



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

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

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

قسم العلوم الفلاحية

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 synergique entre les antagonistes biologiques et l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill. dans le contrôle intégré du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

Présenté par : BOUSSAADA *Samira* et BENIZIDE *Khadidja*

Devant le jury :

Président : M<sup>eme</sup> A BOURAHLA ..... MAA (Université de BBA)

Encadrant : M<sup>r</sup> D. MOUTASSEM ..... MCA (Université de BBA)

Examineur : M<sup>eme</sup> H MESSAOUDI ..... MAA (Université de BBA)

Année universitaire : 2021/2022

# *Remerciement*

*On remercie Dieu le plus puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr MOUTASSEM Dahou, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury pour leur présence, pour leur lecture attentive de notre mémoire ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail*

*Notre remerciement s'adresse à Mr OULD KIAR Ridha pour son aide pratique et son soutien moral et encouragements.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

# *Dédicace*

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soit soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse :  
mon adorable mère Noura

Mes sœurs Samia et Sara que j'aime beaucoup...mes adorables frères Chamsou Walid et Iyes mon supports  
éternels...

Ma petite Lina mon ange gardien....

Mes chères copines : Anfel sans son aide ce travail ne sera jamais accompli mon hormone de joie et de bonheur une source de confiance je t'aime. Nouha l'ambiance du groupe...Randa une vraie sœur. Rahma ma habouba d'amour ...Chaïma. Hasna.... Nadouche ..Imen... Amina

Mon cher coach Yacine qui m'a beaucoup soutenu et encouragé

Mes chers amis : Oussama mon petit frère qui m'a toujours soutenu jusqu'à la dernière minute... Saphir Le S.. Aymen .. Younes Hichem Basset Ragoub et notre très cher El-Bachir Laabachi oustadhe LEFKIR .Et à tous mes amis que je n'ai pas cité je vous aime

Sans oublier ma chère binôme Khedoudja avant quelle soit une binôme c'est une sœur une amie que j'ai eu le plaisir de partager avec ce travail modeste plein d'amour de joie et de plaisir je t'aime ma chère

*Samira*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soit soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère :*

*A l'homme de ma vie « Papa » et le pilier de la maison « Mama » de m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour leur amour, Et leur encouragement. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse.*

*A mon support, mon frère « Omer » sa bonté, son précieux soutien, son encouragement tout au long de mes années d'étude, son amour et son affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance.*

*A ma deuxième maman tante Atika et ses jumelles Alaa & Yakine*

*A mon grand-père maternel « Mohamed Tahar » et mon oncle « Hakim » et toute la famille BENIZID,  
BENZIOUEHE, SLIMANI*

*A mes amis et mes copines que j'aime un par un : ma sourette Cerine , mes belles cousines Meriem, Lina, mon ame sœur Anfel, la sourse d'ambiance Nouha ,la poupée Nada , mes puces Habouba , Nadine ,Hasna  
et*

*Les jeunes qui m'a toujours soutenu jusqu'à la dernière minute Oussama, green eyes Saphir , Aymen et  
abd el basset ragoub*

*A mon binôme Samira une personne adorable qui a une place spéciale dans mon cœur, une bonne amie qui a été à mes côtés tous au long de mon parcours qui a partagé avec moi beaucoup de souvenirs d'aigredoux, je t'aime très fort ma grande sœur la S*

*Khadija*

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX .....	
LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES ABREVIATION.....	
INTRODUCTION	01

### CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologiques utilisés.....	03
1.1. Matériel végétales.....	03
1.2. Matériel fongiques.....	03
1.3. L'huile essentielle .....	03
2. Analyse de l'effet des huiles essentielles sur le Foc <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	04
2.1. Formulation de l'huile essentielle.....	04
2.2. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles <i>in vitro</i> .....	04
2.2.1. Evaluation par test direct.....	04
2.2.2. Evaluation par techniques indirect.....	04
2.2.3. Tests antagonistes des <i>Trichoderma sp</i> .....	05
- Test antagoniste direct des <i>Trichoderma sp</i> contre le Foc <i>in vitro</i> .....	05
- Efficacité antifongique des métabolites volatils (Test antagoniste indirect). .....	05
2.2.4. Effet du filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> sur la croissance mycélienne du Foc .....	06
- Synergisme par contact direct.....	06
- Synergisme par contact indirect.....	06
2.2.5. Effet des métabolites secondaires .....	06
2.2.6. Test de synergie entre l'huile essentielle et les espèces de <i>Trichoderma sp in vitro</i> .....	06
- Synergisme par contact direct.....	06
- Synergisme par contact indirect.....	07
2.3. Analyse de synergisme des huiles essentielles avec les filtrats de la culture de <i>Trichoderma sp</i> .....	07
2.3.1. Effet des huiles essentielles <i>in vivo</i> .....	08
- Préparation de substrat .....	08
- Préparation de l'inoculum du Foc .....	08
- Préparation de l'inoculum des <i>Trichoderma sp</i> .....	08
- Préparation des plantules du pois chiche.....	08

2.3.2. Traitement du sol par les formulations des huiles essentielles.....	09
2.3.3. Traitement du sol par les formulations du <i>Trichoderma sp</i> .....	09
2.3.4. Test de synergie entre l'huile essentielle et les espèces de <i>Trichoderma sp in vivo</i> .	09
2.4. Exploitation des résultats .....	09
2.4.1. Mesure de la sévérité d'attaque .....	10
2.4.2. Calcul de l'indice de Flétrissement ( <i>DII</i> ) .....	10
2.4.3. Calcul de l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve) .....	10
3. Analyse statistique .....	11

## **CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Efficacité des huiles essentielles contre le Foc <i>in vitro</i> .....	13
2. Effet des huiles essentielles <i>in vivo</i> .....	14
3. Effet des espèces de <i>Trichoderma sp</i> contre le Foc <i>in vitro</i> .....	16
4. Effet des filtrats de culture sur la croissance mycélienne du Foc .....	20
5. Effet des espèces de <i>Trichoderma sp in vivo</i> .....	20
6. Analyse de synergisme par contact direct et indirect .....	20
7. Analyse de synergisme entre filtrat de culture de <i>Trichoderma</i> et huile essentielle .....	24
8. Analyse de synergisme <i>in vivo</i> .....	27
<b>DISCUSSION</b> .....	28
<b>CONCLUSION</b> .....	39
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	42
<b>RESUMES</b> .....	

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Matériel fongique utilisés dans cette étude (A : Tsa 10 ; B : Tsa03 ; C : TsaDk ; D : Tsa Ik ; E : TsaJk ; F : Tsa 20 ; G : TsaDh ; H : Tsa 22).....	13
<b>Figure 2.</b> Efficacité des huiles essentielles d' <i>E. globulus</i> sur la croissance mycélienne du Foc en traitement direct et indirect.....	14
<b>Figure 3.</b> Effet de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> sur la croissance mycélienne du Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions±l'erreur standard. Les lettres a, b, ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	15
<b>Figure 4.</b> Résultats des traitements de la variété Flip 90-13C par les différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> (A :10ul /ml ; B :20ul/ml ; C :30ul /ml ; D :40ul /ml ; D :50ul /ml ; E :60ul /ml ; F :70ul /ml ; G :80ul/ml ; H :90ul/ml)	15
<b>Figure 5.</b> Résultats du test antagoniste direct in vitro entre les différentes souches de <i>trichoderma sp</i>	16
<b>Figure 6.</b> Résultats du test antagoniste indirect in vitro entre les différentes souches de <i>trichoderma sp</i>	17
<b>Figure 7.</b> Résultats de test de confrontation A) directe et B) indirect des espèces de <i>Trichoderma sp</i> contre le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions±ES. Les lettres a, b, ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	18
<b>Figure 8.</b> . Observations microscopiques de la zone de confrontation entre <i>Trichoderma sp</i> et le Foc. a) enroulement de mycélium de <i>Trichoderma sp</i> sur le Foc, b) vacuolisation et c) lyse des hyphes de Foc.	19
<b>Figure 9.</b> Effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma sp</i> sur la croissance mycélienne du Foc <i>in vitro</i> .....	20
<b>Figure 10.</b> Observations microscopiques de la zone de confrontation entre <i>Trichoderma sp</i> et le Foc. a) enroulement de mycélium de <i>Trichoderma sp</i> sur le Foc, b) vacuolisation et c) lyse des hyphes de Foc.....	20
<b>Figure 11.</b> Résultats des tests antagonistes de sept espèces de <i>Trichoderma sp</i> in vivo.	22
<b>Figure 12.</b> Résultats des tests antagonistes de onze espèces de <i>Trichoderma sp</i> in vivo. Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à p<0,05.....	22
<b>Figure 13.</b> Résultats d synergisme de confrontations direct (A) et indirect (B) des souches de <i>Trichoderma sp</i> avec l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> . Les valeurs	

représentent la moyenne de quatre répétitions± ES. Les lettres a, b, ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	23
<b>Figure 14.</b> résultats des associations Trichoderma sp est l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions± ES. Les lettres a, b, ...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.....	24
<b>Figure 15.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct.	25
<b>Figure 16.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct.	26
<b>Figure 17.</b> Effet synergique des associations Trichoderma spp et l'huile essentielle d'E. globulus dans les tests in vivo.	27
<b>Figure 18.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct. Délibération	27
<b>Figure 19.</b> Synergisme entre les espèces de Trichoderma sp et l'huile essentielles E. globulus( A.Trichoderma 8 20µL/mL;B Trichoderma 5 20µL/ml ; C. Trichoderma 30 20µL/mL ;D. Trichoderma 10 20µL/m L; E Trichoderma Dk 20µL/mL ; F Ttrichoderma Dh20µL/mL ; G Trichoderma Hk 20µL/mL ; H Témoin )	28

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct.....	22
<b>Tableau 2.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans un test de contact direct.....	23
<b>Tableau 3.</b> Effet synergique des associations Trichoderma sp et l'huile essentielle d'E. globulus dans les tests in vivo.....	24



## LISTE DES ABREVIATION

**ANOVA** : annalyse of variance  
**AUDPC** : area under the curve progressing of the desease  
**°C** : degrés celsuis  
**Cm** : centimètre  
**DI** : incidence  
**DII** : l'index de l'intensité de la maladi **C** : degrés celsuis  
**Foc** : *Fusariumoxysporum*  
**G**: gramme  
**I** : indice d'inhibition  
**ISM** : l'indice de sévérité moyenne  
**ITGC** : institut technique des grandes cultures  
**Kg** : kilogramme  
**MGI** : Mycelial growth inhibition  
**ml** : millilitre  
**PDA** : potato dextrose agar  
**PDB** : potato dextrose broth  
**Ppm** : partie par million  
**S** : sévérité  
**SAS** : Statistical Analysis System  
**GLM** : General Liner Model.  
**ZI** : Zone d'inibition

# **INTRODUCTION**

---

L'utilisation des composés chimiques en agriculture a donné des résultats positifs contre un large éventail de phytopathogènes qui affectent la quantité et la qualité des productions agricoles. Malheureusement, ces composés ont révélé très offensive pour la santé humaine, animale et de l'environnement (**Monfil et Casas-Flores 2014**). Ces produits sont à l'origine de développement de la résistance chez les phytopathogènes. A cause des problèmes que pose l'utilisation des pesticides chimiques, d'autres méthodes de lutte visant une réduction de l'intensité d'application de ces produits ont été mises en place (**Goulson, 2013**).

A cet effet, un véritable intérêt a été accordé au développement de moyens de lutte alternatifs contre les maladies et les ravageurs des plantes. L'utilisation des agents de lutte biologiques tels que les espèces fongiques appartenant au genre *Trichoderma* (**Islam et al., 2017 ; Faruk, 2018 ; Elshafie et al., 2020**) et les fongicides biorationnels à base de plantes tels que les huiles essentielles ont été signalés comme des alternatives potentielles pour contrôler les phytopathogènes.

Les agents de lutte biologiques appartenant au genre *Trichoderma sp* sont actuellement considérés très efficaces contre les maladies causées par les phytopathogènes (**Chet 1990 ; Herrera-Estrella et Chet 2003**). Ces espèces fongiques sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (**Vinale et al., 2008**). Malgré leur potentielle efficacité contre beaucoup de phytopathogènes, les formulations à base de *Trichoderma sp* 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**).

Les végétaux produisent des substances actives possèdent des possessions fongicides, et inductrices de la croissance des plantes (**Moutassem et al., 2019**). Le plus souvent, sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux de différents phytopathogènes. Les biopesticides d'origine végétale les plus utilisés sont les huiles essentielles (**Badawi et abdelgualil, 2014**). Ces substances ont été signalées comme une méthode opportune pour contrôler de nombreuses maladies telluriques (**Badawi et abdelgualil, 2014**). En effet, cette technique a reçu une popularité dans le monde entier, un nombre croissant d'agriculteurs reconnaissant les effets des huiles essentielles sur la protection des plantes contre les pathogènes du sol, améliorant l'état de santé des sols et augmentant par conséquent la production agricole (**Zhang et al., 2014**).

Bien qu'ils soient très efficaces en raison de ces potentiels principes actifs, il n'existe qu'un nombre limité en produits à base des huiles essentielles fabriqués et commercialisés. Cela est dû à quatre raisons principales : (i) de nombreuses études publiées, mais seulement quelques

résultats pratiques ; (ii) législation stricte ; (iii) faible persistance des effets ; et (iv) le manque de qualité et de quantités suffisantes à des prix abordables. Ces composées sont très concentrées en principes actifs et peuvent avoir une toxicité élevée vis-à-vis les microorganismes non cibles et même peuvent affecter la plante en cas d'utilisation avec des concentrations élevées (**Pavela et Benelli 2016**).

Ces produits sont utilisés soit à l'état individuel en remplacement directement le produit chimique de synthèse, soit en association avec d'autres produits chimiques ou biologiques en raison de mettre en œuvre un programme de gestion intégrée (**Bartholomew et al., 2017 ; Jimenez-Reyes et al., 2019 ; Elshafie et al., 2019b, 2020b ; Gruřlov'a et al., 2020**). L'utilisation des différentes approches dans le contrôle et l'installation des maladies des plantes, à savoir, les agents de lutte biologique et les extraits de plantes ont été usagés comme un programme de lutte intégrée pour contrôler plusieurs maladies (**El-Mougy et al., 2015 ; Soković et al., 2013**). Cependant, peu de travaux ont été procédés sur l'efficacité des huiles essentielles en traitements intégrés avec les agents de lutte biologique. En plus, ces travaux restent limités en matière de réponses et d'éclaircissement sur l'effet synergisme entre les huiles essentielles et les agents de lutte biologique utilisés comme des produits intégrés. Dans cette optique, notre étude a été tracées comme objectifs l'étude de l'effet synergisme entre les huiles essentielles et les agents de lutte biologiques représentés par les *Trichoderma sp.*

**CHAPITRE I.**

---

**MATERIEL ET METHODES**

## 1. Matériels biologiques

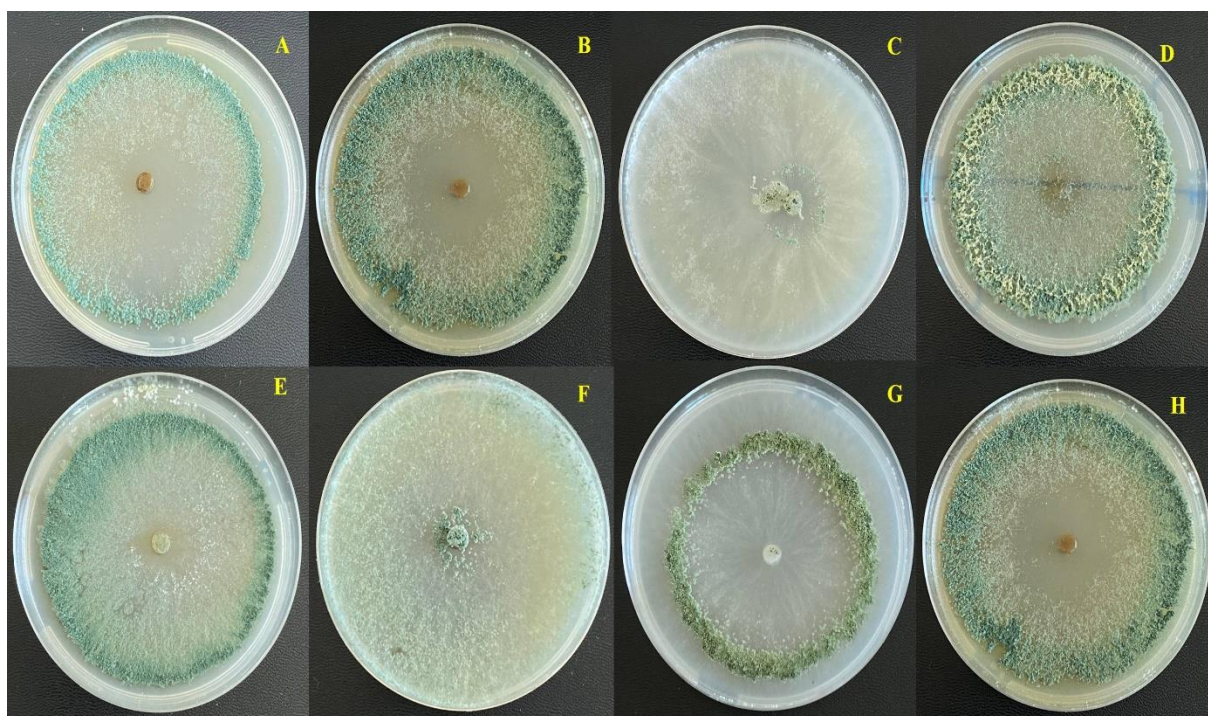
### 1.1. Matériel végétal

Le cultivar du pois chiche utilisé dans cette étude est représenté par la variété FLIP 90-13 C connue par sa sensibilité au *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Cette variété nous été fourni par l'institut technique des grandes cultures (ITGC) de Sétif.

### 1.2. Matériel fongique

L'espèce pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) utilisée dans cette étude a été isolée à partir des tiges des plantes malades présentent des symptômes de jaunissement vasculaire de pois chiche originaire de la région de Mascara (Figure 1).

