ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19) OMPIC

المملكة المغربية
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية

(12) **BREVET D'INVENTION**

(11) N° de publication :
MA 57931 A1

(51) Cl. internationale :
C05F 11/08; A01N 63/00

(43) Date de publication :
29.03.2024

(21) N° Dépôt :
57931

(22) Date de Dépôt :
19.09.2022

(71) Demandeur(s) :
OCP SA, Hay Erraha Rue Alabtal N°2-4 CASABLANCA (MA)

(72) Inventeur(s) :
Douira Allal ; Ouazzani Touhami Amina ; Kribel Sanae ; Qostal Safaa ; Ouazzani Chadi Abdelatif ; My Abdelaziz El Alaoui ; Selmaoui Karima ; ZEROUAL Youssef

(74) Mandataire :
SABA & CO., TMP

(54) Titre : **Bioproduit enrobant des semences à base de Trichoderma asperellum, bioprotecteur, biostimulant et biofertilisant & kit d'enrobage avant semis**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un bioproduit, biostimulant, biofertilisant et biofongicide, à base d'une souche marocaine de Trichoderma asperellum, isolée des boues des laveries des phosphates accompagné d'un kit d'enrobage constitué par des adhésifs, colorants et des desséchants à mélanger avant le semis. Le bioproduit est destiné à enrober les semences de blé et d'orge avant le semis, à solubiliser le phosphate pour fournir le phosphore aux plantes, à stimuler la croissance des plantes et à protéger les racines contre un complexe d'espèces pathogènes telluriques responsables de la pourriture racinaire des céréales cultivées. Les résultats obtenus ont montré que le bioproduit présente une efficacité importante par l'augmentation des paramètres de croissance et de rendement de blé et d'orge et la protection des plantes contre les bioagresseurs fongiques. Il a permis l'établissement d'une relation précoce champignon/racines des plants. Les conidies de la souche de Trichoderma asperellum, véhiculée par le bioproduit, se développent avec les racines des plants dès la germination des semences et y reste fonctionnelle jusqu'à la fin du cycle végétatif. La technique de la production à grande échelle se fait sur un substrat composite à base de pulpe de betterave, de bagasse de la canne à sucre et du maïs broyé, humidifié avec l'eau distillée et inoculé par la suspension conidienne de Trichoderma asperellum. Le bioproduit formulé renferme des additifs qui ont permis à la souche de garder un taux de germination important pendant douze mois de conservation à température ambiante et un pouvoir antagoniste plus élevés vis-à-vis des pathogènes responsables de la pourriture racinaire du blé et d'orge. Un kit d'enrobage est également

préparé, il est constitué de deux adhésifs à base d'extrait de graines de lin et de la gélatine, de colorants liquide et sec à base de betterave rouge et de poudres séchantes à base de talc et d'argile blanc. Le bioproduit final, au moment de l'enrobage des semences de blé et d'orge, est constitué d'un mélange d'une solution du bioproduit formulé à base des conidies de Trichoderma asperellum, une solution à base de graines de lin, une solution visqueuse de gélatine, un colorant liquide à base de betterave rouge, un colorant en poudre à base de betterave rouge, du talc et de l'argile blanc.

MA 57931A1

ABREGE :

La présente invention concerne un bioproduit, biostimulant, biofertilisant et biofongicide, à base d'une souche marocaine de *Trichoderma asperellum,* isolée des boues des laveries des phosphates accompagné d'un kit d'enrobage constitué par des adhésifs, colorants et des desséchants à mélanger avant le semis. Le bioproduit est destiné à enrober les semences de blé et d'orge avant le semis, à solubiliser le phosphate pour fournir le phosphore aux plantes, à stimuler la croissance des plantes et à protéger les racines contre un complexe d'espèces pathogènes telluriques responsables de la pourriture racinaire des céréales cultivées. Les résultats obtenus ont montré que le bioproduit présente une efficacité importante par l'augmentation des paramètres de croissance et de rendement de blé et d'orge et la protection des plantes contre les bioagresseurs fongiques. Il a permis l'établissement d'une relation précoce champignon/racines des plants. Les conidies de la souche de *Trichoderma asperellum,* véhiculée par le bioproduit, se développent avec les racines des plants dès la germination des semences et y reste fonctionnelle jusqu'à la fin du cycle végétatif.

La technique de la production à grande échelle se fait sur un substrat composite à base de pulpe de betterave, de bagasse de la canne à sucre et du maïs broyé, humidifié avec l'eau distillée et inoculé par la suspension conidienne de *Trichoderma asperellum.* Le bioproduit formulé renferme des additifs qui ont permis à la souche de garder un taux de germination important pendant douze mois de conservation à température ambiante et un pouvoir antagoniste plus élevés vis-à-vis des pathogènes responsables de la pourriture racinaire du blé et d'orge.

Un kit d'enrobage est également préparé, il est constitué de deux adhésifs à base d'extrait de graines de lin et de la gélatine, de colorants liquide et sec à base de betterave rouge et de poudres séchantes à base de talc et d'argile blanc.

Le bioproduit final, au moment de l'enrobage des semences de blé et d'orge, est constitué d'un mélange d'une solution du bioproduit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum*, une solution à base de graines de lin, une solution visqueuse de gélatine, un colorant liquide à base de betterave rouge, un colorant en poudre à base de betterave rouge, dutalc et de l'argile blanc.

Mots clés : *Trichoderma asperellum,* biofongicide, biostimulant, biofertilisant, production en masse, substrat, inoculum, formulation, kit d'enrobage, céréales, semences, enrobage.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet ID *AGR-DOI-1/2017 autour des phosphates*Sélection et utilisation des Trichoderma spp. pour l'amélioration de l'efficacité des phosphates et la lutte contre la pourriture racinaire du blé au Maroc*, financé par la fondation OCP, sous la direction du Pr. Douira Allal (Laboratoire des Productions Végétales, Animales et Agro-industrie, Equipe de Botanique, Biotechnologie et Protection des Plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, Kénitra).

DESCRIPTION :

Domaine technique :

La présente invention concerne les domaines de la lutte biologique et la fertilisation microbiennes en agriculture par l'application d'un bioproduit à base des conidies de *Trichoderma asperellum* comme biofertilisant de la culture des céréales et agent de lutte biologique contre le complexe fongique responsable de la pourriture racinaire et les procédés de sa production et de son application.

État de la technique antérieure :

Les espèces de *Trichoderma* sont utilisées comme agents de lutte biologique contre un large spectre de pathogènes aussi bien telluriques (Mouria B., Ouazzani-Touhami A. et Douira A., 2013. Effet du compost et de *Trichoderma harzianum* sur la suppression de la verticilliose de la tomate. J. Appl. Biosci., 70: 5531-5543) que foliaires (Hmouni, A., M. Massoui et A. Douira. 1999. Étude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la tomate. Al Awamia 100: 75-92 ; Dodd S., Lieckfeldt E., Samuels G.J., 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*Mycologia, 95: 27-40). Ils vivent à l'état libre dans le sol, sur le bois, dans la rhizosphère et la phyllosphère des végétaux ou liés aux racines des plantes, sans aucun dommage (Brevet EP 1 876 232 B1), et libèrent des molécules bioactives (Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species –opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2: 43–56). En conséquence, ils stimulent la croissance de diverses plantes et améliorent les mécanismes de défense des plantes (Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N., 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. Eur. J. Plant Pathol. 107:523-533 ; Brevet EP 1 876 232 B1).

Les travaux de Baker et al. (Baker R., 1988. *Trichoderma* spp. as plant growth stimulants. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 7 : 97-106) ont montré que le poids sec des plantes de radis a

augmenté après traitement par la souche T-95 du *T. harzianum.* Dans le même ordre d'idées, les travaux de Yadav et al. (Yadav J., Verma J.P., Tiwari K., 2011. Plant Growth Promoting Activities of Fungi and their Effect on Chickpea Plant Growth. Asian Journal of Biological Sciences 4(3):291-299) ont montré que *T. harzianum* a augmenté significativement la longueur des pousses, la longueur des racines, le poids sec des pousses et le poids sec des racines de pois chiches par rapport à ceux observés chez les plants témoins. Kleifeld et Chet (Kleifeld O. & Chet I., 1992. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil 144 : 267–272) ont rapporté que la stimulation de la croissance des plantes par *Trichoderma* sp. serait due à l'augmentation du transfert des nutriments à partir du sol jusqu'aux racines grâce à la colonisation de celles-ci par le *Trichoderma.* Harman (Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol - changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84: 377-393) a signalé que la souche T-22 de *T. harzianum* était aussi efficace qu'une hormone d'enracinement commerciale pour induire des racines chez les plantes de la tomate et de la pomme de terre. Windham *et al.* (Windham M.T., Elad Y. et Baker R., 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76: 518-521.) ont rapporté que les souches de *Trichoderma* sont capables de produire des régulateurs de croissance qui améliorent la germination et la croissance des plantes hôtes. Mieux encore, Hibar *et al.* (Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. & El Majdoub M., 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo du Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici.* Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (3), 163–171) ont expliqué la stimulation du développement d'une culture de melon à la suite de l'application du *T. harzianum* par une activation du système de défense de la plante, une augmentation de l'activité chitinase et peroxidase et un accroissement de l'activité enzymatique dans les feuilles induisant une résistance systémique chez ces plants.

Parmi les mécanismes d'action des champignons du genre *Trichoderma*, il y a la compétition pour les nutriments, l'antibiose, ou la production d'enzymes spécifiques de dégradation des parois cellulaires comme les chitinases, glucanases et protéases (Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Woo, S.L., Lorito M., Kubicek C.P., & Mach R.L., 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Applied and environmental microbiology, 71(7) : 3959–3965). Les métabolites antibiotiques, tels les peptaibols (par exemple, trichorzianines), agissent en synergie avec les enzymes pour attaquer les champignons cibles (Brevet EP 1 876 232 B1). Des études récentes (Brevet EP 1 876 232 B1)

font en effet état d'une capacité de ces champignons filamenteux à intervenir selon divers mécanismes : mycoparasitisme, antagonisme (compétition), antibiose (production d'antibiotiques), stimulation racinaire, stimulation de la croissance par solubilisation de minéraux fertilisants, stimulation des défenses naturelles des plantes, etc.

Le brevet US6753295 présente un mélange de peptaibols et d'alkyl-cyclopenténones produits par le *T. harzianum* SK-5-5 (NIBH 13327) stimulant la croissance et la défense des plantes.

Les brevets EP1 279 335, EP 1 876 232 B1 et EP 1 990 404 B1 décrivent l'utilisation de l'espèce *Trichoderma atroviride* dans la lutte contre les maladies des plantes chez plusieurs cultures, en tant que produit phytosanitaire avec des propriétés antagonistes et stimulatrice de la croissance.

