



Université Hassan 1^{er}
Centre d'Études Doctorales en Sciences
et Techniques & Sciences Médicales



**Faculté des Sciences et Techniques
Settat**

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Sciences Biologiques

Formation Doctorale : Biologie, Santé et Environnement

Spécialité : Phytopathologie

Sous le thème

LE GENRE FUSARIUM

**Prévalence, caractérisation morphologique,
moléculaire et lutte biologique**

Présentée par :

HAFSA HOUMAIRI

Soutenue le: 10 Juin 2022

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de:

Mr. ISSAMADI Abdelkhalid	Professeur de l'Enseignement Supérieur Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Président
Mr. IMYENE Abdelataz	Professeur de l'Enseignement Supérieur Université Hassan II, FST Mohammédia	Rapporteur
Mr. BELALI Saïd	Professeur de l'Enseignement Supérieur Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Rapporteur
Mr. KOURALI Yahya	Professeur de l'Enseignement Supérieur Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Examinateur
Mr. BENCHABBO Boucheïb	Professeur de l'Enseignement Supérieur Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2021/2022

AVANT PROPOS

*Ce document vise à présenter l'essentiel de mes activités de recherche postérieures à mon habilitation universitaire obtenu en 2016, en vue de l'obtention du Doctorat National. Pour cela je présenterais seulement les travaux de recherche relevant de ma spécialité qui s'articulent de façon générale autour de la problématique de la prévalence, l'identification et la diversité des espèces du genre *Fusarium* contaminant d'abord les céréales dans la région de Casablanca - Settat. Ensuite, la caractérisation morphologique et moléculaire des espèces *Fusariennes* responsables de la maladie de la malformation du Manguier au Sud du Sénégal. Enfin, la confrontation des espèces *fusariennes* identifiées à deux souches du genre *Trichoderma*, parmi les plus compétitives, en vue d'un éventuel contrôle biologique de la maladie. Ces deux derniers axes ont été réalisés dans le cadre du projet *Capitum* entre l'Université Hassan Premier et l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal).*

DEDICACES

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

وبفضله تنزل الخيرات والبركات

والصلاة والسلام على

المبعوث رحمة للعالمين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

RESUME

Le premier axe de ce travail de recherche a porté sur l'étude de la prévalence et la diversité des espèces fusariennes présentes naturellement sur 27 échantillons de céréales (blé dur, blé tendre, orge et maïs) dans la région de Casablanca-Settat par une identification morphologique classique des espèces fongiques isolées des quatre céréales. Le nombre total des isolats obtenus était de 564 dont le genre *Alternaria* a représenté 53% suivi des genres *Fusarium* (16%), *Aspergillus* (14%), *Rhizopus* (8%), *Bipolaris* (3%), *Absidia* (2%) et autres (4%). La fréquence et le type des espèces fongiques varient en fonction de la céréale et de l'origine géographique de l'isolat.

Le deuxième axe avait pour objectif d'identifier les espèces fongiques associées aux symptômes de la malformation chez le mangouier par la méthode classique suivie par une identification moléculaire en se basant sur le gène codant la région ITS de l'ADN ribosomique fongique. En utilisant le couple d'amorces ITS1/ITS4. Le pourcentage de ressemblance entre les isolats de cette étude et ceux présents sur la banque de gène a varié de 99,08 à 99,82 %. L'étude de similarité a permis de rapprocher les espèces étudiées des espèces disponibles sur la base de données NCBI. Les espèces identifiées appartiennent au complexe fujikuroi et equiseti. D'autre part, les treize isolats ont été inscrits à la base de données sous un numéro d'ordre (numéro d'accession) qui les caractérise sur Gene Bank.

Le troisième axe s'est fixé pour objectif d'évaluer le taux d'inhibition de la croissance fongique de 13 espèces fusariennes identifiées en confrontation directe ou indirecte, avec deux espèces du genre *Trichoderma* (*T.coningii* et *T.longibrachyatum*). Les pourcentages moyens d'inhibition en présence de *Trichoderma koningii* Audemas (M35) variaient de 13,13 à 57,67 % lors de la confrontation directe et de 3,33 à 33,33% lors de la confrontation à distance. Alors qu'avec la présence de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (M37), les pourcentages d'inhibition étaient de 9,80 à 37,03 % lors de la confrontation directe et de 11,11 à 33,33 % lors de la confrontation à distance. Ainsi 85% d'isolats ont montré un pourcentage d'inhibition significatif dans le cas de la confrontation directe et 54% dans le cas de la confrontation à distance.

Mots clés : Pourritures racinaires, Fusariose, Céréales, *Fusarium sp*, malformation de mangue, caractérisation morphologique, caractérisation moléculaire, confrontation directe et indirecte, *Trichoderma sp*.

ABSTRACT

The first axis of this collection of research works focused on the study of the prevalence and diversity of Fusarium species present naturally on 27 cereal samples in the Casablanca-Settat region by a classic morphological identification. The total number of isolates obtained was 564, of which the Alternaria genus represented 53%, followed by the Fusarium (16%), Aspergillus (14%), Rhizopus (8%), Bipolaris (3%), Absidia (2%) and others (4%).

The second axis aimed to identify the fungal species associated with the malformation of the mango tree by a morphological and molecular identification, using the pair of primers ITS1/ITS4. The percentage of resemblance between the isolates of this study and those present on the gene bank varied from 99.08 to 99.82%. The similarity study made it possible to bring the studied species closer to the species available on the NCBI database. On the other hand, the thirteen identified isolates were registered in the database under an accession number which characterizes them on Gene Bank.

*The third axis aimed to evaluate the fungal growth inhibition rate of 13 Fusarium species identified in direct or indirect confrontation with two species of the Trichoderma genus (*T. coningii* and *T. longibrachyatum*). The mean percentages of inhibition in the presence of *Trichoderma koningii* Audemas (M35) varied from 13.13 to 57.67% during direct confrontation and from 3.33 to 33.33% during remote confrontation. While with the presence of *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (M37), the inhibition percentages were 9.80 to 37.03% during direct confrontation and 11.11 to 33.33% during indirect confrontation. Thus 85% of isolates showed a significant percentage of inhibition in the case of direct confrontation and 54% in the case of indirect confrontation.*

Key words: *Root rots, Fusarium wilt, Cereals, Fusarium sp, mango malformation, morphological characterization, molecular characterization, direct and indirect confrontation, Trichoderma sp.*

ملخص الأطروحة والكلمات المفتاحية

ركز المحور الأول لهذه المجموعة من العمل البحثي على دراسة انتشار وتنوع أنواع الفيوزاريوم الموجودة بشكل طبيعي في 27 عينة من الحبوب (القمح الصلب والقمح الطري والشعير والذرة) في منطقة الدار البيضاء-سطات. من خلال تحديد شكلي كلاسيكي من الأنواع الفطرية المعزولة من الحبوب الأربعة. بلغ العدد الإجمالي للعزلات التي تم الحصول عليها 564 عزلة ، منها جنس *Alternaria* يمثل 53% ، يليه *Fusarium* (16%) ، الرشاشيات (14%) ، *Rhizopus* (8%) ، ثنائي القطب (3%) ، *Absidia* (2%) وآخرين (4%). يختلف تواتر ونوع الفطريات اعتمادًا على الحبوب والأصل الجغرافي للعزلة.

الهدف الثاني هو التعرف على الأنواع الفطرية المصاحبة لأعراض التشوه في شجرة المانجو بالطريقة التقليدية متبوعة بالتعريف الجزيئي على أساس الجين الذي يقوم بترميز منطقة ITS للحمض النووي الريبوزومي الفطري. باستخدام زوج من البادئات / ITS1 ITS4. تراوحت نسبة التشابه بين عزلات هذه الدراسة وتلك الموجودة في بنك الجينات من 99.08 إلى 99.82%. جعلت دراسة التشابه من الممكن تقريب الأنواع المدروسة من الأنواع المتاحة في قاعدة بيانات NCBI. الأنواع التي تم تحديدها تنتمي إلى مجمع *fujikuroi* و *equiseti*.

من ناحية أخرى ، تم تسجيل العزلات الثلاثة عشر في قاعدة البيانات تحت رقم تسلسلي (رقم المدخل) الذي يميزها في Gene Bank. حدد المحور الثالث نفسه بهدف تقييم معدل تثبيط نمو الفطريات لـ 13 نوعًا من الفطريات التي تم تحديدها في المواجهة المباشرة أو غير المباشرة مع نوعين من جنس *Trichoderma* (*T.coningii* و *T.longibrachyatum*). تراوح متوسط نسب التثبيط في وجود *Trichoderma* (*T.coningii* Ausubon (M25) و *T.longibrachyatum* (M26) 19-19% إلى 57-67% أثناء المواجهة المباشرة

الكلمات المفتاحية:

تعفن الجذور

ذبول الفيوزاريوم

الحبوب ، الفيوزاريوم

تشوه المانجو

التوصيف المورفولوجي

التوصيف الجزيئي

المواجهة المباشرة وغير المباشرة

Trichoderma sp.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux responsables des structures de recherche de l'Université Hassan Premier et de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat :

- Pr. JAMAL NAJA, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat,
- Pr. BOUBKER NASSER, Vice doyen chargé de la recherche scientifique,
- Pr. KHALID ESAMADI, Directeur du Centre des Etudes Doctorales de la Faculté des Sciences et Techniques,
- Pr. BOUCHAIB BENCHARKI, Directeur du Pôle des Etudes Doctorales de l'Université Hassan Premier et Directeur du Laboratoire Agroalimentaire et Santé,

Je tiens aussi à exprimer mes sincères remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu accepter d'évaluer, critiquer, corriger et siéger à cette soutenance, les professeurs :

- Mr. Le professeur A. HMEYENE, rapporteur externe,
- Mr. Le professeur M. IBRIZ, rapporteur externe,
- Mr. Le professeur S. HILALI, rapporteur interne,
- Mr. Le professeur Y. KOULALI, examinateur interne,
- Mr. Le professeur A. ESSAMADI, président de Jury,
- Mr. Le professeur B. BENCHARKI, Directeur de thèse,

A vous chers professeurs et collègues je vous assure de ma gratitude et respect et je vous dis que vous me faite un grand honneur.