Les antagonistes biologiques utilisés ont constitués par 12 espèces appartenant au genre *Trichoderma* sp. Ces 12 espèces ont été isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche, conservées au niveau de laboratoire de phytopathologie université de Bordj Bou Arreridj.



**Figure 1.** Matériel fongique utilisés dans cette étude (A : Tsa 10 ; B : Tsa03 ; C : Tsa Dk ; D : Tsa Ik ; E : Tsa Jk ; F : Tsa 20 ; G : Tsa Dh ; H : Tsa 22).

### 1.3. L'huile essentielle

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* utilisée dans cette étude nous a été fournie par Dr BELLIK Yuva.

## 2. Analyse de l'effet de l'huile essentielle sur le Foc *in vitro* et *in vivo*

### 2.1. Formulation de l'huile essentielle

Les extraits des huiles essentielles ont été formulées par le Tween 80 à 3%. Cinq concentrations ont été préparées 10, 20, 30, 40 et 50µL/mL.

### 2.2. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles *in vitro*

#### 2.2.1. Evaluation par test direct

Dans notre expérience, la solubilisation directe de l'huile essentielle dans le milieu PDA a été utilisée selon la technique de **Solyou *et al.* (2006)**. L'huile déjà formulée par le Tween 80 (3%) ont été additionnées dans des flacons contenant un milieu de culture PDA maintenue en surfusion dans un bain marie (va et vient) réglé à une température de 55°C. Après une bonne agitation, le milieu formulé par l'huile essentielle a été coulé dans des boîtes de Pétri mesurant 90 mm de diamètre. Un dépôt d'une pastille mycélienne d'environ 0,5 cm de diamètre d'une pré-culture de 7 jours au centre des boîtes traitées avec les différentes concentrations de l'huile essentielle. Une boîte de Pétri contenant le milieu PDA sans huile essentielle est inoculer pour servir de témoin. Cinq répétitions ont été retenues pour chaque concentration y compris le Témoin. Après incubation à 25 ± 2°C pendant 8 jours. La croissance mycélienne a été estimée en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture.

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été déterminé par rapport au témoin et calculé selon la formule

$$MGI (\%) = \frac{(dc-dt)}{dc} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Où : *dc* représente la croissance mycélienne moyenne dans le témoin et *dt* représente la croissance mycélienne moyenne dans le milieu traité.

#### 2.2.2. Evaluation par techniques indirect

Une nouvelle technique a été utilisée pour évaluer l'effet fongicide de l'huile essentielle d'*E. globulus* par contact indirect. Cette technique consiste à évaluer l'efficacité fongicide à distance. A partir des cultures âgées de 7 jours du Foc, une pastille gélosée de 5 mm de diamètre a été prélevée aseptiquement est placée au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA. Des disques de papier filtre stérile ont été aseptiquement disposées dans le couvercle supérieur de chaque boîte de Pétri.

L'efficacité indirecte a été testée par l'amendement des papiers filtres disposés préalablement dans les couvercles par les concentrations de l'huile essentielle (10 , 20 , 30 , 40 , 50 µl). Les boîtes ont été bien scellées par un parafilm pour empêcher la perte des huiles essentielles. Pour le témoin, la même disposition a été réalisée est le traitement utilisé est à la base de l'eau distillé stérile. Les boîtes test ont été incubées pendant 6 jours à 28 °C. Quatre répétitions ont été maintenues pour chaque concentration.

### 2.2.3. Tests antagonistes des *Trichoderma sp*

#### - Test antagoniste direct des *Trichoderma sp* contre le Foc *in vitro*

La méthode de double culture citée par (*Morton et Stroube, 1955*) a été adoptée pour étudier l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma sp* contre le Foc *in vitro*. Un disque mycélien de 5 mm de diamètre, issu d'une culture de 7 jours des souches de *Trichoderma sp* et du Foc ont été placés sur les périphéries opposés d'une boîte de pétri contenant un milieu de culture PDA à 5 cm de distance les uns des autres. Le témoin est constitué par le pathogène uniquement, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. L'incubation des boîtes testées a été réalisée à 25°C pendant six jours. Quatre répétitions ont été maintenues pour chaque souche antagoniste. La lecture des résultats a été effectuée 6 jours après l'inoculation. L'évaluation de la zone d'inhibition a été estimée selon la formule décrite par *Whipps (1997)* :  $ZI (\%) = (1 - D_n / D_o) \times 100$ , où  $D_n$  : le diamètre moyen du champignon pathogène  $D_o$  : le diamètre moyen du champignon témoin.

Une observation de la zone de contact entre les deux protagonistes afin d'élucider le mode d'action des antagonistes.

#### - Efficacité antifongique des métabolites volatils (Test antagoniste indirect)

L'activité antifongique *in vitro* des métabolites volatils de *Trichoderma sp* a été évaluée selon la méthode décrite par *Dennis et Webster (1971)*. A partir des cultures âgées de 7 jours des deux protagonistes, une pastille gélosée de 5 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes de pétri ont été incubées pendant 3 jours à 28 °C. Le couvercle supérieur de chaque boîte de Pétri a été retiré de manière aseptique et la boîte inférieure contenant le pathogène a été placée sur la deuxième boîte contenant la souche antagoniste. Les boîtes ont été bien scellées par un parafilm pour empêcher la perte de substances volatiles.

Les boîtes tests ont été incubées pendant 5 jours à 28 °C. Pour le témoin, la même disposition est réalisée par la superposition de deux boîtes. Le fond de boîte contenant le milieu



PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Quatre répétitions sont été maintenues pour chaque souche antagoniste. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

#### **2.2.4. Effet du filtrat de culture de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne du Foc**

L'effet des filtrats de culture de 12 isolats de *Trichoderma sp* 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 sp* âgées de 7 jours et déposés dans des flacon erlenmeyer 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 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 sp* sur la croissance mycélienne du Foc, des volumes de 5, 10 et 15 ml de chaque filtrat a été additionné à 50 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 5 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 sp* quatre répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque souche de *Trichoderma sp* et pour chaque concentration. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

#### **2.2.4. Test de synergie entre l'huile essentielle et les espèces de *Trichoderma sp in vitro***

##### **- Synergisme par contact direct**

Pour sa réalisation, nous avons utilisé les deux méthodes précédemment citées par *Moutassem (2020)*. La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer l'effet d'huile essentielle sur l'activité antifongique des *Trichoderma sp* contre le Foc selon la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite dans les paragraphes précédents. Cette technique consiste

à l'amendement de 100 ml de milieu de culture PDA avec des concentrations 50, 40, 30, 20 et 10 µl/ml de l'huile essentielle.

Le milieu empoisonné est coulé dans des boîtes de Pétrie de 9cm de diamètre. Un co-ensemencement, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA déjà traité par l'huile essentielle, deux pastilles gélosées de 5 mm de diamètre, l'une portant le *Trichoderma sp* et l'autre le Foc. Les deux pastilles ont été placées suivant un axe diamétral à 2.5 cm et à équidistance du centre de la boîte. L'incubation est réalisée à 25°C pendant six jours. Le témoin est constitué par le pathogène uniquement, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA sans traitement par l'huile essentielle.

#### - Synergisme par contact indirect

Cette expérience a été procédé par la disposition de l'antagoniste et le pathogène en association dans une boîte de pétri de la même façon que le test de confrontation direct cité précédemment. Des disques de papier filtre stériles traitées avec les cinq concentrations de l'huile essentielle d'*E. globulus* ont été disposées dans le couvercle supérieur de chaque boîte de Pétri portant le test antagoniste direct. Les boîtes ont été bien scellées par un parafilm pour empêcher la perte de l'huile essentielle. Pour le témoin, la même disposition a été réalisée et les traitements utilisés sont à la base de l'eau distillée stérile. Les boîtes testes ont été incubées pendant 6 jours à 28 °C.

### 2.3. Analyse de Synergisme des huiles essentielles avec les filtrats de la culture de *Trichoderma sp*

Cette technique consiste à l'amendement de milieu de culture PDA tiède avec une formulation de 5 ml des filtrats de la culture de *Trichoderma sp* et un volume de 20 µL/ml de l'huile essentielle d'*E globulus*. 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 le mélange de l'huile essentielle et les Filtrats de la culture de *Trichoderma sp*. Cinq répétitions indépendantes ont été accomplies pour chaque souche de *Trichoderma sp*. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

### 2.3.1. Effet d'huile essentielle *in vivo*

#### - Préparation de substrat

Le substrat pour l'ensemencement est préparé selon le dispositif de *Jimenez-Gasco et al. (2001)*. Le substrat est composé d'un mélange de sable, sol et terreau selon les proportions de 1v/1v/1v, respectivement. Le mélange a été mis dans une étuve universelle réglée à 121°C pendant 24h.

#### - Préparation de l'inoculum du Foc

La préparation de l'inoculum du Foc a été effectuée selon la technique décrite par *Jimenez-Gasco et al. (2001)*. Cette technique consiste à mettre dans des sacs en plastiques autoclavable un mélange à base du sable tamisé avec la farine de maïs, humidifié par l'eau distillée, selon la proportion de 9/1/1, respectivement. Le mélange est stérilisé deux fois à 121°C pendant 20 min, ensemencé par 10 explants de 5 mm de diamètre prélevé à partir d'une culture du Foc âgée de 15 jours. Le mélange est incubé par la suite à 25°C pendant 21 jours. Une agitation des sacs 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.

#### - Préparation de l'inoculum des *Trichoderma sp*

Dans cette étude en rapportant une nouvelle technique de préparation de l'inoculum de *Trichoderma sp*. Cette technique consiste à développer l'inoculum du *Trichoderma sp* sur un substrat stérile à base de la matière organique. La première étape comprend la stérilisation du terreau deux fois successives à 120°C pendant 30 minutes. Le terreau stérile a été pulvérisé par une concentration sporale de  $5 \times 10^8$  de *Trichoderma sp*. Ce dernier a été incubé à 25°C pendant 15 jours.

#### - Préparation des plantules du pois chiche

Les graines de la variété FLIP 90-13C ont été désinfectées superficiellement par un trempage dans de l'hypochlorite de sodium (1%) trois fois successives pendant 3 minutes, rincées trois fois successives à l'eau distillé stérile, puis séchées entre deux papier filters stériles. Les graines sont mises aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles contenant le coton stérile imbibés par l'eau distillée stérile, à raison de 10 graines réparties uniformément sur toute la

surface de la boîte. La germination des graines est assurée suite à l'incubation de ces boîtes dans une étuve réglée à 25°C pendant quatre à cinq jours.

### 2.3.2. Traitement du sol par les formulations de l'huile essentielle

La préparation des formulations des huiles essentielles est effectuée par le mixage de 1, 0.5 et 0.25 ml d'huile essentielle avec 1 l d'eau distillée stérile et tween 80 (3%) afin d'obtenir les doses de 5000, 500 et 250 ppm. Après une bonne agitation, cette formulation a été mise dans un dispositif de pulvérisation produisant des gouttelettes fines selon le dispositif de **Belabid et al. (2010)**. Le substrat déjà inoculé par le Foc a été pulvérisé trois fois successives par les différentes concentrations des huiles essentielles.

Le semis des graines pré-germées a été effectué trois jours après le traitement à la base de 5 graines par pots. L'élevage des plants a été réalisé dans le laboratoire sous une température d'environ 25°C et une photopériode de 12 heures. Les plants sont irrigués régulièrement avec de l'eau distillée stérile une fois par semaine.

### 2.3.3. Traitement du sol par les formulations du *Trichoderma sp*

Le traitement du sol par les espèces du *Trichoderma sp* a été effectué par l'addition de l'inoculum du *Trichoderma sp* au substrat inoculé par le Foc selon les proportions 20g à 1Kg du substrat. Le mélange est bien agité, puis incubé à 25°C pendant 15 jours. Le semis des graines pré-germées a été effectué 15 jours après le traitement à la base de 5 graines par pots. L'élevage des plants a été réalisé dans le laboratoire sous une température d'environ 25°C et une photopériode de 12 heures. Les plants sont irrigués régulièrement avec de l'eau distillée stérile une fois par semaine.

### 2.3.4. Test de synergie entre l'huile essentielle et les espèces de *Trichoderma sp in vivo*

Pour vérifier le synergisme entre les huiles essentielles et les espèces de *Trichoderma sp* les combinaisons suivantes ont été envisagées :

**11 souches de *Trichoderma spp* + huile essentielle d'*E. globulus* (10µL/mL).**

## 2.4. Exploitation des résultats

L'incidence (*DI*) est évaluée selon la formule :

$$DI = \frac{NPM}{NTP} \times 100$$

### 2.4.1. Mesure de la sévérité d'attaque

La sévérité ou la gravité de la maladie est obtenue selon l'évaluation visuelle de la proportion des tissus de la plante atteinte par le flétrissement ou le jaunissement.

La sévérité (S) ou l'indice de sévérité moyenne (ISM) est calculé selon la formule :

$$\mathbf{S \text{ ou } (ISM)} = \frac{\sum \mathbf{n_i \times n_j}}{\sum \mathbf{n_j}}$$

Où

$n_j$  : est le nombre de plantes caractérisées par l'indice

$i_j$  : est l'indice de sévérité attribué aux plantes malades.

L'échelle de notation utilisée par *Trapero-Casas (1983)* a été appliquée le long de nos expérimentations.

Cette échelle consiste à donner une note à la plante malade examinée en fonction de l'importance des symptômes observés :

0 : pas de symptômes.

1 : jaunissement ou flétrissement du 1/3 de la plante.

2 : mêmes symptômes mais affectant les 2/3 de la plante.

3 : symptômes identiques affectant la plante entière.

4 : plante morte.

### 2.4.2. Calcul de l'indice de flétrissement (DII)

L'incidence I et la sévérité S sont utilisés pour le calcul, l'index de l'intensité de la maladie *DII*. Où :

$$\mathbf{DII} = \frac{\mathbf{DI * ISM}}{\mathbf{4}}$$

### 2.4.3. 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)* :

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n [(x_i + x_{i+1})/2](t_i + t_{i+1})$$

Où :

$x_i$  = la proportion des tissus ou le nombre de plantes malades à toute une seule mesure (intensité de la maladie) à l'observation  $i$ ,

$t_i$  = temps (jours) après l'inoculation à l'observation

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

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

### 3. 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*.

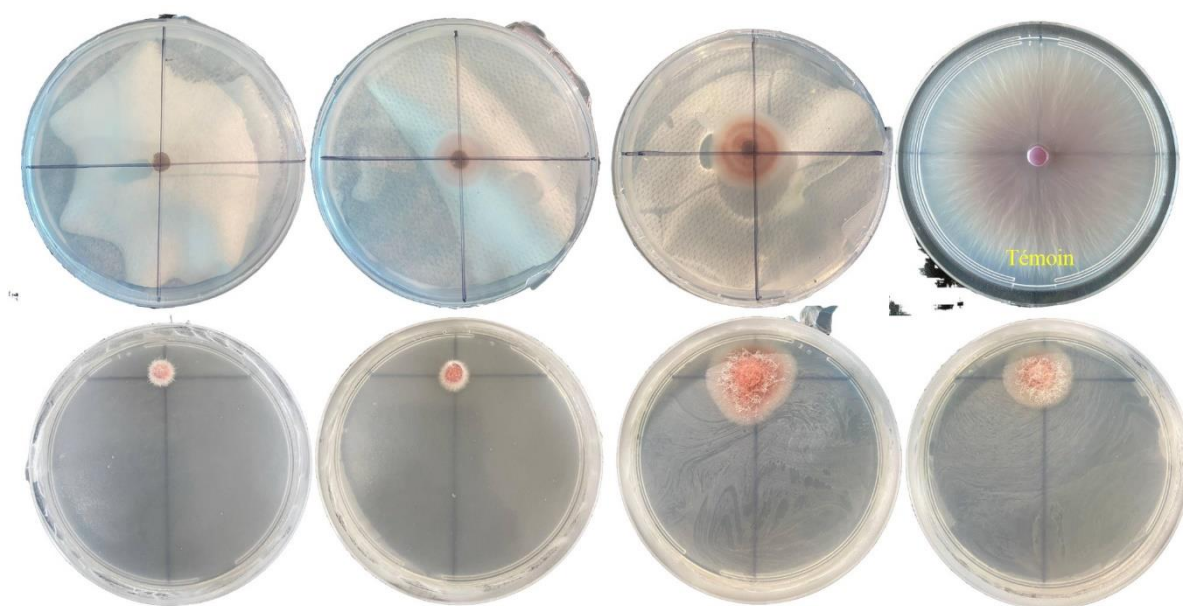
---

**CHAPITRE II.**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## 1. Résultats

### 1.1. Efficacité de l'huile essentielle contre le Foc *in vitro*

Les tests *in vitro* ont révélé que la formulation de l'huile essentielle d'*E. globulus* possède une activité antifongique très remarquable contre le Foc, dont l'intensité varie en fonction du mode d'application en test direct et indirect et la concentration utilisée. L'huile essentielle a permis de réduire significativement la croissance mycélienne du Foc, comparativement aux témoins non traités. Les taux d'inhibition (mesurés en pourcentage) sont représentés dans la (Figure 1). L'analyse de la variance (ANOVA) effectuée par le logiciel SAS (Statistical Analysis System. Cary, NC) et les moyennes sont comparées par le test de Duncan à 5 %.



