



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة Université Mohamed El Bachir El

والحياة وعلوم الرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم الفالحيية

Département des Sciences Agronomiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Agronomiques

Spécialité : Protection des végétaux

Thème

Etude de l'effet antagoniste des *Trichoderma* spp en traitements individuels et associés à l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick), agent du flétrissement vasculaire du pois chiche.

Présenté par : SELLAMI *Ilhem* et BAHLOULI *Khaoula*

Devant le jury :

Président : M . BOUZID C MAA (Université de BBA)

Encadrant : M . MOUTASSEM D MCA (Université de BBA)

Examineur : M . MERZOUKI Y MCA (Université de BBA)

Année universitaire : 2021/2022

Remerciement

Tout d'abord nous remercions Dieu qui nous a permis de mener cette mémoire de fin d'étude

Nous adressons ici notre remerciement à :

Monsieur MOUTASSEM Dahou de nous avoir dirigé au long de ce travail et nous avoir fait bénéficier de son expérience, sa gentillesse et ses orientations qui ont été d'un grand apport pour établir ce mémoire.

Nos remerciements à tous nos enseignants et enseignantes pour leur patience et bienveillance au long de notre parcours universitaire.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude à tous les membres du jury pour avoir évalué ce travail,

Nous tenons tout d'abord à remercier sincèrement Mr C BOUZID qui nous a fait l'honneur de présider ce jury,

Nos remerciements sincères et respectueux également à Mr Youcef MERZOUKI qui a accepté de faire part de ce jury, d'examiner et juger notre travail

Dédicace

Avant tout : louange à Dieu, élément et miséricordieux pour nous avoir donné la force de mener à terme ce travail.

Je dédie mes parents pour les efforts et les sacrifices fait pour que je puisse réaliser ce travail.

Je dédie mes sœurs ikram et farah en témoignage de leur soutien et leurs encouragements incessants.

Pour les moments extraordinaires passés ensemble je tiens à remercier mes amis et mes collègues pour leur fidèle soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs

Ilham

Dédicace

Avant tout : louange à Dieu, élément et miséricordieux pour nous avoir donné la force de mener à terme ce travail.

Je dédie mes parents pour les efforts et les sacrifices fait pour que je puisse réaliser ce travail.

Je dédie mes sœurs Romaissa et Ibtissem en témoignage de leur soutien et leurs encouragements incessants.

Pour les moments extraordinaires passés ensemble je tiens à remercier mes amis et mes collègues pour leur fidèle soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs

Khaoula

Recherche de l'effet antagoniste des *Trichoderma* spp en traitements individuels et associés à l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick), agent du flétrissement vasculaire du pois chiche.

Résumé

L'objectif principal de cette étude est de tester l'efficacité des antagonistes biologiques (*Trichoderma* spp) en traitements individuels et combinés contre *Fusarium* de pois chiche. Les essais *in vitro* ont révélé une activité antagoniste des espèces de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne du Foc variable entre 71.82 et 88.30%, en contact direct et entre 55.3 et 76.3% en contact indirects. Le test antagonistes par filtrat de culture du *Trichoderma* montre que l'espèce *Trichoderma* 3 a dénudé une zone d'efficacité totale pour les trois concentrations testées ; 100% d'inhibition pour chaque concentration. Les associations effectuées *in vitro* indiquent que l'association *Trichoderma* Jk / 22 à montrer la plus efficace avec des taux d'inhibition environ 81.35, 81.71 et 81.84% après 24, 48h et 7h du traitement pour le test direct et l'association *Trichoderma* Jk / DK et *Trichoderma* IK/JK sont les plus efficace avec des taux d'inhibition totale après 24h, pour l'association de filtrats de culture. Toutefois, le traitement *in vivo* par les souches de *Trichoderma* spp a réduit significativement la gravité de la maladie, avec des taux variables entre 57.62% et 79.66 %. Par ailleurs, les valeurs de l'AUDPC ont été significativement diminuées par toutes les associations avec des fréquences de diminution qui varient entre 79.66 et 91.52%. Les traitements combinés ont significativement augmenté l'effet protecteur des plantes contre le Foc comparé avec les traitements individuels. Toutefois, l'application d'un consortium du *Trichoderma* spp constitue une lutte biologique efficace et une meilleure technique par rapport à l'application individuelles.

Mots-clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Pois chiche, *Trichoderma* spp, , Traitements combinés effet antagoniste.

Study of antagonistic effect of *Trichoderma spp* in individual and combined treatments against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick), causal agent of chickpea vascular wilt.

Abstract

The present study was performed to investigate the individual and combined effects of *Trichoderma* species (*Trichoderma spp*). on the disease severity of *Fusarium* wilt of chickpea. In vitro biocontrol tests revealed that isolates of *Trichoderma spp*. had a high antagonistic activity against Foc, the mycelial growth has been reduced by 71.82 and 88.30%, in dual-culture technique, by 55.3 et 76.3% % in volatile compounds test, and a high inhibition of growth was recorded by *Trichoderma* 3 isolate with 100% in culture filtrates test. The combinations carried out *in vitro* indicate that the combination of *Trichoderma* Jk / 22 show the most effective with inhibition rates of around 81.35, 81.71 and 81.84% after 24, 48 and 7 hours of treatment for the direct test. However, *Trichoderma* Jk / DK and *Trichoderma* IK/JK combination are the most effective with total inhibition rates after 24 hours, for the association of culture filtrates. Therefore, in *in vivo* treatments with *Trichoderma spp*. strains have significantly reduced the severity of the disease with a rate of reduction of about 57.62% to 79.66 %. However, all combinations significantly reduced AUDPC values with reduction frequencies varying between 79.66 and 91.52%. Combined treatments were significantly increased the protected effect of plants against Foc compared with individual treatments. However, the application of a consortium of *Trichoderma spp* establishes an effective biological control and a better technique compared to the individual application.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Chickpeas, *Trichoderma spp*, Combination treatments antagoniste effet.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I. MATREIEL ET METHODES

Matériel biologiques	3
I. Matériel végétales	3
1.2. Matériel fongique	3
1.2.1. L'agent pathogène	3
1.2.2. L'agent antagoniste	3
2. Méthodes du travail	3
2.1. Evaluation de l'effet de <i>Trichoderma spp</i> contre le Foc <i>in vitro</i>	3
2.1.1. Test de confrontation directe (Technique de double culture)	3
2.1.2. Test de confrontation indirecte	4
2.1.3. Effet de filtrat de culture de <i>Trichoderma spp.</i> sur la croissance mycélienne du Foc	4
2.2. Evaluation de l'effet de <i>Trichoderma in vivo</i>	5
2.2.1. Préparation de l'inoculum du Foc	5
2.2.2. Préparation de l'inoculum de <i>Trichoderma spp</i> et traitement des semences	5
2.3. Effet de l'association des <i>Trichoderma spp in vitro</i>	6
2.3.1. Association entre deux espèces de <i>Trichoderma</i> en contact direct.....	6
2.3.2. Analyse de l'effet l'association de deux filtrats de la culture de <i>Trichoderma spp</i>	7
2. 3.3. Effet de des associations <i>in vivo</i>	7
2.4. Exploitation des résultats et analyses statistiques	7
2.4.1. Mesure de l'Incidence	7
2.4.2. Mesure de la sévérité d'attaque	8
2.4.3. Calcul de l'indice de Flétrissement (<i>DII</i>)	8
2.4.4. Calcul de l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve)	8
2.5. Analyse statistique	9

CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION

II. Résultats	10
1.1. Pouvoir antagoniste des <i>Trichoderma in vitro</i> contre le Foc	10
1.1.1. Test de confrontation direct	10
1.1.2. Test de confrontation indirecte (à distance)	13
1.1.3. Effet des Filtrats de culture sur la croissance mycélienne du Foc	14
1.2. Effet des espèces de <i>Trichoderma spp in vivo</i>	16
1.2. Effet de l'association <i>in vitro</i>	17
1.2.1. Effet de l'association en contact direct	17
1.2.1. Effet de l'association entre les filtrats de culture.	18
1.3. Effet de l'association <i>in vivo</i>	20
2. Discussion.	21
CONCLUSION	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modalités des tests antagonistes ; A- test direct B- test indirect.....	4
Figure 2. Modalités des tests d'association antagonistes directs entre les espèces de <i>Trichoderma</i> sp.....	6
Figure 3. L'effet inhibiteur de différents espèces antagonistes <i>Trichoderma</i> sp sur Foc en contact direct.....	10
Figure 4. Étude statistique comparative effectuée par GLM sur l'effet de l'espèce fongique et le temps sur la zone d'inhibition en contact direct....	11
Figure 5. Effet inhibiteur des espèces de <i>Trichoderma</i> sp sur le Foc en contact direct. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	11
Figure 6. L'effet inhibiteur de différents espèces antagonistes <i>Trichoderma</i> sp sur Foc en contact direct.....	12
Figure 7. Étude statistique comparative effectuée par GLM sur l'effet de l'espèce fongique et le temps sur la zone d'inhibition en contact indirect....	12
Figure 8. Effet inhibiteur des espèces de <i>Trichoderma</i> spp sur le Foc en contact direct. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	13
Figure 9. Effet des Filtrats de culture sur la croissance mycélienne du Foc	14
Figure 10. Etude statistique comparative effectuée par GLM de l'espèce fongique, le temps et la concentration de filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la zone d'inhibition sur le Foc.....	15
Figure 11. Effet inhibiteur des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp sur le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	15
Figure 12. Effet inhibiteur des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp sur le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	16
Figure 13. Effet des espèces de <i>Trichoderma</i> sur la sévérité de flétrissement vasculaire causé par le Foc dans les conditions in vivo. Les valeurs	

représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	16
Figure 14. Effet de l'association des <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne du Foc.....	17
Figure 15. Etude statistique comparative effectuée par GLM de l'association fongique et le temps sur la zone d'inhibition sur le Foc.....	17
Figure 16. Effet de l'association des <i>Trichoderma spp</i> sur la zone d'inhibition de Foc... Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	18
Figure 17. Etude statistique comparative effectuée par GLM de traitement fongique, le temps et la concentration de filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la zone d'inhibition sur le Foc.....	19
Figure 18. Effet de l'association de filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> sur la zone d'inhibition du Foc.....	19
Figure 19. Effet de l'association des espèces de <i>Trichoderma</i> sur la sévérité de flétrissement vasculaire causé par le Foc dans les conditions <i>in vivo</i> . Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.	20
Figure 20. Sévérité de la maladie de flétrissement vasculaire du pois chiche sur les plantules traitées par les associations des espèces de <i>Trichoderma spp</i>	20

LISTE DES ABREVIATION

°C : degrés celsius

μL : microlitre

ANOVA : annalyse of variance

AUDPC : area under the curve progressing of the desease

Cm : centimètre

DI : incidence

DII : l'index de l'intensité de la maladie

Foc : *Fusariumoxysporum f.sp.ciceris*

g : gramme

I : indice d'hinibition

ISM : l'indice de sévérité moyenne

ITGC : institut technique des grandes cultures

Kg : kilogramme

mL : Millilitre

ml : millilitre

Mm : millimètre

PDA : potato dextrose agar

PDB : potato dextrose broth

Ppm : partie par million

SAS : Statistical Analysis System

GLM : General Liner Model.

INTRODUCTION

Le flétrissement vasculaire causé par *Fusarium oxysporum* fs. sp *ciceris* (Foc) est l'une des maladie la plus destructive de la culture du pois chiche dans le monde. Pour réduire l'importance de cet maladie, les producteurs ont souvent recours à tout un arsenal de pesticides (Jimenez-Díaz *et al.*, 2015) avec des résultats souvent mitigés (Haware *et al.*, 1996 ; Trapero-Casas et Jiminez-Diaz, 1985).

Le contrôle de flétrissement vasculaire de pois chiche causé par *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* est très difficile en raison des capacités intrinsèques représentées par la capacité de survie à long terme des chlamydospores qui peuvent persister pendant des années et des années dans le sol (Jimenez-Díaz *et al.*, 2015).

L'utilisation de composés chimiques a donné des résultats positifs contre un large éventail d'agents pathogènes qui affectent les cultures. Cependant, les préoccupations ont survénue en raison de la sensibilité décroissante des maladies à la lutte chimique, les effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine (Monfil et Casas-Flores, 2014), ainsi que l'apparition des souches résistantes à un ou plusieurs pesticides (Goulson, 2013).

A l'heure actuelle, une pratique clé pour lutter contre les agents pathogènes des plantes dans l'agriculture durable est la lutte biologique, qui repose sur la gestion des ressources naturelles et de développer des activités antagonistes contre les micro-organismes ce qui en fait une approche efficace et écologique en matière de protection contre diverses maladies (Huang *et al.*, 2012).

Le genre *Trichoderma* englobe des agents de contrôle biologiques (BCA) à un pouvoir antagoniste très élevé contre un large éventail phytopathogènes (Medeiros *et coll*, 2017). Ces antagonistes possèdent divers mécanismes d'action, tels que le parasitisme, la compétition sur les nutriments et la synthèse de antibiotiques (Sood *et al.*, 2020). Bien que plusieurs espèces du genre *Trichoderma* sont avérées potentiellement efficaces dans le contrôle de *Fusarium oxysporum* f. sp *ceciris*. , seulement un nombre limité d'entre eux ont été exploités comme agents de lutte contre ce pathogène.

Depuis plusieurs décennies, le genre *Trichoderma spp* a suscité l'intérêt des chercheurs et des industries. Approximativement 60 % des biofongicides homologués à base de champignons filamenteux ont été développés à partir de souches de *Trichoderma spp* (Verma *et al.*, 2007).

Malgré leur potentielle efficacité contre beaucoup de phytopathogènes, les formulations à base de *Trichoderma spp* présentent certains inconvénients incluent la durée de vie limitée, l'efficacité avec une forte dose, une faible efficacité contre les agents pathogènes du sol et des semences et la stabilité dans un environnement défavorable (Keswani *et al.*, 2014).

Pour la gestion des maladies des plantes, l'application d'un consortium microbien constitué de plusieurs souches efficaces pour une lutte biologique efficace peut être une meilleure technique par rapport à l'application de souches microbiennes individuelles (**Sarma *et al.*, 2015**).

La présente étude vise donc à accroître les effets de la lutte biologique par la mise en évidence de quelques espèces de *Trichoderma spp* indigènes et leur pouvoir fongicide contre *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* agent causal de flétrissement vasculaire de pois chiche. Ce modèle de lutte biologique s'appuiera en premier lieu sur une analyse *in vitro* et *in vivo* de quelques souches de *Trichoderma spp* contre le Foc, et en seconde lieu sur l'analyse de l'effet de l'association des *Trichoderma spp* dans la lutte contre le Foc dans les conditions *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE I.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels biologiques

1.1. Matériels végétales

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constituée une variété de pois chiche FLIP, Cette variété nous ont été fournis par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Saida et Sétif, où elles sont multipliées chaque saison.

1.2. Matériel fongique

1.2.1. L'agent pathogène

L'isolat de Foc utilisé dans cette étude a été obtenu à partir des plants de pois chiche présentant des symptômes de jaunissement vasculaire, originaire de la région de mascara.

1.2.2. L'agent antagoniste

Douze agents biologiques de *Trichoderma spp* ont été utilisés pour réaliser cette étude. Les agents de lutte biologique ont été isolés de la rhizosphère de pois chiche provenant de la région de Mascara. Les souches font partie d'une collection de 30 souches de *Trichoderma* ont été maintenu sur un milieu PDA par des repiquages réguliers.