En fin, je remercie tous les collègues avec qui je partage une patience scientifique, qui m'ont encouragé et épaulé pour soutenir mon Doctorat, je leur exprime mes chaleureux remerciements et mon estime.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	III
DEDICACES	IV
RESUME	V
ABSTRACT.....	VI
ملخص الأطروحة والكلمات المفتاحية.....	VII
REMERCIEMENTS	VIII
INTRODUCTION GENERALE.....	2
PREMIER CHAPITRE	4
PREVALENCE NATURELLE DES ESPECES FUSARIENNES SUR LES CEREALES DANS LA REGION DE CASABLANCA – SETTAT	4
1. MISE A JOUR BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1 Distribution géographique et conservation dans le sol	5
1.2 Ecologie du genre <i>Fusarium</i>	5
1.3 Pathogénie et toxicogénie	6
1.4 Prévalence des espèces Fusariennes sur les céréales	6
1.5 Prévalence et répercussion sur l'économie, la santé et la sécurité alimentaire.....	6
1.6 Quelle espèce fongique pour quelle espèce de plante ?	7
1.7 Prévalence du genre <i>Fusarium</i> dans la région Casablanca-Settat.....	7
1.8 Objectif de l'étude.....	8
2. METHODOLOGIE.....	9
2.1 Analyse mycologique.....	9
2.2 Identification	9

3. RESULTATS	11
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	12
DEUXIEME CHAPITRE	13
CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES ESPECES FUSARIENNES IMPLIQUEES DANS LA MALADIE DE LA MALFORMATION DU MANGUIER.	13
1. METHODES D'IDENTIFICATION DANS LE GENRE FUSARIUM: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1.1 Identification macroscopique	14
1.2 Identification microscopique	14
1.3 Identification génétique	15
1.4 Le couple d'amorce ITS1/ITS2 et ITS1/ITS4	15
1.5 Autres amorces.....	16
1.6 Caractérisation moléculaire des espèces fusariennes	17
1.7 Objectif de l'étude.....	18
2. METHODOLOGIE.....	19
2.1 Echantillons	19
2.2 Protocole de la culture monosporelle.....	19
2.3 Caractérisation morphologique	19
2.4 Caractérisation moléculaire.....	20
2.5 Etude bioinformatique	20
3. RESULTATS ET DISCUSSION	22
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	25
TROISIEME CHAPITRE	26
CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE LA MALFORMATION DU MANGUIER.	26

1. PROBLEMATIQUE DE LA LUTTE CONTRE <i>FUSARIUM SYNTHESSE</i>	
<i>BIBLIOGRAPHIQUE</i>	27
1.1 Difficultés de gestion des maladies dues à <i>Fusarium</i>	27
1.2 Contrôle biologique de <i>Fusarium</i>	27
1.3 Relation <i>Trichoderma-Fusarium</i>	28
1.4 Effet antagoniste <i>Trichoderma-Fusarium</i> in vitro.....	29
1.5 Objectif de l'étude.....	29
2. METHODOLOGIE	30
2.1 Agents antagonistes	30
2.2 Protocole du test de confrontation directe.....	30
2.3 Protocole du test de confrontation indirecte.....	30
2.4 Analyse des données	31
3. RESULTATS ET DISCUSSION	32
4. CONCLUSION	33
CONCLUSION GENERALE	35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	39

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les premières descriptions du genre *Fusarium* datent du début du dix-neuvième siècle, elles reposaient sur la description de la forme des macroconidies fusiformes avec des cellules basales et apicales particulières et le mycélium cotonneux blanchâtre qui prend au cours de la croissance de la colonie différentes couleurs dues à une multitude de pigments très variés chez ce genre (Abdel Azeem et al. 2019, Leslie et Summerell, 2006). Depuis cette période les études de systématique de ce genre ont beaucoup évoluées, ainsi que le nombre de ses espèces qui ne cesse de grandir, d'autant plus que les études génétiques commencent à lui rapprocher de nouveaux genres dont les caractéristiques morphologiques principales du genre *Fusarium* ne sont pas toutes présentes (Crous et al. 2021, O'Donnell et al. 2020).

Actuellement, on considère que ce genre appartient à l'embranchement des Ascomycota, ordre des Hypocryales, Famille des Nectriacées. Il est décrit comme étant un genre polyphylétique dont la taxonomie est très discutée. Le nombre d'espèces de ce genre est entre 70 à 500 espèces connues, dont une vingtaine sont des espèces complexes (plusieurs espèces très proches morphologiquement et difficiles à discerner) (Leslie et Summerell, 2011).

Certaines espèces du genre *Fusarium*, comme d'autres genres de champignons, se développent uniquement sous forme asexuée (anamorphe) ce qui les classe dans le groupe des Deutéromycota, alors que d'autres peuvent se reproduire de façon sexuée (le téléomorphe comme *Gibberella*) d'où la double nomination chez les espèces qui se reproduisent par reproduction asexuée et sexuées. Avec l'abandon de cette double nomenclature depuis 2011 (Hawksworth et al. 2011) (Code de Nomenclature International, 2012), un large consensus au sein de la communauté mondiale des chercheurs sur le genre *Fusarium* a fortement soutenu l'utilisation unitaire du nom « *Fusarium* » au lieu de plusieurs noms téléomorphes qui lui seraient liés (Crous et al. 2021, Geiser et al. 2013).

Cette double nomination bien que révolue reste parmi les problèmes de l'identification qui se posent de nos jours et dont les systématiciens ne cessent d'y apporter des révisions afin de combler les lacunes d'identification qui se posent lors du commerce des denrées alimentaires ou les situations de quarantaines dans le cas de plants ou semences contaminées ainsi que dans le domaine des sciences biologiques et médicales (O'Donnell et al. 2020).

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques restent bien considérées dans l'identification et peuvent compléter l'identification génétique qui reste dans le cas de *Fusarium* très discutée entre les phylogénéticiens puisqu'il faudrait faire appel à un grand nombre de gènes (parfois dix-neuf gènes) pour faire la distinction à l'intérieur d'un complexe d'espèce fusariennes comme celui de *F.graminearum* ou *F.solani* par exemple (Crous et al. 2021, O'Donnell et al. 2020, Al-Hatmi, 2016, Refai et al. 2015, Summerell et al. 2011).

Les objectifs auxquels je me suis intéressée dans mon cursus de recherche sur le genre *Fusarium* en tant que phytopathologiste, étaient fixés de telle façon à faire :

- L'identification morphologique des espèces responsables des divers symptômes de la fusariose, les pourritures racinaires, la chlorose, l'échaudage ou la brûlure et le flétrissement dû aux espèces fusariennes.
- L'identification moléculaire afin de renforcer l'identification classique et d'acquérir l'outil moléculaire en phytopathologie qui connaît actuellement une grande évolution en général et spécialement pour le genre *Fusarium*.
- L'étude de la prévalence des espèces fusariennes au niveau des céréales de la région Casablanca – Settat en vue de comprendre les maladies dues à *Fusarium*.

Ce document de doctorat présente les études qui ont été réalisées, depuis 2017, sur le genre *Fusarium* au sein du Laboratoire Agroalimentaire et Santé de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, relevant de l'Université Hassan Premier, à savoir :

- I- L'identification et la prévalence des espèces fusariennes, à la récolte, de 27 échantillons de quatre céréales (blé dur, blé tendre, orge et maïs) de la région de Casablanca - Settat,
- II- La caractérisation morphologique et moléculaire de treize espèces fusariennes isolées à partir de plantes de mangue présentant la maladie de la malformation du manguier.
- III- L'étude de la confrontation entre les treize espèces fusariennes isolées et identifiées avec deux souches de *Trichoderma* (*T.coningii* et *T.longibrachiatum*) en vue de mettre en évidence un contrôle biologique potentiel de la maladie de la malformation du manguier.

PREMIER CHAPITRE

PREVALENCE NATURELLE DES ESPECES FUSARIENNES SUR LES CEREALES DANS LA REGION DE CASABLANCA – SETTAT

1. MISE A JOUR BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE ET CONSERVATION DANS LE SOL

Les espèces de *Fusarium* sont présentes dans toutes les régions géographiques du monde. Elles sont considérées parmi les phytopathogènes les plus divers et les plus largement dispersés. On les trouve couramment dans l'eau douce, l'eau de mer, les sols ou sur les débris organiques des plantes où ils persistent sous forme de chlamydo-spores, pycnides, conidies, mycélium ou sous forme d'organes de reproduction sexuée (ascocarpes, asques et ascospores). De même, elles peuvent se retrouver sur les organes des plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, graines) sous forme de parasites. Les études récentes et d'autres moins récentes confirment que plusieurs espèces fongiques dont les espèces fusariennes peuvent se développer au niveau des organes des plantes en endophytes (Abdel-Azeem et al. 2019, Summerell et al. 2011, Leslie et Summerell, 2006).

1.2 ECOLOGIE DU GENRE *FUSARIUM*

Les espèces fusariennes les plus étudiées sont celles qui provoquent des maladies importantes chez les céréales ou d'autres plantes cultivées dont les pertes en rendement sont très élevées, surtout dans les pays qui adoptent une agriculture industrielle. Ces espèces sont isolées à partir des organes de plantes malades et sont plus ou moins adaptées à leurs hôtes. La fréquence et l'intensité de ces maladies sont très élevées dans les cultures intensives en agriculture conventionnelle qui supporte les intrants chimiques et les pratiques de monocultures monovariétales ou de conservation sur de grandes superficies (Leslie et Summerell, 2011, Fernandes et al. 2008).

Ainsi, par exemple, la maladie de la fusariose est très liée à l'agriculture moderne mécanisée. En effet la comparaison du pouvoir pathogène des *Fusarium sp* montre que les espèces confinées au sol de prairies ou de forêts ou de cultures de subsistance sont moins ou non pathogènes par rapport à celles qui se sont adaptées à parasiter les plantes ; ce qui en fait des sources incontournables pour l'étude de la variabilité observée chez ce genre (Leslie et Summerell, 2011).

Cette variabilité se reflète sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces, ce qui leur confère un pouvoir de coloniser des milieux et des niches écologiques différentes (Leslie et Summerell, 2011).

1.3 PATHOGENIE ET TOXICOGENIE

Les espèces fusariennes sont majoritairement phytopathogènes mais certaines sont pathogènes pour l'homme comme *F.solani*, ou *F.oxysporum* et causent des maladies importantes surtout chez les personnes immunodéprimées. La virulence des espèces fusariennes est en partie aggravée par leur pouvoir toxicogène. En effet, les espèces de ce genre sont productrices d'une grande diversité de mycotoxines parmi les plus redoutables comme les trichothécènes, le déoxynivalénol, la zearalénone, bikaverine, fusarine C et fusarubine et autres fusariotoxines nouvellement identifiées ou en cours d'identification (Refai et al. 2015). A titre d'exemple ; l'espèce *F.graminearum* est dotée d'un large spectre de synthèse de mycotoxines comme le Déoxynivalénol, le Nivalénol, les Trichothécènes, la toxine T, TH-2 et la Zaeralénone...etc et de métabolites secondaires variés.

