosphère de blé

	117	149	berrahal	Annaba	Rhizosphère d'oignon
	118	150	Ain Abid	Constantine	Rhizosphère de blé
T27	119	151	Bejaia	Bejaia	Rhizosphère de figue
	120	152	El rouached	Mila	Rhizosphère pomme de terre
	121	153	El khroub	Constantine	Rhizosphère de farine
	122	154	Teleghma	Mila	Rhizosphère d'ail
	123	155	El milia	Jijel	Rhizosphère d'Olive
	124	156	El Tarf	El Tarf	Rhizosphère
	125	157	Salah boucheour	Skikda	Rhizosphère de mandarine
	126	158	Jijel	Jijel	Rhizosphère
	127	159	El hadaik	Skikda	Rhizosphère d'Orange
	128	160	Skikda	Skikda	Rhizosphère
	129	161	El Milia	Jijel	Rhizosphère de figue de barbarie
	130	162	Toudja	Bejaia	Rhizosphère de figue de barbarie
	131	163	Tébessa	Tébessa	Rhizosphère
	132	164	Berrahal	Annaba	Rhizosphère haricot vert
	133	165	Didouche mourad	Constantine	Rhizosphère de tomate
	134	166	El Harrouch	Skikda	Rhizosphère
	135	167	Ain smara	constantine	Rhizosphère de blé
	136	168	Annaba	Annaba	Rhizosphère
	137	169	Oum el bouaghi	Oum el bouaghi	Rhizosphère
	138	170	Batna	Batna	Rhizosphère
	139	171	Teleghma	Mila	Rhizosphère d'oignon
	140	172	Ain nahas	Constantine	Rhizosphère
	141	173	Didouche mourad	constantine	Rhizosphère de pomme de terre
	142	174	Teleghma	Milla	Rhizosphère de carotte
	143	175	Ain Abid	Constantine	Rhizosphère de lentilles
T28	144	176	El meridj	Constantine	Rhizosphère

					d'avoine
T29	145	177	Ghilizane	Ghilizane	Rhizosphère de blé
	146	178	blida	blida	Rhizosphère
T30	147	179	Jijel	Jijel	Rhizosphère
	148	180	Bejaia	Bejaia	Rhizosphère de blé
	149	181	Sétif	Sétif	Rhizosphère d'orge
T31	150	182	El Eulma	Sétif	Rhizosphère
	151	183	Ain el baida	Oum el bouaghi	Rhizosphère de blé
	152	184	Tamlouka	guelma	Rhizosphère
T32	153	185	Khenchela	khenchela	Rhizosphère de blé tendre
	154	01	Chelghoum	Mila	Forestier
	155	02	Belasel	Mostaganem	Aride
	156	03	Serf bni saleh	Guelma	Montagneuse
	157	04	El hadjira	Ouargla	Oued
	158	05	Arbi ben mhidi	Om bouaghi	Montagneuse
	159	06	Oued souf	Oued souf	Aride
	160	07	Rouiba	Alger	Montagneuse
	161	08	Elharouch – bouhadja	Skikda	Oued
	162	09	Elkala	Taref	Ordinaire
	163	10	Boukadir	Chlef	Aride
	164	11	Tleghma	Mila	Forestier
	165	12	Etaya	Sétif	Forestier
T33	166	13	Bouarfa	Blida	Aride
	167	14	Bordj bouariridj	Bordj Bouariridj	Aride
	168	15	Tiaret	Tiaret	Montagneuse
T34	169	16	Collo	Skikda	Montagneuse
	170	17	Boumerdesse	Boumerdès	Montagneuse
	171	18	Bir el arch	Mila	Aride
	172	19	Djebas djmila	Sétif	Montagneuse
T54	173	20	Bouchloul	Bouira	Aride
	174	21	Elksar	Bedjaïa	Montagneuse