2. Méthodes du travail

2.1. Evaluation de l'effet antagoniste de *Trichoderma spp* contre le Foc *in vitro*

2.1.1. Test de confrontation directe (Technique de double culture)

Les isolats de *Trichoderma spp* ont été évalués pour leur activité antagoniste vis-à-vis le Foc. Le test a été effectué par la technique de double culture décrite par **Morton et Stroube, (1955)**. Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu e culture PDA ; deux pastilles gélosées mesurant 5 mm de diamètre, l'une portant l'espèce antagoniste *Trichoderma* et l'autre le pathogène *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 4 cm et à équidistance du centre de la boîte. Les repiquages sont effectués en même temps (**Benhamou et Chet, 1996**).

L'incubation est réalisée à 25°C pendant trois jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies du Foc et leur envahissement par le mycélium du *Trichoderma spp* sont effectuées chaque jour jusqu'aux troisième jour.

Le témoin est constitué par un repiquage du pathogène seul dans la boîte de pétri qui contient le PDA.

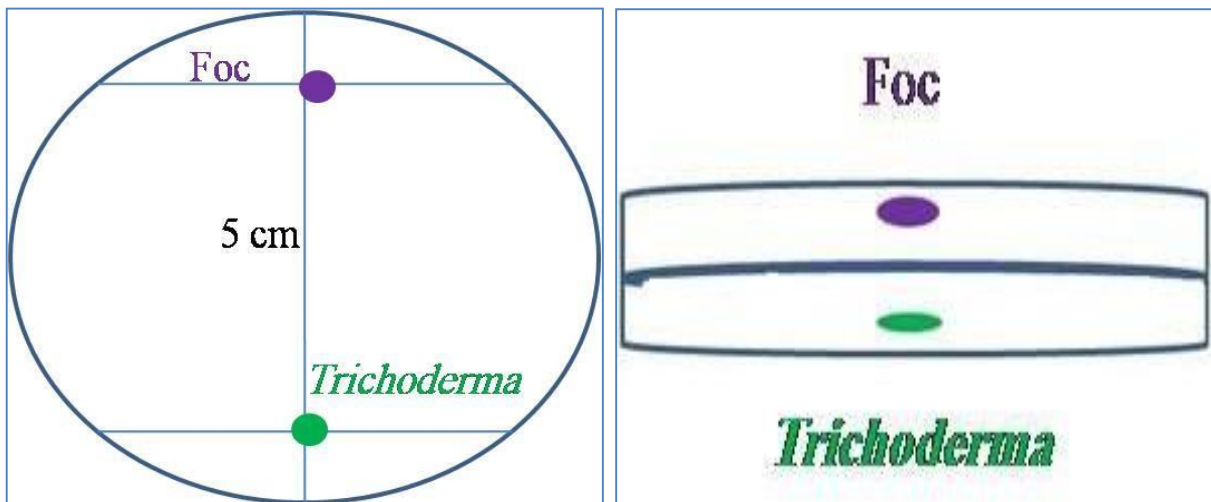


Figure 1. Modalités des tests antagonistes ; A- test direct B- test indirect.

2.1.2. Test de confrontation indirecte

Les souches de *Trichoderma* spp ont été évaluées in vitro par la technique de confrontation directe, qui inhibe la croissance des agents pathogènes en produisant des substances volatiles suivant les techniques décrites par **Dennis et Webster (1971)**. Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Fusarium* en bas et le *Trichoderma* en haut (Figure 01).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par de Parafilm afin d'éviter toute évaporation des substances volatiles. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture. Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, celle du bas contenant une pastille de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* alors que celle du haut ne contient que le milieu PDA.

2.1.3. Effet de filtrat de culture de . sur la croissance mycélienne du Foc

L'effet des filtrats de culture de 12 isolats de *Trichoderma* spp. a été évalué contre le Foc selon la technique de **Dubey et al., (2007)**. Pour réaliser ce test, 10 explants mycéliens de 5 mm de diamètre ont été prélevés à partir des cultures de *Trichoderma* âgées de 7 jours et déposés dans des flacon erlenmayer de 250 ml contenant 100 ml de milieu PDB stérile, puis incubés à 28 °C pendant 15 jours sous agitation continue. Le filtrat de la culture a été d'abord filtré à travers un papier filtre wattman N1 pour éliminer le mycélium et une seconde filtration

à travers des filtres membranes Millipore de 0,20 µm de diamètre pour éliminer les spores. Les filtrats ont été conservés à 4°C.

Pour étudier l'effet antifongique des filtrats de culture de *Trichoderma spp.* sur la croissance mycélienne du Foc, des volumes de 5, 10 et 15 ml de chaque filtrat a été additionné à 30 ml de PDA Stérile et tiède. Les contrôles ont reçu les mêmes volumes de l'eau distillée stérile. A partir des cultures âgées de 7 jours de Foc, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA traité avec les trois concentrations de Filtrats de la culture de *Trichoderma*. Quatre répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque souche de *Trichoderma* et pour chaque concentration. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 3 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

2.2. Evaluation de l'effet de *Trichoderma in vivo*

2.2.1. Préparation de l'inoculum du Foc

Selon la méthode de **Trapero-Casase, (1983); Merkuz et al, (2012)** dans des sacs de 3kg en plastiques contenant du sable tamisé et ajouté à la farine de maïs humidifié par l'eau distillée, selon la proportion de 9/1/2 respectivement. Le mélange est stérilisé deux fois à l'autoclave pendant 20 min à 120° C, puis ensemencé par 50 explants de 8mm de diamètre prélevé à partir d'une culture de FOC âgées de 15 jours, l'incubation est réalisée pendant 21 jours. Une agitation des pots tous les 3 jours est effectuée afin de permettre une colonisation homogène du milieu par le champignon. L'inoculum ainsi obtenu est incorporé dans des pots contenant le substrat de culture stérilisé à raison de 100g d'inoculum pour 1kg de substrat, ce dernier est composé d'un mélange de sable, terre et terreau selon les proportions respectivement de 1/1/1. Le semis est réalisé 15 jours après l'incorporation de l'inoculum au substrat, afin de permettre une meilleure colonisation par le champignon.

2.2.2. Préparation de l'inoculum de *Trichoderma spp* et traitement des semences

Les isolats de *Trichoderma spp* ont été cultivés dans des erlenmeyers contenant chacune 200 ml de bouillon de pommes de terre dextrose (PDB) pendant une semaine à 25°C et bien mélangé avec le milieu en utilisant un agitateur magnétique. Après filtration, la suspension sporale a été ajustée à 5×10^6 spores / ml (**Calvet et al., 1990**).

L'enrobage des semences par les deux espèces de *Trichoderma* a été effectué selon la méthode proposée par **Akladios et al, (2012)**. Les semences du pois chiche de un variété ont été désinfectée en surface par immersion dans une

solution d'hypochlorite de sodium (5%) trois fois successives pendant 3 min, lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles.

Dix graines de chaque variété testée ont été immergées dans 5 ml de la suspension sporale de *Trichoderma* pendant 30 min.

Les semences traitées ont été semées dans des pots à la base de dix grains par pot contenant le sol infesté par le Foc. Les semences non traitées, servis comme témoin.

2.3. Effet de l'association des *Trichoderma spp in vitro*

2.3.1. Association entre deux espèces de *Trichoderma* en contact direct.

Ce test est effectué avec le même principe que le test de confrontation direct avec une légère modification. Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA ; trois pastilles gélosées mesurant 5 mm de diamètre, l'une portant le pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* et l'autre portant deux espèces antagonistes de *Trichoderma* disposées l'une sur l'autre. Les deux pastilles de l'antagoniste et la pastille du Foc ont été placées suivant un axe diamétral à 4 cm et à équidistance du centre de la boîte. Les repiquages sont effectués en même temps.

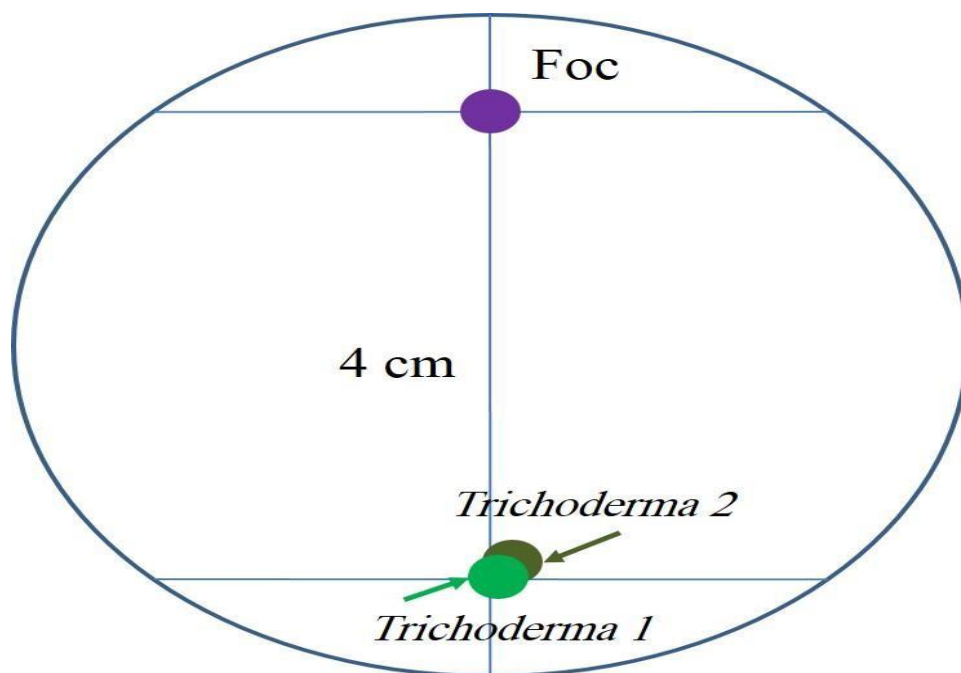


Figure 2. Modalités des tests d'association antagonistes directs entre les espèces de *Trichoderma spp*.

2.3.2. Analyse de l'effet d'association de deux filtrats de la culture de *Trichoderma spp*

Cette technique consiste à l'amendement de milieu de culture PDA tiède avec un mélange des filtrats de la culture de deux espèces de *Trichoderma spp*, selon les proportions (50/50). Pour étudier l'effet antifongique des filtrats de culture de *Trichoderma spp* sur la

croissance mycélienne du Foc, des volumes de mélange selon les concentrations C1 [15mL], C2 [10 mL] et C3 [5 mL] ont été additionné à 30 ml de PDA Stérile et tiède.

Une pastille gélosée de 5 mm de diamètre a été prélevée à partir des cultures âgées de 7 jours de Foc, disposée au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA traité avec les mélange des Filtrats de culture de *Trichoderma spp.* Cinq répétitions indépendantes ont été accomplies pour chaque filtrat. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 3 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

2.3.3. Effet des associations *in vivo*

Les associations ont été testés selon les proportions 50/50 de deux espèces de *Trichoderma* les grains de variété Flip désinfectées préalablement ont été trempées pendant 30 min dans une suspension sporale du *Trichoderma spp.* La suspension de spores a été préparée selon la méthode décrite précédemment.

2.4. Exploitation des résultats et analyses statistiques

Les estimations sont fondées sur l'observation des symptômes et la notation de l'incidence (I) et de la sévérité (S) de la maladie. Lors de chaque visite, l'incidence et la gravité de la maladie ont été évaluées selon les méthodes de **(Trapero-Casas, 1983)**.

2.4.1. Calcul de l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve)

AUDPC est une méthode d'analyse qui permet de résumer les données de l'intensité de la maladie, en une seule valeur. Cette valeur est indispensable pour la comparaison entre les différentes épidémies à travers les années, les emplacements, ou les stratégies de la gestion (Cook, 2006 ; Sparks *et al*, 2008).Cependant, cette méthode est utile pour la description, l'estimation et la comparaison entre les épidémies causées par le FOC (Navas-Cortes *et al*, 2000 ; 1998). L'AUDPC est calculé en utilisant la formule suivante :

L'AUDPC est calculé selon la formule rapportée par Cook, (2006) :

$$\text{AUDPC} = \sum_{i+1} [(\mathbf{x}_i + \mathbf{x}_{i+1})/2](\mathbf{t}_i + \mathbf{t}_{i+1})$$

Où :

$\mathbf{x}_i$ = la proportion des tissus ou le nombre de plantes malades à toute une seule mesure (intensité de la maladie) à l'observation i ,

$\mathbf{t}_i$ = temps (jours) après l'inoculation à l'observation

$\mathbf{n}$ = le nombre total d'observations. La somme de régions individuelles trapézoïdes, ou régions de i à $n-1$. i

$i + 1$ représente des observations de 1 à n .

2.5. Analyse statistique

Les expériences ont été analysées en utilisant une analyse standard de la variance (ANOVA) effectuée par le logiciel STATITICA 8. Pour tous les tests, le niveau de la signification a été évalué au seuil 5%. Le cas échéant, la comparaison des moyennes était faite moyennant le test de Tukey afin de distinguer des groupes selon les valeurs des moyennes des variables testées.

Les mesures des caractéristiques épidémiologiques (I, S, DII,) sont soumises à des analyses de variance, chaque variété étant représenté par trois répétitions pour un seul variable

Lecture des résultats et analyses statistiques les valeurs de l'AUDPC et les traitements statistiques sont les mêmes que le test antagoniste *in vivo*.

CHAPITRE II.

RESULTATS ET DISCUSSION

II. Résultats

1.1 Pouvoir antagoniste des *Trichoderma in vitro* contre le Foc

1.1.1 Test de confrontation direct

L'ensemble des espèces antagonistes *Trichoderma spp* ont été testées afin de mettre en évidence leur activité antifongique vis-à-vis du Foc. L'étude et la comparaison de l'efficacité des isolats de *Trichoderma spp* ont montré une réduction significative de la croissance mycélienne du Foc qui varie avec l'espèce fongique utilisée. A cet effet, l'ANOVA a montré que l'espèce ($F=2.66$; $P=0.007$) et le temps ($F=2.98$; $P=0.001$) ont un effet hautement significatif sur la zone d'inhibition de la croissance mycélienne. A cet égard, les isolats de *Trichoderma BK*, *Trichoderma HK* et *Trichoderma IK* sont les espèces les plus efficaces, contrairement aux espèces *Trichoderma 10* et *Trichoderma CK* constituent les espèces faiblement efficaces.