Récemment, une approche de criblage bioinformatique à l'échelle du génome a révélé que le génome de *F. fujikuroi* ; par exemple ; code pour 45 enzymes clés pour la production de métabolites secondaires comme les polycétides synthases (PKS) et les synthases de peptides non ribosomiques (NRPS), appelées mégasynthases (grosses enzymes ou complexes d'enzymes modulaires et multimodulaires) révélant ainsi un potentiel de gènes importants codant pour ces enzymes. Ces molécules jouent un rôle clé dans les processus d'infection chez les plantes mais peuvent avoir une répercussion sur la qualité des produits alimentaires (Al-Hatmi et al. 2016).

1.4 PREVALENCE DES ESPECES FUSARIENNES SUR LES CEREALES

La fusariose des céréales est actuellement une maladie courante dans la majorité sinon la totalité des régions céréalières du monde. Les espèces ; du genre *Fusarium* ; sont nombreuses et variables d'une région à une autre, d'une espèce de plante à une autre et parfois d'une variété à l'autre (Scala et al. 2016, Fernandes et al. 2008, Arino et al, 1994, Houmairi, 1993). Des études récentes ont mis en évidence cette dynamique temporelle et régionale des différentes populations de *Fusarium sp* qui sont sensibles aux pressions de sélection spécifique à chaque localité (Pfordt et al. 2020, Bustamante et al. 2018, Kelly et al. 2015).

1.5 PREVALENCE ET REPERCUSSION SUR L'ECONOMIE, LA SANTE ET LA SECURITE ALIMENTAIRE

La fusariose est parmi les maladies qui posent le plus de problème de gestion sanitaire en agriculture intensive et ou de conservation en raison de la nature de l'inoculum primaire

qui se conserve dans le sol et dont le taux varie en fonction du précédent cultural et des conditions de la culture (Edwards et Jennings, 2018, Dill-Macky et al. 2000, Flett et al.1998). Pour cela, les pertes de rendement et l'incidence de la fusariose sur les céréales augmentent continuellement. Cette maladie destructrice des céréales à petits grains est un problème majeur de sécurité alimentaire en raison du pouvoir toxigène de la grande majorité sinon la totalité des espèces du genre *Fusarium*. La contamination des grains de céréales en mycotoxines a lieu aussi bien au champ qu'en période de récolte. Elle impacte les céréales bruts ou après leur transformation dans la chaîne agroalimentaire (Elshabrawy E.M., 2021, Bashyal et al.2019, Refai et al.2015).

1.6 QUELLE ESPECE FONGIQUE POUR QUELLE ESPECE DE PLANTE ?

A partir des plantes malades les espèces fusariennes sont toujours isolées en groupes d'espèces formant un complexe pathogène qui joue un rôle plus ou moins important dans la pathogénèse. En plus, les mêmes espèces peuvent infecter tous les organes de la plante et ce à différentes étapes de son cycle de développement (Glinushkin et al. 2021).

Les espèces les plus retrouvées sur les céréales sont *F.culmorum*, *F.graminearum*, *F.avenaceum*, *F.moniliforme*, *F.subglutinans*, *F.sporotrichoides*, *F.nivale*, *F.sambucinum*, *F.poaie*, *F.proliferatum*, *F.oxysporum*, *F.solani* et *F.equiseti*. Cette liste n'est pas exhaustive puisque on continue à identifier de nouvelles espèces (Okorski 2022, Moparthi et al, 2021, Pfordt et al. 2020, Refai et al. 2015, Leslie et Summerell, 2011, Burgess et al.1994).

D'autres espèces fongiques comme *Alternaria sp* ou *Bipolaris sp*, peuvent se retrouver avec les espèces fusariennes et jouer un rôle primaire ou secondaire dans la maladie selon les conditions agroclimatiques et la plante infectée (Glinushkin et al. 2021, Houmairi, 1993).

1.7 PRÉVALENCE DU GENRE *FUSARIUM* DANS LA REGION CASABLANCA-SETTAT

L'importance de chercher à identifier les espèces fusariennes dans des régions céréalières comme Casablanca - Settat est cruciale puisqu'elle permet une comparaison, d'abord entre les points d'échantillonnage dans la région et par rapport à d'autres régions du Maroc ou d'autres pays, ce qui peut donner une idée sur l'importance des espèces les unes par rapport aux autres et leur rôle dans l'infection ainsi que les facteurs qui modulent cette infection (Houmairi et al., 2018, Houmairi, 1993).

L'agriculture de subsistance diffère de l'agriculture conventionnelle ou commerciale. En effet, elle se fait sur des surfaces limitées, avec des pratiques de rotations culturales et peu d'intrants. Les rendements en conséquence sont moins importants mais la maladie est peu importante. La fréquence et la nature des espèces récupérées à partir des parties aériennes des plantes ou à partir des racines, du sol ou des débris, est complètement différentes de celles trouvées dans d'autres régions du monde où l'agriculture conventionnelle est exclusivement pratiquée (Leslie et Summerell, 2011).

La comparaison de la fréquence et de l'abondance de ces espèces peut fournir des données importantes pour comprendre les facteurs qui jouent un rôle dans la progression de la maladie et donc dans les moyens à envisager pour un éventuel contrôle.

1.8 OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif de ce chapitre est de contribuer à l'identification et à l'évaluation de la prévalence des espèces fusariennes, à la récolte, de 27 échantillons de quatre céréales (blé dur, blé tendre, orge et maïs) de la région de Casablanca - Settat,

2. METHODOLOGIE

Le matériel végétal étudié a consisté en une collection de 27 échantillons de céréales issus de la récolte de la campagne agricole 2013-2014. La collecte a été faite en juin 2014 dans les marchés locaux de différentes localités de la région de Casablanca-Settat (Jakma, Mzab, Sahel, Ouled Allal, Ouled Sibendawed, Mzamza et Ouled Said) Un total de 27 échantillons dont 9 de blé dur, 8 d'orge, 6 de maïs et 4 de blé tendre ont été stockés au laboratoire à une température de 5°C jusqu'à utilisation.

2.1 ANALYSE MYCOLOGIQUE

Les grains ont été désinfectés avec l'eau de javel dilué à raison de 4% pendant 3 minutes avant de subir un rinçage 3 fois à l'eau distillée stérile puis séchés sur du papier wattman stérile pendant 15 minutes ; sous une hotte à flux laminaire. Ensuite, 40 grains de chaque échantillon sont déposés aléatoirement sur des boîtes préalablement dotées du milieu de culture Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) à raison de 4 grains par boîte de Pétri.

Les colonies obtenues sont repiquées et purifiées séparément sur d'autres boîtes de pétri contenant un milieu de culture PDA (Potato-Dextrose-Agar) acidifié et additionné par le chloramphénicole. Ensuite, seulement les souches de *Fusarium* sont repiquées sur boîtes de pétri contenant le milieu SNA (Spezieller-Nährstoffarmer-Agar).

L'incubation est faite à l'obscurité, à 25°C jusqu'à l'apparition des premières colonies de moisissures (Houmairi, 1993).

2.2 IDENTIFICATION

L'identification des moisissures est faite en se basant sur leurs caractéristiques culturelles et morphologiques décrites dans Pitt et Hocking (2009) pour les moisissures et Burgess et al. (1994) pour les *Fusarium sp.* L'incidence des espèces fongiques a été calculée selon la formule suivante: $I (\%) = 100 \times n / N$ où n est le nombre total d'isolats et N le nombre total de grains. La fréquence relative des espèces est calculée selon la formule: $Fr (\%) = 100 \times n_i / N_t$ ou n_i est le nombre de genre ou d'espèce et N_t le nombre total d'isolats. Ces fréquences ont été calculées par espèce de céréale et par localité géographique.

Pour les espèces qui ne sporulent pas l'identification est confirmée en cultivant les espèces identifiées sur le milieu CLA (Carnation Leaf Agar) qui favorise la sporulation des espèces fusariennes, dans le cas où la sporulation n'est pas possible les espèces sont considérées comme des « mycelia sterilia ».

3. RESULTATS

Une partie des résultats obtenus dans cette étude se sont soldés par la publication d'un article scientifique publié dans la revue REMASAV en 2018.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce premier axe était l'identification et la prévalence des espèces fusariennes ; à la récolte ; sur quatre céréales (blé dur, blé tendre, orge et maïs) de la région de Casablanca - Settat. Le principal résultat obtenu, pour cette thématique a permis de mettre en évidence un ensemble d'espèces de moisissures dont les genres *Alternaria* suivi par *Fusarium* qui prédominent dans tous les sites étudiés. Les résultats obtenus ont permis de dresser un inventaire des espèces potentiellement responsables des pourritures racinaires et de la fusariose chez le blé dur, le blé tendre, l'orge et le maïs dans la région de Casablanca – Settat.

Ces résultats confirment que dans notre région c'est la maladie des pourritures racinaires qui est à l'origine de l'infestation des grains par *Alternaria sp* et *Fusarium sp*. Ceci nous renseigne sur une infection préalable des racines de ces céréales au cours de leur développement par *Alternaria* et *Fusarium sp*. En outre, ces résultats nous permettent de dire que la fusariose des épis peut facilement se développer dans ces régions si les conditions de cultures et celle de l'environnement changent au profit des conditions favorables à la prolifération de ces pathogènes.

DEUXIEME CHAPITRE

CARACTERISATION

MORPHOLOGIQUE ET

MOLECULAIRE DES ESPECES

FUSARIENNES IMPLIQUEES

DANS LA MALADIE DE LA

MALFORMATION DU

MANGUIER.

1. METHODES D'IDENTIFICATION DANS LE GENRE FUSARIUM: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 IDENTIFICATION MACROSCOPIQUE

La plupart des espèces du genre *Fusarium* se développent en colonies laineuses à cotonneuses, plates et étalées à croissance apicale centrifuge. La couleur du mycélium est d'abord blanchâtre puis, elle peut devenir crème, beige, saumon, cannelle jaune, rouge, violette, rose ou rouge brique. Au verso, la coloration peut être beige, marron, rouge, violette claire ou foncée ou incolore. Certains organes de reproduction peuvent être visibles à l'œil nu ou à la loupe comme les sporodochies (Rifai et al. 2015, Leslie et Summerell, 2006, Burgess et al.1994).

1.2 IDENTIFICATION MICROSCOPIQUE

Cette identification se base sur les critères de présence-absence de macroconidies, microconidies, mesoconidies, chlamydospores, sporodochies, et de périthèces chez les espèces qui se reproduisent de façon sexuée. Toutes ces structures sont supportées par le mycélium plus ou moins ramifié qui produit à partir de ; monophialides ou polyphialides ; des conidies libres ; qui peuvent rester agglomérées ; de différentes formes et tailles selon les espèces (Rifai et al. 2015, Leslie et Summerell, 2006, Burgess et al, 1994).