Le brevet EP 2 320 742 B1 se rapporte à une méthode de contrôle des maladies végétales causées par différentes espèces de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, et / ou *Thielaviopsis*. Le procédé consiste à amender la rhizosphère par les deux espèces *Trichoderma harzianum* T22 et *Trichoderma virens* G41. Les espèces de *Trichoderma harzianum* et *T. virens* sont appliquées sur les plantes dans des conditions efficaces pour traiter les maladies des plantes inoculées par les espèces *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* et/ou *Thielaviopsis*.

Le brevet EP 1 400 586 B1 a montré que l'isolat T34 (2) de *Trichoderma asperellum* a permis la suppression des maladies végétales causées par *Rhizoctonia solani* et / ou *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici*.

Le brevet EP 1 876 232 B1 a montré que les plantes de tomate traitées par la préparation du produit formulé *Trichoderma* MUCL 45632 (10^9 spores/g) puis inoculées artificiellement par une suspension sporale de *Botrytis cinerea,* ont présenté une protection comparable à celles ayant reçu un traitement chimique conventionnel.

Le brevet MA 41534 B2 a concerné un produit biofongicide et biostimulant, à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* KU987252 isolée du compost, destiné aux traitements foliaires et racinaires de la tomate et du fraisier contre un large spectre de pathogènes.

La présente invention concerne un nouveau bioproduit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, isolée des boues des laveries des phosphates accompagné d'un kit d'enrobage ainsi que les procédés de sa production en masse, de sa formulation et des techniques de son application comme produit d'enrobage des semences. La production en masse est effectuée sur un substrat composite à base de Pulpe de betterave, de

Bagasse de la canne à sucre et de Maïs broyé, humidifié avec l'eau distillée et inoculé par la suspension conidienne de *Trichoderma asperellum*. Ce substrat composite peut être exploité trois fois pour produire les conidies de *Trichoderma*. La première collecte est effectuée après 7 jours d'incubation des cultures. La deuxième récolte est effectuée 7 jours après incubation du substrat ayant servi à la première récolte. La troisième récolte est réalisée après incubation du substrat ayant servi à la deuxième collecte des conidies.

Le bioproduit formulé à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 renferme huit additifs (amidon poudre, gélatine, paraffine, glycérine, huile de table, Tween 20, $CaCl_2$ et Talc) qui ont permis à la souche de garder un taux de germination et un pouvoir antagoniste plus élevé vis-à-vis des pathogènes responsables de la pourriture racinaire du blé et d'orge pendant 12 mois de conservation à température ambiante.

Le bioproduit formulé à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 est caractérisé par un pH variant entre 6,4 et 5,32 et une viscosité oscillant entre 22 mPa et 5,32 mPa respectivement après 3 et 12 mois de conservation.

Le bioproduit final utilisé au moment de l'enrobage des semences de blé et d'orge est constitué d'un mélange d'une solution du bioproduit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* et des constituants du kit d'enrobage : une solution à base de graines de lin, une solution visqueuse de la gélatine et un colorant liquide à base de betterave rouge et des poudres séchantes, talc et argile blanc, avec un colorant en poudre à base de betterave rouge.

Le bioproduit final d'enrobage a permis de véhiculer les conidies la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 via les semences de blé et d'orge et son installation précoce au niveau des racines des plants issus de la germination et de rester fonctionnelle pendant tout le cycle végétatif de la culture : un bon développement des plantes, une protection des racines et du feuillage contre les bioagresseurs et une amélioration du rendement.

EXPOSE DE L'INVENTION :

Description de la souche

L'invention a concerné la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 isolée à partir des boues des laveries des phosphates. Cette souche est déposée à la Mycothèque du Laboratoire des Productions Végétales, Animales et Agro-industrie (Université Ibn Tofail, Faculté des sciences de Kénitra).

La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 est caractérisée par une croissance rapide sur le milieu PSA (Potato Saccharose Agar : 200 g de pomme de terre ; 20 g de

saccharose ; 15 g d'Agar-agar ; 1000 mL d'eau distillée) avec des colonies verdâtres à aspect cotonneux, floconneux, parfois compactes, un relief régulier à plissé avec une forte sporulation (6,8 10^7 conidies.mL^{-1}) et production des chlamydospores.

L'analyse des séquences ITS (ITS1 / ITS4) a permis l'identification moléculaire de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099.

La séquence des bases azotées caractérisant la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099
GCGGGAGGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAAC GTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCC CCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCC CCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAG CGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGG ACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAG CCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTC CACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA

Activité phosphatase de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099

Matériel fongique

La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a été maintenue sur le milieu de culture PSA à 28 °C et à l'obscurité.

Détermination de l'activité enzymatique de la phosphatase

L'étude de l'induction des enzymes phosphatases par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a été effectuée sur milieu 'bouillon de Pikovskaya modifié' (Glucose: 13 g; $(NH_4)\ SO_4$: 0,5 g; NaCl: 0,2 g; $MgSO_4,7H_2O$ 0,1 g; KCl: 0,2 g; Extrait de levure: 0,5 g; $MnSO_4$: 0,0002 g; $FeSO_4,7H_2O$: 0,0002 g) avec trois combinaisons différentes de phosphates liés, $Ca_3\ (PO_4)_2$(TCP) et de phosphates disponibles (KH_2PO_4): (1) TCP (10 gL^{-1}), mais pas de KH_2PO_4; (2) TCP (10 $g.L^{-1}$) + KH_2PO_4 (0,5 $g.L^{-1}$) et (3) KH_2PO_4 (0,5 $g.L^{-1}$), mais pas de TCP. Le pH a été ajusté à 7,2 avec une solution de KOH à une molarité de 0,1 mol/L à l'aide d'un pH-mètre et les composants ont été dissous dans 1000 mL d'eau distillée (Pikovskaya, 1948). Cinq disques mycéliens de 5 mm de la souche de *Trichoderma asperellum* ont été inoculés dans un flacon Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de bouillon et incubés à 28°C dans un agitateur (GFL 3020) à 120 tr/min pendant 7 jours). Les bouillons ont été filtrés à travers du papier Whatman N ° 1 (0,45 µm) et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 min pour éliminer les conidies et le mycélium de la souche de *Trichoderma asperellum*. Le

surnageant a été utilisé comme extrait enzymatique brut pour déterminer l'activité enzymatique de la phosphatase extracellulaire par spectrophotométrie (Beckmann DU, USA) à 405 nm, en utilisant la méthode décrite par Lowry *et al.* (Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75*)*.

L'étude de l'activité phosphatase de la souche de *T. asperellum* MW074099 (Tableau 1) a permis de noter que :

- Dans les filtrats du milieu NBRIP, avec le TCP comme seule source de phosphate, l'activité phytasique est de l'ordre de 622,25 U/mL après 48 heures d'incubation ; elle est maximale de 632 U/mL après 72 heures et elle diminue après 96 heures d'incubation ;

-Dans le milieu NBRIP, avec comme source de phosphate la combinaison de KH_2PO_4 et de Ca_3 $(PO_4)_2$, l'activité enzymatique est moins importante par rapport à celle notée dans le milieu avec le TCP, les valeurs les plus élevées n'ont pas dépassé 129,45 U/mL, 147,4 U/mL et 169,45 U/mL après respectivement 24h, 48h et 72 heures d'incubation.

- Dans le milieu NBRIP, avec comme source de phosphate soluble KH_2PO_4, l'activité enzymatique enregistrée est faible, la valeur enregistrée n'a pas présentée de différence par rapport à celle notée chez le témoin non inoculé par *Trichoderma asperellum* ;

-L'augmentation de l'activité phytasique de la souche de *Trichoderma asperellum* étudiée dans le milieu NBRIP, avec comme source de phosphate le TCP, après 72 heures d'incubation, s'est accompagné d'une diminution de pH à des niveaux bas de l'ordre de 4,2 et a commencé à augmenter, mais faiblement, à partir de 96 heures d'incubation ;

- Dans le milieu NBRIP, avec comme source de phosphate TCP et KH_2PO_4, le pH du milieu de culture de la souche de *Trichoderma asperellum* a diminué à partir de 72 heures d'incubation (pH=5,2), la valeur la plus faible a été enregistrée après 96 heures d'incubation (pH = 4,4).

-Dans le milieu NBRIP, avec KH_2PO_4, comme source de phosphate, le pH du milieu de culture de *Trichoderma* tend vers l'acidité en fonction du temps. Il a varié entre 6,4 et 5,4 après respectivement 24 et 96 heures d'incubation.

Procédé de la production en masse des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099

Préparation de l'inoculum à base des conidies de *Trichoderma asperellum*

La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, maintenue sur le milieu PSA à 28°C et à l'obscurité, a été repiquée sur le même milieu. A partir des cultures jeunes, âgées de 7 jours, la suspension conidienne est préparée en raclant la surface de ces cultures immergées

avec de l'eau distillée stérile, puis le filtrat est passé à travers des couches de gaze. La concentration en conidies de la suspension a été ajustée à 10^6conidies.mL^{-1} à l'aide d'une lame de Malassez.

Préparation du substrat de culture composite

Le substrat de culture de la production en masse de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 est composite, constitué de 50% de Pulpe de betterave, 40% de Bagasse de la canne à sucre et 10% de maïs broyé.

Une quantité (50 à 70 g) de ce substrat de culture composite a été déposée dans chaque plateau en inox, humidifiée avec l'eau distillée (90 à 120 mL) et autoclavée à 121°C pendant 20 mn.

Inoculation par la suspension conidienne de *Trichoderma asperellum*

Le substrat a été inoculé avec 2 à 10 mL de la suspension conidienne de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 et mélangé à l'aide d'une spatule pour assurer la répartition des conidies de *Trichoderma* sur le substrat. Après, les plateaux de culture ont été incubés à 28°C et à l'obscurité.

Récolte des conidies de *Trichoderma asperellum*

Trois récoltes ont été effectuées à 7 jours d'intervalle, après chaque récolte, le substrat utilisé est remis dans les plateaux en inox et incubés.

Après 7 jours d'incubation, la première récolte a été effectuée en humidifiant le substrat contenant la culture de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 avec de l'eau distillée stérile. La suspension conidienne obtenue est filtrée à travers une mousseline.

Les concentrations en conidies des filtrats obtenus après chaque récolte ont été déterminées à l'aide d'une lame de Malassez. La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a produit des conidies de l'ordre de $4{,}32.10^{10}$, 9.10^{10} et de 9.10^8 conidies.g^{-1} du substrat composite, respectivement après la première, la deuxième et la troisième récolte.