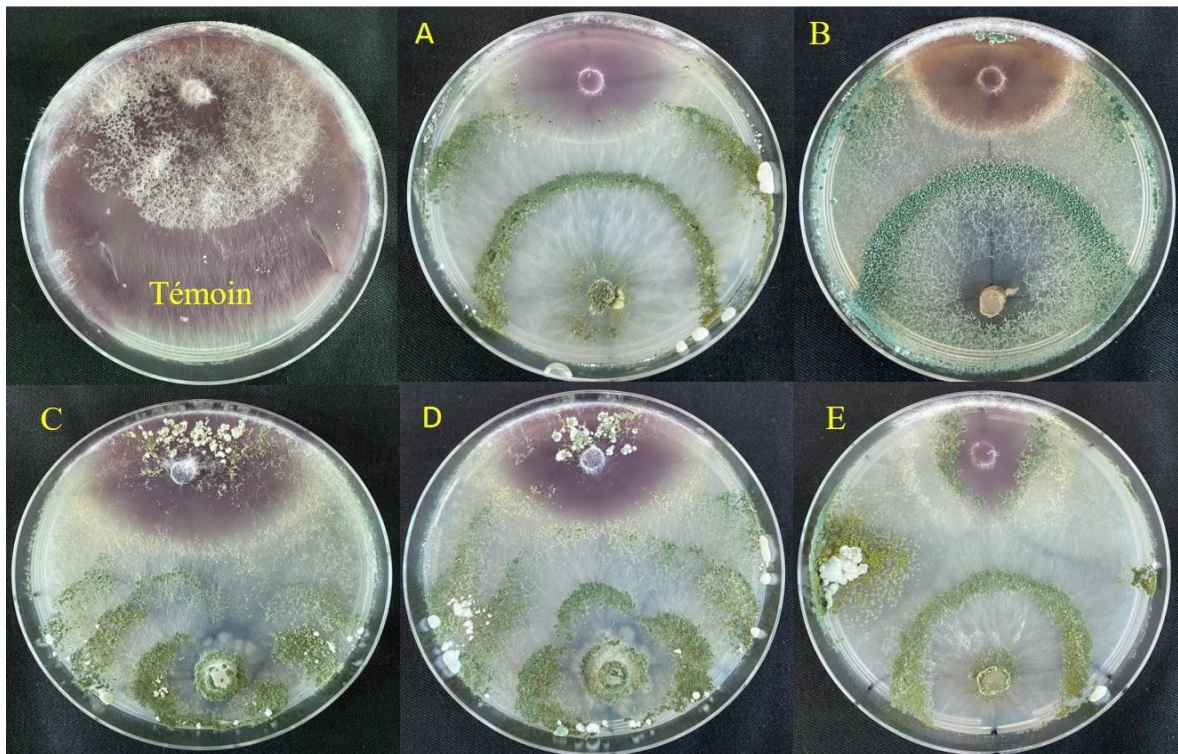


Figure 3. L'effet inhibiteur de différents espèces antagonistes *Trichoderma spp* sur Foc en contact direct.

Après 48 h de confrontation, la vitesse de l'inhibition devient très forte et la croissance de Foc devient pratiquement faible. La zone d'inhibition la plus élevée a été notée chez l'espèce *Trichoderma BK* avec une zone d'inhibition de 81.66%, en revanche la zone d'inhibition la plus faible a été notée chez l'espèce *Trichoderma CK* avec une valeur d'inhibition 27.06%. Les valeurs de la zone d'inhibition ont été significativement augmentées après 48 h de confrontation.

La zone d'inhibition devient 71.82% pour l'espèce *Trichoderma CK*, alors qu'elle est de 92.66% pour *Trichoderma BK* et *Trichoderma EK*. Après 72hr de confrontation avec le Foc une disparition progressive du mycélium a été constaté chez quelques espèces, mais totale chez d'autre espèces notamment *Trichoderma BK* et *Trichoderma EK*, avec une zone d'inhibition environ 88.30% pour chaque espèce. Cette dégradation du mycélium qui est plus marquée au cinquième jour, révèle une action mycoparasitique lytique de *Trichoderma spp* envers le Foc.

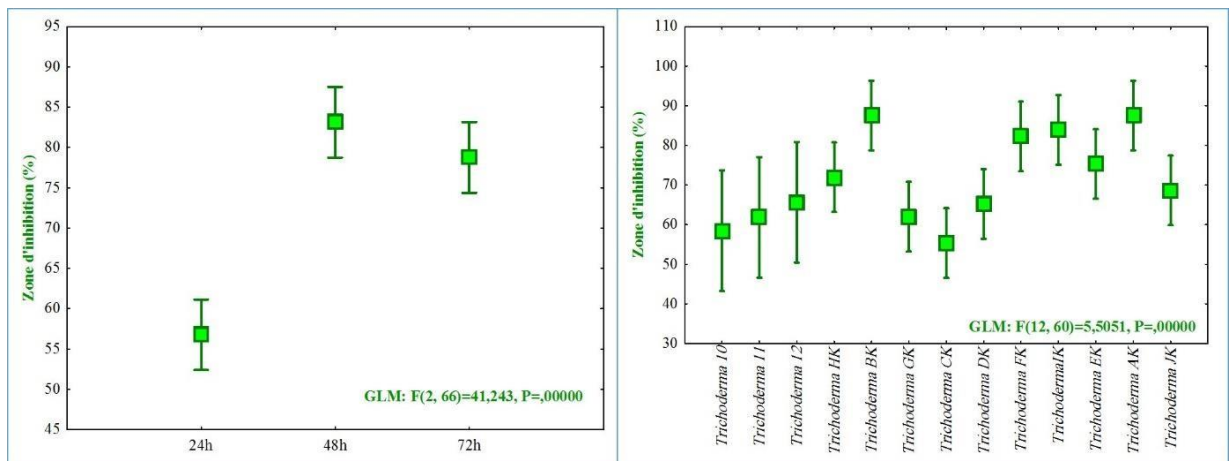


Figure 4. Étude statistique comparative effectuée par GLM sur l'effet de l'espèce fongique et le temps sur la zone d'inhibition en contact direct.

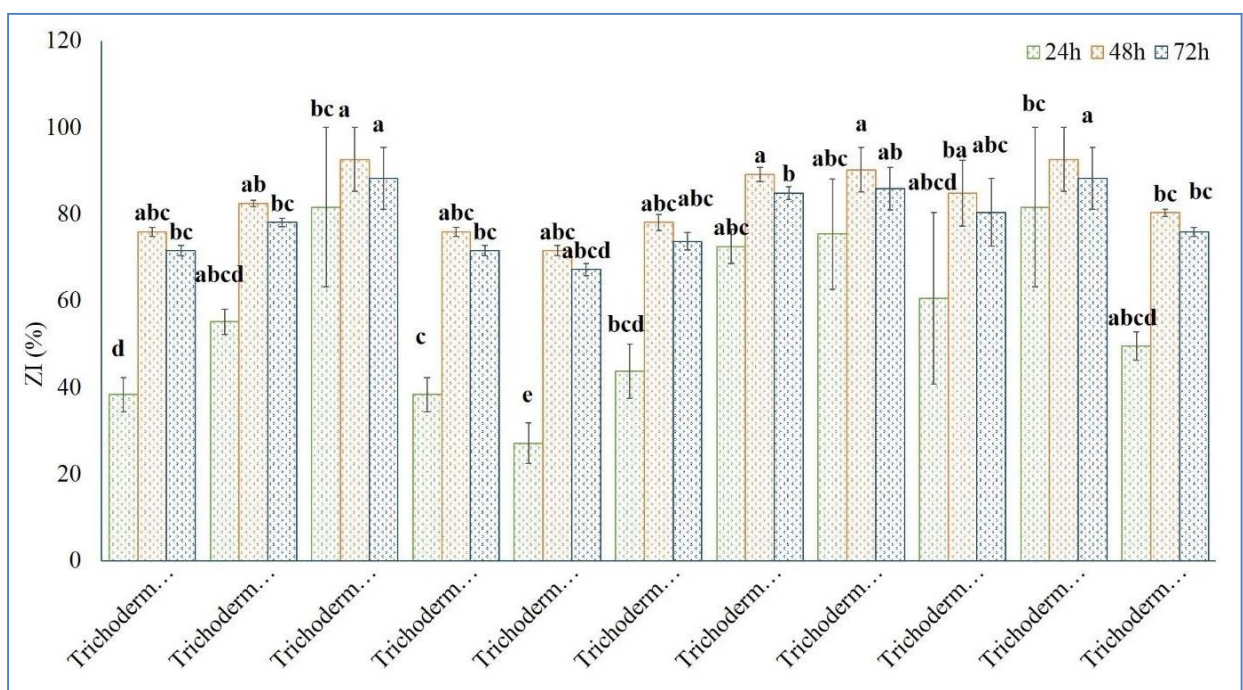


Figure 5. Effet inhibiteur des espèces de *Trichoderma spp* sur le Foc en contact direct. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes, montrent une modification au niveau du mycélium, se marquant par une lyse total ou partiel, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sur celui du *Foc*.

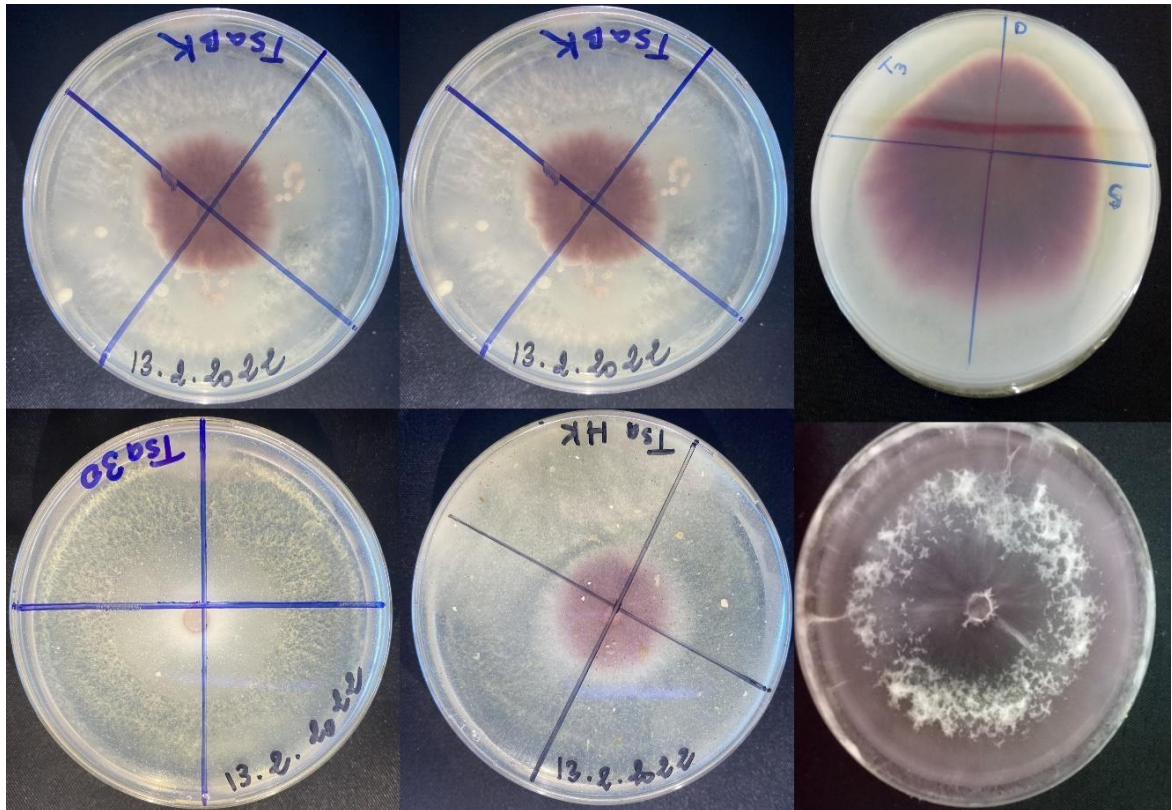


Figure 6. L'effet inhibiteur de différents espèces antagonistes *Trichoderma* spp sur *Foc* en contact direct.

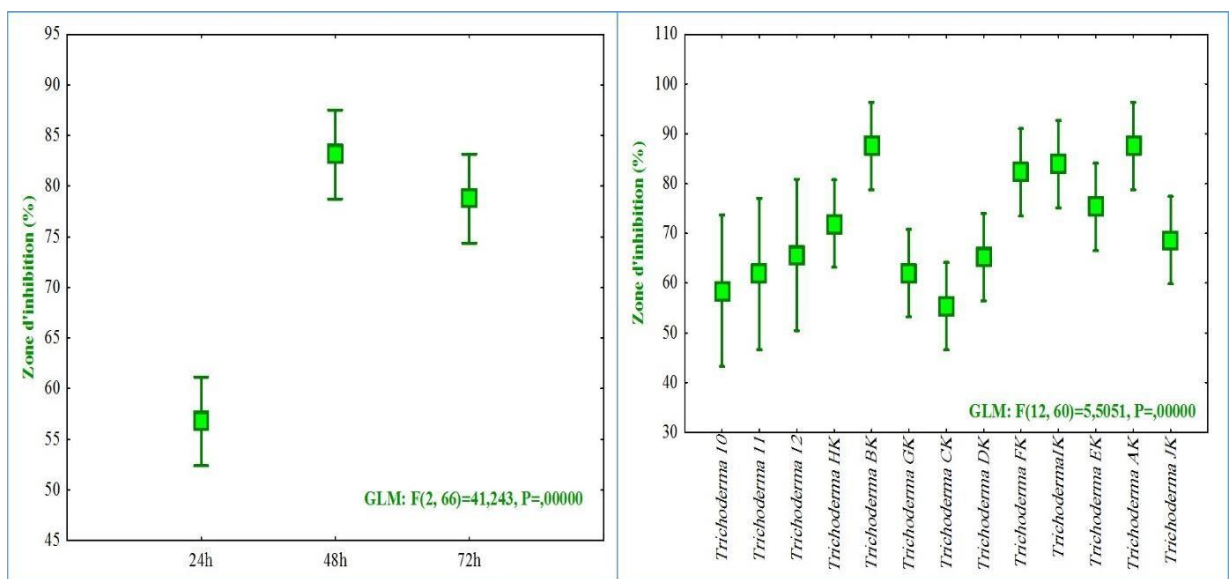


Figure 7. Étude statistique comparative effectuée par GLM sur l'effet de l'espèce fongique et le temps sur la zone d'inhibition en contact direct.

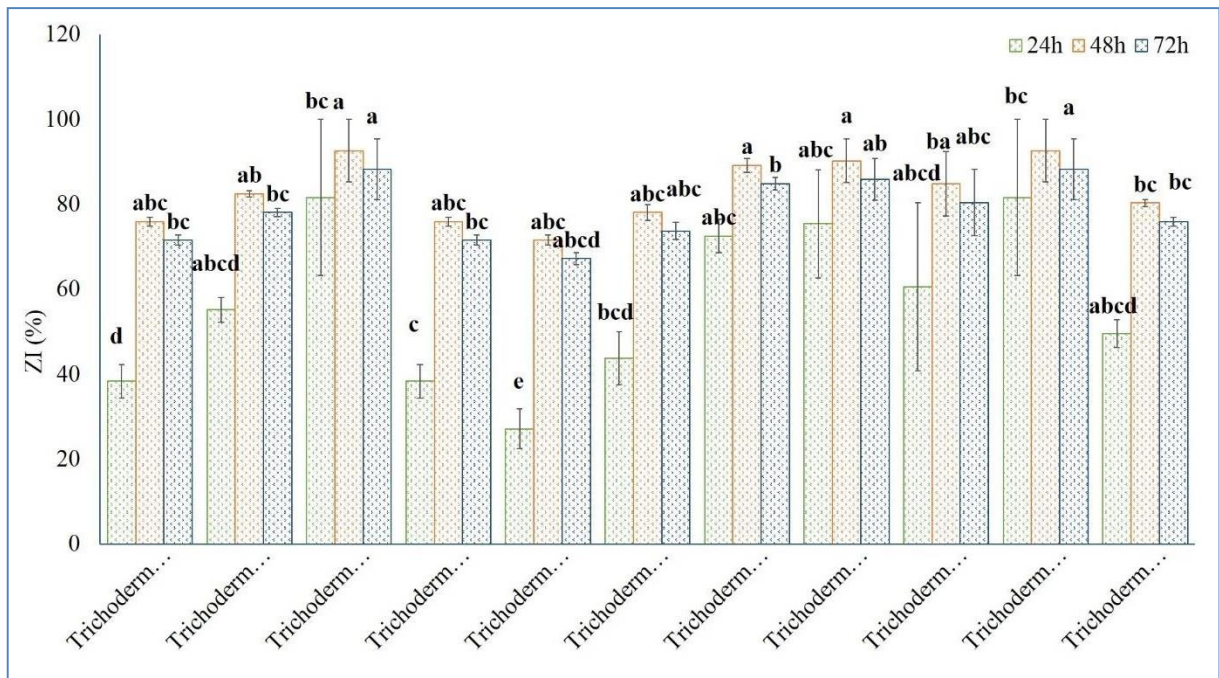


Figure 8. Effet inhibiteur des espèces de *Trichoderma spp* sur le Foc en contact direct. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

1.1.1. Test de confrontation indirecte (à distance)

L'action antagoniste des *Trichoderma spp* a été vérifiée *in vitro* vis-à-vis le Foc par confrontation à distance. Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance de différentes souches testées.