L'identification macroscopique et microscopique se fait en se basant sur des clés d'identification et sur des milieux de culture appropriés. Elle demande une période de temps relativement assez importante puisque certaines espèces de *Fusarium* ont une croissance ralentie de plus d'une semaine pour la croissance de la colonie et plus de deux semaines pour la sporulation et l'observation des organes de fructification (Houmairi, 1993). En plus, certaines caractéristiques de la reproduction sexuée ou asexuée sur lesquelles se base l'identification ne sont pas toujours obtenues en culture.

Bien que cette méthode soit la base de l'identification dans tous les laboratoires de mycologie, elle doit se faire par des spécialistes confirmés et expérimentés (O'Donnell et al. 2020, Huzeifa et al. 2017).

1.3 IDENTIFICATION GENETIQUE

Chez les champignons en général et les espèces du genre *Fusarium* en particulier, bien que les caractéristiques morphologiques et culturales soient essentielles pour l'identification, elles restent souvent limitées surtout pour les espèces d'un même complexe ou très proches. Ces difficultés sont d'autant plus importantes que le nombre d'espèces nouvelles ne cesse d'augmenter dans différentes régions et différents biotopes. L'identification moléculaire basée sur des séquences particulières d'ADN permet d'explorer le polymorphisme à différents niveaux et permettre une discrimination entre les espèces où même à l'intérieure des espèces (Huzeifa et al.2017, Al-Hatmi et al.2016).

Les séquences d'ADN ribosomal ont été considérées comme des régions de choix pour les études moléculaires pour la première fois par White et al. en 1990. En effet, les gènes ribosomiaux se répètent en nombreuses copies, en tandem, au niveau de l'organisateur nucléolaire du génome fongique. Les régions codant pour les ARNr sont très conservées et peu variables, les amorces sont souvent conçues sur la base de leurs séquences. Les ARN transcrits (transcrit primaire) subissent la maturation en éliminant des régions appelées ITS (Internal Transcribed Spacer), régions transcrites mais non codantes. Ces régions ont une grande variabilité inter-espèces.

Ainsi, le gène ribosomique possède plusieurs avantages. En effet, en plus d'une amplification facilitée (taille des séquences) ; il présente des régions hautement conservées (ARN 18S, 5,8S et 28S) ; permettant la conception d'amorces universelles (panfongiques) et d'autres régions variables (ITS1 et ITS2) ; ayant accumulées suffisamment de mutations ; permettant l'identification des espèces fongiques (Huzeifa et al. 2017, Singha et al. 2016, Stielow et al. 2015).

En raison de sa facilité d'amplification, de son utilisation généralisée et de l'écart de code à barres suffisamment important (c'est-à-dire la différence entre la variation interspécifique et infraspécifique), la région ITS a été choisie comme code à barres officiel pour les espèces de champignons par un large consortium de mycologues (Barcode of life, 2000).

1.4 LE COUPLE D'AMORCE ITS1/ITS2 ET ITS1/ITS4

La région ITS a environ une taille moyenne de 600 paire de bases, et comporte deux zones ITS1 et ITS2, qui encadrent la région codant pour l'ARNr 5,8S (l'ensemble a une taille

de 450 à 800 paire de bases) elles-mêmes encadrées par les régions 18S (petite sous-unité (côté 5')) et 28S (grande sous-unité (côté 3')). Cette dernière comporte également deux domaines très variables qui ont servi à développer d'autres types d'amorces. Le couple d'amorce ITS1/ITS2 et ITS1/ITS4 est souvent utilisé et donne des résultats satisfaisant pour l'identification au rang de l'espèce. La région ITS a été adoptée comme code à barres universel pour tous les champignons (Schoch et al. 2012), son taux de réussite pour la PCR est de 92%. Le calcul de la probabilité d'identification est de 76% pour les espèces fongiques d'intérêt médical par exemple (Huzeifa et al. 2017).

Cependant, le nombre important d'espèces fongiques et la grande variabilité du génome du règne fongique en général et spécialement pour certains genres comme *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* ou *Fusarium* ; qui ont un grand intérêt scientifique et écologique mais qui montrent une grande variabilité intraspécifique. et qui présentent des lacunes au niveau de leur de code-barres au niveau de leur régions ITS. De telles raisons ont poussé les chercheurs à recourir à d'autres séquences plus spécifiques et présentant plus de variabilités pour les espèces très proches qui peuvent compléter les séquences ITS (Huzeifa et al. 2017, Al-Hatmi et al. 2016).

1.5 AUTRES AMORCES

Les conditions précitées qui constituent une limite de l'utilisation de la région ITS comme code à barres unique et l'évolution rapide des nouvelles méthodes de séquençage, ont permis de penser au développement d'un code à barres secondaire afin d'augmenter la pertinence du codage à barres de l'ADN. Le facteur d'élongation de la traduction EF1-alpha (TEF1- α) a été proposé en 2015 comme code-barres secondaire chez les champignons (Stielow et al. 2015). D'autres séquences ont été proposées comme le gène de la β -tubuline, la calmoduline, TEF3, RPB1, RPB2, Lys2...etc. (Al-Hatmi et al. 2016, Stielow et al. 2015, Watanab et al. 2011).

Chez le genre *Fusarium*, parmi les gènes qui ont été le plus étudiés ces deux dernières décennies et qui ont montré une fiabilité intéressante (qui s'approche de celle reportée pour l'ITS, pouvant la compléter), les gènes TEF1- α , le gène TOPI (topoisomérase), et le gène PGK (phosphoglycérate kinase). Ces gènes offrent plusieurs types d'amorces qui sont des plus utilisées dans le cas de l'identification des espèces du genre *Fusarium* (particulièrement l'amorce EF1-1018F/EF1-1620R), d'où la proposition de les utiliser comme code à barres

secondaire complémentaires ou codes spécifiques pour les différents types de taxons fongiques (Kidd et al. 2020, Huzeifa et al. 2017, Refai et al. 2015, Stielow et al. 2015, O'Donnelle et al. 2013).

1.6 CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ESPECES FUSARIENNES

Dans le genre *Fusarium* l'identification classique bien qu'elle reste très utile en mycologie et en phytopathologie, elle peut être à l'origine d'une certaine confusion en raison d'abord, de la grande variabilité des espèces isolées en fonction des nombreux facteurs agro-climatiques (substrat, sol, espèce de plante ou variété). Ensuite, des facteurs géographiques (la localité, le microclimat, la saison) (voir chapitre précédant). Enfin, les conditions et la composition des milieux de culture utilisés pour isoler et purifier ces espèces. D'autres facteurs comme la reproduction sexuée ou les facteurs para sexués peuvent augmenter l'ambiguïté dans l'identification (O'Donnell et al. 2020, Huzeifa et al. 2017, Lepoivre et al. 2003).

Le recours à l'identification moléculaire permet de compléter la caractérisation morphologique qui, à elle seule, ne peut apporter la précision et la rapidité requises et ce, dans tous les domaines aussi bien économiques (certification de semences ou de denrée alimentaires), de santé (pour les espèces d'intérêt clinique chez l'homme ou les animaux) ou commerciale (le transit international des produits agricoles par exemple). D'autre part, l'identification moléculaire a été à l'origine du rapprochement entre la forme asexuée et la forme sexuée des différentes espèces fongiques généralement et Fusariennes spécialement bien qu'elles ne partagent pas la même niche écologique (Summerell et al. 2011).

En outre, la caractérisation moléculaire et les études phylogénétiques ont rapprochées certaines espèces et éloignée d'autres. Par exemple, certains complexes de *Fusarium* qui contenaient un nombre important de lignées ont éclatés en espèces (complexe *F. graminearum*, *F. oxysporum* ou le complexe *F. fujikuroi*), alors que d'autres genres de la famille des Nectriacées (à laquelle appartient le genre *Fusarium*) se sont trop rapprochés du genre ce qui a incité les chercheurs phylogénéticiens à les considérer comme des formes fusarioïdes qui peuvent être attachées au genre *Fusarium* (Crous et al. 2021).

D'un autre côté, le changement du système de nomenclature double vers un système de nomenclature unique pour les champignons n'a pas pu être complètement instauré à travers le monde jusqu'à présent. Ceci a augmenté le nombre des espèces Fusariennes identifiées et

prête à la confusion (deux noms différents peuvent concerner la même espèce) (Huzeifa, et al. 2017)

En plus, l'utilisation du nom de « *Fusarium* » est réservée à la forme asexuée mais elle continue à être utilisée même pour la forme sexuée car elle est bien plus ancienne et plus ancrée dans les systèmes éducatifs, de recherche ou de santé par rapport aux noms des formes téléomorphes; comme « *Gibberella* » ; qui sont moins utilisés, moins connus et donc moins identifiés. Ainsi, cette démarche peut aussi contribuer à la confusion dans l'identification sur les bases de données comme Gène Bank (O'Donnelle et al. 2020, Huzeifa et al. 2017).

1.7 OBJECTIF DE L'ETUDE

Ce deuxième axe de recherche avait pour objectif la caractérisation morphologique et moléculaire de treize espèces fusariennes isolées à partir de plantes de mangue présentant la maladie de la malformation du manguier.

2. METHODOLOGIE

2.1 ECHANTILLONS

Les échantillons fongiques (une vingtaine) sont arrivés au laboratoire sous forme de culture en conservation dans des tubes de gélose inclinée. Après une première culture sur milieu PDA, les espèces qui montraient les caractéristiques morphologiques de *Fusarium sp.* ont été repiquées dans le but de réaliser une culture monospore.

2.2 PROTOCOLE DE LA CULTURE MONOSPORALE

La culture monospore est préconisée dans le but d'obtenir un matériel fongique génétiquement homogène (Booth, 1971). Pour cela les souches ont été d'abord repiquées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA jusqu'à sporulation (entre sept et dix jours). Ensuite, un disque mycélien de 5mm de diamètre est prélevé à la périphérie de la colonie et introduit dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile. Après agitation, une série de dilutions est réalisée avec une pipette stérile (de 10^{-1} à 10^{-5}) puis un volume de 0,1ml contenant généralement quelques microconidies (comptées grâce à la cellule de Thomas) est prélevé et étalé avec des billes stériles sur un milieu gélosé à 2%.

Le repérage et la délimitation des spores en germination sont effectués à l'aide d'une loupe binoculaire après 48h d'incubation à 25°C. Un fragment de gélose portant la conidie est prélevé à l'aide d'une anse stérile puis déposé dans une nouvelle boîtes de Pétri contenant le milieu PDA modifié au chloramphénicole avant d'être scellée et incubées dans une étuve à 25° C. Cette opération a été répétée pour les différents isolats et pour chaque isolat.