Procédé de la formulation du bioproduit à base des conidies de la souche *Trichoderma asperellum* MW074099

Préparation de la suspension conidienne de la souche de *Trichoderma asperellum*

La concentration en conidies de la suspension conidienne de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a été ajustée avec de l'eau distillée stérile à la concentration de 2,5 à 4 10^{10} conidies.mL^{-1}à l'aide d'une lame de Malassez.

La formulation du bioproduit

La formulation du bioproduit a été effectuée par l'ajout de différents additifs à 1 L de la suspension conidienne de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 ajustée à la

concentration de 2,5 à 4 10^{10} conidies.mL^{-1}, amidon poudre (5 à 10%), solution de gélatine (5 à 10%), huile de paraffine (0,5 à 2%), huile de glycérine (0,5 à 2%), huile de table (1 à 4%), Tween 20 (0,1 à 2%), $CaCl_2$ (0,6 à 1%) et Talc (2 à 6%).

Le bioproduit formulé a été mis dans des flacons à bouchon en verre de 200 ml et conservé à la température ambiante du laboratoire variant de 18°C à 28°C (Figure 1).

Contrôle de la qualité du bioproduit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099

Mesures du pH et de la viscosité

Le pH et la viscosité du produit formulé ont été mesurés chaque 3 mois, pendant 12 mois de conservation. Après 3 et 12 mois de conservation, les valeurs de pH ont varié entre 6,4 et 5,32 et celles de la viscosité du produit, à 28°C ont oscillé entre 22,6 et 18,5 mPa. (Tableau 2).

Test de la viabilité des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 du bioproduit formulé

Une suspension conidienne a été préparée à partir du bioproduit formulé à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 et ajustée à une concentration de 10^3 conidies.mL^{-1} à l'aide de la lame de Malassez. Dans des boites contenant 20 mL d'eau gélosée (15 g d'Agar-agar, 1000 mL eau distillée), 0,1 mL de la suspension contenant 100 conidies est étalée sur l'eau gélosée. Les boites sont incubées à 28°C pendant 24 et 48 h et à l'obscurité. Le pourcentage de germination (G%) des conidies est déterminé par dénombrement des conidies ayant germé par rapport au nombre total de conidies. Les pourcentages de germination des conidies, après un mois et 12 mois de conservation, sont de 78,4% et 62,75% (Tableau 3).

Mise en évidence des aptitudes à l'antagonisme de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 après formulation du bioproduit vis-à-vis des pathogènes de la pourriture racinaire (Figure 2)

- La confrontation directe est réalisée dans des boites de Petri contenant le milieu PSA. Un disque mycélien de 5 mm de diamètre d'un des pathogènes responsables de la pourriture racinaire de blé et d'orge (*Fusarium roseum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *C. spicefera*, *B. sorokiniana* 1 et 2) et une rondelle de papier filtre imbibée du bioproduit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 sont placées à 40 mm l'un de l'autre. Le témoin est constitué par une bouture du pathogène placée au centre de la boite contenant le milieu PSA. Les boites sont incubées par la suite à 28°C et à l'obscurité. Après 4 jours, la

colonisation **(C%)** de l'espace par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé a été déterminée selon la formule suivante :

$$\mathbf{C\ (\%) = (DT / DE) \times 100}$$

DT: La distance en mm couverte par la croissance frontale de *Trichoderma asperellum* sur l'axe reliant les boutures des deux champignons;

DE: La distance séparant les deux champignons.

Le pourcentage d'inhibition **(IC%)** de la croissance mycélienne du pathogène parla souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé a été déterminée selon la formule suivante :

$$\mathbf{IC\ (\%) = (DT\text{-}DPA) / DT \times 100}$$

DT : croissance mycélienne radiale du pathogène

DPA : croissance mycélienne radiale du pathogène en présence du produit à base des conidies de *Trichoderma asperellum.*

La confrontation directe a permis de mettre en évidence les aptitudes de la souche de*Trichoderma asperellum* MW074099 après la formulation à la compétition pour l'espace en présence de *Fusarium roseum, F. culmorum, F. graminearum, C. spicefera, B. sorokiniana* 1 et 2, les pourcentages de colonisation de l'espace par la souche de *Trichoderma asperellum* du produit formulé, conservés pendant 3 et 12 mois, ont varié entre 70,2% et 75,45% et entre 65,25 et 69,75% (Tableau 4). De plus, les pourcentages d'inhibition des agents pathogènes par le bioproduit formulé, conservé pendant 3 et 12 mois, ont varié de 79,5% à 72,75% en présence de *F. roseum,* de 79,55 à 71,65% en présence de *F. culmorum,* de 79,26 à 72,26% en présence de *F. graminearum,* de 78,28 à 70,19% en présence de *Curvularia spicefera,* de 73,07 à 67,40% en présence de *Bipolaris sorokiniana* 1 et de 75,5 à 68,45% en présence de *B. sorokiniana* 2 (Tableau 5).

- La production des substances volatiles : Un disque mycélien de 5 mm de diamètre est prélevé à partir d'une culture du pathogène et un disque en papier filtre imbibé du produit formulé à base de *Trichoderma* MW074099 sont placés séparément au centre des boîtes de Petri contenant le milieu PSA. Les couvercles des boîtes sont enlevés aseptiquement, puis chaque fond de boite contenant le produit testé est placé en dessous de celui contenant le pathogène. Les deux fonds de boites juxtaposés sont fermés par des couches de Parafilm. Un fond de boite contenant le milieu seul est placé en dessous d'un fond de boite contenant le pathogène pour le témoin. Après quatre jours d'incubation à 28°C et à l'obscurité, l'inhibition de la croissance mycélienne est estimée comme précédemment (Tableau 6).

Les pourcentages d'inhibition de la croissance des pathogènes par les substances volatiles libérées par *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé sont élevés même après 12 mois de conservation, ils varient de 80 à 76,5 % en présence de *Fusarium roseum*, de 79,16 à 70,75% en présence de *F. culmorum*, de 80,2 à 71,25% en présence de *F. graminearum*, de 78,5 à 71,28% en présence de *Curvularia spicefera*, de 79,15 à 70,15% en présence de *Bipolaris sorokiniana* 1 et de 80,85 à 70,37% en présence de *B. sorokiniana* 2.

- La production des substances diffusibles : Le milieu PSA est recouvert par une feuille de cellophane stérile. Après 24 heures, un disque en papier filtre imbibé du produit à base de *Trichoderma asperellum* MW074099 est placée au centre de la surface de la feuille de cellophane. Après incubation pendant 48 heures et à 28°C à l'obscurité, la membrane de cellophane et la colonie de *Trichoderma asperellum* adhérente sont alors enlevées et un disque mycélien du pathogène est placé au centre du milieu de culture. Les boites témoins sont ensemencées par un disque mycélien du pathogène. Après incubation pendant 4 jours à l'obscurité et à 28°C, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène est calculé par rapport au témoin.

Les substances diffusibles secrétées par *Trichoderma asperellum* ont présenté un effet inhibiteur faible vis-à-vis des pathogènes de la pourriture racinaire du blé et d'orge, les pourcentages d'inhibition n'ont pas dépassé 24,59% (Tableau 7).

Les résultats des tests de contrôle de la qualité du bioproduit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 ont montré que cette souche a pu garder ses aptitudes à l'antagonisme aussi bien par compétition pour l'espace que par antibiose par les substances volatiles même après une année de conservation du bioproduit à température ambiante.

Procédé de préparation de différents ingrédients du kit d'enrobage des semences du blé et d'orge

Préparation des adhésifs

Deux solutions (S1 et S2) à base de deux adhésifs, extraits de graines de lin et de la gélatine, ont été préparées.

- La solution S1 est une bouillie de graines de lin : 10 à 30 g de graines de lin sont bouillis dans 1 à 1,5 litre d'eau distillée pendant 30 min jusqu'à obtention, après filtration, de 1 litre de solution visqueuse. La solution (S1) est placée au réfrigérateur pendant 24 h, sa viscosité est de 54 mPa/200 Tpm à 4°C.

- La solution S2 est une solution visqueuse à base de gélatine : 2 à 10 g de la gélatine a été incorporé dans un 1 à 1,5 L d'eau distillée stérile portée à l'ébullition. La solution (S2) est laissée refroidir à température ambiante, sa viscosité est de7,6 mPa/200 Tpm à 24°C.

Préparation des colorants biologiques

Colorant liquide

Des bulbes de betterave rouge coupés en morceaux, sont bouillis, pendant 45 min, dans l'eau distillée. La bouillie obtenue est mixée et filtrée sous une passoire. 5 à 20 g d'amidon est additionné à la solution de betterave pour obtenir 1 L de colorant. La solution du colorant liquide est placée au réfrigérateur pendant 24 h, sa viscosité est de 600 mPa/200 Tpm à 4°C.

Colorant poudre

Des rondelles de bulbes de betterave sont séchées à l'air libre pendant 5 jours ou dans un four à 80°C pendant 72 heures, puis broyées et la poudre qui en résulte a été utilisée comme colorant.

La croissance de la souche *Trichoderma asperellum* MW074099 a été normale sur les ingrédients du kit d'enrobage, elle a pu se développer et sporuler sur la solution diluée de la betterave, sur l'extrait dilué de graines de lin et sur le mélange de ces deux solutions.

Le kit d'enrobage contient également le talc et l'argile blanc.

Procédé d'enrobage des semences du blé et d'orge, destinées au semis, par le bioproduit à base de la souche de*Trichoderma asperellum* MW074099 et les ingrédients du kit d'enrobage

Matériel végétal

Les semences de trois céréales, orge (variété Oussama), blé dur (variété Amjad), blé tendre (variété Wafia) sont désinfectées par trempage pendant 5 min dans une solution d'éthanol à 70%, rincées trois fois par l'eau distillée stérile, et séchées sur du papier filtre pendant 24 heures.

Technique d'enrobage des grains de blé et d'orge

- 2 à 3 Kg des semences de chacune des céréales désinfectées sont mélangées dans un grand récipient, pendant 15 min, avec 60 à 100 mL du produit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, 50 à 100 mL de la solution visqueuse de la bouillie à base des graines de lin (S1), 10 à 15 mL de la solution de gélatine (S2) et 20 à 50 mL du colorant liquide à base de bulbes de betterave rouge. Le mélange est placé pendant une heure dans une passoire pour éliminer l'excès des produits.

Les semences enrobées sont placés ensuite dans un sachet en plastique renfermant 90 à 250 g de talc, 90 à 250 g d'argile blanc et 10 à 20 g de colorant poudre de betterave rouge. Le

sachet fermé a été agité manuellement jusqu'à coloration de toutes les semences. Les semences traitées sont séchées pendant 24 h sur des feuilles de papier filtre et tamisées pour éliminer l'excès du talc et d'argile (Figure 3). Ce sont les semences enrobées avec traitement par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099.