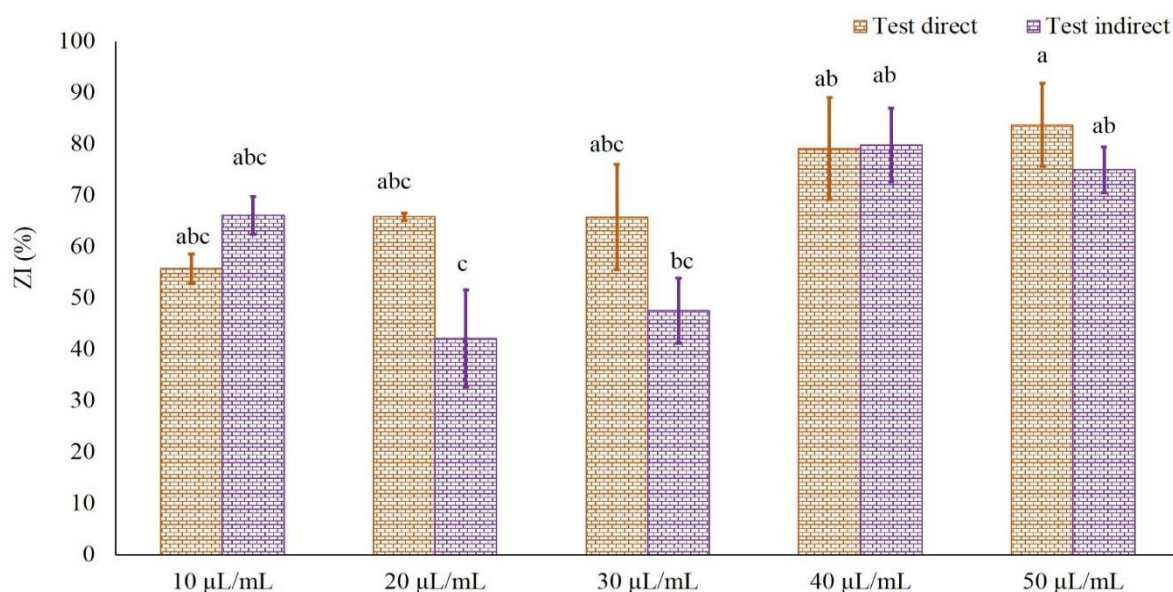
**Figure 1.** Efficacité des huiles essentielles d'*E. globulus* sur la croissance mycélienne du Foc en traitement direct et indirect.

Les principaux résultats obtenus de la recherche d'éventuelles corrélations, indiquent une corrélation positivement significative entre la zone d'inhibition et la concentration de l'huile essentielle utilisée. Par ailleurs, En effet, l'espèce, la concentration et l'interaction entre les deux facteurs ont montré un effet très hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) sur la variation de l'inhibition de la croissance mycélienne, (tableau 05). Ce dernier effet a été expliqué par la séparation très nette des différents groupes homogènes des deux facteurs étudiés.

L'huile essentielle d'*E. globulus* a montré très efficace en traitement direct comparée avec le traitement indirect. En traitement direct, la zone d'inhibition varie entre 55.81 e 83.81%, alors qu'elle est variable entre 66.13 et 75.04% en traitement indirect. Autrement, l'analyse des données montre que l'activité inhibitrice de la croissance mycélienne dans les deux traitements et dose dépendante, elle augmente significativement avec l'augmentation de la concentration. La concentration 50  $\mu\text{l/ml}$  a montré la zone d'inhibition la plus élevée pour les



deux traitements, alors que 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (pour le test direct) et 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (pour le test indirect) ont indiqué une zone d'inhibition la plus faible de l'ordre de 55.81% et 42.14%, respectivement.



**Figure 2.** Effet des huiles essentielles d'*E. globulus* sur la croissance mycélienne du 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 de l'huile essentielle *in vivo*

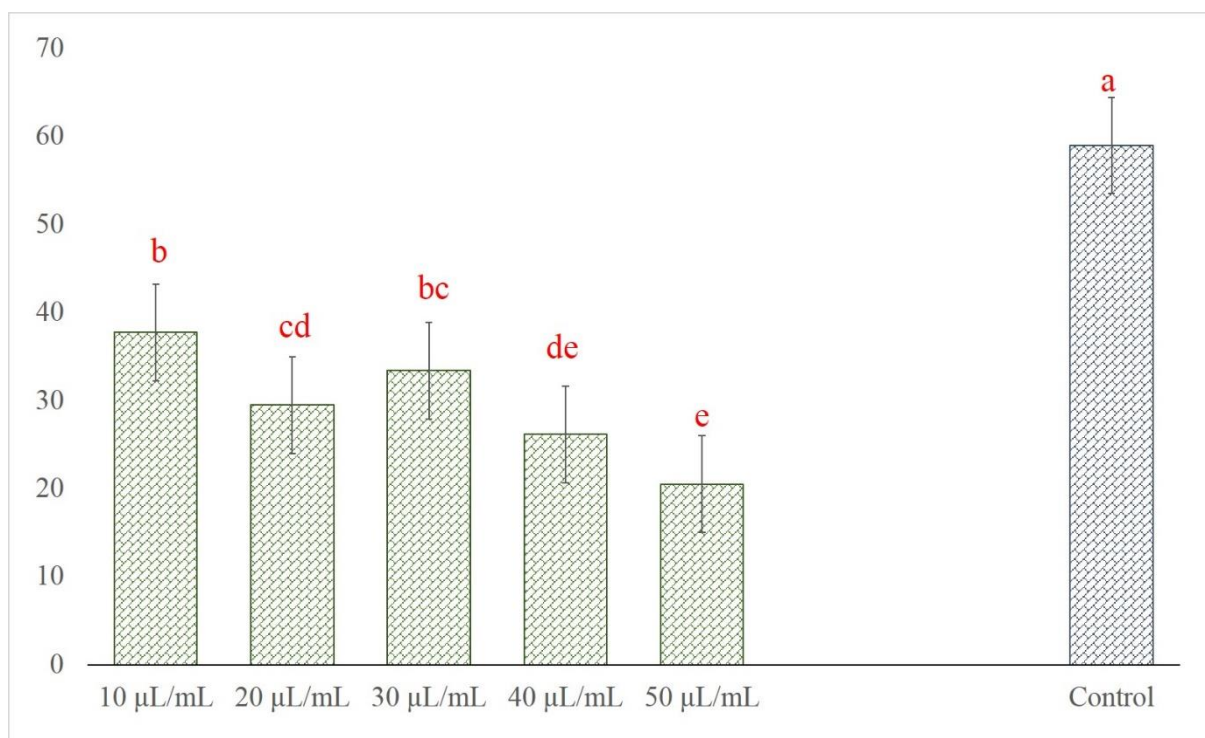
Les résultats obtenus après l'application de l'huile essentielle d'*E. globulus in vivo* montrent un effet fongicide sur le Foc. Les symptômes de la maladie ont été observés 28 jours après le semis sur les plantules traitées et 12 jours après le semis chez le témoin positif.

D'après l'ANOVA, la concentration de l'huile essentielle a montré un effet très hautement significatif ( $P = 41.85$  ;  $F = 0.0000$ ) sur la variation de la valeur de l'AUDPC. Une gamme de concentration de 10 et 20 et 30, 40 et 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a été choisie. Elle a permis d'établir des courbes dose-effet (figure 12). La courbe exprime la relation entre la dose testée et l'effet fongicide montrent une activité dose-dépendante. En général, les résultats obtenus avec les différentes concentrations de l'huile essentielle révèlent que l'activité fongicide croît au fur et à mesure que la concentration augmente. La dose forte 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  semble la plus intéressante pour comparer par les doses 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

A cet effet, les valeurs de l'AUDPC notées chez les plantules de pois chiche traitées par l'huile essentielle sont variables entre 20.5 et 37.7 traduisent des diminutions de la gravité de la maladie entre 36.01% et 65.25%.



**Figure 3.** Résultats des traitements de la variété Flip 90-13C par les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*E. globulus* (A :10ul /ml ; B :20ul/ml ; C :30ul /ml ; D :40ul /ml ; D :50ul /ml ; E :60ul /ml ; F :70ul /ml ; G :80ul/ml ; H :90ul/ml)



**Figure 4.** Résultats des traitements de la variété Flip 90-13C par les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*E. globulus*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre

répétitions±l'erreur standard. Les lettres : a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

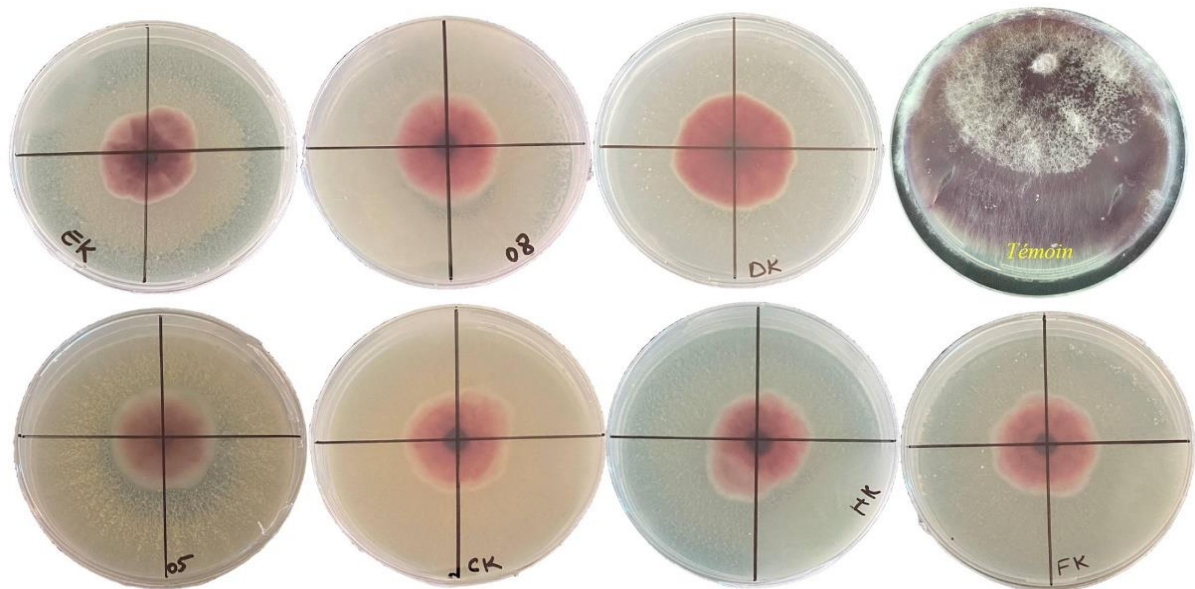
### 1.3. Effet des espèces de *Trichoderma sp* contre le Foc *in vitro*

L'ensemble des espèces de *Trichoderma sp* ont été testées afin de mettre en évidence leurs activité antifongique vis-à-vis le Foc, par la technique de confrontation directe et indirecte. L'analyse ANOVA effectuée sur les tests de confrontation direct a montré un effet significatif ( $F(11, 24) = 17.56 ; P=0.000$ ) de l'espèce fongique sur la croissance mycélienne du Foc.

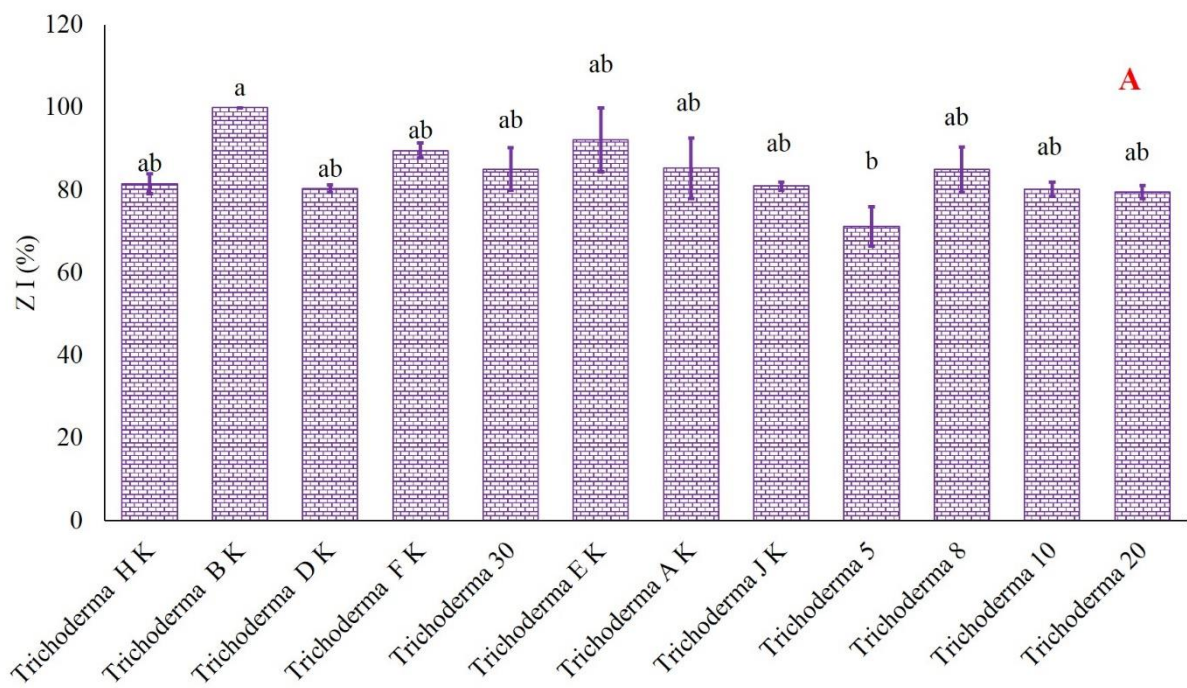


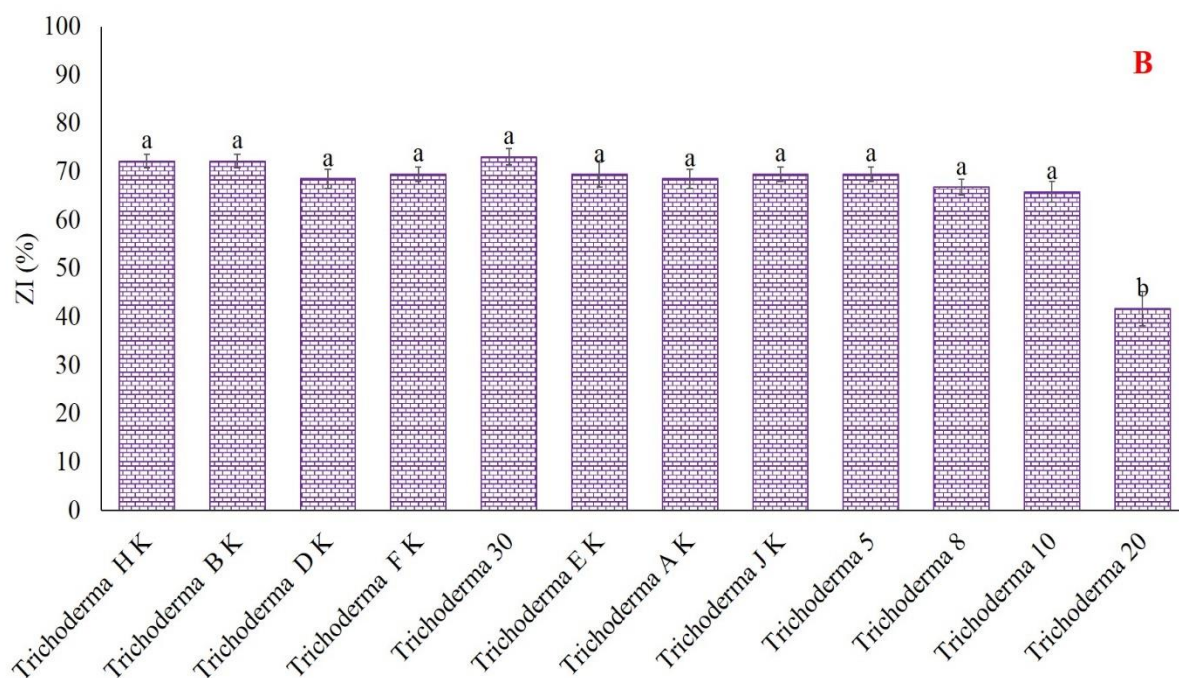
**Figure 5** : . Résultats du test antagoniste direct *in vitro* entre les différentes souches de *trichoderma sp*





**Figure 6** : Résultats du test antagoniste indirect in vitro entre les différentes souches de *trichoderma sp*

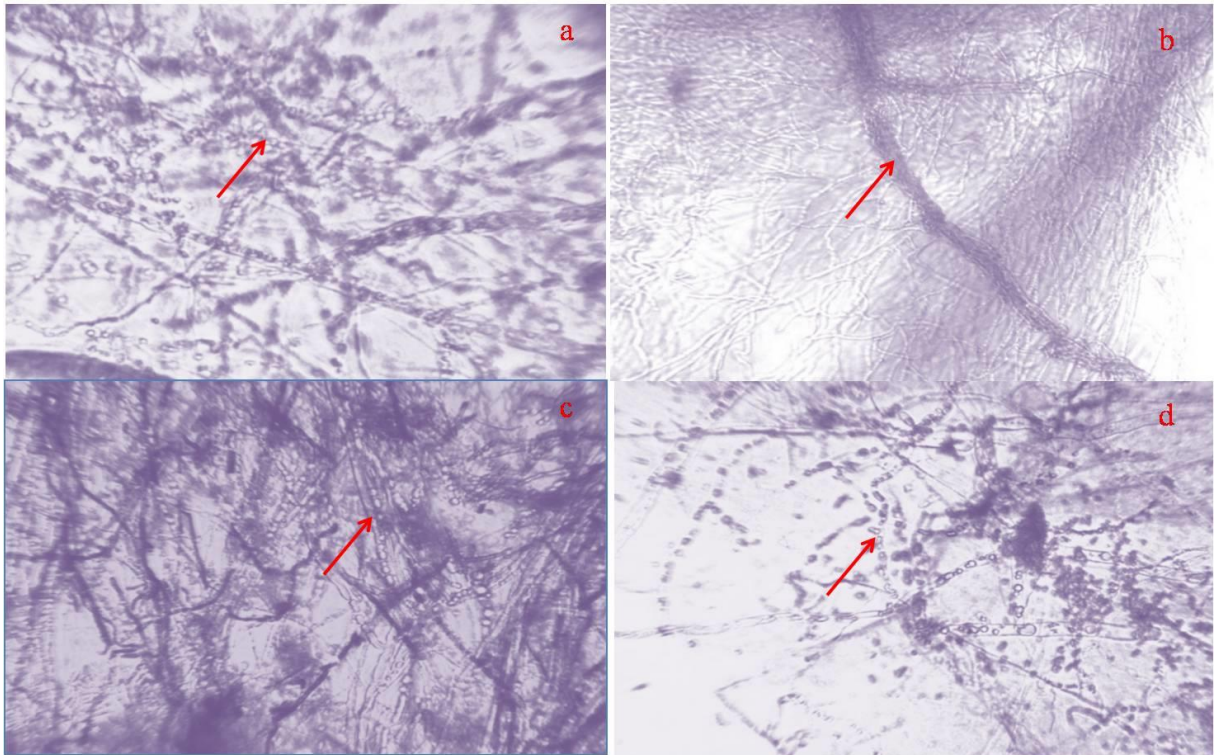




**Figure 07.** Résultats de test de confrontation A) directe et B) indirect des espèces de *Trichoderma sp* contre le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions  $\pm$  ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

L'analyse des résultats mentionné dans la figure 6 montre l'efficacité de 12 espèces de *Trichoderma sp* contre le Foc. Après 144h de confrontation, les zones d'inhibitions sont variables entre 71.25 et 100% dont les valeurs faibles sont notées chez *Trichoderma 5* et la plus élevée a été notée chez *Trichoderma BK*. Des observations microscopiques réalisées sur la zone de contact entre les douze espèces de *Trichoderma sp* et le Foc, montrent une modification au niveau du mycélium, se marquant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma sp* sur celui du Foc. Chez les souches *Trichoderma Bk* et *Trichoderma Fk* nous avons constaté une lyse totale du mycélium du Foc.