T36	175	22	Elmansoura	Bordj Bouariridj	Aride
T37	176	23	Elkhefdji	Ouargla	Sable saharien
	177	24	Acheacha	Mostaganem	
	178	25	Elkhroube	Constantine	Montagneuse
	179	26	Mersset	Tebessa	Aride
	180	27	Bouira	Bouira	Montagneuse
	181	28	El marssa	Oran	Aride
	182	29	cheria	Tbessa	Aride
	183	30	Ain tin	Mila	Forestier
T38	184	31	Tedjna	Chlef	Aride
	185	32	Still	Oued souf	Aride
	186	33	El harrouch	Skikda	Montagneuse
	187	34	Ain zada	Bordj Bouaririj	Aride
	188	35	Bouchlouf	Guelma	Montagneuse
	189	36	Chelghoum	Mila	Aride
	190	37	Sidi Abdelaziz	Jijel	Sable de plage
T39	191	38	Hamma	Sétif	Montagneuse
	192	39	Ain Arnet	Sétif	Aride
	193	40	Ouled Rahmoun	Constantine	Forestier
	194	41	Sétif	Sétif	Aride
T40	195	42	Collo tamalous	Skikda	aride
	196	43	Mziraa	Biskra	Sable
	197	44	Omr idris	Illizi	Aride
	198	45	Ourgla	Ouargla	Aride
	199	46	Bekaria	Tbessa	Aride
	200	47	Touggourt	Touggourt	Sable
	201	48	Hassi benabdallah	Ouargla	Aride
	202	49	Jam3a	Oued souf	Sable
	203	50	Ain saleh	Tamanrasset	Sable
	204	51	Ain guezzam	Tamanrasset	Sable
	205	52	Tamanrasset	Tamanrasset	Sable

T41	206	53	El hammamet	Tébessa	Bord d'un ravin sec
	207	54	Lemniaa	Ghardaïa	Aride
T42	208	55	Jijel	Jijel	Aride
	209	56	El ramka ami moussa	Ghilizane	Forestier
	210	57	/	Bachar	Sable
T43	211	58	Bir el ater	Tébessa	Aride
	212	59	El ghar	Illizi	Sable
	213	60	Msila	Msila	/
T44	214	61	Sétif	Sétif	Aride
	215	62	Bachar	Bachar	Sable
	216	63	Ain aminas	Illizi	/
	217	64	Bir el ater	Tébessa	Aride
T45	218	65	El kantra	Biskra	Aride
T46	219	66	Ain yagout	Batna	Aride
T47	220	67	Sidi khouiled	Ouargla	Sable
T48	221	68	Al heria	Constantine	Aride
T49	222	69	Biskra	Biskra	Sable
T50	223	70	Batna	Batna	Sabkha
T51	224	71	Erouisset	Ouargla	Sable
T52	225	72	Ezrek	Oum el Bouaghi	Montagneuse
T53	226	73	Ain baida	Ouargla	Sable

Résumés

Résumé

Le blé (*Triticum* spp.) est l'une des céréales les plus importantes au monde. Malheureusement, la plante de blé est la cible de plusieurs espèces du genre *Fusarium*. Ce genre provoque deux maladies graves : la pourriture du collet (FCR) et la brûlure de l'épi (FHB). Dans ce travail une enquête a été menée pour étudier les plus importantes espèces associées à cette maladie en Algérie, puis deux axes de recherche ont été abordés afin d'essayer de résoudre cette problématique.

Cent dix-sept échantillons ont été collectés (2019), soixante-trois à partir du collet et cinquante-quatre à partir des grains de blé dans plusieurs régions du nord-est Algérien. Les *Fusarium* spp. ont été identifiés au niveau de l'espèce par le séquençage des régions de l'espaceur interne transcrit (ITS1) de l'ADNr. Aussi leurs traits de vie (taux de croissance et taux de sporulation) ont été mesurés. Les tests de pathogénicité des isolats ont été réalisés par deux méthodes *in vitro* (test des tubes) et *in vivo* (test des pots). Une souche hautement pathogène de *Fusarium culmorum* (FC11) a été utilisée dans trois essais de tolérance/sensibilité afin d'évaluer la résistance variétale de huit cultivars (cv) de blé dur et neuf de blé tendre largement commercialisés en Algérie, plusieurs paramètres phénotypiques ont été mesurés. Le potentiel de bio-contrôle de 15 isolats de *Trichoderma* (T1 à T15), isolés de différents sols de la rhizosphère et d'écosystèmes algériens, a été évalué contre 4 souches de *F. culmorum* (FC11, FC2, FC4, et FC20) afin d'identifier une nouvelle souche indigène ayant un fort potentiel de bio-contrôle contre la FCR et la FHB. Ce potentiel a été évalué par des tests *in vitro* (confrontation directe et indirecte) et confirmé par des tests *in vivo*. En outre des tests dans la serre et sur champs ont été réalisés afin de sélectionner un mode de traitement de bio-contrôle meilleur par l'usage de ces souches indigènes.