- 2 à 3 Kg des semences de blé et d'orges ont été désinfectés et séchés pendant 24h à la température ambiante. Ce sont les semences témoins.

- 2 à 3 Kg des semences désinfectées et séchées ont été enrobés par les ingrédients du kit d'enrobage puis séchées pendant 24 heures à la température ambiante. Ce sont les semences enrobées sans traitement par le bioproduit à base de *Trichoderma asperellum* MW074099.

Contrôle de la qualité des semences de blé et d'orge enrobées par le bioproduit à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et les ingrédients du kit d'enrobage

- Suivi de la germination des semences de blé et d'orge enrobées par le bioproduit en fonction du temps de conservation du bioproduit

- Les semences (100 semences) enrobées de blé (dur et tendre) et d'orge par le produit formulé sont mises à germer dans des boites de Petri contenant trois rondelles de papier filtre imbibées d'eau distillée stérile. Après 7 jours d'incubation, le taux de germination des semences **TG (%)** est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{TG\ (\%) = (NGg/NGt) \times 100}$$

NGg =Nombre de semences germées

NGt =Nombre de semences testées

- Suivi de la viabilité de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 sur les semences enrobées en fonction du temps de conservation du bioproduit

Les semences enrobées, conservées au laboratoire, ont été mises à germer sur milieu PSA, à raison d'une semence par boite. Après 7 jours d'incubation, à une température de 26°C et à l'obscurité, la surface des cultures de *Trichoderma* issues de semences enrobées est submergée par de l'eau distillée stérile, raclée stérilement à l'aide d'une spatule métallique stérile. La suspension résultante est filtrée sur de la mousseline pour séparer les spores du mycélium. La concentration des spores de *Trichoderma* est déterminée par comptage sur une Cellule de Malassez et exprimée en nombre de conidies par mL.

- Analyse de la mycoflore conservée dans les semences enrobées par le produit formulé à base de *Trichoderma asperellum* MW074099

L'analyse de la mycoflore des semences enrobées par le produit formulé à base de *Trichoderma asperellum* MW074099, conservées pendant 12 mois à température ambiante, a

été réalisée par la méthode du buvard. Les semences sont lavées dans l'eau de robinet, puis dans de l'eau distillée stérile. Ensuite, elles sont placés stérilement dans des boîtes de Petri contenant 2 rondelles de papier filtre (Figure 4), humidifiées par l'eau distillée stérile. Les boîtes sont ensuite incubées soit à la lumière continue, soit en alternance de lumière et obscurité. Après 48 h, les semences sont examinées sous microscope optique au grossissement x 100, pour observer la présence des spores des espèces de champignons. Les différents types de spores formées sur les semences sont prélevées et transférées une à une sous microscope à l'aide d'un capillaire en verre étiré, préalablement stérilisé à la flamme et refroidi dans le milieu gélosé (15 g d'Agar-agar, 1000 mL d'eau distillée), puis transférées à l'aide d'une aiguille stérilisée à la surface du milieu PSA. Des repiquages successifs précédés par des observations sous microscope permettent d'obtenir des cultures pures de champignons. Le taux d'infection et/ou de contamination est calculé selon le nombre de chaque microorganisme isolé par 100 semences par l'observation des spores.

Ces techniques ont été utilisées pour **1/** connaitre la survie de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 avec le temps sur les semences enrobées, 2/ l'influence de l'enrobage sur la germination des semences.

Les résultats obtenus ont montré que :

-Après 3 et 12 mois de conservation, les pourcentages de germination des semences enrobées de blé et d'orge avec le produit d'enrobage sont élevés, varient respectivement entre 98 et 100% et 84 et 89% (Tableau 8);

- Les ingrédients du kit d'enrobage et le bioproduit à base des conidies de *Trichoderma asperellum* n'ont pas inluencé la germination des semences ;

- Les semences enrobées repiquées sur milieu PSA ont développé des colonies de *Trichoderma* sporulantes (Figure 5) ;

- La durée de conservation des semences enrobées n'a pas beaucoup influencée sur la sporulation de la souche de *Trichoderma asperellum* du produit d'enrobage (colonies de ce champignon se développant autour de ces semences): les concentrations en conidies de *Trichoderma asperellum* sont de l'ordre de 3,4 10^7 conidies.mL^{-1}et de 9,5 10^5conidies.mL^{-1}, après respectivement 3 et 12 mois de conservation à température ambiante (Tableau 9);

- Les semences du blé non enrobées, conservées pendant 12 mois à température ambiante, hébergent 3 pathogènes responsables de la pourriture racinaire : *Bipolaris sorokiniana* (blé dur), *Curvularia spicifera* (blé tendre) et *Fusarium solani* (blé tendre), les pourcentages d'isolement sont respectivement de 5 %, 1% et 2 % ;

- Les semences d'orge non enrobées, conservées pendant 12 mois à température ambiante, hébergent deux pathogènes responsables de la pourriture racinaire : *Fusarium graminearum* et *F. oxysporum,* avec respectivement des pourcentages d'isolement de 4 et 12 % ;

-Les semences d'orge et de blé non enrobées, conservées pendant 12 mois à température ambiante, hébergent également des saprophytes : *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp., avec des pourcentages d'isolement qui ont varié entre 7 et 23% ;

-Les semences enrobées avec le produit d'enrobage, conservées pendant 12 mois à température ambiante, hébergent une mycoflore dominée par *Trichoderma*. Les pourcentages d'isolement à partir des semences de blé dur, tendre et d'orge ont respectivement varié entre 89, 85 et 87% (Figure 5). *Curvularia spicifera* a été isolé des semences de blé tendre, avec un pourcentage d'isolement de 2%.

- Suivi de l'influence de l'enrobage sur le développement des semences après germination

Les semences enrobées, conservées à la température ambiante sont repiquées dans des pots contenant le sable de la Mamora.

Le sol de la forêt de la Mamora est très sablonneux, de structure meuble et de pH légèrement basique (7,53). Il présente une faible capacité d'échange cationique (7 meq / 100 g), une très faible salinité et une teneur en matières organiques n'excédant pas 0,7%. Il est également déficient en phosphore total (0,239%), en potassium total (0,15 meq/ 100 g) et en azote total (0,05%). La quantité nécessaire aux essais est tamisée puis stockée au sec à température ambiante dans un sac en polyéthylène fermé.

100 g du sol de la Mamora a été mélangé avec 25 g de la tourbe sont placé dans des pots en plastique. Chaque pot a reçu une semence de blé ou d'orge. Les pots sont ramenés dans une serre de culture et l'arrosage avec l'eau souterraine a été effectué chaque jour.

Les résultats ont montré que :

- Les semences enrobées, conservées pendant 12 mois à la température ambiante, et repiquées sur un substrat de culture, sable de la Mamora, ont présenté après un mois de culture, par rapport aux plants témoins, semences non enrobées, des plants avec une masse racinaire et une partie aérienne plus apparente que celles observées chez les plants témoins (Figures 6 et 7).

Isolement de la souche *Trichoderma asperellum* MW074099 des racines des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le bioproduit

Les racines des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées conservées pendant 12 mois et mises à germer sont prélevées à différentes dates du semis. Les racines fines sont

coupées en fragments de 1 cm, mises en culture en chambre humide. Après 3 à 4 jours d'incubation, les fragments de racines sont colorés par le bleu coton et observés sous microscope entre lame et lamelle. Parfois les observations microscopiques des fragments des racines fines sont effectuées dans une goutte de Lactophénol ou de l'eau. Les différentes composantes du cycle de la reproduction asexuée de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 sont notées : filament mycéliens septés, phialides, conidiophores, conidies et chlamydospores (Figure 8). La mise en évidence de *Trichoderma* au niveau des racines des plants provenant des semences enrobées a été effectuée également par des réisolements. Les racines sont coupées en petits fragments, désinfectées avec l'alcool 95° pendant 2 minutes, rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile, séchées rapidement sur papier filtre stérile, repiquées sur milieu PSA et incubées à l'obscurité à 25°C. La lecture des résultats est effectuée après quatre jours. Le pourcentage de réisolement (Pr%) est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{Pr = Ns\ Px\ /\ NT \times 100}$$

Ns Px : Nombre de segments contenant l'espèce fongique x.

NT : Nombre total de segments.

Les résultats obtenus ont montré que :

- La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a été ré-isolée à partir des racines des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées et conservées à température ambiante pendant 12 mois;
- La souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a colonisée avec le temps les racines des plants (Figure 9), les pourcentages de réisolement ont oscillé entre 20,5 et 23,1% et entre 76,5 et 79,2%, respectivement après 15 jours et 6 mois de culture (fin du cycle de la culture) (Tableau 10) ;
- La colonisation des racines a été visualisée par des observations microscopiques des fragments des racines des plants issus des semences enrobées, différentes composantes du cycle de vie de *Trichoderma* ont été notées au niveau des racines des plants : mycélium avec phialides et conidies au niveau des cellules du cortex racinaire (Figure 8).

Colonisation de substrat de culture des plants de blé et d'orge par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099

La présence de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 dans le substrat de culture des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées a été réalisée par la technique du soil-plates de Warcup (Warcup J.H., 1950. The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi

from Soil. Nature, 166, 117-118). Dans des boites de Petri contenant le milieu de culture PSA, une faible quantité de sol allant de 5 à 15 mg est déposée dans le milieu avec 0,2 mL d'eau distillée stérile puis étalée immédiatement. Les cultures sont mises en incubation et les observations sont faites après une semaine. Le nombre d'unité formant colonies de *Trichoderma* a été estimé par gramme du sol.

Les résultats obtenus ont montré que la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a pu se maintenir dans le substrat de culture des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées et conservées pendant 12 mois au laboratoire à température ambiante. Après 15 jours et 3 mois de culture, le nombre d'unité de *Trichoderma* (UFC /g du sol) au niveau du sol a varié entre 41,6 10^3 et 47 10^3 UFC /g du sol et entre 84,8 et 85,7 10^3 UFC /g du sol. Le nombre d'unités de *Trichoderma* a subi une diminution dans le sol après 6 mois de culture et a varié entre 75,4 et 78,8 UFC /g du sol (Tableau 11)

Bioessais en conditions contrôlées : Evaluation de l'effet du bioproduit d'enrobage des semences sur les paramètres de croissance des plants de blé et d'orge et sur les pathogènes responsables de la pourriture des racines du blé

Matériel végétal

Les semences d'orge, variété Oussama, de blé dur, variété Amjad et de blé tendre, variété Wafia, sont préalablement désinfectées par trempage pendant 5 min dans une solution d'éthanol à 70%. Après, elles sont rincées trois fois par l'eau distillée stérile, et séchées sur du papier filtre pendant 24h.