Les analyses ANOVA exposent un effet hautement significatif de Tempes et de l'espèce fongique sur la zone d'inhibition du Foc. En effet, les données obtenues montrent des taux d'inhibition variables en fonction l'espèce fongique et le temps d'exposition. A cet égard, les deux espèces *Trichoderma* BK et *Trichoderma* HK sont les plus efficaces avec des taux d'inhibition de l'ordre de 76.3 pour chacune. En revanche, l'espèce *Trichoderma* CK est la faiblement efficace avec un taux d'inhibition 55.3%

L'analyse des données explique significativement l'effet du temps sur la zone d'inhibition souvent elle augmente avec l'augmentation de temps d'exposition. A cet effet, les zones d'inhibition après 24h d'exposition sont les faiblement efficace (15.2 jusqu'à 69.7%), alors que celles après 72h sont les plus efficace (55.3 jusqu'à 76.3%).

1.1.2. Effet des Filtrats de culture sur la croissance mycélienne du Foc

L'analyse de la variance ANOVA a montré un effet très hautement significatif ($p < 0.00001$) de l'espèce sur la croissance mycélienne du Foc. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux de l'inhibition de la croissance mycélienne du Foc.

La lecture de donnée indique des zones d'inhibition très variables en fonction l'espèce de *Trichoderma spp* ($F=19.2$, $P=0,0000*$) et le dose appliquée ($F=20.76$, $P=0,000*$). A cet effet, l'espèce *Trichoderma* 3 a dénudé la zone d'efficacité la plus élevée pour les trois concentrations testées ; 100% d'inhibition pour chaque concentration, contrairement à l'espèce *Trichoderma* 10 qui a enregistré la valeur d'efficacité la plus faible aussi pour les trois concentrations C1, C2, C3 avec environ 56.50, 53.05 et 78,57% de la zone d'inhibition. Pour toutes les espèces, la zone d'inhibition est dose dépendante, elle augmente avec l'augmentation de la concentration. L'intervalle d'efficacité est variable entre 3.56 et 100% pour la C1, 7.72 et 100% pour la C2, ainsi qu'entre 14.72 et 95.64% pour la C3.

Le traitement de donnée indique un accroissement de l'efficacité des filtrats des *Trichoderma spp* en fonction le temps. A cet effet, l'efficacité la plus élevée a été notée après 72 h de traitement contrairement à l'efficacité après 24 h qui est la plus faible.

La lecture des données affichées sur la figure expose une efficacité totale de l'espèce *Trichoderma* 03 pour toutes les concentrations même après 24 h seulement de traitement. Alors que la souche *Trichoderma* 10 a exposé un taux de la zone d'inhibition avec environ 81,35, 44,05 et 44,05 pour les concentrations C1, C2 et C3 après 24 h de traitement, respectivement. Cependant, elle est de l'ordre de 75,31, 7,79 et 14,42% après 72h de traitement, respectivement

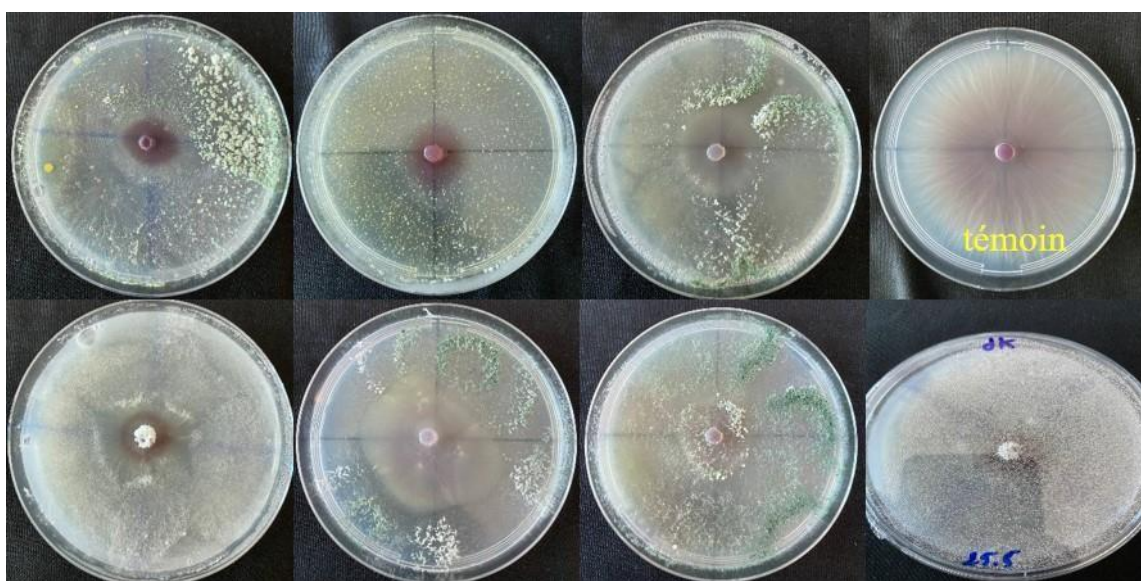


Figure 9. Effet des Filtrats de culture sur la croissance mycélienne du Foc

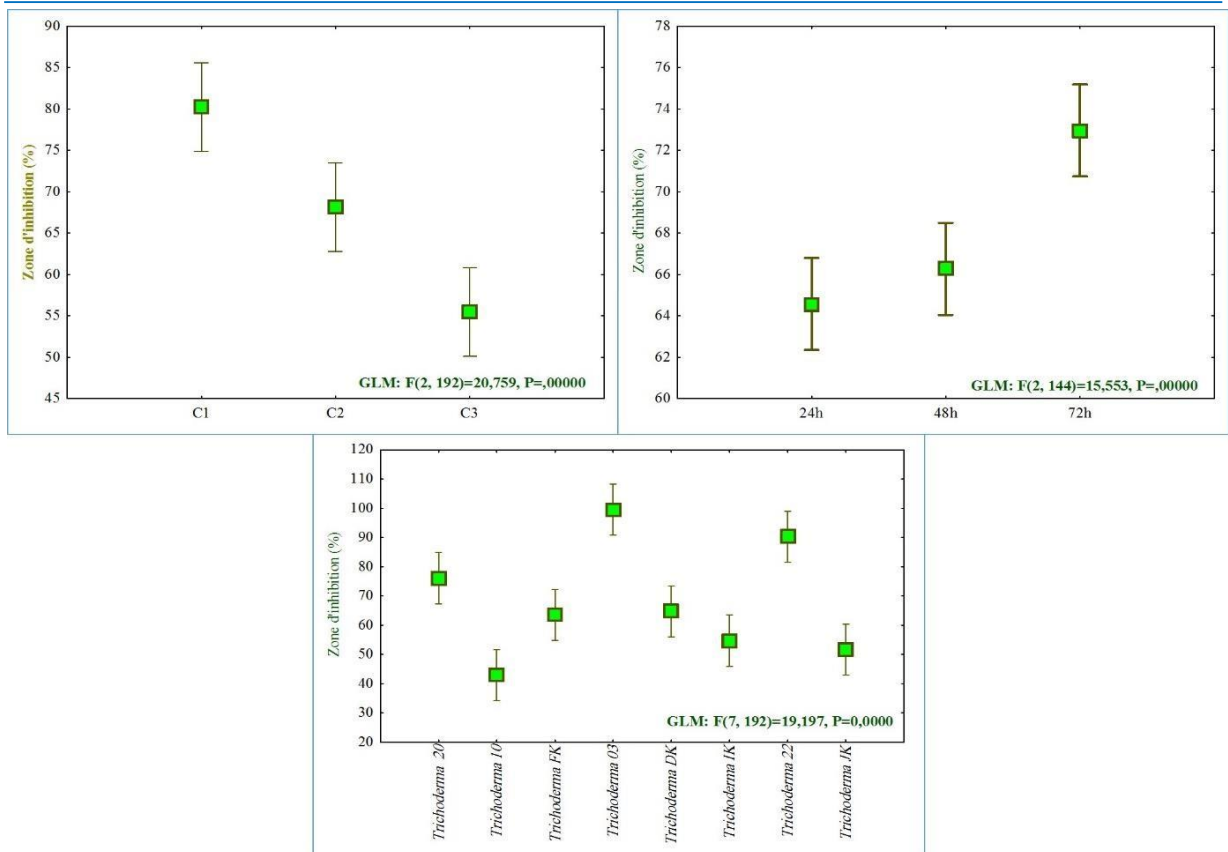


Figure 10. Etude statistique comparative effectuée par GLM de l'espèce fongique, le temps et la concentration de filtrats de culture de *Trichoderma* sur la zone d'inhibition sur le Foc.

120

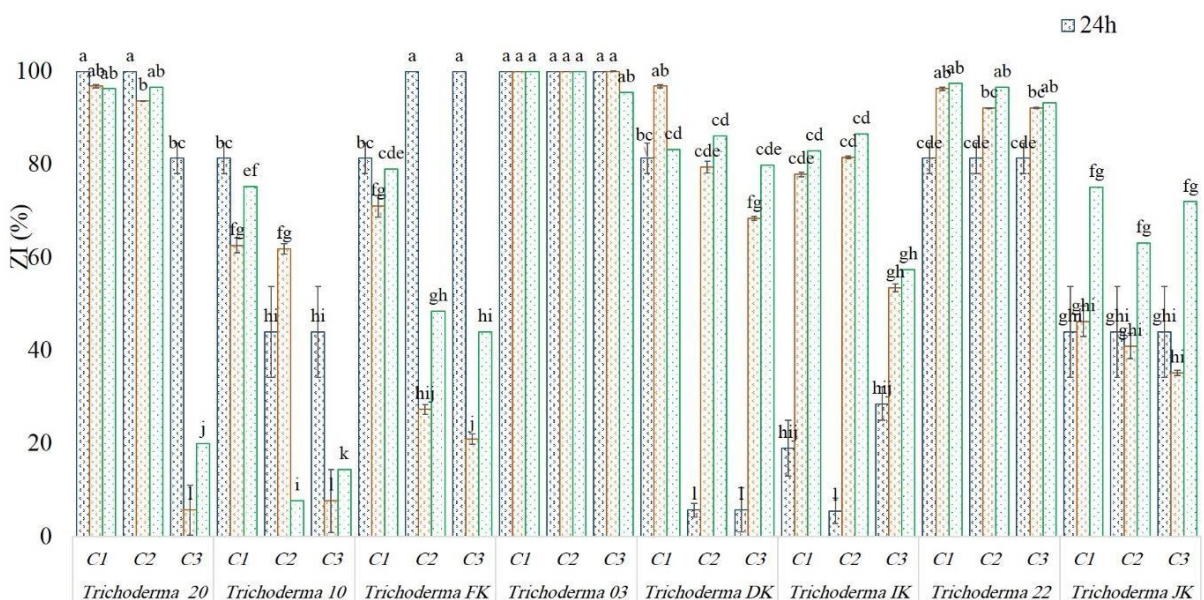


Figure 11. Effet inhibiteur des filtrats de culture de *Trichoderma* spp sur le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

1.2. Effet des espèces de *Trichoderma* *sp* *in vivo*

Le traitement du sol par les différentes souches de *Trichoderma sp* a exposé effectivement une efficacité très intéressante contre le Foc dans les conditions *in vivo*. Les analyses ANOVA effectués par GLM et moyennes comparées par test de Dunken montrent que, l'espèce de *Trichoderma sp* a un effet très hautement significatif ($F = 13.57$; $P = 0.00013$) sur la variation de la valeur de l'AUDPC.



Figure 12. Sévérité de la maladie de flétrissement vasculaire du pois chiche sur les plantules traitées par les différentes espèces de *Trichoderma spp.*

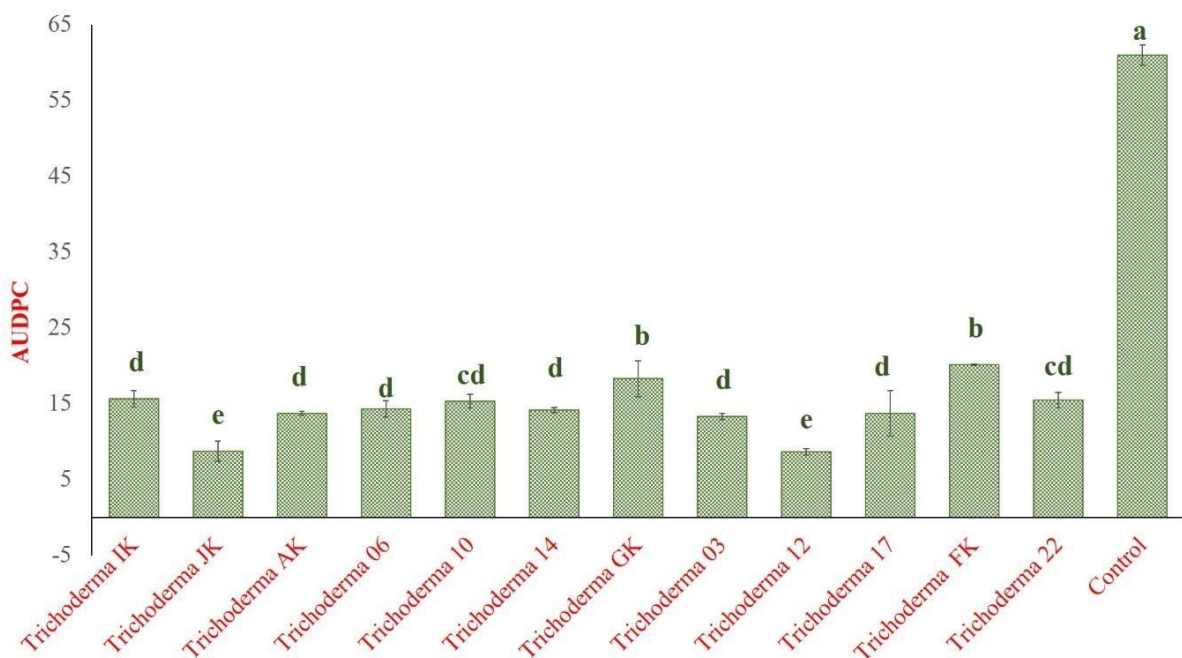


Figure 13. Effet des espèces de *Trichoderma* sur la sévérité de flétrissement vasculaire causé par le Foc dans les conditions *in vivo*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

La lecture des données affichées sur la figure montre une diminution de la valeur de l'AUDPC dans tous les traitements comparativement au témoin non traité. Les valeurs de l'AUDPC notées chez les plantules traitées sont variables 12 entre et 25 expliquent une réduction de la maladie variable entre 57.62% et 79.66 %. Dans ce cadre, *Trichoderma* 12 et la plus efficace et *Trichoderma* JK est la faiblement efficace.