Un total de 34 isolats représentant 10 espèces de *Fusarium* a été obtenu. Les résultats ont montré l'existence de cinq espèces de *Fusarium* isolées des collets ; *Fusarium culmorum* (16), *F. cerealis* (3), *F. acuminatum* (2), *F. graminearum* (1) et *F. oxysporum* (1) ; et sept espèces isolées des grains ; *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1) et *F. brachygibbosum* (1). Les souches de *F. culmorum* ont été dominantes et plus agressives, ainsi que *F. graminearum* et *F. cerealis* qui ont été agressives dans le test *in vitro*. Cependant, le reste des espèces a été plutôt saprophyte qu'agressif. Une corrélation significative a été enregistrée entre la vitesse de croissance et le taux de sporulation ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$). Aussi une forte corrélation a été enregistrée entre le test des tubes et celui des pots ($r = 0.62$, $P = 0.007 < 0.01$), ce résultat démontre l'efficacité

d'un simple test *in vitro* pour prédire l'agressivité de *F. culmorum* sur la FCR du blé. Les cv. Sétifis et Akhamokh ont montré les niveaux de tolérance les plus intéressants parmi les cultivars de blé dur et tendre testés, respectivement. Dans cette étude, nous avons conclu qu'un simple test *in vitro* sur boîte de Pétri rapide, facile et stable peut être utilisé pour prédire la résistance variétale de différents cultivars du blé contre l'infection initiale des graines par *F. culmorum*. Les résultats du bio-contrôle par *Trichoderma in vitro* ont montré une inhibition significative de la croissance mycélienne des espèces de *F. culmorum* par rapport au contrôle. L'isolat T14 a été sélectionné pour le bio-contrôle dans les tests *in vivo*. Des expériences en tube et en pot contre *F. culmorum* (FC2) ont montré que T14 a diminué la sévérité de la FCR avec 50 et 63,63% de réduction, respectivement. L'infection par FHB a été significativement réduite par T14 dans tous les cultivars de blé dur testés. L'antagoniste T14 a été caractérisé sur le plan moléculaire, en utilisant le facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF1- α) et ITS1. Les résultats ont identifié le T14 comme étant *Trichoderma afroharzianum* avec des numéros d'accès attribués par NCBI GenBank comme MW171248 et MW159753.

Cette étude met en évidence que *F. culmorum* est l'espèce dominante associée à la FCR et la FHB en Algérie. De plus, il s'agit du premier rapport concernant l'identification de *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. cerealis*, *F. asiaticum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* et *F. brachygibbosum* du blé en Algérie. Aussi cette étude a mis en évidence la complexité des tests de résistance contre la FCR et FHB, et a démontré la nécessité d'utiliser autant de protocoles de dépistage de la résistance dans la mesure du possible. *Trichoderma afroharzianum*, évalué pour la première fois en Algérie en tant qu'agent de bio-contrôle, est une approche de bio-contrôle prometteuse contre la fusariose. En outre le traitement de bio-contrôle avec graines enrobées avant semis a montré une efficacité plus importante parmi les modes de traitement testés.

Mots-clés : *Fusarium*, *Trichoderma*, blé, résistance variétale, fusariose, bio-contrôle.

ملخص

القمح (*Triticum spp.*) هو أحد أهم الحبوب في العالم. لسوء الحظ، نبات القمح هو هدف لعدة أنواع من جنس فطريات الفيوزاريوم *Fusarium*. يتسبب هذا الجنس في مرضين خطيرين: تعفن العنق (FCR) ولفحة الأذن (FHB). في هذا العمل تم إجراء تحقيق لدراسة أهم الأنواع المصاحبة لهذا المرض في الجزائر، كما تم تناول فصلين من البحث لمحاولة حل هذه المشكلة.