Essais sous serre

Les semences de blé et d'orge enrobées avec et sans le bioproduit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 et les semences témoins sont cultivées sous serre sur un substrat constitué du sable de la Mamora, pauvre en phosphore. Le substrat est travaillé sous forme de lignes recouvertes de polyéthylène, avec un système d'irrigation goutte-à-goutte. 250 semences sont cultivées dans chaque ligne.

Mesure des paramètres agronomiques

Après 45 jours, 3 mois et 5 mois de culture, les plants sont ramenés de la serre et la hauteur des racines et des parties aériennes ont été mesurés. Le nombre de talles, d'entres nœuds, de feuilles, d'épi et de grains par épi ont été également comptés (Tableau 12).

Les racines des plants, séparées des substrats, sont lavées sous un courant d'eau afin d'éliminer les particules de sol adhérentes et laissées sécher sur papier absorbant dans les conditions ambiantes du laboratoire pendant une nuit. La biomasse végétative et, éventuellement le poids des épis, sont mesurés à l'aide d'une balance le même jour alors que

la biomasse racinaire a été mesurée après une nuit pour que l'eau de rinçage ne fausse pas les résultats. Le poids sec des racines et des parties aériennes sont déterminés après séchage à 80°C pendant 24 heures. Les mesures précédentes sont notées aussi après trois mois et cinq mois de la mise en culture (Figures 10, 11, 12 et 13).

Les résultats obtenus sous serre après 5 mois de culture ont montré une nette amélioration des paramètres agronomiques (Tableau 12) et de rendement :

- Chez les plants du blé, les pourcentages de gain sont pour la longueur des racines de 67,91% ; la longueur des parties végétatives de 16,34% ; le poids racinaire de 179,44% ; le poids des parties végétatives de 86,89% ; le nombre de talles développés de 71,43% ; le nombre d'entre nœuds de 33,3% ; le nombre de feuilles par plant de 88,8% ; le nombre d'épis portés par les plants de 120%.
- Chez les plants d'orge les pourcentages de gain sont pour la longueur des racines de 52,27% ; la longueur des parties végétatives de 31,54% ; le poids racinaire de 293,72% ; le poids de la partie végétative de 106,72% ; le nombre de talles de 50% ; le nombre d'entre nœuds par plant de 86,11% ; le nombre de feuilles par plant de 28,57% ; le nombre d'épis portés par les plants de 120%.

Evaluation de la sévérité de la maladie, incidence et indice de la maladie

Au laboratoire, la partie racinaire des échantillons de cinquante plantes de chaque traitement a été examinée visuellement et la maladie a été évaluée selon l'échelle de sévérité de Greany *et al.* (Greany FJ, Machacek JE, Johnston CL. 1938.Varietal resistance of wheat and oats to root rot caused by *Fusarium culmorum* and *Helminthosporium sativum*. *Sci. Agric*, 18: 500–523) qui ont distingué six classes de sévérité selon les types de symptômes observés : S0, pas d'infection ; S1, petites lésions nécrotiques dispersées au niveau du sous-collet et des racines ; S2, lésions nécrotiques distinctes sur la partie basale de la plante, particulièrement au niveau du sous-collet et des racines ; S3, grandes lésions nécrotiques sur le collet, le sous-collet et les racines avec diminution de la vigueur de la plante ; S4, pourritures de la partie basale, chlorose de la plante, souvent nanisme et flétrissement et S5, plante morte.

L'incidence de la maladie a été calculée selon la formule suivante : **I = 100 [Nm / Nt]**, c'est-à-dire le pourcentage de plantes malades, Nm rapporté au nombre total Nt de plantes examinées.

L'indice de la pourriture racinaire a été calculé selon la formule suivante :

IM = 100 Σ (Ni Si) / (5 Nt), avec Ni nombre de plantes de classe de sévérité i et Si classe de sévérité i.

Le degré d'altération des feuilles a été estimé après 60 jours de culture selon le barème suivant.

0 : Surface foliaire saine ;

1 : 1 à 20% de la surface foliaire malade ;

2 : 21 à 40% de la surface foliaire malade ;

3 : 41 à 60% de la surface foliaire malade ;

4 : 61 à 80% de la surface foliaire malade ;

5 : 81-100% de la surface foliaire malade.

Les notes rapportées au nombre de feuilles observés constituent l'Indice d'Altération Foliaire (IAF), calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{IAF = [\sum (i \times xi)] / [6 \times NtF]}$$

IAF : Indice d'altération foliaire.

i : Notes d'apparence des feuilles 0 – 5.

xi : Nombre de feuilles présentant la note i.

NtF : Nombre total de feuilles.

L'indice moyen est ensuite calculé pour chaque lot de plantes.

Les résultats obtenus sous serre (Tableau 13) sur un sol non désinfecté pauvre en phosphore ont montré que les plants provenant des semences enrobées sont protégés contre les maladies telluriques :

- Les pourcentages des classes de sévérité de la maladie, estimés à partir des symptômes de la pourriture racinaire, sont nuls ou faibles ;

- Les pourcentages des plants qui ont présentés les classes de sévérité S2 et S3 sont nuls chez les plants issus des semences enrobées et de 10% chez les plants témoins ;

- Les pourcentages des classes de sévérité S1 chez les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées sont respectivement de 0 et de 10%, ceux des plants témoins sont de 10% ;

- Le pourcentage des plants de blé qui ont présenté la classe S0, absence de symptômes, est de 100% chez les plants de blé enrobés est de 90% chez les plants témoins. Celui des plants d'orge provenant des semences enrobées est de 90% et des témoins de 70% ;

-L'incidence de la maladie relevée chez les plants de blé et d'orge, issus des semences provenant des semences enrobés par le produit formulé, et celle notée chez les plants témoins varient respectivement entre 0 et 10% et entre 10 et 30% ;

-Les indices de la maladie ont atteint 49% chez les plants témoins et chez les plants enrobés 32% (orge) et 20% (blé) ;

-Les plants de blé et d'orge se développant sous serre ont présenté, avec le temps des symptômes foliaires, estimés par le calcul de l'indice d'altération foliaire (Tableau 19) :

*Les indices d'altération foliaire notés chez les plants de blé enrobés, après 5 mois de culture, sont de l'ordre de 0,1 ;

* Les indices d'altération foliaire notés chez les plants témoins, après 5 mois de culture sont de l'ordre de 0,49.

Colonisation des racines

Afin de mettre en évidence la colonisation du système racinaire des plants de blé et d'orge par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, les racines ont été lavées, désinfectées superficiellement à l'alcool 90° pendant 1 min, rincées abondamment à l'eau distillée stérile, séchées, découpées en petits morceaux et déposées dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée. Le pourcentage de colonisation des racines a été calculé à partir du nombre de fragments de racines entourés par un mycélium du *Trichoderma* selon la relation ci-dessous. Quatre fragments de racines ont été déposés par boîte de Petri et chaque plante a fait l'objet de trois répétitions. Nfc % Co = X 100 NTf où : % Co = pourcentage de colonisation ; Nfc = nombre de fragments colonisés ; et NTf = nombre total de fragments.

Les résultats obtenus (Tableau 14) ont montré que les semences de blé et d'orge enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 ont donné des plants qui ont présenté en fonction du temps de culture des racines colonisées par *Trichoderma asperellum*:

- Les pourcentages de colonisation ont atteint 68%, après un mois de culture ;
- Les pourcentages de colonisation ont atteint 82% après 5 mois de culture ;
- La colonisation est confirmée également par observation sous microscope optique des structures des composantes du cycle de vie du champignon : hyphes, conidiophores, phialides et conidies.

Traçage biologique et moléculaire de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 à partir des racines des plants de blé et d'orge cultivés sous serre issus des semences enrobées par le produit d'enrobage

A la fin du cycle végétatif, les plants de blé et d'orge cultivés sous serre issus des semences enrobées par le produit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 sont déterrées et les racines sont coupées et lavées sous un filet d'eau de robinet puis séchées sur du papier filtre. Les racines, découpées en section de 1 cm, sont désinfectés dans l'alcool à 95°C pendant 2 mn, rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile, séchés rapidement sur un papier absorbant stérile puis déposés sur milieu PSA. Quatre fragments

sont placés par boîte à raison de 3 répétitions par traitement. Les boites sont incubées à 28°C et à l'obscurité pendant 3 jours. Des repiquages à partir des boites de réisolement sont réalisés et les isolats obtenus ont servi au traçage moléculaire.

L'analyse moléculaire par l'outil BLAST des séquences des isolats collectés des racines en fin du cycle végétatif des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le bioproduit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099.

Les résultats obtenus ont montré que :

L'étude du traçage biologique et moléculaire de la souche de *T. asperellum* a montré que :

-Le traçage biologique, effectué sur milieu de culture, a montré que le réisolement de la souche de *T. asperellum* MW074099 est positif à partir des racines des plants de blé et d'orge provenant des semences enrobées par le produit d'enrobage ;

-Les racines des plants de blé et d'orge, après 5 mois de culture, sont colonisées par *Trichoderma*, l'observation microscopique des racines fines a montré la présence de différentes structures de la reproduction asexuée de ce champignon ;

-Le traçage moléculaire a montré que les séquences des isolats collectés des racines en fin du cycle végétatif des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées ont un pourcentage de similarité de 99,66 et 100%, (Tableau 15) avec les séquences de la souche de base du produit d'enrobage *T. asperellum* MW074099.

Essais pilote chez l'agriculteur : Evaluation de l'effet du bioproduit d'enrobage, dans les conditions normales de fertilisation et de traitements chimiques, sur les paramètres de croissance des plants de blé et d'orge et sur les pathogènes responsables de la pourriture des racines du blé.

Expérimentation au champ

Le site d'expérimentation est situé à Jorf el Melha dans la région de Sidi Kacem, au Nord Ouest du Maroc (34°28'60''Nord - 5°31' 00''Ouest, Alt: 35 m). La région de Sidi Kacem, d'un climat méditerranéen, est caractérisée par l'alternance d'une saison humide d'Octobre à Avril et une saison sèche et chaude de Mai à Septembre. Les mois les plus froids de l'année sont janvier et février où la température moyenne descend jusqu'à 9,54°C. Les mois les plus chauds sont Juillet et Août avec des températures plus élevées de l'ordre de 27,72°C en Juillet et 27,47°C en Août (Anonyme, 2012). La pluviométrie moyenne annuelle est variable, de l'ordre de 395 mm en 2012 et de 420 en 2017, et l'humidité relative de 30-40%.