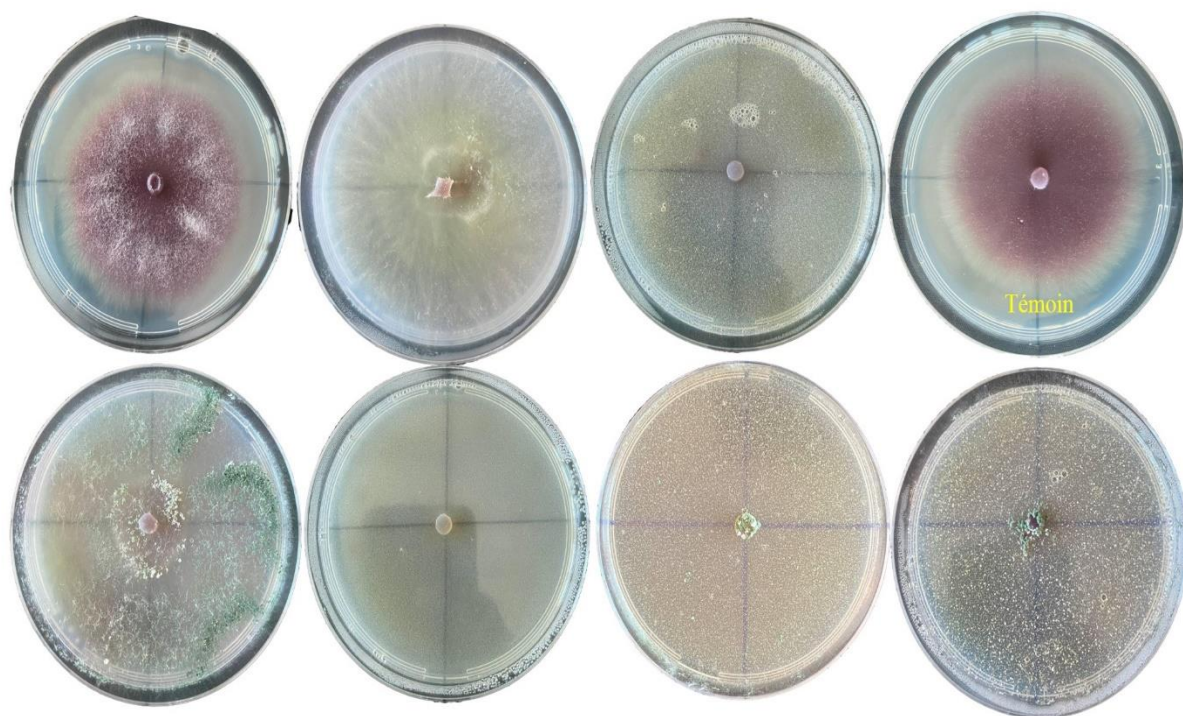
La technique de confrontation indirecte nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance des isolats de trois isolats du *Trichoderma sp* exercé sur le Foc ; cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé en présence ou en absence de l'antagoniste. Les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne du Foc exercée par toutes les douze espèces du *Trichoderma sp* comparativement aux témoins. Contrairement au test de confrontation directe, on remarque que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.



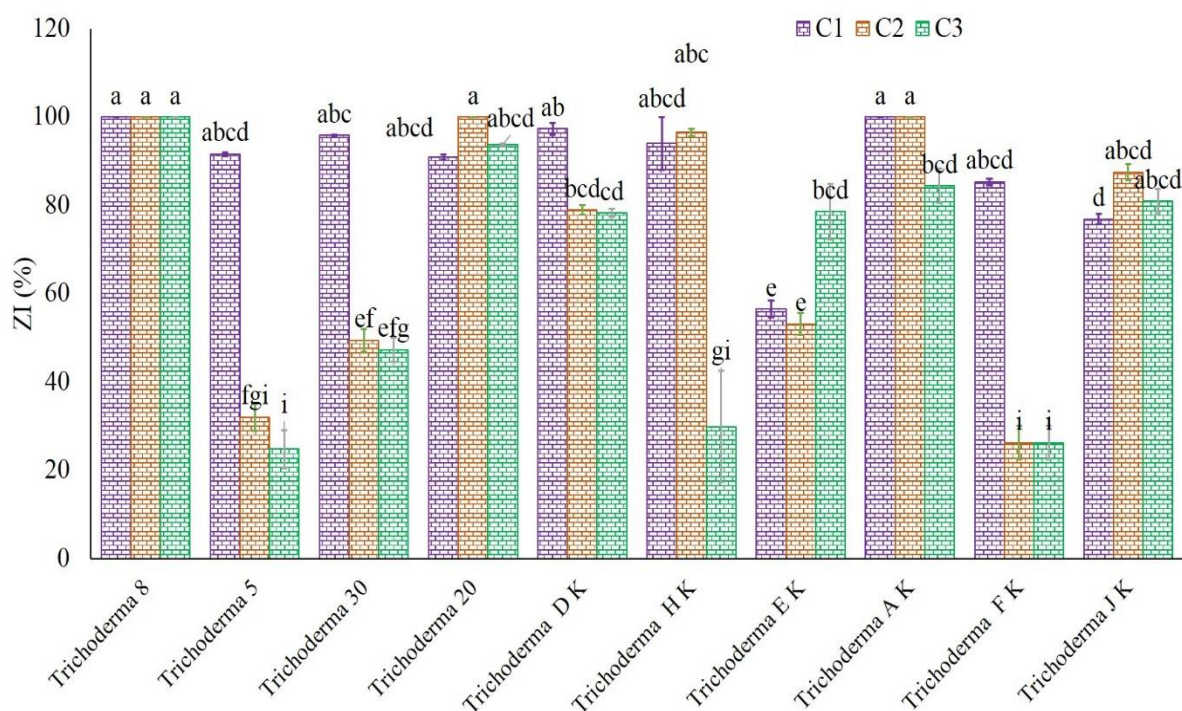
**Figure 08.** Observations microscopiques de la zone de confrontation entre *Trichoderma sp* et le Foc. a) enroulement de mycélium de *Trichoderma sp* sur le Foc, b) vacuolisation et c) lyse des hyphes de Foc.

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.





**Figure 9.** Effet des filtrats de culture de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne du Foc *in vitro*.



**Figure 10.** Résultats de test des filtrats d cultures de douze espèces de *Trichoderma sp* contre le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions± ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

Les données affichées sur la (Figure 5) indiquent que la croissance mycélienne des témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations

pathogène et antagoniste. Les résultats obtenus après 72h de confrontation montrent l'existence d'une réduction du diamètre moyen des colonies de tous les isolats du Foc par rapport au témoin, provoquant ainsi des zones d'inhibition variables, dont la plus faible a été notée chez *Trichoderma sp* 1 (24.12%) et la plus élevée est constatée chez *Trichoderma sp* 2 (81.84%).

#### 1.4. 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.

L'analyse de donnée indique des zones d'inhibition très variables en fonction l'espèce de *Trichoderma sp* ( $F=95,6$ ,  $P=0,00^*$ ) et le dose appliquée ( $F=133,8$ ,  $P=0,00^*$ ). A cet effet, l'espèce *Trichoderma* 8 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* EK 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 56 et 100% pour la C1, 26 et 100% pour la C2, ainsi qu'entre 26 et 100% pour la C3.

#### 1.5. Effet des espèces de *Trichoderma sp in vivo*

Le traitement du sol par les espèces de *Trichoderma sp* a montré également une efficacité très intéressante contre le Foc *in vivo*. D'après l'ANOVA, l'espèce de *Trichoderma sp* a montré un effet très hautement significatif ( $F = 13.57$  ;  $P = 0.00013$ ) sur la variation de la valeur de l'AUDPC. 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 entre 36.58 et 58.5 expliquent une réduction de la maladie variable entre 0.98% et 38.41 %. Dans ce cadre, *Trichoderma* EK et la plus efficace et *Trichoderma* 30 est la faiblement efficace.

#### 1.6. Analyse de synergisme par contact direct et indirect

L'analyse de l'effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur l'activité antagoniste des espèces de *Trichoderma sp* a montré un effet significatif de l'espèce fongique ( $F=21$  ;  $P=0,00^*$ ) et non significatif de la dose de l'huile essentielle ( $F=30.3$  ;  $P=0,0000$ ) sur la zone d'inhibition du Foc. L'observation macroscopique révèle une croissance mycélienne dense du *Trichoderma*



et une activité inhibitrice très prononcée sur le milieu amendé par l'huile essentielle, suivi par une agrégation totale sur le mycélium du Foc. Cela a été constaté chez les espèces *Trichoderma* DK, *Trichoderma* BK et *Trichoderma* EK. Une lyse totale du mycélium a été observée après 6 jours d'incubation.



Figure 11. Résultats des tests antagonistes de sept espèces de *Trichoderma sp* in vivo.

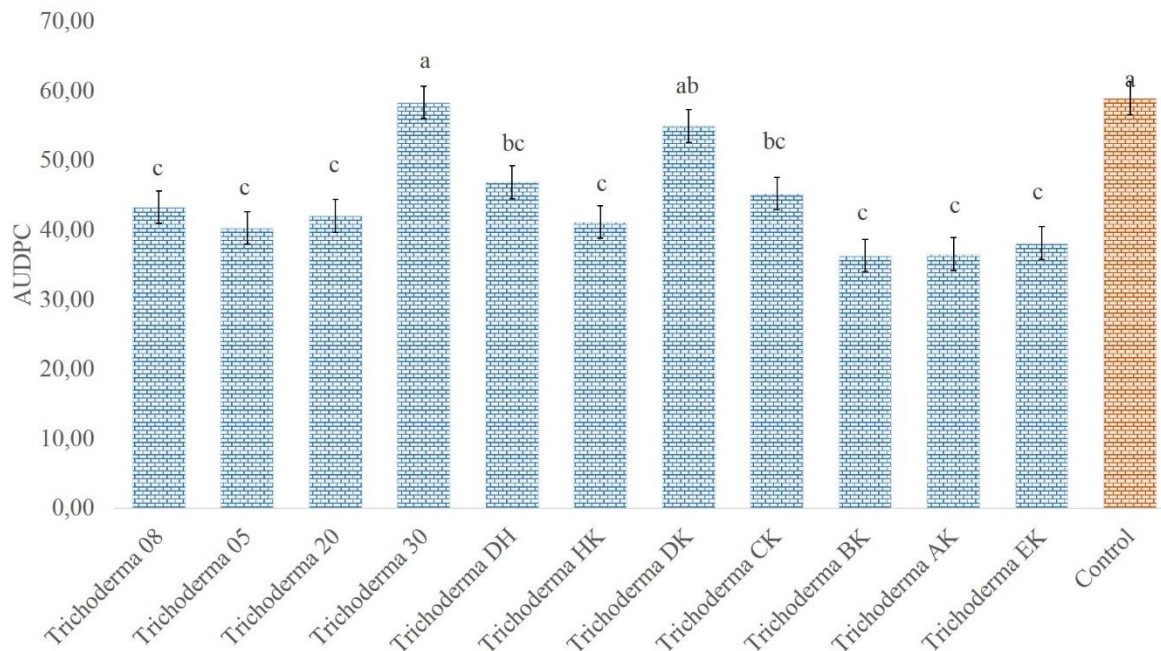
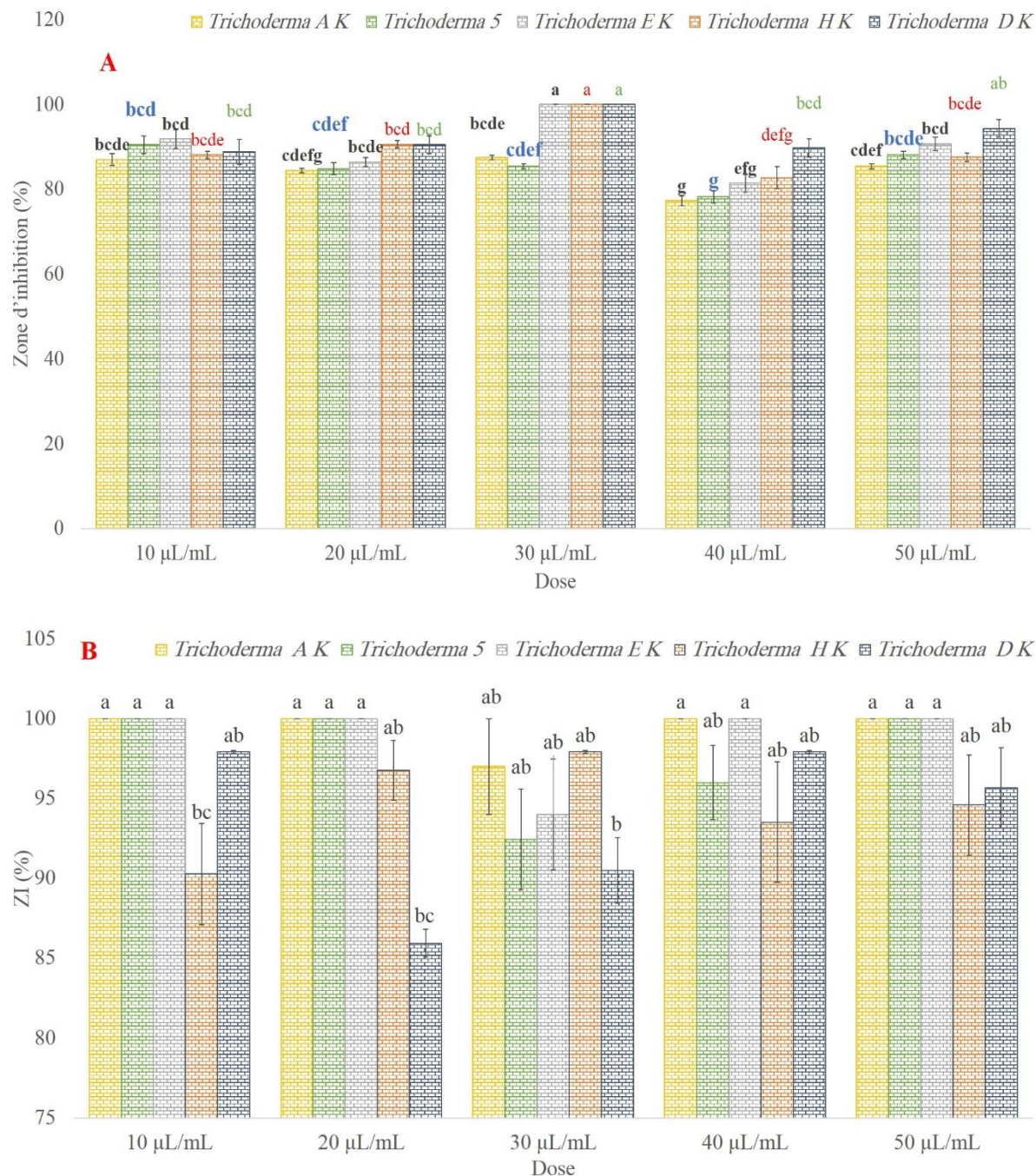


Figure 12. Résultats des tests antagonistes de trois espèces de *Trichoderma sp* in vivo. Les données sont les moyennes de 3 répétitions  $\pm$  ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à  $p < 0,05$ .

Dans des cas pareil, l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des espèces de *Trichoderma sp* a été complètement changé. L'aspect microscopique de *Trichoderma* DK et

*Trichoderma* 05 a devenu poudreux avec une coloration blanche. Bien qu'une inhibition de mycélium du Foc a été constatée à distance apparemment due à une sécrétion des métabolites secondaire dans le milieu de culture.