مائة وسبعة عشر عينة تم جمعها (2019)، 63 من العنق و54 من حبوب القمح في عدة مناطق شمال شرق الجزائر. سلالات الفيوزاريوم (*Fusarium spp.*) تم تحديدها على مستوى الأنواع من خلال تسلسل مناطق المبادئ الداخلية (ITS1) من الحمض النووي الريبوزومي rDNA. كما تم قياس سمات حياتها (معدل النمو ومعدل التبرويض sporulation). تم إجراء اختبارات الأمراض للعزلات بطريقتين في المختبر *in vitro* (اختبار الأنبوب) و *in vivo* (اختبار الجرة). تم استخدام سلالة شديدة الأمراض من *F. culmorum* (FC11) في ثلاثة اختبارات تحمل / حساسية من أجل تقييم المقاومة النوعية لثمانية أصناف (cv) من القمح الصلب وتسعة من القمح اللين اللذان يتم تسويقهما على نطاق واسع في الجزائر، تم قياس العديد من المتغيرات الظاهرية. كما تم تقييم إمكانات المكافحة الحيوية لـ 15 عزلة من *Trichoderma* (T1 إلى T15)، معزولة من اترية مختلفة في منطقة الجذور (la rhizosphère) والنظم البيئية الجزائرية، ضد 4 سلالات من *F. culmorum* (FC20، FC4، FC2، FC11)، من أجل تحديد سلالة أصلية جديدة ذات إمكانات قوية للمكافحة الحيوية ضد مرضي ال FCR و FHB. تم تقييم هذه الإمكانيات عن طريق الاختبارات المعملية *in vitro* (المواجهة المباشرة وغير المباشرة) وتأكيدتها عن طريق الاختبارات في الجسم الحي *in vivo*. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء الاختبارات في البيت البلاستيكي وفي الحقول من أجل تحديد طريقة أفضل لمعالجة المكافحة الحيوية باستخدام هذه السلالات الأصلية.

تم الحصول على 34 عزلة تمثل 10 سلالات من الفيوزاريوم. أظهرت النتائج وجود خمسة أنواع من الفيوزاريوم معزولة من العنق (16) *F. culmorum*، (3) *F. cerealis*، (2) *F. acuminatum*، (1) *F. graminearum*، (1) *F. oxysporum*؛ وسبعة أنواع معزولة من الحبوب؛ (3) *F. incarnatum*، (3) *F. culmorum*، (1) *F. brachygibbosum*، (1) *F. graminearum*، (1) *F. equiseti*، (1) *F. asiaticum*، (1) *F. fujikuroi*، وكذلك *F. cerealis* و *F. graminearum* التي كانت عدوانية في الاختبار *in vitro*. أما بقية الأنواع فكانت طفيلية أكثر منها عدوانية. تم تسجيل ارتباط احصائي بين سرعة النمو ومعدل التبرويض ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$). كما تم تسجيل علاقة ارتباط احصائي قوية بين اختبار الأنابيب واختبار الجرة، ($r = 0.62$ $P = 0.007 < 0.01$)، وتوضح هذه النتيجة فعالية اختبار بسيط في المختبر للتنبؤ بمدى عدوانية FCR للقمح.

أظهرت الأصناف Sétifis و Akhamokh مستويات التحمل الأكثر إثارة للاهتمام بين أصناف القمح القاسي والقمح اللين المختبرين على التوالي. في هذه الدراسة، خلصنا إلى أنه يمكن استخدام اختبار *in vitro* بسيط وسريع وسهل ومستقر للنتج بمقاومة الأصناف المختلفة للقمح ضد الإصابة الأولية للبذور بالفطر *F. culmorum*. أظهرت نتائج مكافحة الحيوية ب *Trichoderma* في المختبر تثبيطاً لنمو الفطريات من نوع *F. culmorum* مقارنةً بالشاهد. تم اختيار عزلة T14 للمكافحة الحيوية في الاختبار *in vivo*. أظهرت تجارب الأنبوب والجرة ضد *F. culmorum* (FC2) أن T14 قلل من شدة FCR بنسبة 50 و 63.63% على التوالي. تم تقليل الإصابة بمرض FHB بواسطة T14 في جميع أصناف القمح الصلب المختبرة. تم وصف المضاد T14 جزيئياً، باستخدام عامل الاستطالة الترجمي 1-alpha- (TEF1- α) ITS1. حددت النتائج T14 على أنها *Trichoderma afroharzianum* مع أرقام انضمام تم تعيينها بواسطة NCBI GenBank وهي - MW171248 و MW159753.