1.2. Effet de l'association *in vitro*

1.2.1. Effet de l'association en contact direct

L'analyse de la variance ANOVA effectuée par GLM a montré un effet très hautement significatif de temps ($F= 10.75$; $P=0.001$) et non significatif du traitement ($F= 1.57$; $P=1.91$) associé sur la croissance mycélienne du Foc. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux de l'inhibition de la croissance mycélienne du Foc. Par ailleurs, l'efficacité est temps dépendante elle augmente avec l'évolution du temps d'augmentation.

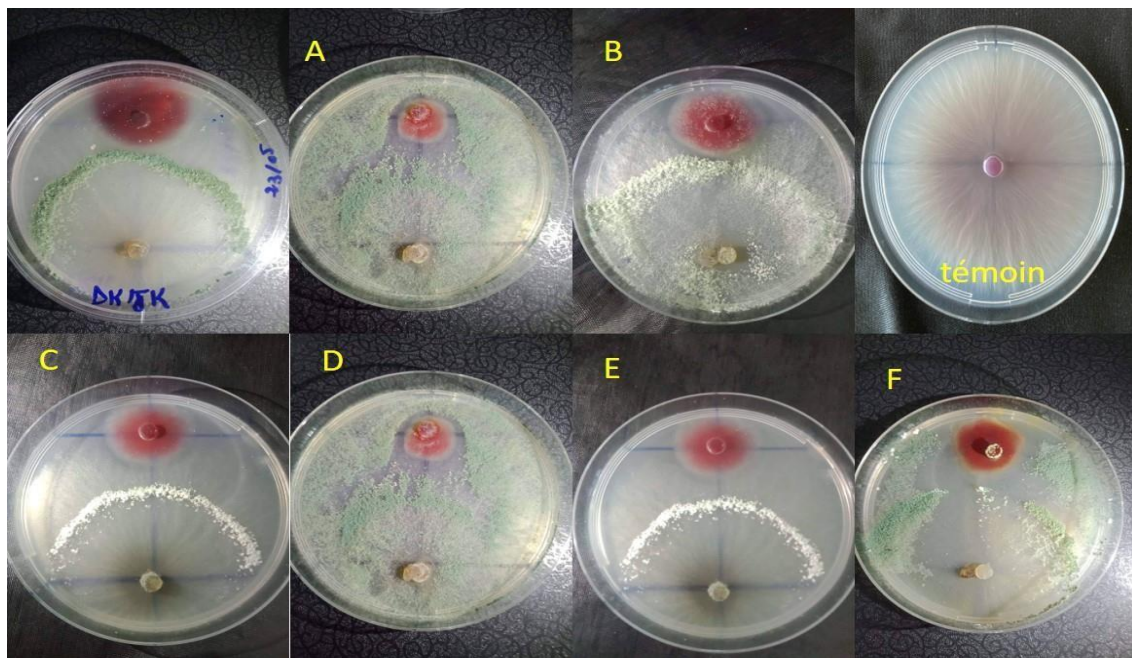


Figure 14. Effet de l'association des *Trichoderma* sur la croissance mycélienne du Foc.

Dans ce cadre, l'association *Trichoderma* Jk / 22 à montrer la plus efficace avec des taux d'inhibition environ 81.35, 81.71 et 81.84% après 24, 48h et 72h du traitement. Alors que l'association *Trichoderma* IK/03 est le moins efficace avec des taux d'inhibition de 71.43, 75.94 et 79,62%.

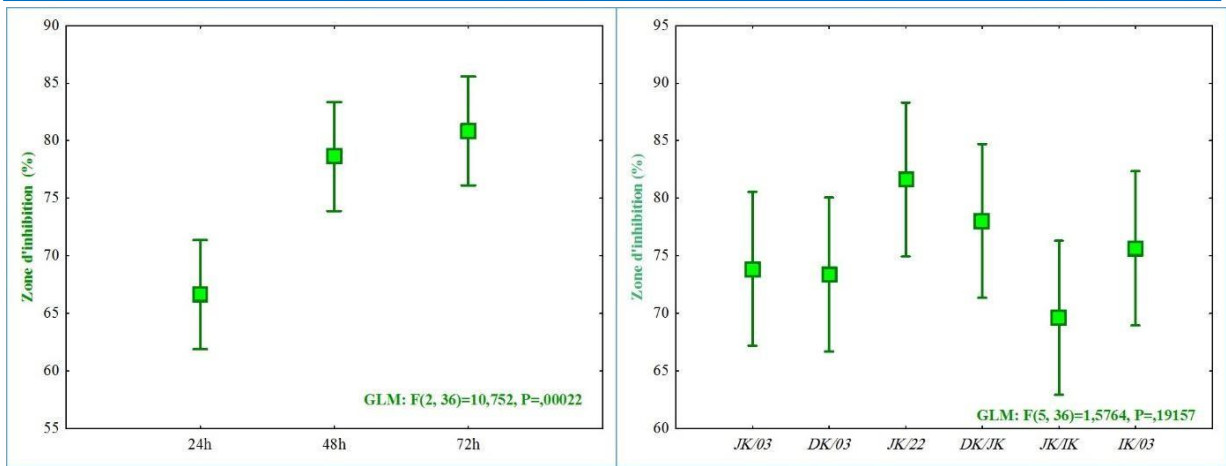


Figure 15. Etude statistique comparative effectuée par GLM de l'association fongique et le temps sur la zone d'inhibition sur le Foc.

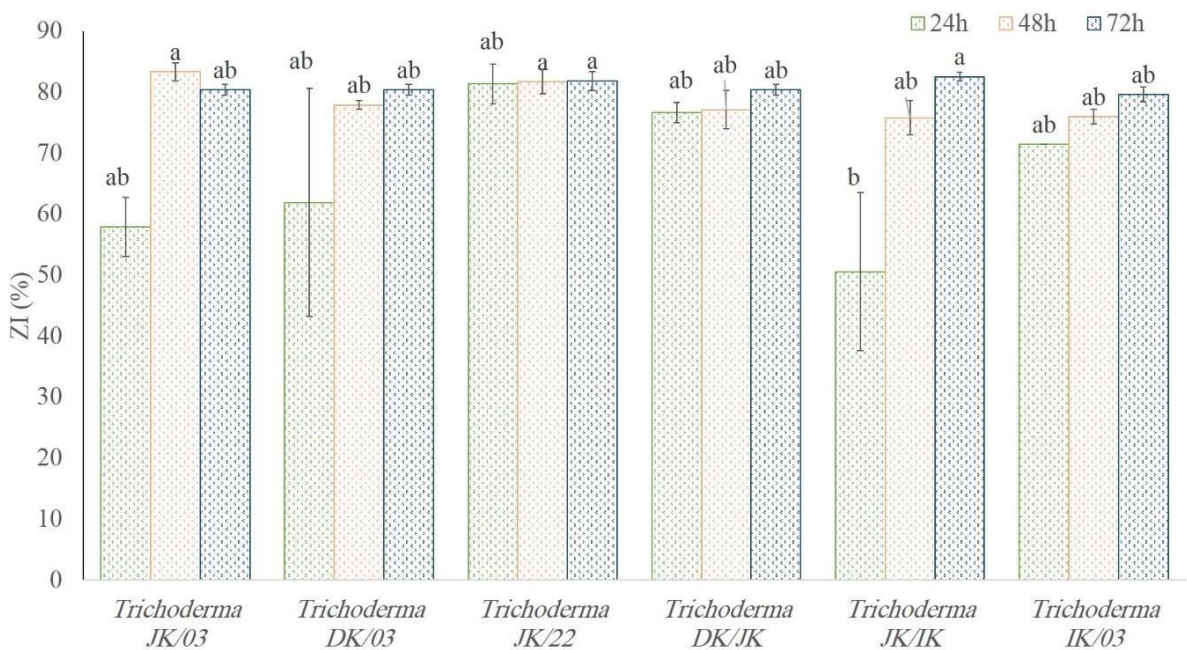


Figure 16. Effet de l'association des *Trichoderma* spp sur la zone d'inhibition de Foc... Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

1.2.1. Effet de l'association entre les filtrats de culture.

L'ANOVA a montré le traitement ($F=112.29, P=0.0000$), le temps ($F=50.8, P=0.000$) et la concentration ($F=98.68, P=0.0000$) ont un effet hautement significatif sur la zone d'inhibition. Les cinq traitements associés des filtrats de culture des différentes espèces de *Trichoderma* spp exposent également l'augmentation de l'efficacité en comparaison avec les traitements individuels.

Dans ce cadre, l'association *Trichoderma* Jk / DK et *Trichoderma* IK/JK sont les plus efficace avec des taux d'inhibition totale après 24, pour toutes les concentrations. Alors que l'association *Trichoderma* IK/03 est le moins efficace avec des taux d'inhibition de 71.43, 75.94 et 79,62%.

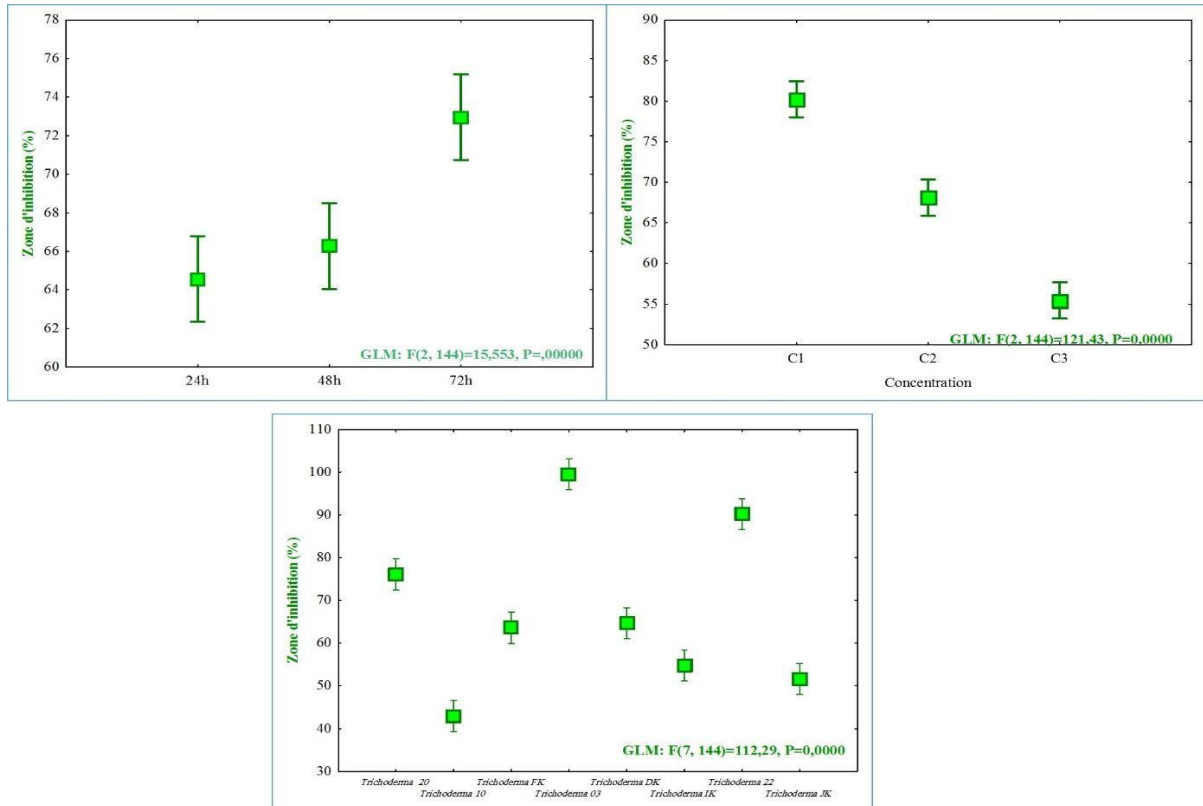


Figure 17. Etude statistique comparative effectuée par GLM de traitement fongique, le temps et la concentration de filtrats de culture de *Trichoderma* sur la zone d'inhibition sur le Foc.

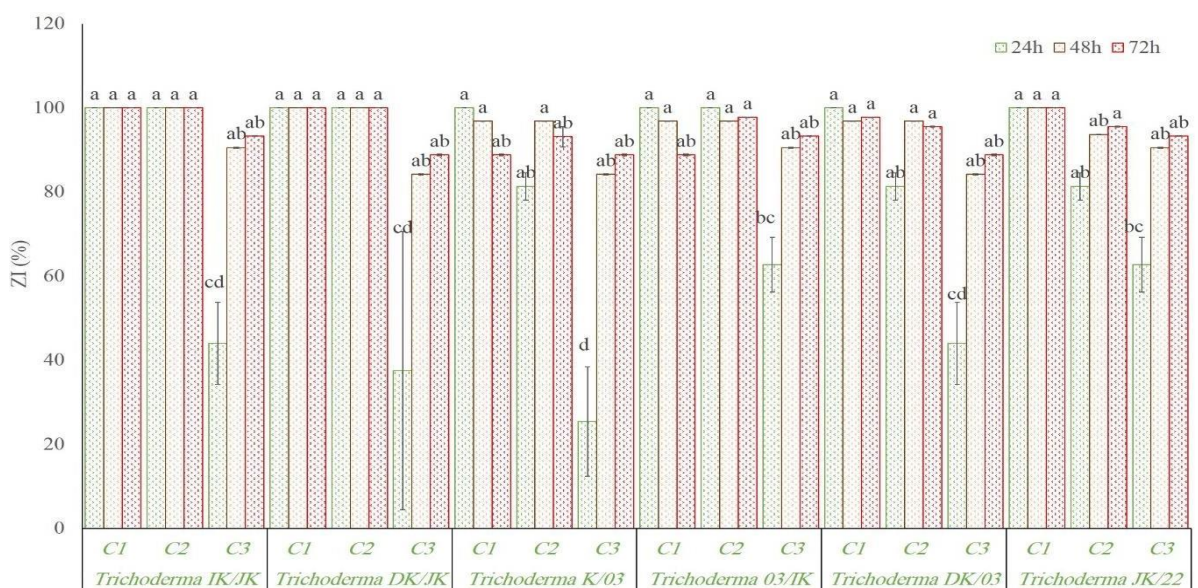


Figure 18. Effet de l'association de filtrats de culture de *Trichoderma* sur la zone d'inhibition du Foc.

1.3. Effet de l'association *in vivo*

L'étude de l'effet de l'association *in vivo* des *Trichoderma spp* dévoile une augmentation de l'efficacité dans la diminution de la gravité de la maladie en comparaison avec les traitements individuels.