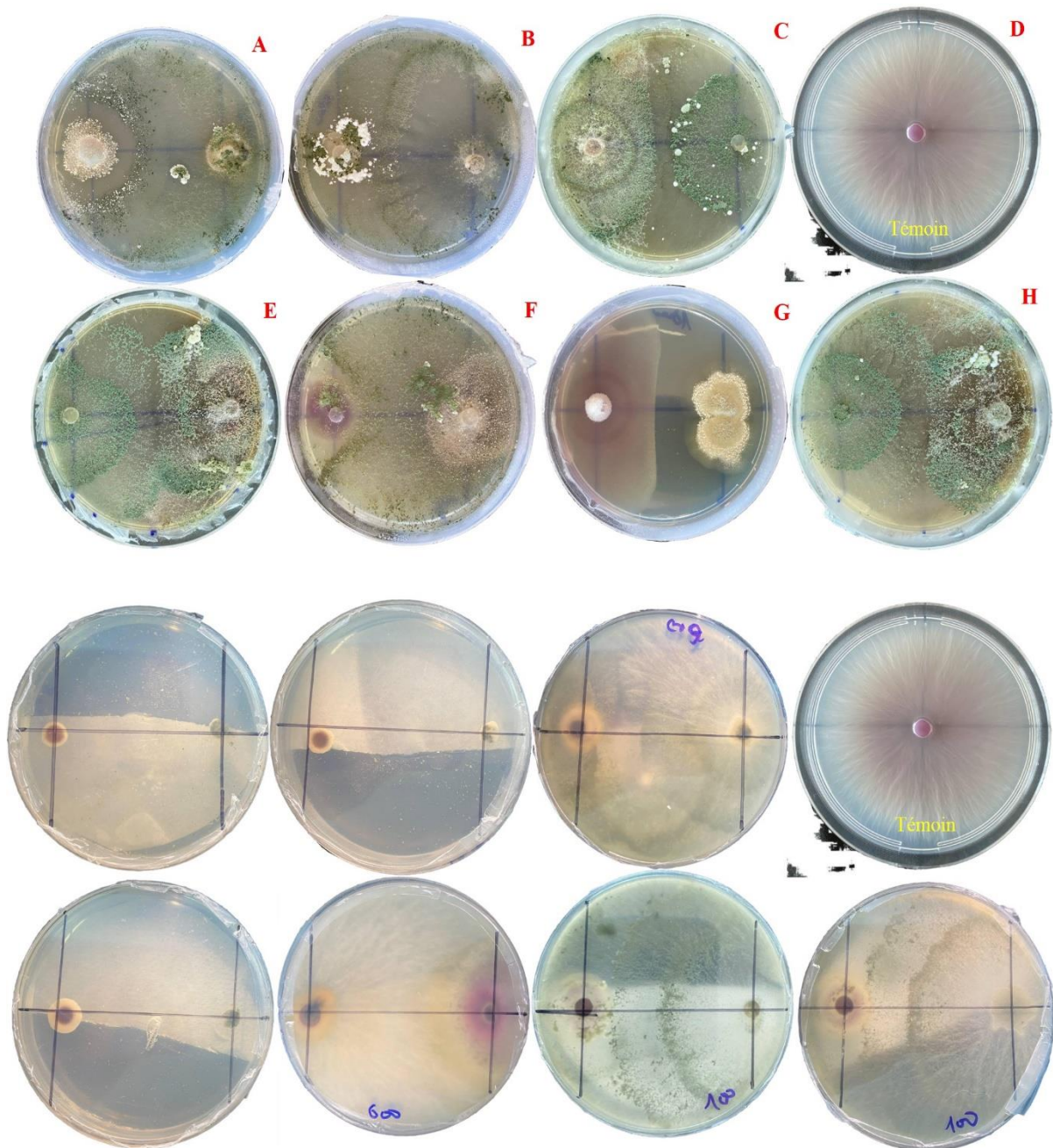
**Figure 13.** Résultats d synergisme de confrontations direct (A) et indirect (B) des souches de *Trichoderma* sp avec l'huile essentielle d'*E. globulus*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions ± ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

Un troisième aspect a caractérisé les souches du *Trichoderma* sp exposées à un stress de l'huile essentielle d'*E. globulus* représenté par un mycélium typique de *Trichoderma* sp porte



une poudre blanche avec une croissance mycélienne rapide provoque une zone d'inhibition très prononcée.

L'ensemble de souche a présenté des taux d'augmentation de la zone d'inhibition qui varie entre 0.11 et 27.02%. Sauf exception une diminution significative de la zone d'inhibition a été marquée pour la souche *Trichoderma* EK avec des taux de diminution variable entre 0.44 et 11.72%.



**Figure 14.** L'association *Trichoderma* sp et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans un test de contact direct et indirect.

	Test direct		Test indirect	
	Intervalle d'augmentation ou de diminution de la ZI (%)	Effet	Intervalle d'augmentation ou de diminution de la ZI (%)	Effet
<i>Trichoderma</i> A K	0,11-2,55	Synergisme	13,67-45,80	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 5	9,84-27,02	Synergisme	29,71-43,83	Synergisme
<i>Trichoderma</i> E K	0,037-66	antagonisme	1,90-46,96	Synergisme
<i>Trichoderma</i> H K	1,36/22,57	Synergisme	14,62/25,00	Synergisme
<i>Trichoderma</i> D K	10,58/24,44	Synergisme	6,95/21,85	Synergisme

**Figure15** Effet synergique des associations *Trichoderma sp* et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans un test de contact direct.

A propos le test de synergisme entre les espèces de *Trichoderma sp* et l'huile esentielle d'*E. globulus*, les résultats obtenus indiquent une augmentation des zone d'inhibtion pour toutes les souches et toutes les concentartions avec des taux variables entre 1.89 et 45.80%.

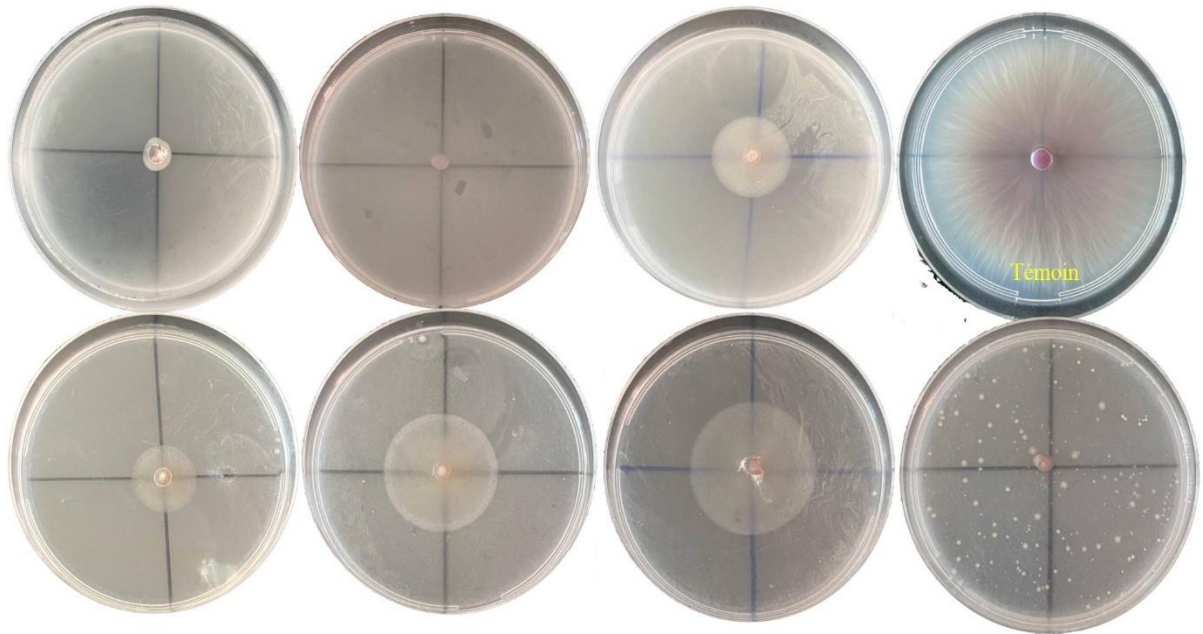
A ce titre la majorité des souvches ont présentées des effet synergisme dans les deux test direct et à distance (**figure 15**).

### 1.7. Analyse de synergisme entre filtrat de culture de *Trichoderma sp* et huile essentielle

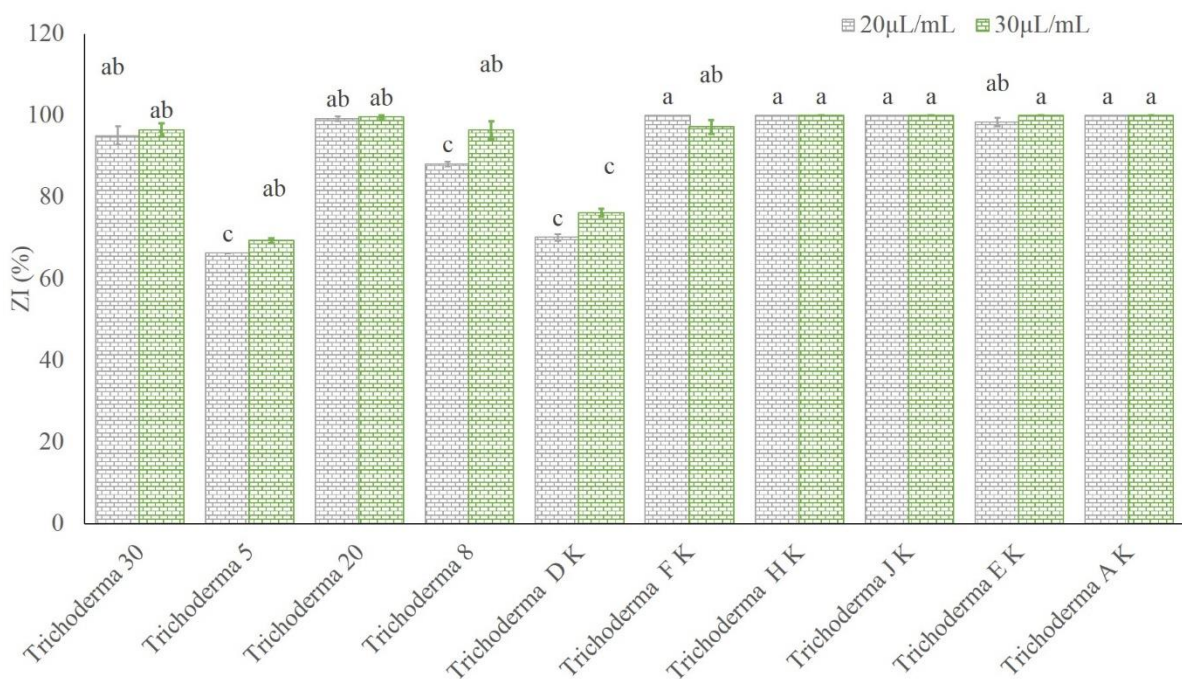
Les filtrats issus de Cinq espèces de *Trichoderma sp* ont été testés pour leur synergisme avec cinq concentrations de l'huile essentielle d'*E. globulus* envers la croissance mycélienne du Foc. En premier temps, les analyses statistiques par GLM démontrant un effet très hautement significatif de la dose de l'huile essentielle ( $F= 30,3$  ;  $P=0,000^*$ ) et la souche fongique ( $F=21$  ;  $P=0,000^*$ ) sur la zone d'inhibition du Foc.

Il ressort des résultats affichés sur la ( **Figure18**) que les traitements associés des filtrats de culture de *Trichoderma sp* avec les cinq concentrations de l'huile essentielle affectant considérablement la croissance mycélienne du Foc. Une zone d'inhibition marquante a été constatée avec des valeurs variables entre **77.29 et 100%** pour toutes les concentrations et pour toutes les souches du *Trichoderma sp*.

A la lumière des résultats obtenus, une augmentation de la zone d'inhibition a été constatée chez la majorité des espèces du *Trichoderma sp* testées sur un milieu de culture traité avec l'huile essentielle d'*E. globulus* en association avec les filtrats de culture de *Trichoderma sp*.



**Figure 15.** Effet des filtrats de culture de *Trichoderma sp* en association avec l'huile essentielle d'*E. globulus*.



**Figure 16.** Effet synergique des associations *Trichoderma sp* et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans un test de contact direct.



Espèce de <i>Trichoderma</i>	Huile essentielle		Effet
	20 µL/mL	30 µL/mL	
<i>Trichoderma</i> 30	50,26	50,98	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 5	62,65	64,28	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 20	05,57	5,94	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 8	-13,52	-3,73	antagonisme
<i>Trichoderma</i> D K	-11,49	-2,68	antagonisme
<i>Trichoderma</i> F K	73,79	73,04	Synergisme
<i>Trichoderma</i> H K	70,12	70,12	Synergisme
<i>Trichoderma</i> J K	19,08	19,08	Synergisme
<i>Trichoderma</i> E K	20,14	21,42	Synergisme
<i>Trichoderma</i> A K	15,64	15,64	Synergisme

**Figure 17.** Effet synergique des associations *Trichoderma* spp et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans les tests *in vivo*.

Traitement	Taux de diminution des maladies		Effet
	Individuels	Associée	
Espèces			
<i>Trichoderma</i> 08	26,55	63,27	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 05	31,63	64,83	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 20	28,67	60,16	Synergisme
<i>Trichoderma</i> 30	0,98	57,20	Synergisme
<i>Trichoderma</i> DH	20,48	64,83	Synergisme
<i>Trichoderma</i> DK	30,22	67,79	Synergisme
<i>Trichoderma</i> HK	06,77	70,76	Synergisme
<i>Trichoderma</i> CK	23,30	72,17	Synergisme
<i>Trichoderma</i> BK	38,41	63,41	Synergisme
<i>Trichoderma</i> EK	37,99	56,92	Synergisme
<i>Trichoderma</i> AK	35,31	70,05	Synergisme

**Figure 18.** Effet synergique des associations *Trichoderma* sp et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans un test de contact direct. Délibération

Un taux d'augmentation variable entre 15.64 et 50.26 % pour les souches disposées sur un milieu traité avec la concentration 20µL/mL et entre 5.94 jusqu'à 73.03% pour la

concentration de 30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . L'exception a été notée chez les deux espèces *Trichoderma* 8 et *Trichoderma* DK marquant une diminution de la zone d'inhibition variable entre 3.73 et 13.52%. Dans l'ensemble la majorité des souches ont exposées un effet synergisme avec l'huile essentielle d'*E. globulus* (figure 16).

### 1.8. Analyse de synergisme *in vivo*

L'étude de l'effet synergisme *in vivo* de l'huile essentielle en association avec les espèces de *Trichoderma sp* dévoile une augmentation de l'efficacité dans la diminution de la gravité de la maladie en comparaison avec les traitements individuels.



**Figure19.** Synergisme entre les espèces de *Trichoderma sp* et l'huile essentielles *E. globulus* (A. *Trichoderma* 8 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; B *Trichoderma* 5 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; C. *Trichoderma* 30 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; D. *Trichoderma* 10 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; E *Trichoderma* Dk 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; F *Trichoderma* Dh 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; G *Trichoderma* Hk 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ; H Témoin )

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 16.2 et 25,5 exprimant une diminution de sévérité de la maladie variable entre 56.92 et 70.76%. Tous les traitements associés ont élucidé une action synergétique positif contre le Foc *in vivo*.

#### 4. Discussion

En effet, les pesticides chimiques sont responsables de plusieurs problèmes de santé chez les êtres humains et les animaux. L'utilisation abusive des fongicides chimiques peut entraîner la pollution de l'environnement et avoir par conséquent l'émergence de pathogènes résistants aux fongicides. A cet effet, une réduction ou une élimination des applications des pesticides synthétiques dans l'agriculture est fortement souhaitable. Actuellement, la recherche des substances d'origine biologiques alternatives aux pesticides chimiques devient une nécessité. Des avancées ont été réalisées durant cette période à travers une plus grande compréhension des mécanismes de contrôle utilisés par les agents biologiques et les substances d'origine végétale. Les agents de contrôle biologique utilisés comme traitements des semences sont des micro-organismes et en particulier les *Trichoderma sp* protègent les semences et les semis de pathogènes variés.

Dans le présent travail, l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*E. globulus*, constitue une étude préliminaire sur la recherche de nouvelles molécules bioactives à intérêt pesticide. Les résultats des expériences sur le pouvoir fongicide sont très encourageants du fait qu'ils constituent une initiative sur des plantes médicinales à intérêt agronomique. Nos résultats ont également révélé l'efficacité de l'huile essentielle d'*E. globulus* dans le contrôle de la croissance mycélienne du Foc avec des taux variable entre 55.81 et 83.81% par la technique de contact direct et 66.13 à 75.04% par la technique de contact indirect.

Ces effets fongicides et fongistatiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* ont été déjà signalés pour la même espèces pathogènes (Moutassem *et al.*, 2019) et même pour d'autres phytopathogènes tels que *Alternaria solani* Sorauer, *Stemphylium solani* Weber et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Tomazoni *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). Selon les travaux de recherches précédents, ces effets sont associés à la forte concentration de cette huile en monoterpènes, sesquiterpènes, phénols aromatiques, oxydes, éthers, alcools, esters, aldéhydes et cétones. Cependant, dont la composition et la proportion exactes varient selon les espèces végétales (Salema *et al.*, 2018 ; Spadaccino *et al.*, 2021). L'activité fongicides des huiles d'*Eucalyptus globulus* est attribuée aux composants majeurs tels que ; 1,8-cinéole, citronellal, citronellol, acétate de citronellyle, *p*-cymène, eucamalol, limonène, linalol, a-pinène, g-terpinène, a-terpinéol, alloocimène , et aromadendrane (Watanabe *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1995, 1996 ; Cimanga *et al.*, 2002 ; Duc, 2004 ; Batish *et al.*, 2006 ; Su *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2008 ). Cependant, la bioactivité de l'huile essentielle dépend du type et de la nature



des constituants et de leur concentration individuelle (**Batish et al., 2008, Moutassem et al., 2019**).

Ces composants acides ont montré une activité inhibitrice élevée de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani* Sorauer, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum* (**Lu et al., 2008**). De plus, l'acide hexanoïque avait une action fongicide contre le *Botrytis cinerea* dans les conditions *in vitro* et *in vivo* (**Leyva et al., 2008**).

Un des facteurs intervenants sur l'intensité de l'action antifongique des huiles essentielles est la concentration appliquée, ceci a été généralement confirmé *in vitro* et *in vivo*. Ceci a été évident dans notre étude, où nous avons remarqué que le taux d'inhibition de la croissance mycélienne, augmente significativement avec l'augmentation de la concentration. La diversité des composés à intérêt antifongique implique nécessairement la variabilité dans leurs modes d'action sur les organismes phytopathogènes. En effet, les huiles essentielles influencent les cellules fongiques par plusieurs mécanismes tels que ; la membrane cellulaire, les systèmes enzymatiques, le matériel génétique, la force motrice des protons, flux d'électrons, le transport actif et le contenu cellulaire (**Oussalah et al., 2006, Viuda-Martos et al., 2011, Burt et al., 2004**). Les huiles essentielles sont des composées hydrophobes, elles peuvent pénétrer dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire et de la mitochondrie, provoquant une déformation de leur structure et les rendant plus sensibles à la perforation (**Sikkema et al., 1995, Badawy et Ab-delgaleil, 2014**).