تظهر هذه الدراسة أن *F. culmorum* هو النوع السائد المرتبط ب FCR و FHB في الجزائر. بالإضافة إلى ذلك، يعتبر هذا التقرير الأول المتعلق بإظهار وجود *F. incarnatum* ، *F. fujikuroi* ، *F. cerealis* ، *F. asiaticum* ، *F. oxysporum* ، *F. acuminatum* و *F. brachygibbosum* في القمح الجزائري. سلطت هذه الدراسة أيضاً الضوء على تعقيد اختبار المقاومة ضد FCR و FHB، وأظهرت الحاجة إلى استخدام أكبر عدد ممكن من بروتوكولات اختبار المقاومة. *Trichoderma afroharzianum* الذي تم تقييمه لأول مرة في الجزائر كعامل تحكم بيولوجي (bio-contrôle) ، هو نهج واعد للمكافحة الحيوية ضد مرض الفيوزاريوم. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت طريقة مكافحة الحيوية بالبذور المغلفة ب *Trichoderma* قبل البذر فعالية أكبر بين طرق العلاج المختبرة.

الكلمات المفتاحية: الفيوزاريوم، *Trichoderma*، القمح، مقاومة الأصناف، *Fusarium*، مكافحة الحيوية.

Abstract

Wheat (*Triticum* spp.) is one of the most important cereals in the world. Unfortunately, the wheat plant is the target of several species of the genus *Fusarium*. This genus causes two serious diseases: crown rot (FCR) and head blight (FHB). In this work a survey was conducted to study the most important species associated with this disease in Algeria, then two research axes were approached to try to solve this problem.

One hundred and seventeen samples were collected (2019), sixty-three from the crown and fifty-four from wheat grains in several regions of northeast Algeria. *Fusarium* spp. were identified to the species level by sequencing the internal transcribed spacer (ITS1) regions of the rDNA. Also their life traits (growth rate and sporulation rate) were measured. Pathogenicity tests of the isolates were performed by two methods *in vitro* (tube test) and *in vivo* (pot test). A highly pathogenic strain of *Fusarium culmorum* (FC11) was used in three tolerance/susceptibility trials to evaluate the varietal resistance of eight cultivars (cv) of durum wheat and nine of bread wheat widely marketed in Algeria, several phenotypic parameters were measured. The biocontrol potential of 15 *Trichoderma* isolates (T1 to T15), isolated from different rhizosphere soils and Algerian ecosystems, was evaluated against 4 strains of *F. culmorum* (FC11, FC2, FC4, and FC20), in order to identify a new indigenous strain with a high biocontrol potential against FCR and FHB. This potential was evaluated by *in vitro* tests (direct and indirect confrontation) and confirmed by *in vivo* tests. In addition, tests in the greenhouse and in the field were carried out in order to select a better bio-control treatment method by using these indigenous strains.