2.3 CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE

Les cultures obtenues ci-dessus sont repiquées de nouveau au moyen d'un disque mycélien de 5mm de diamètre prélevé aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce sous la hotte, les boîtes avant d'être incubées de nouveau dans l'étuve à 25°C. Au bout de dix jours la majorité des espèces fusariennes sporulent et sont prêtes pour l'identification. Les cultures obtenues en double sont conservées au réfrigérateur pour l'identification moléculaire.

L'étude macroscopique a été faite en se basant sur la couleur à la surface et au revers des boîtes, la vitesse de croissance du mycélium et la pigmentation. Alors que la description microscopique a été effectuée en observant la forme des microconidies, des macroconidies,

des phialides et les chlamydospores. En outre une étude biométrique a été effectuée sur 50 conidies par isolat.

2.4 CARACTERISATION MOLECULAIRE

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir de culture jeune de sept jours. en utilisant le Kit de la plate forme « Isolate II Plant DNA kit » de BIOLINE selon le protocole du kit. Puis un dosage par Nanodrop a été effectué avant la PCR pour vérifier la pureté des échantillons. Une réaction PCR a été préparée pour les 13 échantillons d'ADN en utilisant le couple d'amorce universelle (sens/anti sens) ITS1 / ITS4 (ITS1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' and ITS4 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC 5') (Kumar et al. 2016, Singha et al. 2016).

Le tableau suivant donne la composition du mix :

RÉACTIFS : Taq DNA polymérase kit de Bioline	Quantité pour un tube
2xTampon	10 µl (microlitres)
ITS1, 10 µM (microMolaire)	2 µl (microlitres)
ITS4, 10 µM (microMolaire)	2 µl (microlitres)
ADN	120 ng (nanogramme)
H ₂ O	QSP pour un volume de 25 µl

La PCR a été effectuée à l'aide d'un Thermocycleur « Veriti » marque ABI (Applied Biosystems) selon le programme suivant : 95°C, 2min ; (95°C, 30sec ; 57°C, 30 sec ; 72°C, 30sec) 35x ; 72°C, 3min.

Les produits de la PCR ont été détectés à l'aide d'une électrophorèse effectuée par migration sur un gel d'agarose 1% en présence d'un marqueur de poids moléculaire de 1Kb. Les photos ont été visualisées par le système de photo documentation « G Box ». Les produits PCR des échantillons d'ADN amplifiés sont passés au laboratoire de séquençage pour la suite des analyses. L'étude moléculaire a été faite au niveau du Centre National de Recherche Scientifique (CNRST, Rabat, Maroc).

2.5 ETUDE BIOINFORMATIQUE

Après séquençage et traitement par BLAST, les séquences consensuelles ont été comparées aux séquences de la base de données NCBI GenBank. L'identité de chaque isolat a été définie en se basant sur le pourcentage de ressemblance le plus proche des résultats du Blast. Un arbre phylogénétique a alors été construit à l'aide du logiciel MEGA 10.1.6 (Kumar

et al. 2018) en utilisant l'algorithme Maximum Likelihood (Felsenstein, 1985). Les séquences obtenues ont été soumises à Genbank NCBI pour l'attribution de numéros d'accèsion. Cette partie bioinformatique a été réalisée grâce à la contribution de M^{me} Fatima Gaboune remerciée, docteur-ingénieur bio-informaticien à l'INRA de Rabat, Maroc.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Le résultat de l'identification morphologique et moléculaire est reporté dans le tableau suivant afin de tirer les principales conclusions quand à cette étude. C'est un récapitulatif de l'identification morphologique et moléculaire avec les pourcentages de similarité sur la banque de gène NCBI avec des pourcentages de similarité (scores %) pour les treize isolats de *Fusarium*:

ISO LA T	SEQUENCE	MORPHOLOGIE	GENETIQUE	SCORE%
17	540	<i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>	99,82
2	543	<i>F. sterilihyphosum</i>	<i>F. sp. ASPBI-TR Buralikson</i>	99,26
			<i>F. fujikuroi strain Bt4L</i>	99,25
			<i>F. proliferatum isolate EFS12</i>	99,25
3	544	<i>F. mangifera</i>	<i>F. subglutinans</i>	99,45
			<i>F. proliferatum TF1</i>	99,45
			<i>F. sp.3.BRO-2013</i>	99,45
5	545	<i>F. mangifera</i>	<i>Ffujikuroi strain Bt4L</i>	99,44
			<i>G. moniliformis strainsEXGF-2</i>	99,45
6	521	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. circinatum Isolate L-943/2013</i>	99,44
7	548	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. sterilihyphosum isolate EFA6F SRG</i>	99,25
8	554	<i>F. mangifera</i>	<i>F. fujikuroi FZ04</i>	99,44
			<i>Fusarium verticillioides strain AE-FPO8</i>	99,62
			<i>Fusarium proliferatum strain TF1</i>	99,44
9 et 6'	543	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. circinatum</i>	99,62
11	560	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. sudanens/G.thapsinaM3790</i>	99,64
			<i>Gibberella thapsina isolate M3790</i>	99,64
			<i>Fusarium annulatum 2704/2012</i>	99,46
12	558	<i>F. subglutinans</i>	<i>G. moniliformisFM7</i>	99,08
26	543	<i>F. mangifera</i>	<i>F. subglutinans</i>	99,44
53	548	<i>F. sp.</i>	<i>G. moniliformis Novb1 = F. verticillioides</i>	99,82

L'identification morphologique a permis d'identifier les 13 espèces selon une fréquence de :

- 30,76 % (isolat 6, 7, 11 et 12) comme étant *F. subglutinans* qui est aussi connue sous le nom de *F. moniliform var subglutinans* aussi connue sous le nom de *F. mangifera*.
- 30,76 % (isolats 3, 5, 8 et 26) comme étant *F. mangifera* espèce responsable de la malformation du manguiier.

- 7,68 % (isolat 2) comme étant *F. sterilihyphosum*, cette espèce est aussi associée au nom de *F. subglutinans* ou *F. mangifera*.
- 15,38 % (isolat 6' et 9) comme étant *F. oxysporum*, espèce normalement confinée au sol.
- 7,68 % (isolat 53) qui n'a pas pu être identifié : *F.sp.*

Au total, 9 isolats sur treize sont identifiés et connus comme étant responsables de la maladie de la malformation du manguier. L'espèce la plus dominante étant *F. mangifera*.

Les neuf espèces (les plus abondantes dans cette caractérisation morphologique) ont des noms synonymes selon Summerell et al. (2011). Avec l'espèce *F. mexicanum*, ces espèces ont été citées comme étant des espèces les plus responsables de la maladie de la malformation du manguier par Kumar et al. (2021) et Liew et al. (2016). Toutes ces espèces appartiennent au complexe fujikuroi traditionnellement appelée « section des Liseola »

D'autre part, *Gibberella fujikuroi* ou *Fusarium fujikuroi* est la forme téléomorphe des espèces de la section des Liseola. Actuellement, il groupe 50 anamorphes et 11 espèces biologiques sexuellement fertiles. Elles sont citées comme étant responsables de plusieurs maladies de plantes agricoles et horticoles; comme le manguier; qui sont économiquement importantes à travers le monde (El-Shabrawy, 2021, Bashyal, 2019).

L'analyse morphologique a permis d'identifier 13 espèces du genre *Fusarium* qui, selon des études récentes ou précédentes (Kumar et al. 2021, Liew et al. 2016, Lima et al. 2012, Marasas et al. 2006), sont toutes incriminées dans la maladie de la malformation du manguier à travers le monde. Le complexe Fujikuroi est le plus sinon le seul représenté (Montoya et al. 2022, Nihaus et al. 2016, Lima et al. 2012, Summerell et al. 2011).

Les résultats de la caractérisation moléculaire ont montré que les espèces identifiées présentaient des degrés de similarité, avec les espèces inscrites et disponibles sur la base de données NCBI, allant de 99,08 à 99,82 %. Les espèces qui ont été retenues, sont toutes des espèces du genre *Fusarium* appartenant au complexe Fujikuroi, à l'exception de *F.equiseti*.

Cette caractérisation moléculaire a permis de confirmer que les isolats 9 et 6' identifiés comme étant *F. oxysporum* étaient similaires à *F. circinatum*. Alors que l'isolat 53 était similaire à *Gibberella moniliformis* équivalent à *F. verticillioides*.

La majorité des isolats sont en effet du groupe fujikuroi qui renferme un ensemble d'espèces biologiques qui sont en réalité des formes téléomorphes des espèces fusariennes de la section des Liseola (El-Shabrawy, 2021, Leslie et Summerell, 2011). D'autre part, Huzeifa et al. (2017) ont signalés la nécessité d'utiliser d'autres séquences plus précises pour remplacer les amorces ITS ou les compléter dans le cas de l'identification des espèces du genre *Fusarium*.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue IJAR en 2021.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce deuxième axe de recherche a été la caractérisation des espèces fusariennes isolées à partir des plantes présentant les symptômes de la malformation du manguiier par une étude morphologique et moléculaire. Ainsi, 13 isolats du genre *Fusarium*, obtenus à partir de tissus présentant les symptômes de la maladie ont été caractérisés en utilisant des critères d'identification morphologique (culturels et microscopiques) ainsi qu'une analyse moléculaire où les séquences ITS des gènes l'ADNr ont été amplifiées par les amorces universelles ITS1 et ITS4.

L'analyse morphologique a permis d'identifier treize espèces du genre *Fusarium* qui, dont neuf sont impliquées dans la maladie de la malformation du manguiier à travers le monde. Le complexe Fujikuroi est le plus représenté avec une fréquence de 69,23 %.

Les résultats de la caractérisation moléculaire ont montré que les espèces identifiées présentaient des degrés de similarité, avec les espèces inscrites et disponibles sur la base de données NCBI, allant de 99,08 à 99,82 %.

Les espèces qui ont été retenues, sont toutes des espèces du genre *Fusarium* appartenant au complexe Fujikuroi, avec une fréquence de 92,30 % à l'exception de *F.equiseti* qui a une fréquence de 7,69 %. Ces résultats montrent l'intérêt d'associer l'identification morphologique à celle moléculaire, les deux se complètent pour donner le maximum de chance de faire une identification correcte.

Une étude du pouvoir pathogène de ces espèces suivie d'une nouvelle caractérisation moléculaire avec des amorces plus spécifiques aux espèces fusariennes comme celles du gène TEF1- α et/ou celles de la β -tubuline, ou bien l'utilisation d'une amorce spécifique à *F. mangifera*, pourrait discriminer avec précision ces espèces.