Le 1.8-cinéole provoquent des modifications importantes dans les constitutions des parois cellulaires, la dégradation de la membrane plasmique, le rétrécissement des cellules, la condensation du contenu cytoplasmique, la fuite intracellulaire et l'effondrement cellulaire (**De Sousa et al., 2015, Moutassem et al., 2019**). Le limonène a un effet inhibiteur très remarquable sur l'activité de la pectine méthyl estérase PME et de la cellulose (**Marei et al., 2012**). Alors que, le  $\alpha$ -pinène et le limonène inhibent le développement précoce des racines et provoquent des dommages oxydatifs dans les tissus radiculaires grâce à une augmentation de la production de ROS, une peroxydation élevée des lipides, une interruption de l'intégrité membranaire et une inhibition du transport des électrons (**Sing et al., 2006**).

Dans notre étude, le traitement des plantules du pois chiche par la formulation de l'huile essentielle d'*E. globulus* a suivi la même tendance que le traitement *in vitro* et les résultats obtenus montrent la diminution de la gravité de la maladie en fonction le mode d'application et la concentration appliquée de l'huile essentielle.

Le mécanisme de suppression des maladies *in vivo* par les huiles essentielles et les agents de bio-contrôle ont suggéré que les principes actifs présents peuvent soit agir directement sur l'agent pathogène ou induire une résistance systémique chez les plantes hôtes résultant dans la

réduction du développement de la maladie (**Belabid et al., 2010, Moutassem et al., 2019, Moutassem, 2020**). Ce constat, conduit à l'hypothèse que ces bio-fongicides influençant la population du Foc résidant le sol en diminuant sa quantité et dépréciant sa qualité. Les résultats obtenus sont en accordances avec ceux obtenus par **Moutassem et al. (2019)** rapportent l'efficacité des huiles essentielles de six plantes médicinales sur le Foc avec des taux variables selon l'huile essentielle et la concentration utilisée. Les résultats obtenus par ces chercheurs sont attribués à l'induction des mécanismes de résistances de plantules de pois chiche contre le Foc notamment l'augmentation des taux des polyphénols et des flavonoïdes chez les plantules traitées.

Les résultats obtenus peuvent être justifiées par les travaux de **Belabid et al. (2010)** qui ont démontré que le traitement avec les différentes formulations des huiles essentielles a significativement réduit les densités de la population de Fol agent de la fusariose vasculaire de la lentille et par conséquent l'incidence de la maladie dans les conditions de laboratoire. Par ailleurs, les formulations des huiles essentielles peuvent affecter les mécanismes physiologiques de la plante hôte en surmontant les mécanismes des défenses de la plante contre les bioagresseurs.

Les résultats de l'accumulation des polyphénols et des flavonoïdes sous l'effet des huiles essentielles mis en évidence que ces biofongicide assurant une bonne protection de la plante contre le Foc. L'accumulation des polyphénols et des flavonoïdes a été démontrée chez plusieurs espèces végétales et dans plusieurs situations de stress biotique et abiotiques (**Clériver et al. 1996**). Toutefois, l'accumulation de ces composés joue un rôle déterminant dans la mise en place des mécanismes de défense contre les phytopathogènes (**Clériver et al., 1996**). En effet, l'accumulation des phénols permis la protection de la membrane cellulaire et impliquent principalement la lignification des parois cellulaires en empêchant la pénétration et la progression des pathogènes, ce qui explique une partie la diminution de la sévérité de la maladie après le traitement par différentes huiles essentielles observés dans nos expériences (**Wang et al., 2008, Jin et al., 2011, Ben-Jabeur et al., 2015**)

La présente étude s'intéresse par l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'effet biocide de quelques espèces indigène de *Trichoderma sp* ainsi que leurs métabolites secondaires sur la fusariose vasculaire du pois chiche. Dans les conditions *in vitro*, les résultats relatifs à l'effet antagoniste des différentes espèces du *Trichoderma sp* présentent une importante efficacité à l'égard du Foc. Nos résultats dévoilent l'efficacité soit en tests directs et indirects. Dans ce cadre, la zone d'inhibition obtenue varie entre 24.12 et 81.84% pour les tests directs et dans les tests indirects. Cependant, il est très évidant que l'effet inhibiteur des filtrats de culture de *Trichoderma sp* extraites à partir des espèces antagonistes vis-à-vis le Foc. Ces filtrats inhibent

significativement la croissance mycélienne du Foc, à des concentrations supérieures à 26%. Par ailleurs, les résultats de la présente étude ont révélé que les tests indirects des espèces de *Trichoderma sp* testées ont inhibé d'une manière significative la croissance mycélienne du Foc, alors que la gamme d'inhibition est comprise entre 71.25 et 100%. 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%.

Ces résultats indiquent la grande compétitivité des espèces de *Trichoderma* envers le Foc. Les observations microscopiques au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes montrent une grande altération du mycélium du Foc, une excellente lyse, une transformation dans les cordons des filaments mycéliens et l'enroulement du mycélium de *Trichoderma sp* sur celle du pathogène.

Ceci est analogue aux résultats antérieurs, rapportant que les *Trichoderma sp* inhibent la croissance du phytopathogènes cibles grâce à sa vitesse de croissance comparé avec celle pathogènes (compétition pour l'espace et les nutriments) (Dubey et al., 2007., Nassr et Barakat 2013 ; Hammad et al., 2021; Younesi et al., 2021; Mukherjee et al., 2022 ; Asad 2022) ; mycoparasitisme (enroulement et pénétration des hyphes) et l'antibiose sous forme de lyse des cellules et des spores des hyphes, dénaturation et rupture des hyphes (Dubey et al., 2007 ; El-Debaiky, 2017 ; Younesi et al., 2021 : Mukherjee et al., 2022 ; Asad 2022). La réduction des concentrations de nutriments conduit généralement à une diminution de la germination des conidies et à une croissance plus lente des germes pathogènes (Asad, 2022).

En effet, le mycoparasitisme implique l'enroulement des hyphes autour de l'agent pathogène, la pénétration, la production d'haustoria et la lyse des hyphes. Ce phénomène, débute le plus souvent par un développement des hyphes en direction du pathogène, l'établissement de contact, enroulement et pénétration (Chet, 1998 ; Dubey et al., 2007 ; Mukherjee et al., 2022). Par la suite, l'interaction entraîne des événements séquentiels, y compris la pénétration et la destruction de l'hôte, dus à la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire telles que les chitinases; les  $\beta$ -1,3-glucanases; les  $\beta$ -1,4-glucanases; les  $\beta$ -1,6-glucanases; les protéases; et xylanases (El-Debaiky, 2017; Dubey et al., 2007 ; Mukherjee et al., 2022, Toghueo et al., 2016). Cette constatation laisse à suggérer que l'activité antagoniste de nos isolats (*Trichoderma* BK et *Trichoderma* EK) contre le Foc peut être provoquée par des enzymes lytiques et des composés antifongiques.

Les travaux de recherche antérieurs ont rapporté que *T. atroviride*, *T. virens*, *T. viridicens* 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 ; Moutassem et al., 2020). 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. 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**). Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par **Reithner et al., (2007)**. Des changements morphologiques profonds ont été apportés sur le mycélium de *B. ceneria* et *R. solani* par *T. atroviride*, afin de provoquer une zone d'inhibition supérieure à 75%. Par ailleurs, **Daryaei et al. (2016)** signalant l'efficacité antagoniste de *T. atroviride* contre *Rhizoctonia solani*, où cette espèce provoque une inhibition de la germination et la sporulation avec un taux supérieur à 65%.

Regardant les données sur la confrontation indirect, nous pouvons également anticiper que le *Trichoderma* inhibe la croissance mycélienne du Foc par la fabrication de substances volatiles. Des résultats antérieurs énoncent que l'antibiose est l'un des mécanismes importants impliqués dans la lutte biologique contre Foc (**Dennis et Webster, 1971 ; Dubey et al., 2007, Moutassem et al., 2020**). En effet, l'antibiose est un mécanisme d'antagonisme induit par des métabolites secondaires spécifiques ou non spécifiques d'origine fongique, par des substances volatiles et d'autres composés toxiques (**Dennis et Websters, 1971, Toghueo et al., 2016, Mukherjee et al., 2022 ; Asad 2022**).

Les composés volatiles produits par *T. atroviride* provoquent l'inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora sojae* (**Ayoubi et al., 2014**), dont la zone d'inhibition constatée est de 49.08%. L'espèce *T. virens* a été testée dans de nombreuses expériences afin de contrôler différents champignons phytopathogènes par le test direct et indirect, tels que *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Sclerotinia spp.* et *Sclerotium spp.*, avec des résultats encourageants (**Sarrocco et al., 2006**).

Différentes concentrations d'extrait de filtrats de culture de *Trichoderma* sp ont été analysées pour leur pouvoir antagoniste contre le Foc *in vitro*. Ce test a été effectué par la technique d'empoisonnement de milieu de culture PDA. L'activité antagoniste très prononcée des filtrats de la culture de *Trichoderma* varie en fonction l'espèce fongique et la concentration utilisée. Par ailleurs, cette efficacité augmente au fur et à mesure l'augmentation de la concentration. Ces résultats sont en accord avec les rapports précédents rapportés par (**Mathew et Gupta, 1998 ; Ezziyani et al., 2009; Srideepthi et Krishna, 2015**).

Des résultats similaires obtenus par inhibition similaire de la croissance des colonies de *F. oxysporum*, *P. capsici* et *R. solani* par *T. asperellum* a été signalé plus tôt (El Komy et al., 2015; Jiang et al., 2016). Les filtrats de culture de *T. asperellum* a montré une inhibition significative sur trois phytopathogènes.

Le succès de *Trichoderma* en tant qu'agent de lutte biologique contre diverses phytopathogènes, est associée à la production d'un nombre excessif de composés et de métabolites bioactifs, y compris les métabolites secondaires (Zeilinger et al., 2016; Li et al., 2018). Ces rapports confirment les résultats de notre travail actuel selon lequel les métabolites secondaires extraits à partir des *Trichoderma* sp ont montré une réduction significative de la croissance mycélienne de Foc. Cependant, la variation observée de l'activité fongicide des *Trichoderma* pourrait être attribuée aux différents types de composés chimiques produits par les différentes espèces.

Nos résultats montrent l'effectivité de toutes les espèces de *Trichoderma* sp testées *in vivo*, par conséquent réduisent la sévérité de la fusariose du pois chiche dans les conditions contrôlées. Les résultats obtenus indiquent la diminution de la sévérité de la maladie avec des pourcentages qui s'étalent entre 36.01% jusqu'à 65.25%. *in vivo*, l'efficacité des *Trichoderma* sp pourrait être attribuée à la réduction de la population du Foc du sol d'une part certifiant ainsi l'activité antifongique des espèces de *Trichoderma* sp *in vitro* et à l'induction de la résistance systémique chez la plante hôte d'autre part.

Une grande variété de métabolites biologiquement actifs sont produites par les *Trichoderma* sp pour exclure les agents pathogènes selon plusieurs modes d'action tels que la compétition pour l'espace et le nutriment ainsi que par l'antibiose (Sharma et al., 2017). De même, Vinale et al., (2012) suppose que les *Trichoderma* induisent la production de métabolites secondaires toxiques qui engendrent une activité antifongique par la stimulation de la défense des plantes et renforçant la croissance des plantes. Pendant la coaction plante-*Trichoderma* sp, divers éliciteurs sont libérés peuvent stimuler divers types de signaux transmis dans la plante tels que l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'éthylène ou les espèces réactives de l'oxygène, qui par conséquent génèrent l'expression de molécules de défense (NawJain, A., Singh, A., Singh, S., Singh, H. B. (2015). Phenols enhancement effect of microbial consortium in pea plants restrains *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 89: 23–32rocka et al., 2013; Abdelrahman et al., 2016).

Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par Moutassem et al. (2020) exposent l'efficacité des *Trichoderma* sp avec des seuils variables entre 50 et 89% de diminution de la sévérité de flétrissement vasculaire de pois chiche. Les résultats obtenus corroborent ceux obtenus par Bourguda et Bouznad (2009) qui ont utilisé le traitement de la semence par les

isolats de *Trichoderma* spp avant le semis dans un sol préalablement infesté par le Foc a abouti à une réduction significative de l'indice de maladie par rapport au témoin non traité. L'indice de maladie le plus faible est obtenu avec l'isolat *T. atroviride*, avec un pourcentage de réduction environ 83.92% de l'indice de maladie par rapport au témoin.

Les résultats obtenus corroborent ceux obtenus par **Bourguda et Bouznad (2009)** qui ont utilisé le traitement de la semence par les *Trichoderma* sp., avant le semis dans un sol préalablement infesté par le Foc a abouti à une réduction significative des taux de la maladie par rapport au témoin non traité. Parallèlement à la réduction de l'incidence de la maladie, une stimulation de la croissance végétale du pois chiche est observée concernant la hauteur de la tige, le poids frais et le poids sec de la partie aérienne sous l'effet des isolats de *Trichoderma* sp. , utilisés. Les mêmes résultats obtenus par **Trivedi et al. (2013)** après le traitement des variétés sensibles avec plusieurs souches de *Trichoderma*. La fréquence de la maladie a été réduite de 23 jusqu'à 53.5% selon la souche. Cependant, **Irum (2007)** a signalé que les résultats de la suppression du flétrissement vasculaire du pois chiche en utilisant les microorganismes sont plus efficaces qu'en utilisant le carbendazim ou le bénomyl, qui sont deux produits chimiques très efficaces contre le Foc.

Fait intéressant, même lorsqu'elle est appliquée à des concentrations élevées, cette huile essentielle n'a pas montré des actions fongitoxique et fongistatiques contre les champignons bénéfiques *Trichoderma* sp, des antagonistes largement utilisés dans la lutte biologique contre phytopathogènes, notamment ceux présents dans le sol. Nos résultats montrent que les associations des *Trichoderma*/huile essentielle d'*E. globulus* que nous avons testé ont montré de forts effets synergiques, étant plus toxique que toutes les huiles essentielles et les *Trichoderma* appliquées individuellement.

Les tests directs exécutés en milieu amendées par les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*E. globulus* a augmenté la zone d'inhibition contre le Foc et maintien le processus de parasitisme. Nos résultats dénoncent aussi une augmentation de la lyse des hyphes du pathogène dans la zone de contact entre les deux protagonistes. L'effet inhibiteur des filtrats de la culture de *Trichoderma* a été augmenté avec des fréquences variables entre 10 à 15% lorsqu'elle est appliquée en association avec l'huile essentielle d'*E. globulus* avec les concentrations 5 et 10  $\mu\text{L/mL}$ . Ces résultats sont attribués aux effets bénéfiques des huiles essentielles dans l'augmentation de la croissance mycélienne et le taux de la sporulation. L'analyse des données montre aussi une augmentation de la production des métabolites secondaires chez les espèces de *Trichoderma* sp en culture liquide amendée avec les huiles essentielles d'*E. globulus*, ce qui témoigne l'augmentation de l'efficacité des *Trichoderma* sp contre le Foc *in vitro* et *in vivo*.



Nos résultats indiquent une diminution significative de la gravité de la maladie avec des fréquences variable e50.92 et 72.17%. En comparaison avec les traitements individuels. Ces constatations peuvent être expliquées par l'effet synergique des composés des huiles essentielles en association avec les composés d'origine fongiques. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. Ces substances peuvent agir différemment sur les voies de signalisation les d'induction des mécanismes de résistance des plantules de pois chiche contre le Foc. Dans ce cadre, les molécules antimicrobiennes en combinaison avec les dérivés de plantes améliorent à la fois le spectre d'activité et le degré d'inhibition due à des effets synergiques.

Ces résultats sont probablement expliqués par l'augmentation de l'activité des précurseurs de synthèse des polyphénols chez les plantules reçues un traitement combinés comparativement aux traitements individuels. Nos résultats sont analogues à ceux obtenus par **Singh et al. (2014)**, dont ils ont démontré l'augmentation des taux des polyphénols chez les plantules de pois chiche traitées avec les associations *Pseudomonas/T. harzainum* envers *Sclerotium rolfisii* en comparaison avec les traitements individuels. La quantité d'acide shikimique variait de 848.7 à 6288µg/g, acide gallique 66.9 à 210µg/g, acide t-chlorogénique 24.2 à 168.3 µg/g, acide tannique 58.1 à 129.1 µg/g, acide syringique de 17.27 à 576.7 µg/g pour les traitements individuels. Cependant, les traitements associés sont avérés plus efficaces et surmontent plus le taux des polyphénols, où l'acide shikimique s'était accumulé 7,41 fois, acide t-chlorogénique, 3 fois, acide férulique 17.6, myricétine 2.5 fois, quercétine 1.3 fois et acide syringique 11.3.

De même **Jain et al. ( 2015)** suggèrent que les taux des précurseurs des phénols représentés par l'acideshikimique, acide gallique, acidechlorogenique, acide syringique,acide p-coumarique, acide cinnamique, acide salicylique, myricitine et le quercitrine sont nettement augmentés chez les plantules de petits pois traitées avec un mélange de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *T. harzianum* comparativement aux traitements individuels et/ou bi traitements. Par contre, une diminution dans les taux de ces derniers chez les témoins inoculés comparativement aux témoins négatifs.

A titre de l'exemple les taux de l'acide shikimique sont nettement augmentés trois fois et 4 fois plus chez les plantules de petits pois subissent des traitements avec 2 (14972 µg/g) et trois (15093.3 µg/g) agents dans lutte biologique, en comparaison avec les témoins non traités (2939.9) et les traitements individuels *B. subtilis* (6654.3µg/g), *P. aeruginosa* (8386.8µg/ g) et *T. harzianum* (10166.5µg/g). Dans ces plantes, l'acide shikimique est non seulement converti en d'autres phénols dans la filière, mais se forme également via l'érythrose-4-phosphate pour

fournir des plantes avec un flux continu de précurseur phénolique pour lutter contre les agents pathogènes envahissants.

Les plantes traitées avec un consortium composé de trois microbes ont enregistré une augmentation de 2.73 et 2.45 fois leur teneur en acide synergique par rapport aux témoins inoculé et non inoculé, respectivement (**Jain et al., 2015**). Les modifications des composés phénoliques dans les tissus du pois indiquent que la réponse induite par les BCA est de nature systémique, par conséquent, modifiant l'état physiologique de la plante. Par conséquent, le niveau de la protection a significativement augmenté.