L'essai pilote chez l'agriculteur a été mis en place durant la campagne agricole 2019-2020, dans la région de Sidi Kacem (Jarf El Malha). Le sol, limono argilo sableux (60/15/25)

à pH=7,5 a été labouré trois fois, deux labours par chisels et un labour par vibroculteurs. L'épandage des engrais de fond (N P K : 15, 30, 10 U/ha), à raison de 3,5 Qx par Ha, a été effectué d'une manière mécanique. Le semis n'a été initié qu'en Décembre 2019 (14/11/2019), à cause du retard des précipitations. Deux désherbages chimiques ont été réalisés, le premier au Mustang 306SE à raison de 2,5 l /ha au stade début tallage, le deuxième antidicotylédones par le printazole (75 g/l à la dose recommandée de 1,2 L/ha dans 200 L d'eau) au stade fin tallage. Les mauvaises herbes ont ensuite été contrôlées manuellement. Les travaux préparatoires du sol et la conduite de l'essai ont été effectués selon les normes de l'itinéraire technique suivies dans la région de Sidi Kacem. Deux applications d'ammonitrate (33,5%) ont été appliquées, le 28/12/2020 et le 04/02/2020. Toutes les parcelles ont été traitées le 15/03/2020 contre les maladies foliaires des céréales (Septoriose, Rouilles, Oïdium, Fusariose, Piétin verse, Helminthosporiose et les Rynchosporioses). Les mois de Mars, Avril et Avril ont connu un manque de précipitations.

Des parcelles expérimentales, 100 m de longueur et 6 m de largeur, ont été utilisées pour le semis des semences de blé dur (variété Amjad), blé tendre (variété Wafia) et d'orge (Oussama), enrobées avec et sans le produit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 et les semences témoins.

Estimation des paramètres agronomiques

La lecture a été effectuée après 45 jours, 3 et 5 mois du semis des semences enrobées ou non par le produit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099. Les plants de blé et d'orge ont été collectés, au hasard selon la technique d'échantillonnage en diagonale décrite par Matsushima (1966). Au laboratoire, après nettoyage des racines des plants des traces de sol, les paramètres suivants sont examinés : longueur de la tige, longueur des racines, le poids des masses racinaire et aérienne, nombre de talles, de feuilles et d'entre nœuds, longueur des épis et leurs poids, voir Bioessai en conditions contrôlées (sous serre)

Les résultats obtenus (Tableau 16), après 5 mois de culture, ont montré une amélioration des différentes composantes des paramètres agronomiques et de rendement chez les plants de blé (dur et tendre) et d'orge provenant des semences traitées par le bioproduit formulé par rapport à celles présentées par les plants témoins.

- Les longueurs de plants de blé dur et tendre traités varient entre 80,5 et 90 cm et celles des témoins entre 78 et 82 cm (pourcentage de gain est de 6,56%) ;
- Les longueurs des plants d'orge traités sont de l'ordre de 130 cm et celles des témoins de 102 cm ; (pourcentage de gain est de 27,45%) ;

- Les masses végétatives des plants de blé dur et tendre traités oscillent entre 32,5 et 35,6 et celle des témoins varient entre 22,5 et 30,5 g (pourcentage de gain est de 28,49%) ;
- La masse végétative chez les plants d'orge traités est de 315g et celle des témoins de 155 g (pourcentage de gain est de 103,20%) ;
- Le nombre de talles chez les plants de blé dur et tendre traités sont de l'ordre de 4 et 5 et celui des témoins de l'ordre de 3 (pourcentage de gain est de 50%) ;
- Le nombre de talles chez les plants d'orge traités est de 11 et celui des témoins est de 9 (pourcentage de gain est de 22,22%) ;
- Le nombre d'entre nœuds observés chez les plants de blé dur et tendre traités varie entre 6 et 8 et celui des témoins de l'ordre de 5 (pourcentage de gain est de 40%) ;
- Le nombre de feuilles émises par les plants de blé dur et tendre traités varie entre 32 – 42 et ceux des témoins de 18 – 22 (pourcentage de gain est de 85%) ;
- Le nombre de feuilles émises par les plants d'orge traités est de 160 et celui des plants témoins de 128 (pourcentage de gain est de 25%) ;
- Le nombre d'épis par plant observés chez les plants de blé dur et tendre traités est de 3 et celui noté chez les témoins est de un (pourcentage de gain est de 200%) ;
- Le nombre moyen d'épis/ plant observés chez les plants d'orge traités est de 4 et celui noté chez les témoins est de 2 (pourcentage de gain est de 100%) ;
- La longueur moyenne des épis des plants de blé dur et tendre traités varie de 27 à 28 cm, celle des épis des plants témoins oscille entre 22 et 23 cm (pourcentage de gain est de 22,22%) ;
- La longueur moyenne des épis des plants d'orge traités est de 20 cm et celle des épis des plants témoins 19 cm (pourcentage de gain est de 5,26%) ;
- Le poids des épis chez les plants de blé dur et tendre traités varie entre 3,9 – 4,1g et celui des témoins oscille entre 2,5 – 2,6 g (pourcentage de gain est de 56,86%) ;
- Le poids des épis chez les plants d'orge traités est de 2,3 et celui des témoins de 2,1 g (pourcentage de gain est de 9,52%) ;
- Le nombre de grains/plant de blé dur et tendre varie entre 27 et 28 et celui des grains des plants témoins a oscillé entre 42 et 44 (pourcentage de gain est de -36,05%) ;
-Le nombre de grains/plant chez les plants d'orge traités est de 68 et celui des plants témoins de 40 (pourcentage de gain est de 70%) ;
- Le poids moyen de 100 grains chez les plants de blé dur et tendre traités est de 3,8 et 5,1 et celui de plants témoins de 1,4 et 2,8. (Pourcentage de gain est de 111,90%) ;

-Le poids moyen de 100 grains chez les plants d'orge traités est de l'ordre 5,4 et celui des plants témoins de 5,1 (pourcentage de gain est de 5,88%).

Estimation de la colonisation des racines par*Trichoderma*

La colonisation du système racinaire des plants de blé et d'orge par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 a été mise en évidence par la même technique réalisée lors de l'essai en conditions contrôlées permettant de calculer le pourcentage de colonisation des racines.

Les résultats obtenus (Tableau 17) ont montré que les racines des plants de blé et d'orge provenant des semences enrobées par le produit d'enrobage formulé sont colonisées par *Trichoderma.*

-Après un mois de culture, les pourcentages de colonisation des racines ont varié entre 56,5 (blé tendre) et 69,2% (orge) ;

-Après 2, 4 et 5 mois de culture, les pourcentages de colonisation des racines des plants d'orge sont de l'ordre de 71,8 ; 89,5 et 87,2% ;

-Après 2, 4 et 5 mois de culture, les pourcentages de colonisation des racines des plants de blé dur sont respectivement de 72,6 ; 88,7% et 77,4 %;

-Les racines des plants témoins de blé et d'orge ne sont pas colonisées par *Trichoderma,* mais d'autres champignons ont été isolés.

Evaluation de la sévérité de la maladie, incidence et indice de la maladie

Au laboratoire, la partie racinaire des échantillons de cinquante plantes de chaque traitement a été examinée visuellement et la maladie a été évaluée selon l'échelle de sévérité de Greany *et al.* (Greany FJ, Machacek JE, Johnston CL. 1938. Varietal resistance of wheat and oats to root rot caused by *Fusarium culmorum*and *Helminthosporiumsativum. Sci. Agric*, 18: 500–523).

Le degré de la maladie est estimé par le calcul de l'incidence de la maladie, l'indice de la pourriture racinaire, le degré de l'altération foliaire et l'indice de l'altération foliaire de la même manière précédente.

L'étude de la sévérité de la maladie de la pourriture racinaire (Tableau 18) chez les plants du blé et d'orge issus des semences enrobées par *Trichoderma* a montré que :

- Les classes de sévérité S2, S3 et S4 ne sont pas représentés chez les plants du blé et d'orge, les pourcentages de la classe S1 ont variées entre 20 et 30 % ;
- Les pourcentages des plants (classe S1) qui n'ont pas montré les symptômes de la pourriture racinaire chez les plants du blé et d'orge ont oscillé entre 70 et 80% ;

L'étude des incidences de la maladie a permis de noter que :

- Les pourcentages des incidences de la maladie chez les plants de blé et d'orge issus des semences témoins ont varié entre 50 et 60% ;
- Les pourcentages des incidences de la maladie chez les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées ont oscillé entre 20 et 30% :

L'étude des indices de la maladie a montré que :

-Les pourcentages des indices de la maladie ont varié entre 36,6 et 42,6% chez les plants de blé et d'orge issus des semences non enrobées ;

-Les pourcentages des indices de la maladie ont varié entre 23,5 et 33,3% chez les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées ;

Altérations foliaires

Les résultats obtenus (Tableau 19) ont permis de noter que :

- Les symptômes foliaires n'ont été observés qu'après 3 mois de mise en culture des semences en plein champ ;
- Les indices d'altération foliaires relevés chez les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées ont montré des indices foliaires qui ont varié entre 0,04 et 0,1 et entre 0,1 et 0,44, respectivement après 3 et 5 mois de culture ;
- Les indices d'altération foliaires relevés après 3 et 5 mois de culture chez les plants de blé et d'orge témoins ont varié respectivement entre 0,07 et 0,1 et entre 0,21 et 0,46.

Traçage biologique et moléculaire

Le traçage biologique, effectué sur milieu de culture, a montré que le réisolement de la souche de *T. asperellum* MW074099 est positif à partir des racines des plants de blé et d'orge cultivés au champ et provenant des semences enrobées par le produit d'enrobage.

Le traçage moléculaire a montré que les séquences des isolats collectés des racines en fin du cycle végétatif des plants de blé et d'orge cultivés au champ issus des semences enrobées ont un pourcentage de similarité de 100%, (Tableau 15) avec les séquences de la souche de base du produit formulé à base des conidie de *T. asperellum* MW074099.

Annexes

Tableau 1 : Variation de l'activité phosphatase de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 et du pH des filtrats dans le milieu NBRIP, en fonction du temps (exprimé en U/ mL).

Sources de phosphate	24h		48h		72h		96h	
	A.E	pH	A.E	pH	A.E	pH	A.E	pH
TCP	513,41^{a}	5,6^{b}	622,25^{a}	5,0^{b}	632,6^{a}	4,2^{b}	655,65^{a}	4,6^{b}
TCP+ KH_2PO_4	127,12^{b}	6,6^{a}	151,58^{b}	6,1^{a}	169,45^{b}	5,2^{a}	282,45^{b}	4,4^{b}
KH_2PO_4	47^{c}	6,7^{a}	48^{c}	6,4^{a}	48^{c}	5,8^{a}	50^{c}	5,4^{a}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 2 : Variation du pH et de la viscosité en fonction du temps du produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099.