TROISIEME CHAPITRE

CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE LA MALFORMATION DU MANGUIER.

1. PROBLEMATIQUE DE LA LUTTE CONTRE *FUSARIUM* SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 DIFFICULTES DE GESTION DES MALADIES DUES A *FUSARIUM*

Les espèces du genre *Fusarium* se conservent dans le sol et les débris organiques sous forme de chlamydospores, conidies, mycélium ou d'organes de fructification pendant de longues périodes. L'infection des plantes par l'inoculum primaire dépend de plusieurs facteurs dont la sensibilité de l'hôte, les facteurs de l'environnement et la pathogénie de l'espèce phytopathogène (Moparthy et al. 2021, Pfordt et al. 2020).

En outre, les maladies causées par les espèces telluriques ; comme celles du genre *Fusarium* ; impactent plus les cultures pratiquées sous l'agriculture intensive ; dite industrielle ; qui utilise les produits chimiques de synthèse comme les engrais ou les pesticides et qui se base sur des variétés performantes ; en termes de rendement ; dans des conditions de monoculture avec mécanisation et technologies de pointe (Glinushkin et al. 2021, Leslie et Summerell, 2011).

1.2 CONTROLE BIOLOGIQUE DE *FUSARIUM*

Depuis plusieurs décennies et jusqu'à nos jours, les chercheurs et les agronomes proposent la méthode du contrôle intégré pour lutter contre les maladies dues à *Fusarium* puisque l'utilisation d'une seule méthode de contrôle ne peut pas assurer un contrôle efficace de la maladie (Glinushki et al. 2021, Lepoivre et al. 2003). Les sols qui ne permettent pas le développement des maladies dues à *Fusarium* sont caractérisés de suppressifs, dont la principale caractéristique est une flore microbienne très diversifiée et en équilibre où le seuil de l'inoculum primaire ne peut déclencher la maladie (Cha et al. 2016).

L'utilisation de la microflore du sol et de la rhizosphère comme agents de contrôle biologique afin de limiter le développement des agents phytopathogènes en vue de restituer l'équilibre biologique est très étudiée et exploitée (Veldman et al. 2018, Druzhinina et al. 2011, Howell, 2003). La définition du contrôle biologique a beaucoup évolué avec la révolution des études sur la génomique et la transcriptomique pour englober l'induction de la résistance chez les plantes par des microorganismes ou par le produit de leurs molécules.

L'étude du contrôle biologique par la stimulation des défenses naturelles de la plante (par l'acquisition de la résistance systémique) est actuellement en plein essor (Ben Amira et al. 2017).

Les espèces fongiques, bactériennes ou un produit de la dégradation de leurs molécules ainsi que d'autres molécules organiques produites par les plantes ou autres organismes ; naturellement ou dans des conditions de stress ; sont actuellement très étudiés dans le même but (Druzhinina et al. 2011).

1.3 RELATION TRICHODERMA-FUSARIUM

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) est l'un des genres de champignons de lutte biologique le plus utilisé dans le biocontrôle des maladies des plantes en générale et dans les infections dues à *Fusarium* en particulier (Druzhinina et al. 2011, Kubicek et al. 2011). Ceci est dû à sa nature comme étant un microorganisme du sol donc, peu nocif à l'environnement et à son large spectre d'activités biologiques nombreuses dont les mécanismes sont diversifiés (Howell, 2003).

Ces mécanismes sont d'abord un effet sur la morphologie et la croissance du mycélium : c'est le mycoparasitisme qualifié de l'hyper-parasitisme nécrotrophe par la production élevée de protéases, de chitinases, de cellulases et autres (Kubicek et al. 2011).

Le deuxième mécanisme est l'antibiose par la sécrétion de substances antibiotiques et de métabolites secondaires : plus de 200 dont les mycotoxines, des molécules diffusibles et d'autres volatiles (Vinale et al. 2014).

Enfin, le troisième mécanisme est la compétition spatiale ou nutritionnelle qui s'exerce vis-à-vis du pathogène. D'autre part, d'autres molécules sont produites lors de la relation avec la plante afin de moduler les interactions plante-hôte-pathogène (Zhu et al. 2022, Sharma et al. 2020, Zhang et al. 2018, Druzhinina et al. 2011, Benitez et al. 2004).

Parmi les espèces qui ont été étudiées et qui exercent un biocontrôle sur les espèces de *Fusarium*, figurent *T. harzianum*, *T. viridea*, *T. atoviride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* et *T. coningii*...etc (Druzhinina et al. 2011, Kubicek et al. 2011, Howell, 2003).

Ces données n'ont fait qu'augmenter le recours aux espèces de *Trichoderma* comme agent de biocontrôle de la fusariose spécialement et d'autres maladies généralement; en

agriculture conventionnelle ou biologique ; surtout pour les parasites telluriques comme *Fusarium* ce qui en fait un biopesticide de choix ; (Jitendra Mehta et al. 2012).

1.4 EFFET ANTAGONISTE TRICHODERMA-FUSARIUM IN VITRO

L'étude du biocontrôle de *Trichoderma* vis-à-vis de *Fusarium* in vitro a été reportée par plusieurs chercheurs qui ont évalué le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne in vitro. L'effet antagoniste est soit direct par compétition vis-à-vis des sources nutritives et de l'espace ou indirect par libération de composés volatils ; en culture double ou en filtrat de culture en milieu liquide (Dugassa et al. 2021, Veenstra et al. 2018, Mokhtari et al. 2017, Sharma et al. 2011).

La confrontation entre *F. moniliforme var subglutinans* (*F. mangifera*) agent responsable de la malformation du manguier par trois espèces de *Trichoderma* a permis de conclure sur l'effet antagoniste de ces espèces in vitro, (Kumar et al. 2012).

1.5 OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif de ce troisième axe de recherche a été d'étudier la confrontation entre les treize espèces fusariennes isolées et identifiées dans le deuxième chapitre avec deux souches de *Trichoderma* : *T. coningii* et *T. longibrachiatum* en vue de mettre en évidence un contrôle biologique potentiel de la maladie de la malformation du manguier.

2. METHODOLOGIE

2.1 AGENTS ANTAGONISTES

Les espèces de *Trichoderma*: qui ont été choisi pour le test de confrontation ont été récupérées au niveau de la collection de microorganismes du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique de Rabat, (CNRST) sous forme de culture jeune d'une semaine sur milieu PDA. Un choix judicieux a porté sur deux espèces connues pour leur pouvoir antagoniste important *Trichoderma koningii* Audemans (M35) et *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (M37).

2.2 PROTOCOLE DU TEST DE CONFRONTATION DIRECTE

Sur le milieu gélosé, une carotte de 5mm de diamètre du mycélium de *Fusarium sp.* est placée à une extrémité sur la boîte de Pétri. Au bout de 2 jours une autre carotte du mycélium de *Trichoderma sp.* est déposée sur l'autre extrémité de la même boîte à une distance de 5 cm. Les témoins sont constitués uniquement de l'agent pathogène ou de l'antagoniste ; cultivés séparément sur deux boîtes de Pétri séparées.

Des mesures quotidiennes (de 24 heures) de la croissance du mycélium ont été effectuées jusqu'à ce qu'il se stabilise et forme une zone d'inhibition entre les colonies. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne ont été calculés à l'aide de la formule: $PICR = [(R1 - R2) / R1] \times 100$ où PICR est le Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale, R1: le diamètre du témoin, R2: le diamètre du traitement (Howell, 2003, Benhamou et Chet, 1993).

2.3 PROTOCOL DU TEST DE CONFRONTATION INDIRECTE

Le test de la culture en double est le plus préconisé pour la mise en évidence des substances volatiles. Il consiste à repiquer une carotte de 5mm diamètre *Trichoderma sp.* et une autre de de *Fusarium sp.* de même diamètre et de même âge (six jours) dans deux boîtes séparées en même temps. Par la suite les couvercles sont enlevés, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes de culture de telle sorte que la boîte de *Trichoderma* soit en bas et celle de *Fusarium* en haut. L'assemblage des deux boîtes est renforcé par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Le témoin est assuré de la même façon en remplaçant la boîte de culture de *Trichoderma sp.* par une boîte de milieu gélosé stérile (PDA).

L'expérience a été répétée trois fois pour chaque isolat. Les cultures en double ont été incubées à 28 °C. La notation du diamètre moyen des colonies a été réalisée au bout de six jours. L'inhibition de la croissance mycélienne a été estimée en pourcentage par rapport aux témoins selon la formule précédente (Deniss et Webster, 1971).

2.4 ANALYSE DES DONNÉES

Les données ont été analysées avec le logiciel statistique R 3.5.1. Une analyse de variance à deux facteurs a été effectuée grâce à la fonction AOV du PACKAGE AGRICOLAE. Le test de comparaison multiple de Student Newman et Keuls (SNK) a été fait grâce à la fonction SNK.test du PACKAGE AGRICOLAE.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Ce travail de recherche a fait l'objet d'une publication dans le journal IJAIR en 2021.

4. CONCLUSION

L'objectif de ce troisième axe de recherche a été d'évaluer *in vitro*, l'effet antagoniste de deux espèces de *Trichoderma* : *T. coningii* A. et *T. longibrachiatum* R., sur les treize espèces de *Fusarium* qui ont été identifiées comme principales responsables de la malformation du manguiier. Les résultats obtenus montrent que les deux espèces antagonistes ont produit un effet direct et indirect d'inhibition de croissance sur les isolats testés.

Les pourcentages moyens d'inhibition en présence de *Trichoderma koningii* Audemas variaient de 13,13 à 57,67 % lors de la confrontation directe et de 3,33 à 33,33% lors de la confrontation à distance. Alors qu'avec la présence de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, les pourcentages d'inhibition étaient de 9,80 à 37,03 % lors de la confrontation directe et de 11,11 à 33,33 % lors de la confrontation à distance. Ainsi 85% d'isolats ont montré un pourcentage d'inhibition significatif dans le cas de la confrontation directe et 54% dans le cas de la confrontation à distance pour les deux souches testées.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Dans ce document je présente les thématiques principales que j'ai pu développer au Laboratoire Agroalimentaire et Santé à la FST de Settat. Ces thématiques s'articulent de façon générale autour de trois axes :

Le premier axe a porté sur l'étude de la prévalence et la diversité des espèces fusariennes présentes naturellement sur les céréales dans la région de Casablanca - Settat. En effet, étant donné le peu d'information concernant la fusariose au Maroc, l'objectif de cette étude était de détecter une éventuelle contamination naturelle de vingt-sept échantillons de céréales : blé dur (9), blé tendre (4), orge (8) et maïs (6) récoltés pendant l'année agricole 2013/2014, dans sept localités différentes de la région. Pour cela, une identification morphologique classique prenant en compte les principales caractéristiques microscopiques et macroscopiques des espèces fongiques isolées des quatre céréales a été réalisée sur des échantillons frais.