Ces résultats sont analogues avec celles obtenue par **El-Sharkawy et al. (2018)** rapportent une augmentation des phénols totaux dans les plantules traitées avec les différentes espèces de *Trichoderma sp.* Ces taux sont de l'ordre de 331.2 et 314.9 µg/g. Cette valeur devenue supérieure environ (413.9 µg/g) pour le traitement combiné des plantules avec *Trichoderma sp.*

Ces résultats sont similaires aux résultats de certaines études précédentes, qui rapportent l'effet très positif des traitements combinés des extrais bioactif des plante et agents biologiques contre une multitude des agents phytopathogènes par rapport aux traitements individuels par les extrais ou les agents biologiques. Ces dernières études ont prouvé l'effet dans la réduction de la gravité des maladies des plantes.

En effet, des études récentes menées par **El-Sharkawy et al. (2018)** indiquent l'efficacité une diminution de la sévérité de la maladie environ 57.15% après le traitement des plantules par *T. harzianum*, la même fréquence après le traitement par un mélange de champignons mycorhiziens et plus de 85.71% avec un traitement combiné de *T. harzianum* et le mélange champignons mycorhiziens.

Les recherches effectuées par **Larkin, (2016)** indiquent l'augmentation de la population de *T. virens* et *T. harzianum* dans le sol prétraité avec des formulations à base de *T. harzianum* et *T. virens* en provoquant la diminution de la population fongique de *Rhizoctonia*, par conséquent diminuant sa sévérité avec des valeurs qui sont supérieures à 16%.

En effet, le pouvoir de lutte intégrée a été mis en évidence par les extrais botanique avec les bactéries antagonistes (**Akila et al., 2011**), les extrais avec champignon, bactéries avec les huiles essentielles le mélange huile essentielle/champignons (**Abdel-Kader et al., 2013**), champignons (**Omomowo et al., 2018**) et champignons x bactérie x fongicides (**Dubay et al., 2015**).

Cette dernière constatation est en accord avec les résultats publiés récemment par **El-Mougy et al. (2015)** qui rapportent une diminution significative de l'incidence de la pourriture racinaire induite par le complexe de flétrissement *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*,



*Sclerotium rolfsii* et *Macro phomina* après le traitement par l'huile essentielle de Thym et *T. harzianum* en association comparé avec les traitements uniques. Les fréquences de la maladie obtenue sont environ 16.4% pour le traitement par huile de thym et de, 12,2% pour le traitement par *T. harzianum* et 11.4% pour le traitement huile de thym+*T. harzianum* en association.

Dans les conditions de laboratoire la combinaison *Trichoderma*+huile essentielle augmente significativement l'activité antagoniste (**Abdel-Kader et al., 2011**) contre *Sclerotinia sclerotiorum*. La croissance mycélienne de ce pathogène en traitement combiné *T. hazianum* +huile essentielle de thym est de 34.79, 56.53 et 78.27% à la concentration 0.25, 0.5 et 1% de thym respectivement comparé avec le témoin non traité, respectivement. Cependant, ces valeurs sont de l'ordre de 10, 15 17 en traitement individuels. Par ailleurs, ces valeurs sont avérées faibles environ 45.65, 76.08 et 76.09% en cas de traitement combiné *T. viride* + huile essentielle de thym.

Les études *in vivo* portées sur l'effet des extraits de *Azerdica indica* et *T. harzianum* en traitement combiné contre le Foc ont montré une efficacité supérieure à celle des traitements individuels ou équivoque à celle des traitements par les pesticides (**Hossain et al., 2013**). L'incidence enregistrée est de 16.67% après un traitement par *T. harzianum*, 15,47% par le traitement *Azerdicaindica* et 13.09% après un traitement combiné *T. hazianum*+extraits d'*Azerdica indica* comparés avec le contrôle sans traitement 22.61%.

Une augmentation de l'efficacité des traitements combinés à base de bactérie et extraits botanique comparés par le traitement unique contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* a été constaté (**Akila et al., 2011**). Les résultats obtenus indiquent des taux de diminution environ 9% par le traitement extraits botanique, 37–45% avec le traitement avec les agents biologiques et plus de 63% de réduction avec le traitement combiné.

Dans le même ordre des idées, **Muthukumar et al. (2010)** ont rapporté l'augmentation de niveau de protection de *Capsicum annum* contre *Pythium aphanidermatum* en traitements associés des agents de lutte biologique et extraits de plantes comparées avec le traitement individuel. Le traitement des semences par les extraits d'*Allium cepa* L. et *Allium sativum* L, *T. viride* et les extraits+*T. viride* en traitement combiné ont diminué significativement l'incidence de la maladie avec des fréquences de 36.8, 37.3 et 44.9%, respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Adandonon et al. (2006)**. Toutefois, le traitement des semences par l'extraits de *Moringa oleifera* associée avec le *Trichoderma sp* a entraîné un accroissement de niveau de protection environ avec environ 72% de l'espèce *Vigna unguiculata* contre *Sclerotium rolfsii*, avec une augmentation significative du rendement sur le terrain. Cependant, ce niveau est supérieur à 52% après le traitement avec l'extraits de *Moringa oleifera* et de 53.57 % après le traitement par *Trichoderma sp* en traitements individuels.

Les travaux de **Zamani-Zadeh *et al.* (2014)** témoignant nos résultats. Les traitements combinés de fraise avec *Lactobacillus plantarum* + l'huile de cumin (50 uL/L) et *Lactobacillus plantarum*+ l'huile de thym (100 µL/L) a entraîné une amélioration remarquable de niveau de protection contre les infections de *Botrytis cinerea*, en comparaison avec l'application de *Lactobacillus plantarum* ou l'huile essentielle en traitement individuels.

Des résultats contradictoires ont été obtenus par **Abo-Elyousr *et al.* (2014)**. Ces travaux indiquent que le traitement par l'huile de thym a montré une grande efficacité sur le flétrissement environ 83.3% comparé avec le traitement combiné *Glomus mosseae*+huile de thym 72.2%.

## **CONCLUSION**

---

Aujourd'hui, le phénomène de la résistance aux pesticides chimique prend rapidement l'ampleur à travers le monde. Par conséquent, les perspectives d'application des pesticides à l'avenir sont devenues difficiles et incertaines. Les huiles essentielles d'origine végétale et leurs phytoconstituants sont des sources remarquables de nouveaux composés bioactifs aux propriétés antifongiques à large spectre d'action. Ces composés peuvent exercer une action homosynergique ou interagir d'une manière synergique avec d'autres agents de lutte biologique et en particulier les *Trichoderma sp* et ces molécules bioactives.

L'objectif de cette recherche expérimentale, est de mettre en évidence l'efficacité potentielle de l'huile essentielle d'*E. globulus*, ainsi que les agents de lutte biologique des *Trichoderma* vis-à-vis le Foc *in vitro* et *in vivo* en traitement individuels et associés sur le flétrissement vasculaire. Ce travail s'intéresse à l'effet synergique entre les agents de lutte biologique et leurs biomolécules et l'huile essentielle d'*E. globulus* dans les conditions *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats des tests *in vitro* exposent un effet inhibiteur très remarquable de l'huile essentielle d'*E. globulus* sur la croissance mycélienne du Foc. En traitement direct, la zone d'inhibition varie entre 55.81 et 83.81%, alors qu'elle est variable entre 66.13 et 75.04% en traitement indirect. En même titre que l'huile essentielle, les *Trichoderma* exercent une action inhibitrice contre le Foc *in vitro*, dont les zones d'inhibitions sont variables entre 71.25 et 100% en test de confrontation direct et entre 24.12 et 81.84% pour le test de confrontation indirect. Les filtrats de culture des *Trichoderma* inhibent significativement la croissance mycélienne du Foc, bien que l'efficacité est en fonction l'espèce de *Trichoderma sp*. 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 56 et 100% pour la C1, 26 et 100% pour la C2, ainsi que entre 26 et 100% pour la C3.

L'analyse de l'effet de l'association huile essentielle et *Trichoderma sp* expose des modifications parfois profondes sur l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des souches fongiques. Les souches de *Trichoderma* présentent un aspect de stress évoqué par un mycélium typique de *Trichoderma sp* porte une poudre blanche avec une croissance mycélienne rapide et une zone d'inhibition très prononcée. A propos le test de synergisme entre les espèces de *Trichoderma sp* et l'huile essentielle d'*E. globulus*, les résultats obtenus indiquent une augmentation de la zone d'inhibition pour toutes les souches et toutes les concentrations avec des taux qui varient entre 1.89 et 45.80%. Les traitements associés des filtrats de culture de *Trichoderma sp* avec les cinq concentrations de l'huile essentielle affectant considérablement la croissance mycélienne du Foc. Une zone d'inhibition marquante a été constatée avec des

valeurs variables entre 77.29 et 100% pour toutes les concentrations et pour toutes les souches du *Trichoderma*. Ces résultats marquant un synergisme positif entre les deux produits biologiques testés, effectivement manifesté par une réduction de la zone d'inhibition avec des fréquences variables entre 15.64 et 73.03% d'augmentation.

Le traitement biologique des plantules de pois chiche confirme les résultats obtenus *in vitro*, voir diminuer la gravité de la maladie représentée par les valeurs de l'AUDPC et qui sont variables entre 20.5 et 37.7 expriment des diminutions variable entre 36.01% jusqu'à 65.25%. Par ailleurs, ces valeurs sont de l'ordre de 36.58 et 58.5 chez les plantules contrôlées par les différentes espèces de *Trichoderma sp* manifestant par conséquent une réduction de la gravité de la maladie avec des taux qui s'intercale 0.98% et 38.41 %. L'association des traitements a mis en évidence un synergisme très intéressant se traduit par une diminution très significative de la gravité de flétrissement vasculaire plus supérieur en comparaison avec les traitements individuels. Les fréquences de diminution sont variables entre 50.92 et 72.17%.

Des développements récents de stratégies de lutte innovantes ont été mis en œuvre pour améliorer l'efficacité des traitements biologiques contre les phytopathogènes. Ce modeste travail que les métabolites phytochimiques bioactifs présents dans les huiles essentielles interagissent d'une manière synergique avec celle des agents biologiques pour médire l'activité antifongique du Foc.

Ces avancées méritent d'être mieux exploiter, et consolider par d'autres travaux de recherches portant les mêmes objectifs. Les perspectives de cette étude s'inscrivent d'une part à des études très approfondies portées sur les analyses moléculaires des souches et les biomolécules responsables de l'effet synergétique, et la recherche de d'autres techniques de lutte innovantes basées sur le synergismes approuvé .

**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. Abdel-Kader M.M., El-Mougy, N.S., Aly M.D.E., Embaby, E.I. (2011). Occurrence of Sclerotinia Foliage Blight Disease of Cucumber and Pepper Plants under Protected Cultivation System in Egypt II. Bio-Control Measures against Sclerotinia Spp. in Vitro. *Advances in Life Sciences*, 1(2): 59-70.
3. Abdel-Kader, M.M., Abdel-Kareem, F., El-Mougy, N.S., El-Mohamady, R.S. (2013). Integration between Compost, *Trichoderma harzianum* and Essential Oils for Controlling Peanut Crown Rot under Field Conditions. *Journal of Mycology*
4. Abo-Elyousr, K.A.M., Mohamed, A.A., Seleim, Abd-El-Moneem K., M.H., Frag A.S. (2014). Integrated effect of *Glomus mosseae* and selected plant oils on the control of bacterial wilt disease of tomato. *Crop Protection*, 66: 67-71.
5. Abo-Elyousr, K.A.M., Mohamed, A.A., Seleim, Abd-El-Moneem K., M.H., Frag A.S. (2014). Integrated effect of *Glomus mosseae* and selected plant oils on the control of bacterial wilt disease of tomato. *Crop Protection*, 66: 67-71.
6. Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, 57: 175–183
7. Akira, I., Tomohiro, M., Tetsuro, F., Takalshi, Y. (1999). Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9: 3393-3396.
8. 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.
9. Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104 (1): 21–29.
10. Asad S. A., 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. *Ecological Complexity* 49: 100978.
11. 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.

12. Ayoubi, N., Zafari, D., Mirabolfathy, M. (2014). Evaluation of  $\beta$ -1,3-glucanase and  $\beta$ -1,4-glucanase enzymes production in some *Trichoderma* species, Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2013.862457.
13. Badawy, M.E.I., Abdelgaleil, S.A.M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. Industrial Crops and Products, 52:776–782.
14. 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.
15. 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.
16. Bartholomew, N.A., Emylia, J.T., Chibuzor, N., 2017. Preventive and curative control of Sclerotium rot disease of cocoyam cormel (*Colocasia esculenta* [L., Scott]) using plant extracts and *Trichoderma koningii*. J. App. Biol. Biotechnol. 5, 40–44.
17. Belabid, L., Simoussa, L., Bayaa, B. (2010). Effect of some plant extracts on the population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, the causal organism of lentil wilt. *Advances in Environmental Biology*, 4(1): 95–100.
18. 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.
19. Boureghda, H. (2009). Recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. à l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et Sato, K., (Foc), agent du flétrissement du pois chiche. Thèse de Doctorat Institut National Agronomique –El Harrach. 143 p
20. Boureghda, H., Bouznad, Z., (2009). Biological control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzanium* and *T. longibrachiatum*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 44(1):1588-2691.
21. 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.
22. Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food e a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>



23. Carovic-Stanko, K., Orlic, S., Politeom, O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chem*, 119: 196–201.
24. Chet I. 1990. Mycoparasitism- recognition, physiology and ecology. In: *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing the Agricultural Pests and Diseases* (R. baker and P. Dunn, eds.). Alan R Liss NY, 725 pp.
25. Chet, I. (1987). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, p. 405-416.
26. Chet, I. (1993). *Biotechnology in Plant Disease Control*. John Wiley and Sons, New York
27. 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.
28. Chet, I., Baker, R. (1981). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 71: 286-290.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Clavet, C., Pera., Bera, J.M. (1990). Interaction of *Trichoderma* sp. With *Glomus mossaeae* and two pathogenic. *Agric Ecosyst. Environ*, 9: 59-65.
33. 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.
34. Cooke B.M. and Kaye B., Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. Pp 81-110.
35. 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.
36. Dennis, L., Webster, J. (1971). Antagonisme properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57: 363-369.

37. Dervilla, M.X., Dgnnelly, M., Sheridan, M. (1986). Anthraquinones from *Trichoderma polysporum*. *Phytochemistry*, 25(10): 2303-2304.
38. De Sousa JP, De Oliveira KAR, de figueiredo RCBQ, De Souza EL (2015) Influence of Carvacrol and 1.8-Cineole on Cell Viability, Membrane Integrity, and Morphology of *Aeromonas hydrophila* Cultivated in a Vegetable-Based Broth. *Journal of Food Protection* 78: (2), 424-429. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-242
39. 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.
40. Dubey, S.C. Singh, V., Priyanka, K., Upadhyay, B. K. Singh, B. (2015). Combined application of fungal and bacterial bio-agents, together with fungicide and Mesorhizobium for integrated management of Fusarium wilt of chickpea. *BioControl*, 60 (3): 413–424.
41. Dubey, M.K, Broberg, A., Sooriyaarachchi, S., Wimal, U., Dan, F.J. (2013). The glyoxylate cycle is involved in pleotropic phenotypes, antagonism and induction of plant defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. *Magnus Karlsson Fungal Genetics and Biology*
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y., 2015. Characterization of
46. Novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* 31, 50-60.
47. Elshafie, H.S., Camele, I., Sofo, S.A., Mazzone, G., Calvano, M., Masi, S., Caniani, D., 2020a. Mycoremediation effect of *Trichoderma harzianum* strain T22 combined with ozonation in diesel-contaminated sand. *Chemosphere* 252, 126597.
48. Elshafie, H.S., Caputo, L., De Martino, L., Grufova, D., Zheljaskov, V.Z., De Feo, V., Camele, I., 2020b. Biological investigations of essential oils extracted from three *Juniperus* species and evaluation of their antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Appl. Microbiol.* 129, 1261–1271.

49. Elshafie, H.S., Devescovi, G., Venturi, V., Camele, I., Sofo, S.A., 2019b. Study of the regulatory role of n-acyl homoserine lactones mediated quorum sensing in the biological activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* causing soft rot of *Agaricus* spp. *Front. Microbiol.* 10, 2619.
50. Elshafie, H.S., Sakr, S.H., Sadeek, A.S., Camele, I., 2019a. Biological investigations and spectroscopic studies of new moxifloxacin/glycine-metal complexes. *Chem. Biodiv.* 16, 1–13.
51. El-Mougy, N.S., Shaban, A.M.H., Abdel-Kader, M.M. (2015). Evaluation of Seed Coating with Some Essential oils and Bio-agents against Root Rot Disease of Faba Bean. *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, 4(11): 244-248.
52. Elshafie, H.S., Sakr, S.H., Sadeek, A.S., Camele, I., 2019a. Biological investigations and spectroscopic studies of new moxifloxacin/glycine-metal complexes. *Chem. Biodiv.* 16, 1–13.
53. 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.
54. Faruk, M.I., 2018. Effect of tricho-compost against seedling blight disease of wheat caused by *Sclerotium rolfsii*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 46, 395–402.
55. 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.
56. Gava, C.A.T., Pinto, J. M. (2016). Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. *Biological Control*, 97: 13–20.
57. Ghisalberti, E., Rowland, C.Y. (1993). Antifungal Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 56(10): 1799-1804.
58. Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4): 977–987.
59. Gruřlov'a, D., Caputo, L., Elshafie, H.S., Baranova, B., Martino, L., Sediak, V., Gruřlov'a, Z., Poracova, J., Camele, I., De Feo, V., 2020. Thymol chemotype *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential selective bio-based herbicide on monocot plant species. *Molecules* 25, 595.
60. Hammad Massinissa;Thomas Guillemette;Meriem Alem;Franck Bastide;Meriem Louanchi; (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, (), -. doi:10.1186/s41938-021-00423-4
61. Harris, D.R. (1998). The spread of Neolithic agriculture from the Levant to western central Asia. In: Damania A. B., Valkoun J., Willocox G and Qualset C. O. (eds). The origine of Agriculture and Crop Domestication. ICARDA, Allepo, Syria, pp.54-64.
62. Heguera, G., Beauge, L. (1997). Phosphoryl group exchange between ATP and ADP catalyzed. Plant Physiol. 114, 1397–1403.
63. Herman A, Herman KTA (2016) Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. Curr Microbiol 72:165–172. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.018
64. Herrera-Estrella A. and Chet I. 2003. The biological control agent *Trichoderma* from fundamentals to applications. In: Arora D.K., Bridge P.D. and Bhatnagar D. (eds), Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, Marcel Dekker, New York, pp. 147–156.
65. Herrera-Estrella A., Chet I. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. p. 263–282. In: Agricultural Biotechnology (A. Altman, ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
66. Hibar, K., Mejda, D.R., Haifa, K., Mohamed, E. (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. radices lycopersici. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 9(5): 163-171.
67. Irum, M. (2007). Comparison of phytochemical and chemical control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Mycopathology, 5(2):107-110.
68. Islam, M.M., Hossain, D.M., Nonaka, M., Harada, N., 2017. Biological control of tomato collar rot induced by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma* species isolated in Bangladesh. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 50, 109–116.
69. Jiang, H., Zhang, L., Zhang, J., Ojaghian, M.R., Hyde, K.D., 2016. Antagonistic interaction between *Trichoderma asperellum* and *Phytophthora capsici* in vitro. J. Zhejiang Univ-Sci. B. 17, 271–281.
70. Jiménez-Reyes, M.F., Carrasco, H., Olea, A.F., Silva-Moreno, E., 2019. Natural compounds: a sustainable alternative to the phytopathogens control. J. Chil. Chem. Soc. 64, 4459–4465
71. Jiménez-Díaz, R., Jiménez-Gasco, M.M. (2011). Integrated Management of *Fusarium* Wilt Diseases. *Control of Fusarium Diseases*, 177-215.
72. 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.