A total of 34 isolates representing 10 *Fusarium* species were obtained. The results showed the existence of five *Fusarium* species isolated from the crowns; *Fusarium culmorum* (16), *F. cerealis* (3), *F. acuminatum* (2), *F. graminearum* (1) and *F. oxysporum* (1); and seven species isolated from grains; *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1) and *F. brachygibbosum* (1). *F. culmorum* strains were dominant and more aggressive, as well as *F. graminearum* and *F. cerealis* which were aggressive in the *in vitro* test. However, the rest of the species were saprophytic rather than aggressive. A significant correlation was recorded between growth rate and sporulation rate ($r = 0.35$ $P = 0.012 < 0.05$). Also a strong correlation was recorded between the tube test and the pot test ($r = 0.62$, $P = 0.007 < 0.01$), this result demonstrates the effectiveness of a simple *in vitro* test to predict the aggressiveness of *F. culmorum* on wheat FCR. The cv. Sétifis and Akhamokh showed the most interesting tolerance levels among the tested durum and bread

wheat cultivars, respectively. In this study, we concluded that a simple, easy and stable *in vitro* petri dish test can be used to predict the varietal resistance of different wheat cultivars against initial seed infection by *F. culmorum*. The results of the *in vitro* *Trichoderma* biocontrol showed significant inhibition of mycelial growth of *F. culmorum* species compared to the control. Isolate T14 was selected for biocontrol in *in vivo* tests. Tube and pot experiments against *F. culmorum* (FC2) showed that T14 decreased the severity of FCR with 50 and 63.63% reduction, respectively. FHB infection was significantly reduced by T14 in all tested durum wheat cultivars. The antagonist T14 was molecularly characterized using translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) and ITS1. Results identified T14 as *Trichoderma afroharzianum* with accession numbers assigned by NCBI GenBank as MW171248 and MW159753.

This study highlights that *F. culmorum* is the dominant species associated with FCR and FHB in Algeria. Moreover, this is the first report concerning the identification of *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. cerealis*, *F. asiaticum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* and *F. brachygibbosum* of wheat in Algeria. Also this study highlighted the complexity of resistance testing against FCR and FHB, and demonstrated the need to use as many resistance screening protocols as possible. *Trichoderma afroharzianum*, evaluated for the first time in Algeria as a biocontrol agent, is a promising biocontrol approach against *Fusarium*. In addition, the biocontrol treatment with coated seeds before sowing showed a higher efficacy among the tested treatment methods.

Keywords: *Fusarium*, *Trichoderma*, wheat, varietal resistance, fusariosis, biocontrol.

Année universitaire : 2021/2022

Présentée par : **BOUANAKA Hamza**

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle en Microbiologie
Option : Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés

Thème : Interaction *Triticum durum/aestivum*, *Fusarium* spp. et *Trichoderma* spp. : effet du traitement par *Trichoderma* spp. sur la résistance chez le blé à l'égard des fusarioses