Temps	pH	Viscosité en mPa à 28°C
3 mois	6,4^{a}	22,6^{a}
6 mois	6,15^{a}	22,2^{a}
9 mois	5,94^{b}	20,64^{b}
12 mois	5,32^{c}	18,5^{c}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 3 : Pourcentage de germination (G) des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé (exprimé en %).

Temps	G(%)
1er mois	78,40^{a}
2ème mois	75,50^{a}
3ème mois	72,25^{b}
6ème mois	68,35^{b}
9ème mois	65,25^{b}
12ème mois	62,75^{c}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 4: Colonisation de l'espace par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé en présence de différentes espèces fongiques pathogènes sur les céréales (exprimé en %).

	Espèces fongiques					
Temps	***F .roseum***	***F. culmorum***	***F. graminearum***	***C. spicifera***	***B. sorokiniana* 1**	***B. sorokiniana* 2**
3 mois	71,50^{a}	73,50^{a}	75,45^{a}	72,25^{a}	74,62^{a}	75,50^{a}
6 mois	70,25^{a}	72,32^{ab}	72,50^{b}	70,35^{b}	70,25^{b}	72,23^{b}
9 mois	70,20^{a}	71,45^{b}	71,64^{b}	69,18^{c}	68,12^{c}	70,92^{c}
12 mois	68,75^{b}	69,75^{c}	68,50^{c}	66,50^{d}	65,25^{d}	68,45^{d}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 5: Inhibition de la croissance mycélienne des différentes espèces fongiques pathogènes sur les céréales par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé en confrontation directe I_{CD} (%).

	Espèces fongiques					
Temps	***F. roseum***	***F. culmorum***	***F. graminearum***	***C. spicifera***	***B. sorokiniana* 1**	***B. sorokiniana* 2**
3 mois	79,5^{a}	79,55^{a}	79,26^{a}	78,28^{a}	73,07^{a}	75,5^{a}
6 mois	78,5^{b}	77,16^{b}	77,45^{b}	76,75^{b}	71,95^{b}	72,23^{b}
9 mois	76,25^{c}	73,4^{c}	75,5^{c}	74,5^{c}	69,54^{c}	70,92^{c}
12 mois	72,75^{d}	71,65^{d}	72,12^{d}	70,19^{d}	67,40^{d}	68,45^{d}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 6 : Inhibition de la croissance mycélienne des différentes espèces fongiques pathogènes sur les céréales par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé en confrontation indirecte par les substances volatiles I_{SV} (%)

	Espèces fongiques					
Temps	***F. roseum***	***F. culmorum***	***F. graminearum***	***C. spicifera***	***B. sorokiniana* 1**	***B. sorokiniana* 2**
3 mois	$80,00^{a}$	$79,16^{a}$	$80,25^{a}$	$78,50^{a}$	$79,15^{a}$	$80,85^{a}$
6 mois	$78,50^{ab}$	$77,50^{b}$	$76,50^{b}$	$75,72^{b}$	$75,38^{b}$	$76,50^{b}$
9 mois	$77,25^{bc}$	$73,25^{c}$	$74,95^{c}$	$73,25^{c}$	$72,80^{c}$	$73,45^{c}$
12 mois	$76,50^{c}$	$70,75^{d}$	$71,25^{d}$	$71,28^{d}$	70,15d	$70,37^{d}$

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 7: Inhibition de la croissance mycélienne des différentes espèces fongiques pathogènes sur les céréales par la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé en confrontation indirecte par les substances diffusibles I_{SD} (%).

	Espèces fongiques					
Temps	***F. roseum***	***F. culmorum***	***F. graminearum***	***C. spicifera***	***B. sorokiniana 1***	***B. sorokiniana 2***
3 mois	$20,35^{a}$	$22,19^{a}$	$22,5^{a}$	$22,45^{a}$	$23,73^{a}$	$24,59^{a}$
6 mois	$15,25^{a}$	$20,32^{b}$	$20,49^{b}$	$19,50^{b}$	$22,19^{a}$	$22,83^{b}$
9 mois	$14,50^{b}$	$19,58^{c}$	$16,75^{c}$	$18,35^{c}$	$20,45^{b}$	$21,33^{b}$
12 mois	$14,25^{b}$	$16,75^{d}$	$14,45^{d}$	$16,25^{d}$	$18,75^{c}$	$18,53^{c}$

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 8 : Comparaison du taux de germination des grains des céréales enrobés par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et des grains témoins (exprimé en %).

		Temps			
Traitements	**Cultures**	**3 mois**	**6 mois**	**9 mois**	**12 mois**
Témoins	**Blé tendre**	74^{e}	74^{d}	72^{d}	70^{d}
	Blé dur	78^{e}	78^{d}	74^{d}	72^{d}
	Orge	84^{d}	80^{c}	76^{d}	76^{d}
Enrobage sans *Trichoderma*	**Blé tendre**	92^{c}	89^{c}	84^{c}	81^{c}
	Blé dur	90^{c}	86^{c}	82^{c}	80^{c}
	Orge	96^{b}	92^{b}	91^{b}	$90b^{c}$
Enrobage avec *Trichoderma*	**Blé tendre**	100^{a}	99^{b}	98^{b}	97^{b}
	Blé dur	98^{b}	97^{b}	96^{b}	96^{b}
	Orge	100^{a}	100^{a}	100^{a}	100^{a}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 9 : Suivi de la sporulation de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé sur les grains de blé et d'orge enrobés et conservés (conidies.mL^{-1}).

	Temps (6 premiers mois)						
Grains	**T0**	**1 mois**	**2 mois**	**3 mois**	**4 mois**	**5 mois**	**6 mois**
Blé tendre	$2,9.10^{7b}$	$2,9.10^{7b}$	$2,6.10^{7b}$	$2,3.10^{7b}$	$2,2.10^{7b}$	$2,1.10^{7b}$	$1,9.10^{7b}$
Blé dur	$3,4.10^{7a}$	$3,4.10^{7a}$	3.10^{7a}	$2,9.10^{7a}$	$2,8.10^{7a}$	$2,6.10^{7a}$	$2,6.10^{7a}$
Orge	$2,1.10^{7b}$	$2,1.10^{7b}$	2.10^{7b}	$1,8.10^{7c}$	$1,6.10^{7c}$	$1,6.10^{7c}$	$1,5.10^{7c}$
	Temps (6 derniers mois)						
Grains	**7 mois**	**8 mois**	**9 mois**	**10 mois**	**11 mois**	**12 mois**	
Blé tendre	$8,8.10^{6a}$	$8,1.10^{6a}$	$7,8.10^{6a}$	$9,1.10^{5a}$	$8,9.10^{5a}$	$7,7.10^{5a}$	
Blé dur	$8,9.10^{6a}$	$8,4.10^{6a}$	$7,9.10^{6a}$	$9,8.10^{5a}$	$8,6.10^{5a}$	$7,8.10^{5a}$	
Orge	$8,4.10^{6a}$	8.10^{6a}	$7,4.10^{6a}$	$9,5.10^{5a}$	$8,5.10^{5a}$	$7,6.10^{5a}$	

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 10 : Suivi en fonction du temps de la colonisation des racines des plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et conservées pendant 12 mois (exprimée en %).

		Temps			
		15 jours	**1 mois**	**3 mois**	**6 mois**
Partie racinaire	**Blé tendre**	$20,5^{f}$	$42,7^{c}$	$77,8^{b}$	$79,2^{a}$
	Blé dur	$22,6^{e}$	$44,8^{b}$	$72,5^{c}$	$77,2^{b}$
	Orge	$23,1^{d}$	$45,1^{b}$	$75,2^{b}$	$76,5^{b}$

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 11 : Colonisation en fonction du temps des substrats de culture des plantes de blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et conservées 12 mois (exprimée en %).

		15 jours	**1 mois**	**3 mois**	**6 mois**
Sol	**Blé tendre**	$47,5^{a}$	$66,5^{a}$	$84,8^{a}$	$78,8^{a}$
	Blé dur	$41,6^{c}$	$64,3^{a}$	$84,9^{a}$	$76,6^{b}$
	Orge	$44,3^{b}$	$65,7^{a}$	$85,7^{a}$	$75,4^{c}$

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 12 : Effet de l'enrobage des semences de blé et d'orge par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 sur la croissance des plantes de blé et d'orge dans l'essai sous serre.

Traitements	**Variétés**	**Racine**		**Tige**		**Entre nœuds**	**Feuilles**	**Épi**		**PTG (g)**
		T	**P**	**T**	**P**			**T**	**P**	
Témoin	**Blé tendre Wafia**	$13,0^{b}$	$1,3^{b}$	$49,8^{d}$	$3,4^{b}$	4^{b}	5^{d}	$13,0^{bc}$	$2,7^{c}$	$40,1^{c}$
	Blé dur Amjad	$12,9^{c}$	$1,4^{b}$	$50,0^{c}$	$3,2^{b}$	4^{b}	5^{d}	$12,8^{c}$	$2,9^{c}$	$38,9^{d}$
	Orge Oussama	$12,2^{c}$	$1,2^{b}$	$49,6^{d}$	$3,1^{b}$	4^{b}	6^{c}	$13,5^{b}$	$3,0^{b}$	$45,4^{c}$
Enrobage sans *Trichoderma*	**Blé tendre Wafia**	$12,9^{c}$	$1,6^{b}$	$48,7^{d}$	$3,3^{b}$	4^{b}	5^{d}	$13,5^{b}$	$2,8^{c}$	$42,5^{c}$
	Blé dur Amjad	$13,0^{b}$	$1,3^{b}$	$50,3^{c}$	$3,4^{b}$	4^{b}	6^{c}	$12,6^{c}$	$3,0^{b}$	$40,1^{c}$
	Orge Oussama	$12,4^{c}$	$1,5^{b}$	$49,5^{d}$	$3,2^{b}$	4^{b}	6^{c}	$13,4^{b}$	$3,0^{b}$	$45,3^{c}$
Enrobage avec *Trichoderma*	**Blé tendre Wafia**	$18,9^{a}$	$3,2^{a}$	$65,0^{a}$	$5,5^{a}$	6^{a}	8^{b}	$18,1^{a}$	$5,1^{a}$	$62,9^{a}$
	Blé dur Amjad	$19,5^{a}$	$2,9^{b}$	$66,5^{a}$	$5,5^{a}$	6^{a}	9^{a}	$18,3^{a}$	$5,2^{a}$	$58,3^{b}$
	Orge Oussama	$18,0^{a}$	$2,8^{b}$	$65,7^{a}$	$5,6^{a}$	6^{a}	9^{a}	$18,3^{a}$	$5,5^{a}$	$65,0^{a}$

T : Taille. **P :** Poids. **PTG :** Pois totale des grains (1000 Grains).