73. Jain, A., Singh, A., Singh, S., Singh, H. B. (2015). Phenols enhancement effect of microbial consortium in pea plants restrains *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 89: 23–32
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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
78. Leyva, M.O., Vicedo, B., Finiti, I., Flors, V., Del Amo, G., Real, M.D., González-Bosch, C., 2008. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathol.* 57, 1038–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x>.
79. 3059.2008.01891.x.
80. 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.
81. 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.
82. Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., Wang, J., 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166, 93–102. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9124-1>.
83. 10.1007/s11046-008-9124-1.
84. 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.
85. Marei GIK, Abdel Rasoul MA, Abdelgaleil SAM (2012) Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103: 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.004>
86. 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
87. 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.
88. Moutassem D., 2020. Epidémiologie de la fusariose vasculaire de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) causée par *Fusarium oxysporum* Scheicht. Emend. Snyder. Flans, f. sp. *ciceris* (Padwick), et méthodes et moyens de lutte. Thèse de de Doctorat. 295pp.
89. MOUTASSEM Dahou, Lakhdar Belabid and Yuva Bellik. (2020). Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. *J. Crop Prot.* 2020, 9 (2): 217-231. <https://jcp.modares.ac.ir/article-3-24941-en.html>
90. Moutassem, D., Belabid L., Bellik, Y., Ziouche, S. and Baali, F. 2019. Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing system-ic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55 (3): 202–217.
91. 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.
92. 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.
93. Muthukumar, A., Eswaran, A., Nakkeeran, S., Sangeetha, G. (2010). Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Protection*, 29: 1483-1488.
94. Navas-Cortés, J. A., Hau, B., Jiménez-Díaz, R. M. (1998). Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt of chickpea. *Phytopathology*, 88:1338-1346.
95. Navas-Cortés, J.A., Hau B., Jiménez-Díaz, R.M. (2000). Yield loss in chickpeas in relation to the development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology*, 90: 1269-1278.
96. 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.

97. Nawrocka, J., Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67 (2), 149–156.
98. New, A.P., Eckers, C., Haskins, N.J., Neville, W.A., Elson, S., Hueso-Rodríguez, J.A., Rivera-Sagredo, A. (1996). Analytical Structures of Polysporins A-D, Four New Peptaibols Isolated from *Trichoderma polysporum*. *Tetrahedron Letters*, 37 (17): 3039-3042.
99. Oh, S-U., Lee, S.J., Kim, J.H., Yoo, I.D. (2000). Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*. *Tetrahedron Letters*, 41: 61–64.
100. Omomowo, O., Fadiji A. O E., Omomowo, I. (2018). Assessment of bio-efficacy of *Glomus versiforme* and *Trichoderma harzianum* in inhibiting powdery mildew disease and enhancing the growth of cowpea. *Annals of Agricultural Sciences*, 63 (1): 9-17.
101. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2006) Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236-244. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.11.019
102. 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.
103. Prasun K. MUKHERJEE, Artemio MENDOZA-MENDOZA, Susanne ZEILINGER, Benjamin A. HORWITZ, 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma* mediated suppression of plant diseases. *fungal biology reviews* 39 ( 2 0 2 2 ) 1 5 e3 3
104. Pavela, R., Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12): 1000–1007.
105. 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.
106. Riley I.T., McKay A.C. (2009). Cereal cyst nematode in Australia: biography of a biological invader. In: Riley, I.T., Nicol, J.M. et Dababat, A.A. (Eds.). *Cereal cyst nematodes: status, research and outlook*. CIMMYT, Ankara, Turkey. pp. 23–28.
107. Salem, Nidhal; Kefi, Sarra; Tabben, Olfa; Ayed, Ameni; Jallouli, Slim; Feres, Nedja; Hammami, Majdi; Khammassi, Saber; Hrigua, Islem; Nefisi, Sirine; Sghaier, Ameni; Limam, Ferid; Elkahoui, Salem (2018). Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. *Industrial Crops and Products*, 124(), 115–125. doi:10.1016/j.indcrop.2018.07.051

108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. Sikkema J, De Bont JA M, Poolman B (1995) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8022-8028.
115. Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt Ş. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathol*, 161: 119–128.
116. Soković, M.D., Glamočlija, J.M., Ćirić, A.D. (2013). Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides. *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. doi:10.5772/50277
117. Spadaccino;L G.. Frabboni;F. Petruzzi;G. Disciglio;A. Mentana;D. Nardiello;M. Quinto; (2021). Essential oil characterization of *Prunus spinosa* L., *Salvia officinalis* L., *Eucalyptus globulus* L., *Melissa officinalis* L. and *Mentha x piperita* L. by a volatolomic

- approach . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (), -. doi:10.1016/j.jpba.2021.114167
118. Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J Microbiol Methods*, 81(2):187-93.
119. Sunpapao, A., Chairin, T., Ito, S. (2018). The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control*, 123: 36–42.
120. Toghueo, R.M.K., Eke, P., Zabalgoceazcoa, 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.
121. Tomazoni, E.Z., Pauletti, G.F., Ribeiro, R.T.S., Moura, S., Schwambach, J. (2017). In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*, 223: 72–77.
122. Trapero-casas, A., Jiminez-diaz, R. M. (1985b). Etiologia, importancia. Y. distribucion de la seca del garbanzo eb el valle del Guadalquivir. *Bol. Serv. Plagas*, 11: 95pp.
123. Trapero-Casas, A., Jiminez-Diaz, R.M. (1985). Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology*, 57: 1146-1151.
124. Trivedi, S., Neetu, T., Chaudhary, R.G. (2013). Efficacy of *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the Incitant of Wilt Disease in Chickpea. *J Mycol Plant Pathol*, 43(1).
125. 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.
126. 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.
127. 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.

128. 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.
129. 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.
130. Viuda-Martos M, Mohamady MA, Fernández-López J, Abd ElRazik KA, Omer EA, Pérez JA, Sendra E (2011) In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22: 1715-1722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003>
131. 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.
132. Younesi H, Bazgir E,\* , Darvishnia M, Chehri K, 2021. Selection and control efficiency of *Trichoderma* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in Iran. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 116 (2021) 101731
133. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30 (2): 74–90.
134. Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X., Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolates T-alo against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100: 64-74.
135. 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.



**Etude de l'effet synergique entre les antagonistes biologiques et l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill. dans le contrôle intégré de flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.).**

**Résumé**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet synergique entre l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill., en association avec quelques espèces de *Trichoderma* sp, pour envisager une lutte biologique intégrée. Dans les essais *in vitro*, l'huile essentielle a exercé une activité inhibitrice de la croissance mycélienne du Foc avec des intervalles d'efficacité variable entre 55.81 et 83.81% en contact direct et entre 66.13 et 75.04%, en contact indirect. L'ensemble de souches de *Trichoderma* sp ont marqué des zones d'inhibition de la croissance mycélienne de 71.25 et 100% par le test direct et de 24.12 et 81.84% par le test indirect. Par ailleurs, les filtrats de culture ont également inhibé la croissance mycélienne du Foc, dont l'intervalle d'efficacité est variable entre 56 et 100% pour la C1, 26 et 100% pour la C2, ainsi qu'entre 26 et 100% pour la C3. L'association huile essentielle / *Trichoderma* spp expose des modifications parfois profondes sur l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des souches fongiques. Toutefois, un synergisme significativement positif a été constaté, et la zone d'inhibition a été augmentée avec des fréquences variables entre 0.11 et 27.02% pour les tests directs et entre 1.90 à 46.86% pour le test indirect. L'association filtrats de culture de *Trichoderma*/huile essentielle augmente l'efficacité d'inhibition avec des taux variables entre 15.64 et 73.79%. Les traitements *in vivo* montrent que les valeurs de l'AUDPC enregistrées chez les plantules de pois chiche traitées par l'huile essentielle exposent une diminution de la gravité de la maladie entre 36.01% et 65.25%. Cependant, les valeurs notées chez celles traitées par les différentes espèces de *Trichoderma* sp sont plus au moins supérieures, et sont variables exposent une diminution de la gravité variable entre 0.98 et 38.41 %. Par ailleurs, un effet synergique très remarquable a été constaté en traitement associés de l'huile essentielle avec les *Trichoderma in vivo* en comparaison avec les traitements individuels, où une augmentation de la diminution de la sévérité de la maladie a été constatée avec des taux de diminution variables entre 56.92 et 70.76%. Les huiles essentielles interagissent d'une manière synergique avec les agents biologiques améliorant par conséquent le contrôle biologique du Foc.

**Mots-clés.** Synergisme, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Trichoderma* sp, huile essentielle, *E. globulus*.

دراسة الفعل المتكامل بين الزيت الأساسي لـ *Eucalyptus globulus Labill* و العوامل البيولوجية في المكافحة المتكاملة للبول الوعاني لنبات الحمص (*Cicer arietinum L*).

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير التكامل بين الزيت العطري لأوكالبتوس جلوبولوس *Labill* ، بالاشتراك مع بعض أنواع *Trichoderma sp* ، للنظر في عنصر تحكم بيولوجي متكامل. في الاختبارات الحيوية، اعطي الزيت العطري نشاطاً مثبطاً على النمو الفطري لـ *Fusarium oxysporum* مع فترات كفاءة متغيرة بين 55.81 و 83.81% في الاختبار المباشر وبين 66.13 و 75.04% ، في الاختبار غير المباشر . مجموعة سلالات *Trichoderma sp* حددت مناطق تثبيط نمو الفطريات بنسبة 71.25 و 100% عن طريق الاختبار المباشر و 24.12 و 81.84% بالاختبار غير المباشر. بالإضافة إلى ذلك، فإن عوامل الترشيح المزروعة تمنع أيضاً النمو الفطري لـ *Foc* ، والتي تتراوح كفاءتها الفاصلة بين 56 و 100% لـ C1 و 26 و 100% لـ C2 ، وكذلك بين 26 و 100% لـ C3. تكشف رابطة الزيوت العطرية / *Trichoderma spp* عن تغيرات عميقة في بعض الأحيان في المظهر المورفو والسلوك العدائي للسلالات الفطرية. ومع ذلك ، لوحظ وجود تآزر إيجابي معنوي ، وزادت منطقة التثبيط بترددات متغيرة بين 0.11 و 27.02% للاختبارات المباشرة وبين 1.90 و 46.86% للاختبار غير المباشر. إن ارتباط فلاتر ثقافة *Trichoderma* / الزيت العطري يزيد من كفاءة التثبيط بنسب متغيرة تتراوح بين 15.64 و 73.79%. تظهر المعالجات في الجسم الحي أن قيم AUDPC المسجلة في شتلات الحمص المعالجة بالزيت الأساسي تظهر انخفاضاً في شدة المرض بين 36.01% و 65.25%. ومع ذلك ، فإن القيم التي لوحظت في تلك التي عولجت بنواع مختلفة من *Trichoderma sp* أعلى أو أقل ، ومتغيرة ، تظهر انخفاضاً متغيراً في الشدة بين 0.98 و 38.41% علاوة على ذلك ، لوحظ تأثير تآزري ملحوظ للغاية في العلاج المشترك للزيت العطري مع *rma spptrichode* في الجسم الحي مقارنة بالعلاجات الفردية ، حيث لوحظ زيادة في الحد من شدة المرض مع معدلات انخفاض متفاوتة بين 56.92 و 70.76%. تتفاعل الزيوت الأساسية بطريقة تكاملية مع العوامل البيولوجية وبالتالي تحسين التحكم البيولوجي في *Foc* .

**الكلمات المفتاحية:** *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*, *Trichoderma sp* ، *E. globulus* ، الزيت الأساسي ، التكامل.

**Synergistic effect of biological antagonists and essential oil of *Eucalyptus globulus* Labill. in the integrated control of vascular wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.).**

**Abstract**

The aim of this study is to evaluate the synergistic effect of the essential oils of *E. globulus*, as well as the biological control agents *Trichoderma* in order to consider an integrated biological control. In *in vitro* tests, essential oil exerted an inhibitory activity on the mycelial growth of *Foc* with variable efficiency ranges between 55.81 and 83.81% in direct contact and between 66.13 and 75.04% in indirect contact. The use of strains of *Trichoderma sp* scored zones of inhibition of mycelial growth of 71.25 and 100% by the direct test and 24.12 and 81.84% by the indirect test. In addition, the culture filtrates also inhibited the mycelial growth of *Foc*, with an efficacy range 56-100% for C1, 26-100% for C2, and 26-100% for C3.26 and 100% for C3. The combination of essential oil and *Trichoderma spp.* Changes in the morphotypic aspect and antagonistic behavior of the fungal strains. However, a significantly positive synergism was observed, and the zone of inhibition was increased with frequencies variable between 0.11 and 27.02% for direct tests and 1.90 and 46.86% for the indirect test. The combination of *Trichoderma* culture filtrates/essential oil increase the inhibition efficiency with frequencies variable between 15.64 and 73.79%. In *in vivo* treatments, results show that the AUDPC values recorded in chickpea seedlings in chickpea seedlings treated with essential oil show a decrease in disease severity between 36.01 disease severity between 36.01% and 65.25%. However, the values recorded in those treated with the different species of *Trichoderma sp* are more or less higher, and are the values for those treated with the different species of *Trichoderma sp* are more or less higher, and vary from 0.98 to 38.41%. In addition, a very very remarkable synergistic effect was observed in combined treatment of the essential oil with *Trichoderma in vivo* compared to individual treatments, where an increase in the decrease of the disease severity was observed with rates of decrease varying between 56.92 and 70 between 56.92 and 70.76%. The essential oils interact synergistically with synergistically with the biological agents thereby improving the biological control of *Foc*.

Keywords. *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, synergisems, *Trichoderma sp*, essential oil, *E. globulus*.

# Huile essentielle d'E, globulus

Un enjeu majeur actuel est d'augmenter la production de la culture de pois chiche en contrôlant les biologiquement tout en préservant les ressources naturelles.



*In vitro*  
tests

*In vitro*  
tests

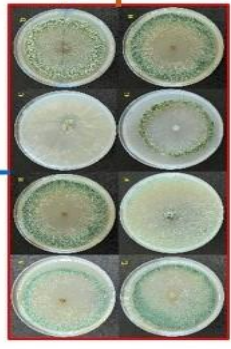
*In vivo*  
tests

Inhibition  
remarquable de la  
croissance mycélienne

Diminution de la  
gravité de la maladie  
*in vivo*

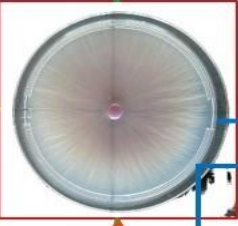
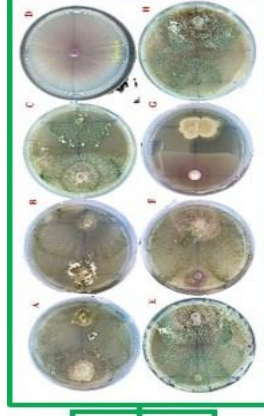
Objectifs: vérifier l'effet individuel et associé des *Trichoderma* sp et HE d'E, globulus sur la maladie *in vitro* et *in vivo*

BCAs  
*Trichoderma* spp



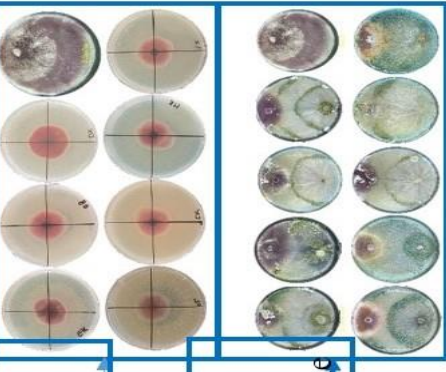
*In vitro*  
tests

Synergisme positif entre HE E  
globulus et  
*Trichoderma* spp



*In vitro*  
tests

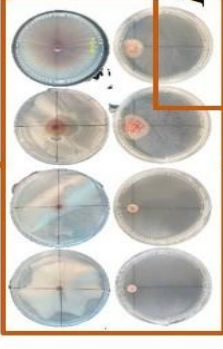
*In vitro*  
tests



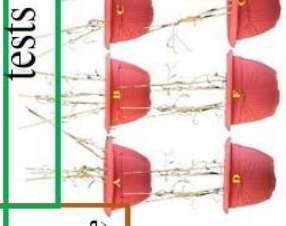
Inhibition  
remarquable de la  
croissance mycélienne

*In vivo*  
tests

Inhibition  
remarquable de la  
croissance mycélienne



*In vivo*  
tests



Diminution de la  
gravité de la maladie  
*in vivo*

Synergisme positif entre  
l'huile essentielle d'E  
globulus et *Trichoderma* spp  
augmentation de niveau de  
protection

Résumé  
graphique