Résumé

Le blé (*Triticum* spp.) est l'une des céréales les plus importantes au monde. Malheureusement, la plante de blé est la cible de plusieurs espèces du genre *Fusarium*. Ce genre provoque deux maladies graves : la pourriture du collet (FCR) et la brûlure de l'épi (FHB). Dans ce travail une enquête a été menée pour étudier les plus importantes espèces associées à cette maladie en Algérie, puis deux axes de recherche ont été abordés afin d'essayer de résoudre cette problématique. Cent dix-sept échantillons ont été collectés (2019), soixante-trois à partir du collet et cinquante-quatre à partir des grains de blé dans plusieurs régions du nord-est Algérien. Les *Fusarium* spp. ont été identifiés au niveau de l'espèce par le séquençage des régions de l'espaceur interne transcrit (ITS1) de l'ADNr. Aussi leurs traits de vie (taux de croissance et taux de sporulation) ont été mesurés. Les tests de pathogénicité des isolats ont été réalisés par deux méthodes *in vitro* (test des tubes) et *in vivo* (test des pots). Une souche hautement pathogène de *Fusarium culmorum* (FC11) a été utilisée dans trois essais de tolérance/ sensibilité afin d'évaluer la résistance variétale de huit cultivars (cv) de blé dur et neuf de blé tendre largement commercialisés en Algérie, plusieurs paramètres phénotypiques ont été mesurés. Le potentiel de bio-contrôle de 15 isolats de *Trichoderma* (T1 à T15), isolés de différents sols de la rhizosphère et d'écosystèmes algériens, a été évalué contre 4 souches de *F. culmorum* (FC11, FC2, FC4, et FC20), afin d'identifier une nouvelle souche indigène ayant un fort potentiel de bio-contrôle contre la FCR et la FHB. Ce potentiel a été évalué par des tests *in vitro* (confrontation directe et indirecte) et confirmé par des tests *in vivo*. En outre des tests dans la serre et sur champs ont été réalisés afin de sélectionner un mode de traitement de bio-contrôle meilleur par l'usage de ces souches indigènes. Un total de 34 isolats représentant 10 espèces de *Fusarium* a été obtenu. Les résultats ont montré l'existence de cinq espèces de *Fusarium* isolées des collets : *Fusarium culmorum* (16), *F. cerealis* (3), *F. acuminatum* (2), *F. graminearum* (1) et *F. oxysporum* (1) ; et sept espèces isolées des grains : *F. culmorum* (3), *F. incarnatum* (3), *F. graminearum* (1), *F. equiseti* (1), *F. asiaticum* (1), *F. fujikuroi* (1) et *F. brachygibbosum* (1). Les souches de *F. culmorum* ont été dominantes et plus agressives, ainsi que *F. graminearum* et *F. cerealis* qui ont été agressives dans le test *in vitro*. Cependant, le reste des espèces a été plutôt saprophyte qu'agressif. Une corrélation significative a été enregistrée entre la vitesse de croissance et le taux de sporulation ($r = -0.35$ $P = 0.012 < 0.05$). Aussi une forte corrélation a été enregistrée entre le test des tubes et celui des pots ($r = 0.62$, $P = 0.007 < 0.01$), ce résultat démontre l'efficacité d'un simple test *in vitro* pour prédire l'agressivité de *F. culmorum* sur la FCR du blé. Les cv. Sétifis et Akhamokh ont montré les niveaux de tolérance les plus intéressants parmi les cultivars de blé dur et tendre testés, respectivement. Dans cette étude, nous avons conclu qu'un simple test *in vitro* sur boîte de Pétri rapide, facile et stable peut être utilisé pour prédire la résistance variétale de différents cultivars du blé contre l'infection initiale des graines par *F. culmorum*. Les résultats du bio-contrôle par *Trichoderma in vitro* ont montré une inhibition significative de la croissance mycélienne des espèces de *F. culmorum* par rapport au contrôle. L'isolat T14 a été sélectionné pour le bio-contrôle dans les tests *in vivo*. Des expériences en tube et en pot contre *F. culmorum* (FC2) ont montré que T14 a diminué la sévérité de la FCR avec 50 et 63,63% de réduction, respectivement. L'infection par FHB a été significativement réduite par T14 dans tous les cultivars de blé dur testés. L'antagoniste T14 a été caractérisé sur le plan moléculaire, en utilisant le facteur d'élongation de la traduction 1-alpha (TEF1- α) et ITS1. Les résultats ont identifié le T14 comme étant *Trichoderma afroharzianum* avec des numéros d'accès attribués par NCBI GenBank comme MW171248 et MW159753. Cette étude met en évidence que *F. culmorum* est l'espèce dominante associée à la FCR et la FHB en Algérie. De plus, il s'agit du premier rapport concernant l'identification de *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. cerealis*, *F. asiaticum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* et *F. brachygibbosum* du blé en Algérie. Aussi cette étude a mis en évidence la complexité des tests de résistance contre la FCR et FHB, et a démontré la nécessité d'utiliser autant de protocoles de dépistage de la résistance dans la mesure du possible. *Trichoderma afroharzianum*, évalué pour la première fois en Algérie en tant qu'agent de bio-contrôle, est une approche de bio-contrôle prometteuse contre la fusariose. En outre le traitement de bio-contrôle avec graines enrobées avant semis a montré une efficacité plus importante en comparaison avec les autres modes de traitement.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biologie Appliquée,
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Frères Mentouri Constantine 1

Mots clés : *Fusarium*, *Trichoderma*, blé, résistance variétale, fusariose, bio-contrôle

Jury d'évaluation :

Président : KHELIFI D.

Directrice de thèse : BELLIL I.

Examineur : BENBELKACEM A.

Examineur : HAMIDECHI M. A.

Examineur : KACEM CHAOUICHE N.

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1

MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

D.R. Institut National de la Recherche Agronomique

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1

Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1