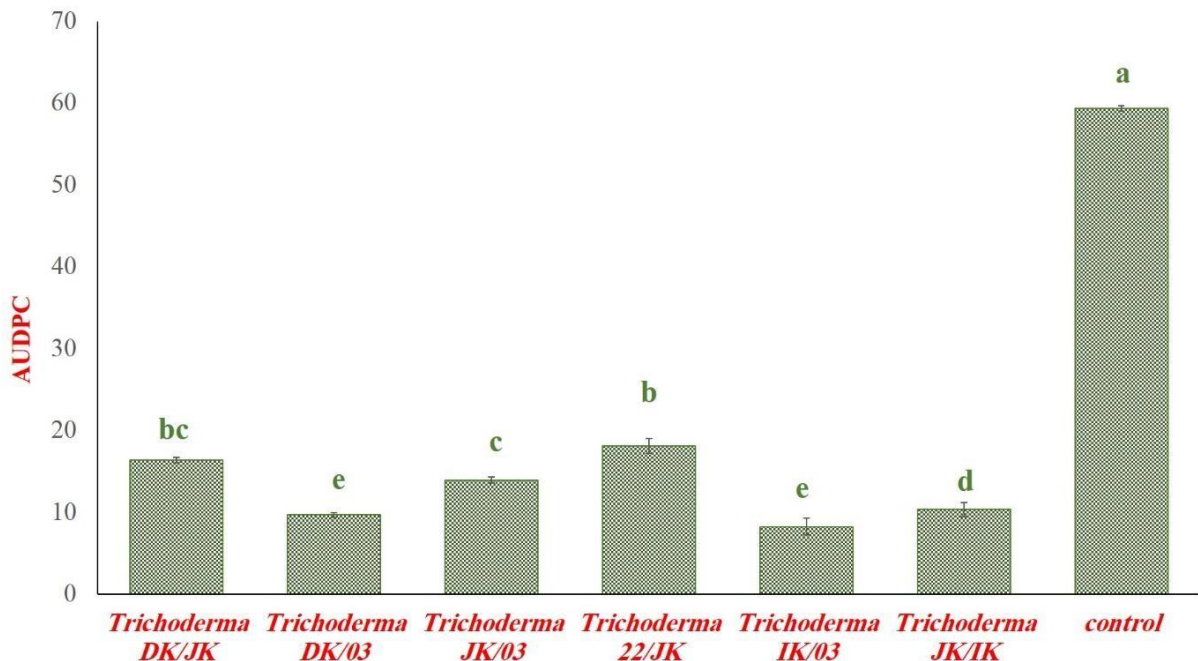


Figure 19. Effet de l'association des espèces de *Trichoderma spp* sur la sévérité de flétrissement vasculaire causé par le Foc dans les conditions *in vivo*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions $\pm$ l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.



Figure 20. Sévérité de la maladie de flétrissement vasculaire du pois chiche sur les plantules traitées par les associations des espèces de *Trichoderma spp*.

Les symptômes de la maladie ont été observés pendant la quatrième semaine après le semis pour tous les traitements. En outre, les symptômes ont été observés 33 jours après le semis dans le traitement et 31 jours après le semis dans le traitement.

L'analyse ANOVA montre un effet hautement significatif du traitement sur la valeur de l'AUDPC ($F=4330$; $P=0,00^*$). Dans ce cadre, les valeurs de l'AUDPC sont variables entre 5 et 12 exprimant une diminution de sévérité de la maladie variable entre 79.66 et 91.52%.

Tous les traitements associés ont élucidé une action synergétique positif contre le Foc *in vivo*.

2. Discussion

A l'heure actuelle, le contrôle des agents phytopathogènes est principalement effectué par les procédures chimiques, mais en raison de sa grande variabilité génétique et leur adaptabilité, des résistances acquises ont été observées avec tous les fongicides utilisés contre plusieurs pathogènes (Shao *et al.* 2021). Cela a encouragé la communauté scientifique pour aller vers des méthodes contrôle alternatif, telles que la lutte biologique, avec l'utilisation de agents antagonistes et en amont les *Trichoderma spp* (Nicot *et al.* 2011). C'est dans cette optique rentre nos objectifs de cette étude.

Le présent travail, analyse des expériences sur le contrôle biologique via quelques souches de *Trichoderma* individuellement et en association contre le Foc, agent pathogène potentilles de la culture du pois chiche. Ces travaux ont été exécutés en deux fraction ; l'analyse de l'effet individuel et associée *in vitro* suivie par des analyses *in vitro*.

Nos résultats sur l'activité antifongique des isolats du *Trichoderma spp in vitro* ont révélé une activité inhibitrice très prononcée de la croissance mycélienne du Foc avec des fréquences d'inhibition qui varient entre 10 et 80% en fonction l'espèce du *Trichoderma spp*. Ces résultats indiquent une compétitivité potentielle des espèces des *Trichoderma spp*. Ces activités sont attribuées aux effets de l'hyperparasitisme. L'observation de l'interaction des hyphes indiqués que les hyphes antagonistes de *Trichoderma* enroulent autour des hyphes de pathogènes Foc et inhibent sa croissance mycélienne.

L'utilisation d'un contrôle biologique pour concourir pour une nutrition limitée est un moyen important de prévenir les maladies des plantes (Livak et Schmittgen, 2001 ; Halifu *et al.*, 2021, Mukherjee *et al.*, 2022). Les espèces de *Trichoderma spp* inhibent la croissance et la reproduction des phyto pathogènes principalement par compétition, hyperparasitisme et antibiose. La compétition est le processus qui se produit lorsqu'un organisme confronte une déficience de nutriments et d'espace vital. La « faim » causée par une insuffisance nutritionnelle est la cause la plus fréquente le phénomène biocide microbien. Ceci est en concordance avec nos résultats sur l'activité antagonistes des *Trichoderma spp* par confrontation direct,

observant

une croissance rapide de l'agent biologique limitant par conséquent le développement de pathogène. La réduction des concentrations de nutriments conduit généralement à une diminution de la germination des conidies et à une croissance plus lente des germes de pathogènes (Nassr et Barakat 2013). Nos résultats dévoilent l'augmentation de la zone d'inhibition avec l'augmentation du temps.

Avec l'augmentation du temps antagoniste, le mycélium de Foc s'amincit progressivement et cesse de croître. Les résultats de l'observation microscopique expose le mycélium de *Trichoderma spp* enroule en forme spirale et entrave le mycélium de Foc pendant la phase de croissance. D'autres études antérieures témoignant nos résultats montrent un enroulement des hyphes et la déformation morphologique dans les cultures doubles de *T. harzianum* avec *F. solani*, *Alternaria solani* et *Pythium ultimum* (Benamira et al., 2017 ; Mazrou et al., 2020 ; Díaz-Gutiérrez et al., 2021).

Au cours du processus hyperparasitaire, *Trichoderma spp* sécrète des enzymes dégradant la paroi cellulaire (CWDE), notamment des chitinases, des cellulases, des xylanases, des glucanases et des protéinases (Francesca et al., 2016, Mukherjee et al., 2022). Les CWDE et les métabolites secondaires dégradent de manière synergique la paroi cellulaire du pathogène (Xiong et al., 2016). Nous avons trouvé plusieurs gènes à réguler positivement, dont sept gènes liés à la reconnaissance et à la transduction du signal, six gènes de chitinase, six de glucanase et un gène de protéase.

Les interactions de *Trichoderma spp* avec plusieurs espèces phytopathogènes entraînent aussi la mort ou l'inactivation des hyphes de l'agent pathogène qui seront envahis plus facilement par les hyphes de l'antagoniste (Askary et al., 1997 ; Bahous et al., 2008). Selon De Oliveira et al. (1984), la vacuolisation cytoplasmique des hyphes peut précéder la pénétration de l'antagoniste par la mise en jeu d'enzyme lytique. Il a également été rapporté que *T. atroviride*, *T. virens*, *T. viridicessens* et *T. viride* ont montré le phénomène de mycoparasitisme représenté par l'enroulement et par la lyse sur les hyphes de Foc et autres phytopathogènes (Dennis et Webster, 1971 ; Dubey et al., 2007).

Nos résultats dévoilent aussi une lyse partielle et même parfois complète des mycéliums du Foc après 6 jours de confrontation direct. Ce constat peut être expliqué par les sécrétions enzymatiques issues des souches de *Trichoderma* qui possèdent des activités lytiques importantes, lysent les parois pectocellulosiques du Foc. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par plusieurs chercheurs. Toutefois, (Benitez et al., 2004 ; Harman et al., 2004 ; Vos et al., 2015 et Gutiérrez et al., 2021) rapportent que les *Trichoderma spp*. Peuvent localiser des proies potentielles à travers la sécrétion constitutive d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (CWDE). Dans ce cadre, le Mycoparasitisme des *Trichoderma spp* implique

la sécrétion

d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (CWDE) comme les chitinases, les protéases et les glucanases (**Harman, 2006 ; Sanchez et al., 2019**). Cette activité bénéfique de *Trichoderma spp.* Varient selon la souche, le type d'agent pathogène, l'état de la plante et l'environnement (Brimmer et Boland, 2003 ; Cordier et Alabouvette, 2009 ; Mohiddin et al., 2010, Mukherjee et al. (2022).

Nos résultats corroborent ceux obtenus par **Dubey et al. (2007)** qui ont signalé que *T. viride*, *T. harzianum* et *T. virens* inhibent la croissance mycélienne du Foc avec environ 50 et 60% dans la culture double. De plus, **Debbi et al. (2018)** ont rapporté que quatre isolats de *Trichoderma spp* collectés dans l'Ouest de l'Algérie représentent une activité inhibitrice de la croissance mycélienne par confrontation directe contre deux isolats de *Fo f. sp. Lycopersici* (FOL), et *Fo f. sp. radialis lycopersici* (FORL) indiquant un pourcentage d'inhibition allant de 62,8 à 70,6 %. Des tests de biocontrôle *in vitro* effectuée par **Hammad et al. (2021)** ont révélé que quatre isolats indigènes de *Trichoderma spp.* Avaient une forte activité antagoniste contre

B. cinerea, la croissance mycélienne a été réduite de 62 à 65 % par la technique de double culture, de 62,31 à 64,49% dans le test des composés volatils, et une forte inhibition de la croissance des germes a été enregistré par l'isolat TBS1 avec 90,68 % dans le test des filtrats de culture. Les travaux effectués par **Reghmit et al. (2021)** portés sur l'activité antagoniste de quatre Algérienne souche de *Trichoderma spp* contre *V. dahliae* ont montré une activité inhibitrice de la croissance mycélienne par confrontation directe avec une moyenne de 68,86%.

En outre, **Zhang et al. (2016)** ont observé que les hyphes de *T. harzianum* se développent en parallèle et sont étroitement liés aux hyphes pathogènes et créent des branches de contact accrochées, représentant le mycoparasitisme. Ces auteurs ont rapporté que *T. harzianum* inhibe la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* avec une efficacité de 56.3% dans les tests en double culture. Néanmoins, *T. harzianum*, *T. viride* et *T. reesei* ont inhibé plus de 85.5% de la croissance mycélienne de *Phytophthora capsici* en double culture (**Nawaz et al., 2018**).

Dans cette étude, *Trichoderma viride* et *Tichoderma harzianum* ont été rapporté par plusieurs chercheurs comme les meilleurs antagonistes pour l'inhibition de la croissance de plusieurs agents pathogènes du sol et grains (**Dubey, 2003**). Selon **Dubey et al. (2007) ; Elad et al. (1980) ; Kumar et al. (2001)** l'observation de l'interaction des hyphes indiqués que les hyphes antagonistes de *T. viride* enroulés autour des hyphes de pathogènes (Foc) et inhibent sa croissance mycélienne. Des modifications profondes au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *T. harzianum* et *T. viride*. Selon **Markuz et al. (2012)** les espèces de *Trichoderma*

spp impliquent dans le mécanisme d'inhibition, l'enroulement des hyphes autour de l'agent

pathogène, la pénétration, la production de l'haustoria et la lyse des hyphes de l'agent pathogène (FOC).

De plus, d'autres modes d'action représentés par la production de composés volatils ont été associés avec l'efficacité de *Trichoderma* pour lutter contre les agents pathogènes des plantes (Dennis et Webster, 1971, Dubey *et al.*, 2007; Toghueo *et al.*, 2016). Les résultats de la présente étude ont révélé que les composants volatils de cinq espèces de *Trichoderma spp* pourraient inhiber d'une manière significative la croissance mycélienne de Foc, dont la gamme d'inhibition était comprise entre 27.86 et 54.79%.

Cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma* (phénomène d'antibiose) (Meslouhi, 1989, Davet 1983a et 1983b). D'après Dennis et Websters (1971), les *Trichoderma spp* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes. La capacité à produire de telles substances varie selon l'isolat d'une même espèce ou d'espèce différente. Une puissante odeur d'arôme a été trouvée dans ces deux isolats potentiellement efficace, ce qui peut suggérer que les inhibiteurs volatils de *T. gamsii* (TGS7) et *T. atroviride* (TAtC11) contre *B. cinerea* peut être due à la pyrone 6-pentyl-2H-pyran-2-one « arôme de noix de coco » généralement produit par *Trichoderma spp*. (Vinale *et al.*, 2008). L'activité antifongique de pyrone 6-pentyl-2H-pyran-2-one a été montrée *in vitro* et *in vivo* contre *B. cinerea* par Pezet *et al.* (1999).

En effet, l'antibiose est un mécanisme d'antagonisme induit par des métabolites secondaires spécifiques ou non spécifiques d'origine microbienne, par des substances volatiles et d'autres composés toxiques (Dennis et Websters, 1971a, Toghueo *et al.*, 2016). Les taux de réduction les plus importants sont notés avec les trois isolats de *T. viride*, *T. harzianum* et *T. atroviride* après une confrontation indirecte avec le Foc, dont la zone d'inhibition varie entre 54 et 78% (Bouregghda, 2009).

Les travaux de Moutassem *et al.* (2020) ont révélé que les composants volatils de cinq espèces de *Trichoderma spp* pourraient inhiber d'une manière significative la croissance mycélienne de Foc, dont la gamme d'inhibition était comprise entre 27.86 et 54.79%. L'effet antagoniste du composé volatil a révélé l'efficacité des différentes espèces testées avec effectivement des degrés variables selon l'espèce testée. Dans ce cadre, *T. gamsii* (TGS7) et *T. atroviride* (TAtC11) ont montré un effet important par rapport aux autres étudiés (Hammad *et al.*, 2021). En effet, *T. harzianum* est également connu par sa production de certains composés volatiles et non volatiles (Markuz *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 1997, Moutassem *et al.*, 2020). D'une manière générale, les composés volatils produits par *Trichoderma spp* ont prouvé

l'inhibition de la croissance mycélienne contre *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* et *Rhizoctonia solani* (Dubey et Patel, 2001).

L'activité antifongique la plus élevée des filtrats de culture de *Trichoderma spp* sur le Foc a été observées. Ces activités inhibitrices très remarquables sont expliquées par la capacité de cette espèce à produire de grandes quantités de métabolites secondaires tels que le trichothécène, trichodermine et harzianum (Klaiklay et al. 2019). Plusieurs auteurs ont rapporté l'activité inhibitrice de ces métabolites contre les champignons phytopathogènes (Shentu et coll. 2014). Ces métabolites inhibent la croissance mycélienne et même la germination et la sporulation du Foc.

Toutefois, la fonction de nombreux métabolites secondaires doit encore être identifié et la tâche est une seule espèce de *Trichoderma spp* est susceptible de produire des métabolites secondaires très diversifiées et spécifiques. L'importance écologique de la plupart des métabolites secondaires est également mal comprise et des recherches supplémentaires sont encore nécessaires dans ce domaine afin de mieux comprendre l'écologie de *Trichoderma spp* (Keswani et al., 2014).