Les résultats de cette étude ont montré la présence d'une microflore fongique assez variée (564 isolats). Le genre *Alternaria* a représenté 53% suivi des genres *Fusarium* (16%), *Aspergillus* (14%), *Rhizopus* (8%), *Bipolaris* (3%), *Absidia* (2%) et autres (4%). La fréquence et le type d'espèces fongiques varient en fonction du type de la céréale et de l'origine géographique de l'isolat. Les résultats montrent aussi que l'infection due à *Alternaria* est plus fréquente que celle due à *Fusarium* ce qui montre que la maladie des pourritures racinaires est plus prépondérante que la fusariose dans la région.

Le deuxième axe a porté à la fois sur l'étude morphologique et moléculaire des espèces fusariennes isolées de plantes présentant les symptômes de la malformation chez le mangouier. L'objectif de cette étude a été d'identifier les espèces fongiques associées aux symptômes de la malformation chez le mangouier par la méthode classique en se basant sur des critères microbiologiques de culture, purification et identification. Ensuite, cette étape a été suivie par une identification moléculaire en se basant sur le gène codant la région ITS de l'ADN ribosomique fongique. L'amplification de la région ITS de l'ADN ribosomal des souches de *Fusarium sp* avec le couple d'amorces ITS1/ITS4, a donné des bandes de tailles comprises entre 500 et 600 paires de bases.

Le séquençage du produit de PCR a été soumis à la base de données de référence du NCBI et analysé par BLASTn pour l'identification des séquences fongiques. Le pourcentage de ressemblance entre les isolats de cette étude et ceux présents sur la banque de gènes était

élevé puisqu'il a varié de 99,08 à 99,82 %. Dans une troisième étape, l'indice de similarité a permis de dresser l'arbre phylogénique des espèces étudiées par rapport aux espèces qui leur sont les plus proches sur la base de données NCBI ce qui a permis de rapprocher la majorité des espèces fusariennes étudiées aux espèces disponibles sur la base de données et qui présentent le plus de ressemblances au niveau des séquences amplifiées. Pour l'espèce *F.equiseti*, l'identification moléculaire a confirmé celle morphologique.

De même, pour les autres espèces identifiées au paravent comme étant du groupe fujikuroi, l'identification moléculaire a confirmée ce résultat. Le manque de séquences identiques sur la base de données NCBI et le problème de nomenclature double et autres difficulté dans l'utilisation des bases de données n'ont pas permis de discriminer toutes les espèces pourtant très proches en % de similarité. La très haute spécificité des espèces fusariennes du groupe fujikuroi, font que le marqueur ITS soit insuffisant pour montrer un polymorphisme chez ces espèces.

D'autre part, la base de données est enrichie par les séquences des espèces identifiées dans différentes régions du monde donc connues, si nos séquences n'ont jamais été identifiées cela explique ce résultat. D'autre part, les treize isolats ont été inscrits à la base de données sous un numéro d'ordre (numéro d'accession) qui les caractérise sur Gene Bank.

Le troisième axe a porté sur l'évaluation de l'effet antagoniste de deux souches de *Trichoderma* vis-à-vis des treize espèces fusariennes isolées et identifiées préalablement. L'objectif de cet axe était d'évaluer le taux d'inhibition de la croissance fongique des espèces fusariennes responsables de la malformation du manguier, en confrontation directe ou indirecte, avec deux espèces du genre *Trichoderma* (*T. coningii* et *T. longibrachyatum*). Ce genre comporte des espèces ayant des propriétés antagonistes envers plusieurs espèces fongiques dont certaines espèces du genre *Fusarium*.

La confrontation directe et indirecte a montré que les souches de *Trichoderma* ont une activité sur la croissance mycélienne des 13 isolats de *Fusarium* à des taux qui varient d'un isolat à un autre, selon la méthode de confrontation utilisée. Les pourcentages moyens d'inhibition en présence de *Trichoderma koningii* Audemas (M35) variaient de 13,13 à 57,67 % lors de la confrontation directe et de 3,33 à 33,33% lors de la confrontation à distance. Alors qu'avec la présence de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (M37), les pourcentages d'inhibition étaient de 9,80 à 37,03 % lors de la confrontation directe et de 11,11 à 33,33 % lors de la confrontation à distance.

La compétition et le mycoparasitisme ont été les principaux modes d'action mis en évidence pour inhiber la croissance mycélienne des 13 isolats testés. Ainsi 85% d'isolats ont

montré un pourcentage d'inhibition significatif dans le cas de la confrontation directe et 54% dans le cas de la confrontation à distance pour les deux souches de *Trichoderma*. Comme pour plusieurs autres espèces de *Trichoderma*, ces résultats montrent la possibilité d'utiliser ces deux espèces *T. longibrachyatum* et *T. coningii* dans une étude ultérieure comme méthode de lutte préventive contre la maladie de la malformation du manguier vis-à-vis des isolats qui s'avèrent pathogènes.

Ce recueil de mes travaux de recherche a résumé brièvement les thématiques principales que j'ai pu développer au Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé à la FST de Settat entre 2016 et 2021. Toutes ces thématiques ont été réalisées en totalité ou en partie au Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé et ont fait l'objet de plusieurs communications orales ou posters et de trois publications.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdel-Azeem** Ahmed M., Amira G. Darwish, Nieven A. Nafady, and Nancy A. Ibrahim, 2019. *Fusarium* Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi, Chap.6, pp 201–261.
- **Al-Hatmi** AMS, Van Den Ende AHGG, Stielow JB, Van Diepeningen AD, Seifert KA, McCormick W, et al. 2016. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*. *Fungal Biol.* 120 (2): 231-45.
- **Arino**, A.A.; Bullermann, L.B.1994. Fungal colonization of corn grown in Nebraska in relation to year, genotype and growing conditions. *J. Food Prot.* 57, 1084–1087.
- **Barcode** of life, 2000. <http://www.barcodeoflife.org>
- **Bashyal** Bishnu Maya, Jagdish Yadav, Ashish Kumar Gupta, Rashmi Aggarwal, 2019. Understanding the secondary metabolite production of *Gibberella fujikuroi* species complex in genomic era Indian. *Phytopathology*,72: 607–617
- **Ben Amiraa** Maroua, David Lopeza , Ali Triki Mohamedc , Ali Khouajab , Hatem Chaard , Boris Fumanala , Aurélie Gousset-Duponta , Ludovic Bonhomme , Philippe Labela , Pascale Goupila , Sébastien Ribeiroa , Valérie Pujade-Renauda,f , Jean-Louis Juliéna , Daniel Auguing , Jean-Stéphane Venissea. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees, *Biological Control* 110: 70–78
- **Benhamou**, N. and I. Chet (1993). "Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process." *Phytopathology-new york and baltimore then st paul-* 83: 1062-1062.
- **Benítez** Tahía , Ana M. Rincón M. Carmen Limón Antonio C. Codón, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain. *International Microbiology*, 7:249-260
- **Booth**, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, surrey. England.
- **Burgess** L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P., Backhouse D. 1994. *Fusarium* Research Laboratory. Department of Crop Sciences University of Sydney Royal Botanic Gardens. Sydney
- **Bustamante** Minely Cerón , Todd J. Ward , Amy Kelly, Martha M. Vaughan, Susan P. McCormick, Christina Cowger, Santos G. Leyva-Mir, Héctor E. Villaseñor-Mir,

- Victoria Ayala-Escoba , Cristian Nava-Díaz, 2018. Regional differences in the composition of *Fusarium* Head Blight pathogens and 2 mycotoxins associated with wheat in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 273, 20, Pages : 11-19
- **Cha** Jae-Yul , Sangjo Han, Hee-Jeon Hong, Hyunji Cho, Daran Kim, Youngho Kwon, Soon-Kyeong Kwon, Max Crüsemann, Yong Bok Lee, Jihyun F Kim, Guri Giaever, Corey Nislow, Bradley S Moore, Linda S Thomashow, David M Weller and Youn-Sig Kwak, 2016. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. *The ISME Journal*, 10: 119–129.
 - **Code** de Nomenclature International, 2012. International Association for Plant Taxonomy. Code de Melbourne, 2012.
 - **Crous** P.W.et L.Lombard, M.Sandoval-Denis, K.A.Seifert, H.-J.Schroers, P.Chaverri, J.Gené, J.Guarro,Y.Hirooka, K.Bensch, G.H.J.Kema, S.C.Lamprecht, L.Cai, A.Y.Rossman, M.Stadler, R.C.Summerbell, J.W.Taylor, S.Ploch, ...M.Thines., 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*. Volume 98, 1000116.
 - **Dennis**, C. and J. Webster, 1971. "Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics." *Transactions of the British Mycological Society* 57(1): 41- 44
 - **Dill-Macky**, R.; Jones, R.K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis*. 84: 71–76.
DOI 10.1007/s13313-016-0454-z
DOI: 10.1094/PHYTO-96-0667
DOI:10.13140/RG.2.1.3104.2728.
<https://www.researchgate.net/publication/278848152>
 - **Druzhinina**, Irina S. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. <https://escholarship.org/doi/10.1038/nrmicro2637>
 - **Dugassa** Alemayehu, Tesfaye Alemu and Yitbarek Woldehawariat, 2021. In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease *Fusarium solani* of faba bean (*Vicia faba* L.). *BMC Microbiology* 21:115
 - **Edwards**, S.; Jennings, P. 2018. Impact of agronomic factors on *Fusarium* mycotoxins in harvested wheat. *Food Addit. Contam.* 35, 2443–2454

- **El-Shabrawy** E.M. 2021. Biological Species and Effective Population Number in *Gibberella fujikuroi* Species complex recovered from Sorghum in Egypt. Egyptian Journal of Phytopathology, Vol. 49, No. 1, pp. 25-36
- **Felsenstein**, J. 1985. “Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap”. Evolution 39: 783 - 791
- **Fernandes**, M.R.; Huber, D.; Basnyat, P.; Zentner, R.P. 2008. Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. Soil Tillage Res.100, 60–71.
- **Flett**, B.C.; McLaren, N.W.; Wehner, F.C. 1998. Incidence of ear rot pathogens under alternating corn tillage practices. Plant Dis. 82, 781–784
- **Geiser** DM, Aoki T, Bacon CW, Baker SE, Bhattacharyya MK, Brandt ME, Brown DW, Burgess LW, Chulze S, Coleman JJ, Correll JC, Covert SF, Crous PW, et al. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. Phytopathology 103: 400 - 408.
- **Glinushkin** A.P., A V Ovsyankina, D A Korniyukov, 2021. Integrated protection of cereals against *Fusarium* species. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 663.012048
- **Hawksworth** et al. 2011. The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. IMA Fungus. Volume 2: N° 1: 105–112.
- **Houmairi** H., A. Oubayoucef, I. Idrissi, F.E. Benchekroun Krimi, 2018. Haute prévalence de *Fusarium* spp. associés aux grains de céréales dans la région centrale du Maroc: risques pathogénique et toxigène. Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. 6 (3): 355-361
- **Houmairi** H. 1993. Contribution à l'étude des pourritures racinaires des céréales: résistance variétale, rotation et pratiques culturales, pathogénie de *Fusarium equiseti*. Thèse de troisième cycle. Université Cadi ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc.
- **Howell** CR, 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts Plant Disease , Vol. 87 No. 1, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00810-20>
- **Huzeifa** A. Raja, Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce and Nicholas H. Oberlies, 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community J. Nat. Prod. 80: 756-770
- **Jitendra Mehta** et al Mridula Khandelwal, Sakshi Datta, Ritu Naruka, Komal Makhijani, Gajendra Sharma, Rajesh Kumar and Subhas Chandra 2012. Isolation,

characterization & biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products- A biocontrol agent Adv. Appl. Sci. Res. 3(6): 3950 - 3955

- **Kelly** Amy C., Randall M. Clear, Kerry O'Donnell, Susan McCormick , T. Kelly Turkington, Andy Tekauz, Jeannie Gilbert, H. Corby Kistler, Mark Busman, Todd J. Ward, 2015. Diversity of *Fusarium* head blight populations and trichothecene toxin types reveals regional differences in pathogen composition and temporal dynamics. Fungal Genetics and Biology, 82: 22 - 31
- **Kidd** Sarah E., Sharon C.-A. Chen, Wieland Meyer and Catriona L. Halliday, 2020. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? Frontiers in Microbiology, Volume 10: 29 - 03.
- **Kubicek** Christian P, Alfredo Herrera-Estrella, Verena Seidl-Seiboth, Diego A Martinez, Irina S Druzhinina et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biology 12: R40
- **Kumar** A., B.D. Bhuj, Sant Ram and C.P.Singh. 2021. Mango Malformation: Etiology and Preventive Measures. Annals of R.S.C.B., Vol. 25, Issue 6, Pages. 8025-8058.
- **Kumar** Pradeep, Ashok Kumar Misra , Dinesh Raj Modib and Vijai Kumar Gupta; 2012. Biocontrol potential of *Trichoderma* species against mango malformation pathogens Archives of Phytopathology and Plant Protection , 1–9
- **Kumar** Pradeep; Madhu Kamle; Asok Kumar Misra; Anthonia O'Donovan; Marcela Pagano; Dinesh Raj Modi, 2016. Identification and characterization of *Fusarium mangiferae* as pathogen of mango malformation in India. Braz. Arch. Biol. Technol. v.59:
- **Kumar**, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms." Molecular Biology and Evolution 35: 1547-1549.
- **Lepoivre** P. (2003). Phytopathologie. Edition De Boeck.
- **Leslie** John, Brett A Summerell, 2006. The *Fusarium* laboratory manuel. Copyright © Blackwell Publishing.
- **Leslie** John, Brett A. Summerell, 2011. In search of new *Fusarium* species. Plant breeding and seed science. V63 : 93-101
- **Liew** E. C. Y. & M. H. Laurence & C. A. Pearce & R. G. Shivas & G. I. Johnson & Y.P. Tan & J. Edwards & S. Perry & A.W. Cooke & B. A. Summerell. 2016.

Fusarium species isolated in association with mango malformation in Australia
Australasian Plant Pathol. DOI 10.1007/s13313-016-0454-z

- **Lima** Cristiano S., Ludwig H. Pfenning, Sarah S. Costa, Lucas M. Abreu & John F. Leslie, 2012. *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. Mycologia Volume 104, Issue 6, <https://doi.org/10.3852/12-052>
- **Marasas** W. F. O., R. C. Ploetz, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, and E. T. Steenkamp, 2006. Mango Malformation Disease and the Associated *Fusarium* Species The American Phytopathological Society Vol. 96, No. 6, 667 - 672.
- **Mokhtari** W , N. Chtaina, E. Halmschlager, H. Volgmayr, C. Stauffer, W. Jaklitsch, 2017. Potential antagonism of some *Trichoderma* strains isolated from Moroccan soil against three phytopathogenic fungi of great economic importance; Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. 5 (3): 248 - 254
- **Montoya-Martínez** Amelia C., Kerry O'Donnell, Mark Busman, Martha M. Vaughan, Susan P. McCormick, Ricardo Santillán-Mendoza, Daniela Pineda-Vaca, Lyana Clapes-Garduño, Sylvia P. Fernández-Pavía, Randy C. Ploetz, Julieta Benítez-Malvido, Juan C. Montero-Castro, and Gerardo Rodríguez-Alvarado, 2022. Weeds Harbor *Fusarium* Species that Cause Malformation Disease of Economically Important Trees in Western Mexico. Plant Disease. Vol. 106, N°2. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1339-RE>
- **Moparthi** Swarnalatha, Mary Burrows, Josephine Mgbechi-Ezeri, and Bright Agindotan. 2021. *Fusarium* spp. Associated With Root Rot of Pulse Crops and Their Cross-Pathogenicity to Cereal Crops in Montana. Plant Disease, 105: 548-557.
- **Niehaus** Eva-Maria and al., 2016. Comparative “Omics” of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Highlights Differences in Genetic Potential and Metabolite Synthesis Genome Biol. Evolution. 8(11): 3574–3599. doi:10.1093/gbe/evw259
- **O'Donnell** K, Al-Hatmi AMS, ..., Geiser DM, ...Leslie JF, ., Summerell BA, van der Lee TAJ, ...MJ, Zhang N, Zhang SX. 2020. No to Neocosmospora: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. mSphere 5: 00810-20.
- **O'Donnell** Kerry, Alejandro P. Rooney, Robert H. Proctor, Daren W. Brown, Susan P. McCormick, Todd J. Ward, Rasmus J. N. Frandsen, Erik Lysøe, Stephen A. Rehner, Takayuki Aoki, Vincent A. R. G. Robert, Pedro W. Crous, Johannes Z. Groenewald, Seogchan Kang, David M. Geiser, 2013. Phylogenetic analyses

of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important *Fusaria*. Volume 52, Pages: 20-31

- **Okorski** Adam, Alina Milewska, Agnieszka Pszczółkowska, Krzysztof Karpiesiuk, Wojciech Kozera, Joanna Agnieszka Dłabrowska and Justyna Radwińska. 2022. Prevalence of *Fusarium* fungi and Deoxynivalenol Levels in Winter Wheat Grain in Different Climatic Regions of Poland *Toxins*, 14, 102.
- **Pfordt** Annette, Lucia Ramos Romero, Simon Schiwiek, Petr Karlovsky, and Andreas von Tiedemann, 2020. Impact of Environmental Conditions and Agronomic Practices on the Prevalence of *Fusarium* Species Associated with Ear- and Stalk Rot in Maize. *Pathogens* 9, 236.
- **Pitt** J.I., Hocking A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*, third edition. Springer.
- **Refai** Mohammed., Atif Abdelaziz Hassan, Mai Ahmed, 2015. The monograph on the genus, *Fusarium*..
- **Scala**, V.; Aureli, G.; Cesarano, G.; Incerti, G.; Fenelli, C.; Scala, F.; Reverberi, M.; Bonanomi, G. 2016. Climate, soil management, and cultivar affect *Fusarium* head blight incidence and deoxynivalenol accumulation in durum wheat of southern Italy. *Frontiers*: 7, 1014.
- **Schoch** CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 N°: 16: 6241 - 6246.
- **Sharma** Ishwar Prakash & Anil K. Sharma, 2020. *Trichoderma–Fusarium* Interactions: A Biocontrol Strategy To Manage Wilt, Part Of The Rhizosphere Biology Book Series (RHBIO).
- **Sharma**, P. (2011). "Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control." *Australian Journal of Crop Science* 5(8): 1027.
- **Singha** Irom Manoj, Yelena Kakoty, Bala Gopalan Unni, Jayshree Das, Mohan Chandra Kalita, 2016. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing *Fusarium* wilt of tomato isolated from Assam, North East India *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.14: 99–105
- **Stielow** JB, Lévesque CA, Seifert KA, et al. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35:242-63.
- **Summerell** Brett A. & John F. Leslie & Edward C. Y. Liew & Matthew H. Laurence & Suzanne Bullock & Tijana Petrovic & Alison R. Bentley & Chris G. Howard &

Sophie A. Peterson & Jillian L. Walsh & Lester W. Burgess, 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*, 46:1–27

- **Veenstra** Amy, M. Suhail Rafudeen & Shane L. Murray , 2019. *Trichoderma asperellum* isolated from African maize seed directly inhibits *Fusarium verticillioides* growth in vitro *European Journal of Plant Pathology* volume 153, pages: 279–283
- **Veldman** W.M., T. Regniera, W.A. Augustyn, 2018. Biocontrol of *Fusarium mangiferae* responsible for mango malformation using bacterial isolates. *Scientia Horticulturae*, 230: 186–195
- **Vinal** Francesco Vinale, Krishnapillai Sivasithamparam , Emilio L. Ghisalberti, Sheridan L. Woo, Marco Nigro, Roberta Marra, Nadia Lombardi, Alberto Pascale, Michelina Ruocco1 , Stefania Lanzuise, Gelsomina Manganiello and Matteo Lorito 2014. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens *The Open Mycology Journal*, 8 : 127-139
- **Watanabe** Maiko, Takahiro Yonezawa, Ken-ichi Lee, Susumu Kumagai, Yoshiko Sugita-Konishi, Keiichi Goto and Yukiko Hara-Kudo, 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes ; *BMC Evolutionary Biology*, 11: 322
- **White** TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*. 18 (1): 315- 322
- **Zhang**, S.W.; Xu, B.L.; Zhang, J.H.; Gan, Y.T., 2018. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pestic. Biochem. Physiol*, 147: 59–66.
- **Zhu Na**, Jing-Jiang Zhou, Shu-Wu Zhang and Bing-Liang Xu, 2022. Mechanisms of *Trichoderma longibrachiatum* T6 Fermentation against *Valsa mali* through Inhibiting Its Growth and Reproduction, Pathogenicity and Gene Expression. *Journal of fungi*, V8, issue 2, 113.