Les analyses par GC-MS de quelques souches du *Trichoderma spp* exposent la présence de 33 composés dans la fraction mé thanolique et hexanique des filtrats de culture, y compris des composés volatils avec des activités antifongiques importantes telles que l'Undecane, l'Octadecane, l'Eicosane, le 13-Docosénamide, (Z), Hexadécanamide, 9-Octadécénamide, (Z), Cyclopentanone, 2-méthyl, Tétradécanoïque acide, ester propylique, acide tétradécanoïque, acide oléique, et l'acide n-hexadécanoïque. Dans des recherches précédentes, il a été signalé que les espèces de *Trichoderma spp* sécrètent divers composés volatils et non volatils tels que les alkylpyrones, peptaibols, polycétides, stéroïdes, isonitriles, sesquiterpènes, dicétopipérazines (Zeilinger et al., 2017; Meena et al., 2017). Ces substances impliquent une très grande variété d'action car elles inhibent la croissance des bactéries et les champignons phytopathogènes. Par ailleurs, leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique.

L'espèce *T. polysporum* produit des familles communes de métabolites secondaires tels que les peptaibols, les trichopolyns, les alaméthicines, les hypelcins, les trichosporines, les trichocellius, les trichokindines et les aibellines. chalneis ionique, hypolysés, découplage de la phosphorylation oxydative (New et al., 1996; Akira et al., 1999). Autrement, Vinale et al. (1999, 2013) ont rapporté que l'acide harzianique est un métabolite secondaire de *T. harzianum*, présentant des activités antifongiques. Keszler et al. (2000) ont identifié des antibiotiques pyroniques aromatiques produits par *T. atroviridae* comme une biomolécule responsable de l'effet inhibiteur.

Un mélange de composés secondaires testé montre un effet antifongique et un antagoniste potentiel contre les isolats de *V. dahliae* par rapport au témoin non traité, la plus grande inhibition était observée avec l'utilisation des filtrats de culture présentait le niveau d'inhibition le plus élevé à la concentration 20% (**Reghmit et al., 2021**).

Nos résultats ont montré que les différentes espèces de *Trichoderma spp* présentent une activité antifongique très remarquable en réduisent la gravité de la maladie dans les conditions contrôlées. Les résultats obtenus indiquent la diminution de la sévérité de la maladie avec des pourcentages qui s'étalent entre 28.27 et 64.27 %. L'efficacité de *Trichoderma spp in vivo* pourrait être attribuée à la réduction de la population du Foc du sol d'une part et à l'induction de la résistance systémique chez la plante hôte d'autre part. Nos résultats sont identiques aux résultats antérieurs rapportent que le *T. harzianum* et *T. viride* diminuent la sévérité de la fusariose vasculaire de pois chiche augmentent le taux de polyphénols chez les plantules traitées (**Moutassem et al., 2020**).

L'induction de la résistance chez les plantes par *Trichoderma spp* a été étudiée et comparée avec les réponses induites par les *Rhizobactéries*. *Trichoderma* est résistante aux cyanures et produit deux différentes enzymes qui sont capables de dégrader les cyanures dans la zone racinaire (**Ezzi et al., 2002**). Par la suite, ce champignon peut augmenter la croissance racinaire, détruit les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines. Des observations microscopiques sur des cultures de différents champignons ont montré que *Trichoderma* croît parallèlement avec *Rizoctonia Solani*.

Toutefois, *Trichoderma* s'enroule autour du *Rizoctonia solani* et forme des crochets empêchant ainsi le développement de celle-ci (**Shalini et al., 2007**).

Les résultats obtenus par **Bouragda et al, (2009)** ont montré que les isolats de *T. viride* et *T. harzianum* ont un effet effectif sur la diminution de la gravité de la maladie et la réduction de la gravité (sévérité) de la maladie obtenue a été associée à une augmentation de la croissance végétale incluant la hauteur de tige aussi bien que le poids frais et sec de la plante.

L'efficacité de *Trichoderma harzianum* et *T. viride* contre *R. solani* a été prouvée par **Rehmen et al, (2012)**. Les tests in vitro montrent la réduction de croissance mycélienne avec des fréquences de 85.5% pour *Trichoderma harzianum* et 83.0 % pour *T. viride*. Cependant, les tests effectués in vivo ont montré que le traitement par *T. viride* est plus efficace que le traitement par *Trichoderma harzianum*, dont l'incidence de la maladie constatée est de 7.4 et 11.53% respectivement.

L'activité fongistatique de *Trichoderma* a été investiguée par **Ragab et al, (2012)**. Les résultats obtenus montrent que de l'incidence observée est de 63% pour *T. viride* et 53.5% pour

T. harzianum. De même **Ramezani, (2009)** a démontré la réduction de l'incidence de la maladie in vitro par *Trichoderma harzianum* 5 % et *Trichoderma viride* 14%

Cet effet bénéfique est obtenu même en absence de tout agent pathogène. En effet, **Windham et al, (1986)** ont montré que l'addition de *T. harzianum* et de *T. koningii* à un sol préalablement autoclavé a augmenté le pourcentage de germination des semences de tomate et du tabac en le comparant au témoin et que l'application de ces deux espèces de *Trichoderma sp* au substrat de culture a amélioré le poids sec des racines ainsi que de la partie aérienne de ces deux espèces qui représentait 213 % à 291 % de celui du témoin non traité.

Toutes les études antérieures portées sur les *Trichoderma sp* ont montré leur efficacité in vivo vis à vis une multitude des microorganismes phytopathogène et en particulier le Foc (**Moutassem et al., 2020**). Des études récentes sur le rôle de *Trichoderma* dans la biologie contrôle ont principalement utilisé des souches telles que *T. harzianum* (**Ferrigo et al., 2020 ; Mei et al. 2019, Moutassem et al., 2020, Mironenka et al., 2021**), *T. asperellum* 525, and *T. pseudokoningii* (**Mei et al. 2019 ; Cheng et al. 2010 ; Bi 2016 ; Díaz-Gutiérrez et al.,**), *T. longibrachiatum* (**Bi 2016; Zhang et coll. 2016**), *T. reesei* (**Luo et al., 2016**) et *T. atroviride* (**Han et al. 2013**).

En plus de son pouvoir de lutte biologique, *T. viride* est connu comme agent d'amélioration de croissance chez la plupart des plantes, les résultats de **Verma et al, (2007)** qui ont travaillé sur la tomate et de **Gravel et al. (Avis et al., 2008)** ont prouvé que *Trichoderma sp* est un améliorateur de croissance chez certains types de végétaux. D'après **Yedida et al,(2001)**, Généralement, *Trichoderma spp* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur, *Trichoderma sp* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systématique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma spp* peut prendre lieu soit au niveau de la plante (**Yedida et al., 2001**), soit au niveau du sol (**Chang et al. 1986; Harman, 2001**).

Les microorganismes associés avec la racine de la plante sont extrêmement diversifiées. Le complexe de la communauté microbienne associée aux espèces végétales est indiqué comme un deuxième génome de la plante qui est considéré comme hautement important pour la santé et le développement de la plante. Des études récentes sur l'interaction plante-microbe ont révélé que les plantes fabriquent leur microbiome rhizosphérique en sécrétant des exsudats racinaires (**Berendsen et al., 2012**).

L'inconvénient majeur est qu'un mode d'action individuel ne peut agir que sur un spectre très étroit de pathogènes. Jusqu'à maintenant, la majorité des agents de contrôle biologique ont ciblé une maladie. Il est possible que les mélanges d'organismes ayant des modes d'action différents ou les combinaisons de produits naturels et d'agents de contrôle

biologique puissent augmenter le spectre d'action mais les connaissances sur l'interaction de tels mélanges sont aujourd'hui limitées.

Ce travail a tracé comme objectif l'analyse des associations de *Trichoderma spp* sur le Foc dans les conditions *in vitro* et *in vivo*. Les données obtenues dénotent une augmentation de l'efficacité dans soit la zone d'inhibition de la croissance mycélienne ou bien pour la réduction de la gravité de la maladie.

Fait intéressant, même lorsqu'elles sont appliquées contre les phytopathogènes, sont des antagonistes largement utilisés dans la lutte biologique contre phytopathogènes, notamment ceux présents dans le sol. Nos résultats montrent que les associations des *Trichoderma/Trichoderma* que nous avons testés ont montré de forts effets synergiques, étant plus efficace que toutes les espèces de *Trichoderma spp* appliquées individuellement.

Pour la gestion des maladies des plantes, l'application d'un consortium microbien constitué de plusieurs souches efficaces pour une lutte biologique efficace peut être une meilleure technique par rapport à l'application de souches microbiennes individuelles (**Sarma et al. 2015**). De plus, l'application de microbes dans un consortium peut améliorer l'efficacité, la fiabilité et la cohérence du microbes dans diverses conditions de sol et d'environnement (**Stockwell et al. 2011**). La compatibilité microbienne, expliquée par l'absence d'un effet suppresseur ou antagonisme d'une souches contre d'autres souches microbiennes lorsqu'elles sont co-cultivées dans un milieu commun (**Jain et al., 2012 ; Singh et al., 2013a,b**). En consortium peut donc avoir un impact accru sur la promotion de la croissance des plantes ou la suppression des maladies. Utilisation de différentes espèces de microbes en combinaison peuvent en outre avoir l'avantage d'améliorer l'efficacité de la lutte biologique lorsque différents microbes occupent différentes niches dans la zone racinaire et réduisent ainsi la concurrence parmi eux. De plus, la diversité des mécanismes de biocontrôle offert par chaque composant microbien peut également aider à améliorer suppression de la maladie.

Cette activité prononcée de l'association est probablement à l'effet synergique entre les métabolites secondaires des espèces de *Trichoderma spp* misent en association. Ce constat a été confirmé par **Saravanakumar et al. (2016)** prouvé que la combinaison de composé dérivé de *Trichoderma spp* et de CWDE pourrait renforcer l'activité de lutte biologique dans les conditions *in vitro* et *in vivo*.

Cependant, la compatibilité des métabolites secondaires dérivés de *Trichoderma spp* avec des plantes hôtes mérite d'être étudié car certains métabolites secondaires ne sont pas seulement des antibiotiques pour les agents pathogènes mais aussi pour la croissance des plantes régulateurs, bénéfiques pour la croissance des plantes (**Vinale et al., 2013, 2014**).

La gestion de la maladie est une étude plus approfondie et également important dans les conditions de terrain (**Markuz et al, 2012**). Cette initiative a permis d'améliorer et de diversifier la production de bioproduits agricoles en partant de simples produits à des produits combinés comme le cas du mélange *S. meliloti* – *T. viride* qui est plus pratique et efficace selon les travaux de **Dubey et al, (2007)** et **Whipps et al, (2001)**.

La diminution de la croissance des pathogènes en présence de l'espèces d'INAT11 était similaire à celle observée pour d'autres candidats potentiels pour lutte biologique *Fusarium* (**El-Hasan et al., 2018 ; Schöneberg et al., 2015**). Cependant, dans association avec des isolats spécifiques tels que la souche *Trichoderma harzianum* FG4, l'antagoniste la capacité a semblé être réduite ; donc le contrôle complet d'un La population de *F. graminearum* ne peut pas être atteinte.

Duffy et al. (1996) ont montré que *Trichoderma koningii* lorsqu'elle est appliquée en association avec *Pseudomonas fluorescent* ont une activité suppressive des agents pathogènes du blé en comparaison avec l'application individuel de *T. koningii*. De même, **Jetiyanon (2007)** a montré que le mélange des souches de *Bacillus* IN937a et IN937b a augmenté le superoxyde dismutase et les activités peroxydases de 25 à 50% dans la tomate et le poivron contre certains agents pathogènes transmis par le sol et les semences. **Srivastava et al. (2010)** ont également montré que l'application combinée de *Trichoderma*, *Pseudomonas fluorescent* et *Glomus* ont supprimé l'incidence de la fusariose chez la tomate dans les conditions de terrain de plus de 50 % en comparaison avec une application individuelle de *Glomus*.

Plus tard microbes capables d'induire une résistance systémique (**Bakker et al., 2007**) ainsi que l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation des nutriments ont également été inclus dans les mélanges microbiens (**Sahni et al., 2008 ; Harman, 2011**).

Les résultats obtenus par **El-Sharkawy et al. (2018)** ont également montré une efficacité plus élevée d'une association de *T. viride* et *T. harzianum* dans la lutte contre *Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. tritici. Cette augmentation de niveau de protection a été attribuée aux augmentations des taux des peroxidase, des polyphénols oxydase et des phénols totaux.

CONCLUSION

L'objectif de notre travail est de tester l'effet antagoniste *in vitro* ainsi qu'*in vivo* de quelques souches de *Trichoderma spp* contre le Foc en traitement individuels et associés.

Les résultats de test direct ont montré un effet inhibiteur variable entre 71.82 et 88.30%, où l'espèce pour *Trichoderma BK* et *Trichoderma EK* sont les plus efficaces contre le Foc. Les examens microscopiques ont révélé des changements profonds au niveau de mycélium de Foc, indiquées par une vacuolisation et une induction du vieillissement précoce par épaissement pariétal et une lyse des mycéliums de pathogène.

Les tests antagonistes à distance nous ont permis de dévoiler une grande potentialité inhibitrice de substances volatiles, dont les taux d'inhibition varient entre 55.3 et 76.3% qui sont constatée faible chez l'espèce pour *Trichoderma BK* et *Trichoderma HK* et supérieure chez l'espèce *Trichoderma CK*.

La lecture des données de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma sp* sur la croissance du Foc expose une efficacité totale de l'espèce *Trichoderma 03* pour toutes les concentrations même après 24 h seulement de traitement. Alors que la souche *Trichoderma 10* a exposé un taux de la zone d'inhibition avec environ 75,31, 7,79 et 14,42% pour les concentrations C1, C2 et C3 après 72h de traitement, respectivement.

Les traitements associés par test direct et filtrat de culture ont dénué une augmentation de l'efficacité *in vitro*. Bien que en test direct, l'association *Trichoderma Jk / 22* à montrer la plus efficace avec des taux d'inhibition environ 81.35, 81.71 et 81.84% après 24, 48h et 7h du traitement. Alors que les traitements associés des filtrats de culture des différentes espèces de *Trichoderma spp* exposent que l'association *Trichoderma Jk / DK* et *Trichoderma IK/JK* sont les plus efficace avec des taux d'inhibition totale après 24, pour toutes les concentrations.

Les souches de *Trichoderma* ont été avérés très efficaces *in vivo* avec des valeurs de l'AUDPC variables entre 12 et 25 expliquent une réduction de la maladie variable entre 57.62% et 79.66 %. Cependant, les traitements associés ont montré une réduction très importante de la sévérité de flétrissement vasculaire, dont les valeurs de l'AUDPC sont variables entre 5 et 12 expriment une diminution de sévérité de la maladie variable entre 79.66 et 91.52%.

L'inconvénient majeur est qu'un mode d'action individuel ne peut agir que sur un spectre très étroit de pathogènes. Jusqu'à maintenant, la majorité des agents de contrôle biologique ont ciblé une maladie. Il est claire dans cette que les mélanges de *Trichoderma spp* ayant des modes d'action différents ou les combinaisons de produits naturels et d'agents de contrôle biologique puissent augmenter le spectre d'action mais les connaissances sur l'interaction de tels mélanges sont aujourd'hui limitées.

REFEFRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abdelrahman, M., Abdel-Motaal, F., El-Sayed, M., Jogaiah, S., Shigyo, M., Ito, S., Tran, L.S.P. (2016). Dissection of *Trichoderma longibrachiatum* -induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. *Plant Science*, 246: 128–138.
2. Akira, I., Tomohiro, M., Tetsuro, F., Takalshi, Y. (1999). Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9: 3393-3396.
3. Akrami, M., Hadi, G., Ahmadzadeh, M. (2012). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10: 2653-2658.
4. Alwhibi, M.S., Hashem, A., Abd_Allah, E..F, Alqarawi, A.A., Soliman, D.W.K., Wirth, S., Egamberdieva, D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8): 1751–1757.
5. Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104 (1): 21–29.
6. Askary, H., Benhamou, N., Brodeur, J. (1997). Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, 87:359-368.
7. Ayoubi, N., Zafari, D., Mirabolfathy, M. (2014). Evaluation of β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase enzymes production in some *Trichoderma* species, *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2013.862457.
8. Bae, S.-J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92: 128–138.
9. Bahous, M., Ouazzani Touhami, A., Douira, A. (2008). Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, section Sciences de la Vie, 2008, n°30, 13-18.
10. Blumenthal, C.Z. (2004). Production of peptide metabolites in *Aspergillus niger*, *A. oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. pharmacol.*, 39: 214-228.
11. Bouregghda, H., Bouznad, Z., (2009). Biological control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 44(1):1588-2691.

12. Braun, H., Woitsch, L., Hetzer, B., Geisen, R., Zange, B., Schmidt-Heydt, M. (2018). *Trichoderma harzianum* : Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. International Journal of Food Microbiology, 280: 10–16.
13. Chet, I. (1987). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology 86, p. 405-416.
14. Chet, I., Benhamou, N., Besselat, B. (1979). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol. 63, p. 2095-2099.
15. Chet, I., Baker, R. (1981). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 71: 286-290.
16. Chet, I. (1993). *Biotechnology in Plant Disease Control*. John Wiley and Sons, New York
17. Chet, I., Benhamou, N., Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 153-172. Edited by C. P. Kubicek and G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor and Francis.
18. Chua, L.S., Latiff, N. A., Lee, S.Y., Lee, C.T., Sarmidi, M.R., Aziz, R.A. (2011). Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). Food Chemistry, 127(3): 1186–1192. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.122.
19. Clavet, C., Pera., Bera, J.M. (1990). Interaction of *Trichoderma* sp. With *Glomus mossaeae* and two pathogenic. Agric Ecosyst. Environ, 9: 59-65.
20. Clériveret, A., Alami, I., Breton, F., Garcia, D., Sanier, C. (1996). Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. Acta Botanica Gallica, 143(6): 531–538.
21. Daryaei, A., Jones, E.E, Alizadeh, H., Glare, T.R. Falloon, R.E. (2016). Biochemical characteristics of *Trichoderma atroviride* associated with conidium fitness for biological control, Biocontrol Science and Technology, DOI: 10.1080/09583157.2015.1086312.
22. De Oliveira, V., Bellei, M., Borges A.C. (1984). Control of white rot of garlic by antagonistic fungi under controlled environmental conditions. Can J. of Microbiol, 30: 884-889.
23. Dennis, L., Webster, J. (1971). Antagonisme properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc, 57: 363-369.
24. Dennis, L., Webster., J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. production of non-volatile antibiotics. Trans. Br, mycol, Soc, 57 (I): 25-39.
25. Dervilla, M.X., Dgnnelly, M., Sheridan, M. (1986). Anthraquinones from *Trichoderma polysporum*. Phytochemistry, 25(10): 2303-2304.

26. Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B, Claydon, N. (1989). Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. J Chem Soc Perkin Trans, 1:1885–1887.
27. Donnelly, D.M.X., Sheridan, M.H. (1986). Anthraquinones from *Trichoderma polysporum*. Phytochemistry, 25 (10): 2303–2304.
28. Dubey, M.K, Broberg, A., Sooriyaarachchi, S., Wimal, U., Dan, F.J. (2013). The glyoxylate cycle is involved in pleiotropic phenotypes, antagonism and induction of plant defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. Magnus Karlsson Fungal Genetics and Biology
29. Dubey, S.C., Suresh, M., Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control, 40(1): 118–127.
30. Dubey, S.C., Tripathi, A., Dureja, P., Grover, A. (2011). Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. Indian Journal of Agricultural Sciences, 81 (5): 455–61.
31. El-Debaiky, S.A. (2017). Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*. Microbial Pathogenesis, 113: 135–143.
32. Elmassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J. (1991). New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products, 54: (2), 396-402.
33. El-Sharkawy, H.H.A., Rashad, Y.M. Ibrahim, S.A. (2018). Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. Physiological and Molecular Plant Pathology, 103: 84–91.
34. Gajera, H.P., Savaliya, D.D., Patel, S.V., Golakiya, B.A. (2015). *Trichoderma viride* induces pathogenesis related defense response against rot pathogen infection in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Infection, Genetics and Evolution, 34: 314–325.
35. Gava, C.A.T., Pinto, J. M. (2016). Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. Biological Control, 97: 13–20.
36. Ghisalberti, E., Rowland, C.Y. (1993). Antifungal Metabolites from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products, 56(10): 1799-1804.
37. Harris, D.R. (1998). The spread of Neolithic agriculture from the Levant to western central Asia. In: Damania A. B., Valkoun J., Willocx G and Qualset C. O. (eds). The origine of Agriculture and Crop Domestication. ICARDA, Aleppo, Syria, pp.54-64.

38. Haware, M.P. Jimenez-Diaz, R.M. Amin, K.S. Phillips, J.C., Halila, H. (1990). Integrated management of wilt and root rots of chickpea. In: Chickpea in the Nineties: Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement, 4–8 December 1989, ICRISAT Center, Patancheru, India. ICRISAT, Patancheru, pp. 129-
39. Heguera, G., Beauge, L. (1997). Phosphoryl group exchange between ATP and ADP catalyzed. Plant Physiol. 114, 1397–1403.
40. Hibar, K., Mejda, D.R., Haifa, K., Mohamed, E. (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis lycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 9(5): 163-171.
41. Iida, A., Mihara, T., Fujita, T., Takaishi, Y. (1999). Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 9 (24): 3393–3396.
42. Irum, M. (2007). Comparison of phytochemical and chemical control of *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceris*. Mycopathology, 5(2):107-110.
43. Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. del M., Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A. (2015). *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. Crop Protection, 73: 16–27.
44. Jin, P., Wang, S. Y., Gao, H., Chen, H., Zheng, Y., Wang, C.Y. (2012). Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. Food Chemistry, 132(1): 399–405.
45. Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C. L.L., Chibbar, R.N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition, 108(S1): S11–S26.
46. Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P., Singh, H.B. (2013). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 98 (2): 533–544.
47. Keszler, A., Forgacs, E., Kotai, I., Vizcaino, J.A., Garcia-Acha, I., (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectroscopy. J Chromatograph Sci, 38 :421-424
48. Li, R.X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.R., Li, R., Chen, W. (2015). Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. PLOS ONE, 10 (6): e0130081. doi:10.1371/journal.pone.0130081.
49. Li, Y.T., Hwang, S.G., Huang, Y.M., Huang, C.H. (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. Crop Protection, 110: 275–282.

50. Malofeeva, E.V., Domanitskaya, N., Gudima, M., Hopper-Borge, E.A. (2012). Modulation of the ATPase and transport activities of broad-acting multidrug resistance factor ABCC10 (MRP7). *Cancer Res*, 72: 6457–6467.
51. Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M.K., Upadhyay, R.S. (2017): Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2017.1357360
52. Mohammad, A., Hadi, G., Masoud, A. (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10(14): 2653–2658.
53. Mona, S.A., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Soliman, D.W.K., Wirth, S., Egamberdieva, D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (8): 1751–1757.
54. Mukherjee, M., Horwitz, B.A., Sherkhane, P.D. Hadar, R., Mukherjee, P.K. (2006). A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes under expressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. *Curr Genet*, 50:193–202.
55. Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow C., Berg, G., Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control*. *Indian J Microbiol*, 52 (4):522–529.
56. Nawaz, K., Shahid, A.A., Bengyella, L., Subhani, M.N., Ali, M., Anwar, W., Iftikhara, S., Ali, S.W. (2018). Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 239: 242–252.
57. Nawrocka, J., Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67 (2), 149–156.
58. Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92: 176–181.
59. Reithner, B., Schuhmacher, R., Stoppacher, N., Pucher, M., Brunner, K., Zeilinger, S. (2007). Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1123–1133.

60. Saravanakumar, K., Dou, K., Lu, Z., Wang, X., Li, Y., Chen, J. (2018). Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103: 130–136.
61. Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94: 37–46.
62. Sarrocco, S., Mikkelsen, L., Vergara, M., Jensen, D.F., Beck, M.L., Vannacci, G. (2006). Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *mycological research*, 110 : 179 – 187.
63. Schubert, M., Fink, S., Schwarze, W.M.R. (2008). In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboric J* 31:227–248 Schwab EK, Keller NP (2008) Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol Res*, 112:225–230.
64. Sharma, M., Nagavardhini, A., Thudi, M., Ghosh, R., Pande, S., Varshney, R.K. (2014). Development of DArT markers and assessment of diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, wilt pathogen of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics*, 15(1): 454.
65. Sharma, V., Salwan, R., Sharma, P.N. (2017). The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and Probiotics: Scope for future research. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 84–96.
66. Toghuego, R.M.K., Eke, P., Zabalgoieazcoa, Í., de Aldana, B.R.V., Nana, L.W., Boyom, F.F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96: 8–20.
67. Trapero-Casas, A., Jimenez-Diaz, R.M. (1985). Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology*, 57: 1146-1151.
68. Trivedi, S., Neetu, T., ChaudharyRG. (2013). Efficacy of *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the incitant of Wilt Disease in Chickpea. *J Mycol Plant Pathol*, 43(1).
69. Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1472-765x.2009.02599.x.

70. Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters, n/a–n/a. doi:10.1111/1574-6968.12231.
71. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo S.L. Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology, 72 (1-3): 80–86.
72. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S., Lorito, M., (2012). *Trichoderma* Secondary Metabolites that Affect Plant Metabolism. Natural Product Communications Vol. 7 (11): 2012.
73. You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. Biological Control, 101: 31–38.
74. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. Fungal Biology Reviews, 30 (2): 74–90.
75. Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X., Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolates T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Plant Physiology and Biochemistry, 100: 64-74.
76. Zhu, J., Lee, B., Dellinger, M., Cui, X., Zhang, C., Wu, S., Nothnagel, E.A., Zhu, J. (2011). A cellulose synthase like protein is required for osmotic stress tolerance in Arabidopsis. Plant J, 63: 128–140.
77. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2⁻(DDCt) method. Methods, 25, 402–408.
78. Halifu S, Deng X, Song X, Song R., Liang., 2021. Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. Plants 2020, 9, 912
79. Francesca, B.; Silvia, C.; Franzetti, E.; Congiu, T.; Marinelli, F.; Casartelli, M.; Tettamanti, G. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. Pest Manag. Sci. 2016, 72, 980–989.
80. Xiong, H.; Xue, K.; Qin, W.; Chen, X.; Wang, H.F.; Shi, X.H.; Ma, T.; Sun, Z.H.; Chen, W.G.; Tian, X.Q.; et al. Does Soil Treated with Conidial Formulations of *Trichoderma* spp. Attract or Repel Subterranean Termites. J. Econ. Entomol. 2018, 111, 808–816.
81. Nassr S, Barakat R (2013) Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea* in vitro. Methods 67:68
82. Harman, G.E. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 2000, 84, 377–393.

83. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 43–56.
84. Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiwy, M.S.; Ramakrishnan, M.; Landi, M.; Araniti, F.; Sharma, A. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants* 2020, 9, 762.
85. Mukherjee, M.; Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Zachow, C.; Berg, G.; ZEILINGER, S. *Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control.* *Indian J. Microbiol.* 2012, 52, 522–529.
86. Ferrigo, D., Mondin, M., Edith, L., Fabio, F., Causin, R., & Raiola, A. (2020). Effect of seed biopriming with *Trichoderma harzianum* strain INAT11 on *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot diseases. *Biological Control*, 104286. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104286
87. LI, Mei; MA, Guang-shu; LIAN, Hua; SU, Xiao-lin; TIAN, Ying; HUANG, Wen-kun; MEI, Jie; JIANG, Xi-liang (2019). The effects of *Trichoderma* on preventing cucumber fusarium wilt and regulating cucumber physiology. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3), 607–617. doi:10.1016/S2095-3119(18)62057-X
88. Carol Díaz-Gutiérrez;Catalina Arroyave;Mercè Llugany;Charlotte Poschenrieder;Soledad Martos;Carlos Peláez; (2021). *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control *Fusarium* wilt in *Stevia rebaudiana* . *Biological Control*, (), –. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104537
89. Hammad Massinissa; Guillemette Thomas; Alem Meriem; Bastide Franck; Louanchi Meriem; (2021). First report of three species of *Trichoderma* isolated from the rhizosphere in Algeria and the high antagonistic effect of *Trichoderma brevicompactum* to control grey mould disease of tomato . *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, (31:85), doi:10.1186/s41938-021-00423-4
90. Medeiros HA, Araújo Filho JV, Grassi de Freitas L, Castillo P, Rubio MB, Hermosa R et al (2017) Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci Rep.* 7(1):40216.
91. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem Eng J* 37(1):1–20.
92. Whipps JM (1997) Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soilborne diseases. *Modern soil microbiology.*, 525-546.

93. Whipps JM, Lumsden RD (2001) Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22.
94. You J, Zhang J, Wua M, Yang L, Chen W, Li G (2016) Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biol Control* 101:31–38
- Zhang F, Chen C, Zhang F, Gao L, Liu G, Chen L, Fan X, Liu C, Zhang K, He Y, Chen C, Ji X (2017) *Trichoderma harzianum* containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and diminished adverse effect caused by *Fusarium oxysporum* in soybean. *J Plant Physiol* 210:84–94
95. Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97, 239e243.
96. Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D., Loper, J.E., 2011. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology* 101, 113e123.
97. Singh, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., Singh, H.B., 2013a. Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research* 168, 33-40.
98. Singh, A., Jain, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., Singh, H.B., 2013b. Rhizosphere microbes facilitate redox homeostasis in *Cicer arietinum* against biotic stress. *Annals of Applied Biology* 163, 33e46.
99. Jain, A., Singh, S., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2012. Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology* 112, 537e550.
100. Huang C, Yu B, Teng Y, Su J, Su Q, Cheng Z, Zeng L. 2009. Effects of fruit bagging on coloring and related physiology, and qualities of red Chinese sand pears during fruit maturation. *Scientia Horticulturae*, 121, 149–158.
101. Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4): 977–987.
102. Monfil, V.O., Casas-Flores, S. (2014). Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 429–453.
103. Dubey S. C., Suresh M. and Singh B., (2007), Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*. (40):118-127.

104. Dubey SC. And Patel.,(2001), Evaluation of fungal antagonist against *Thanatephorus cucumeris* causing web blight urd and mung bean. *Indian Phytopathol* 54:206-209.
105. Dubey.S.C, Singh.B., (2003), Reaction of chickpea genotypes against *Fusarium Oxysporum* f.sp.ciceris causing vascular wilt. *Indian Phytopatholgy*, 57:233.
106. Haware M. P., Nene Y. L. and Natarajan M., 1996. The survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* in the soil in the absence of chickpea. *Phytopathology Mediterranean*. (35): 9-12.
107. Merkuz A. and Getachew A., (2012), Influence of chickpea fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris), on Desi and Kabuli-type of chickpea in integrated disease management option at wilt sick plot in North western Ethiopia. *International Journal of Current Research*. 4 (04): 046-052.
108. Trapero-Casas. and Jiménez-Díaz RM., (1985), Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75: 1146–1151. doi: 10.1094/phyto-75-1146