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 13 : Pourcentage des classes de sévérité de la maladie de la pourriture racinaire sur les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et mises en culture dans la serre.

		Classes de sévérité				
Traitements	**Variétés**	**S0**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**
Témoin	**Blé tendre Wafia**	90^{b}	10^{a}	10^{a}	0^{b}	0^{a}
Enrobage avec *Trichoderma*		100^{a}	0^{b}	0^{b}	0^{b}	0^{a}
Témoin	**Blé dur Amjad**	90^{b}	10^{a}	10^{a}	0^{b}	0^{a}
Enrobage avec *Trichoderma*		100^{a}	0^{b}	0^{b}	0^{b}	0^{a}
Témoin	**Orge Oussama**	70^{c}	10^{a}	10^{a}	10^{a}	0^{a}
Enrobage avec *Trichoderma*		90^{b}	10^{a}	0^{b}	0^{b}	0^{a}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 14 : Pourcentage de colonisation des racines de plantes issues des semences de blé et d'orge enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 en fonction du temps.

Traitements	Variétés	Temps				
		1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois
Témoin	Blé tendre Wafia	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobage avec *Trichoderma*		$67,5_d^a$	$75,4_c^a$	$81,7_b^a$	$82,3_a^a$	$79,9_c^a$
Témoin	Blé dur Amjad	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobage avec *Trichoderma*		$64,7_c^a$	$74,5_b^a$	$83,6_a^a$	$83,4_a^a$	$80,5_{ab}^a$
Témoin	Orge Oussama	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobé avec *Trichoderma*		$68,1_c^a$	$78,6_b^a$	$84,9_a^a$	$85,2_a^a$	$82,4_a^a$

Les valeurs lues, en exposant, sur la même colonne, pour chaque culture, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Les valeurs lues, en indice, sur la même ligne, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Tableau 16 : Effet de l'enrobage des semences de blé et d'orge par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 sur la croissance des plantes de l'essai pilote au champ chez l'agriculteur.

Traitements	Variétés	Racine	Tige			Entre nœuds	Feuilles	Épi		PTG (g)
		T	P	T	P			T	P	
Témoin	Blé tendre Wafia	$12,6^b$	$1,5^b$	$50,0^b$	$3,2^b$	4^c	5^d	$12,9^c$	$3,0^c$	$41,0^c$
	Blé dur Amjad	$13,0^b$	$1,3^b$	$50,6^b$	$3,3^b$	4^c	5^d	$12,5^c$	$2,8^d$	$39,5^d$
	Orge Oussama	$12,2^b$	$1,6^b$	$50,4^b$	$3,4^b$	4^c	5^d	$12,6^c$	$3,1^c$	$42,0^c$
Enrobage sans *Trichoderma*	Blé tendre Wafia	$12,8^b$	$1,4^b$	$49,9^c$	$3,5^b$	4^c	6^c	$13,0^b$	$2,6^d$	$43,0^c$
	Blé dur Amjad	$13,0^b$	$1,6^b$	$50,2^b$	$3,2^b$	4^c	6^c	$13,4^b$	$2,9^d$	$42,2^c$
	Orge Oussama	$12,3^b$	$1,2^b$	$49,0^c$	$3,1^b$	5^b	6^c	$12,5^c$	$3,0^c$	$43,5^c$
Enrobage par *Trichoderma*	Blé tendre Wafia	$19,5^a$	$3,1^a$	$64,5^a$	$5,6^a$	6^a	8^b	$18,0^a$	$5,5^b$	$61,9^a$
	Blé dur Amjad	$19,0^a$	$3,0^a$	$65,2^a$	$5,2^a$	6^a	9^a	$18,0^a$	$5,4^b$	$59,5^b$
	Orge Oussama	$18,05^a$	$2,9^a$	$66,0^a$	$5,7^a$	6^a	9^a	$18,4^a$	$6,0^a$	$64,5^a$

T : Taille. **P :** Poids. **PTG:** Pois totale des grains (1000 Grains).

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 17 : Pourcentage de colonisation des racines des plants issus des semences de blé et d'orge, enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099, cultivées au champ dans l'essai pilote chez l'agriculteur en fonction du temps (exprimé en %).

Traitement	Variétés	Temps				
		1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois
Témoin	Blé tendre Wafia	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobage par *Trichoderma*		$65,5_e^a$	$72,6_d^a$	$83,5_c^a$	$88,7_a^a$	$87,4_b^a$
Témoin	Blé dur Amjad	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobage par *Trichoderma*		$67,3_e^a$	$73,7_d^a$	$87,4_a^a$	$82,6_b^a$	$77,4_c^a$
Témoin	Orge Oussama	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b	0_a^b
Enrobage par *Trichoderma*		$69,2_e^a$	$71,8_d^a$	$89,5_a^a$	$87,2_b^b$	$86,4_c^a$

Les valeurs lues, en exposant, sur la même colonne, pour chaque culture, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Les valeurs lues, en indice, sur la même ligne, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Tableau 18 : Pourcentage des classes de sévérité de la maladie de la pourriture racinaire sur les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et mises en culture au champ dans l'essai pilote chez l'agriculteur.

Traitements	Variétés	Les classes de sévérité				
		S0	S1	S2	S3	S4
Témoin	Blé tendre Wafia	40^{b}	20^{b}	20^{a}	10^{a}	10^{a}
Enrobage avec *Trichoderma*		70^{a}	30^{a}	0^{c}	0^{b}	0^{b}
Témoin	Blé dur Amjad	50^{b}	20^{a}	10^{b}	10^{a}	10^{a}
Enrobage avec *Trichoderma*		80^{a}	20^{b}	0^{c}	0^{b}	0^{b}
Témoin	Orge Oussama	40^{b}	30^{a}	20^{a}	10^{a}	0^{b}
Enrobage avec *Trichoderma*		80^{a}	20^{b}	0^{c}	0^{b}	0^{b}

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 19 : Indices d'altération foliaires (IAF) relevés chez les plants de blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et mises en culture sous serre et au champ dans l'essai pilote chez l'agriculteur.

Traitement	Variétés	Mise en culture dans la serre			Mise en culture dans le champ		
		45 jours	3 mois	5 Mois	45 jours	3 mois	5 mois
Témoin	Blé Tendre Wafia	0^{a}	$0,07^{b}$	$0,20^{b}$	0^{a}	$0,07^{c}$	$0,21^{b}$
	Blé Dur Amjad	0^{a}	$0,09^{a}$	$0,20^{b}$	0^{a}	$0,09^{b}$	$0,23^{b}$
	Orge Oussama	0^{a}	$0,09^{a}$	$0,49^{a}$	0^{a}	$0,10^{a}$	$0,46^{a}$
Enrobage avec *Trichoderma*	Blé Tendre Wafia	0^{a}	$0,03^{d}$	$0,10^{c}$	0^{a}	$0,05^{d}$	$0,15^{c}$
	Blé Dur Amjad	0^{a}	$0,02^{e}$	$0,10^{c}$	0^{a}	$0,04^{e}$	$0,10^{c}$
	Orge Oussama	0^{a}	$0,05^{c}$	$0,40^{a}$	0^{a}	$0,10^{a}$	$0,44^{a}$

Les valeurs lues sur la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau 15 : Traçage moléculaire de la souche de *Trichoderma* à la fin du cycle végétatif après isolement à partir des racines des plants de blé et d'orge cultivés sous serre et au champ, issus des semences enrobées par le produit à base des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099.

	Les isolats	Espèces	Sources d'isolement	Séquences des bases azotées	Pourcentage de similarité (%)
Essai sous Serre	T-BD-S	*Trichoderma asperellum*	Racines de blé dur	CCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTG TTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAG GAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAA TTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCC TCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGT GGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGC GCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC CCCGTGAACTTAAGCATATCAATAAG	99,66%
	T-BT-S	*Trichoderma asperellum*	Racines de blé tendre	ATGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGT TGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAG GAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAA TTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCC TCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGT GGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGC GCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC CCGCTGAACTTAAGCATATC	100%
	T-OR-S	*Trichoderma asperellum*	Racines d'orge	ACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACT GTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGA GGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAA ATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC CTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAG TGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGC GCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAAAAA	99,83%
Essai pilote au Champ	T-BD-C	*Trichoderma asperellum*	Racines de blé dur	TGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTT GCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGG AACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAAT TCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCT CCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTG GCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGC GTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC GCTGAACTTAAG	100%
	T-BT-C	*Trichoderma asperellum*	Raciness de blé tendre	GGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCT CGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACC AACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAA AATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC GCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGG GGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGG TCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCC ACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG AACTTAAGCATATCT	100%
	T-OR-C	*Trichoderma asperellum*	Raciness d'orge	CCAATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAG CCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGC GGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAAC GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT GGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCG TTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCC GCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAA	100%

Figure 1. Les différents adhésifs composants les ingrédients du kit d'enrobage utilisés dans l'enrobage des semences de blé et d'orge **a :** colorant biologique (betterave rouge) **b :** gélatine, **c :** amidon, **d :** extrait de grain de lin, **e :** Produit final d'enrobage, **f :** Développement de *Trichoderma* sur le mélange des solutions diluées des extraits de la betterave rouge et des graines de lin (c).

Figure 2. Activité antagoniste de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099 du produit formulé contre **a:** *Fusarium roseum;* **b:** *F. culmorum* et **c :** *F. graminearum;* **d :** *Bipolaris sorokiniana1 ;* **e :** *B. sorokiniana 2* et **f:** *Curvularia spicifera.* 1: témoin, 2: confrontation directe; 3: confrontation indirecte par la production des substances volatiles, 4: confrontation indirecte par production des substances diffusibles.

Figure 3. Semences de blé (dur et tendre) et d'orge enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et les ingrédients du kit d'enrobage.

Figure 4. Germination des semences de blé dur sur des rondelles de papier filtre. **a :** semences non enrobées ; **b :** semences enrobées avec les ingrédients du kit d'enrobage sans *Trichoderma* ; **c :** semences enrobées avec le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et les ingrédients du kit d'enrobage.

Figure 5. Développement des colonies de la souche de *Trichoderma asperellum* autour des semences de blé tendre, enrobées par le produit formulé à base des conidies de *T. asperellum* MW074099 et conservées pendant 12 mois, et mises à germer sur le milieu PSA.

Figure 6. Plants d'orge, âgé d'un mois, issus de semences enrobées avec le produit formulé à base des conidies de *T. asperellum* MW074099 (A) ou sans (B).

Figure 7. Plants de blé dur, âgé d'un mois, issus de semences enrobées avec le produit formulé à base des conidies de *T. asperellum* MW074099 (A) ou sans (B).

Figure 8. Observation microscopique des différentes structures de *Trichoderma* développées sur les racines des plants issus des semences enrobées par le produit à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 **(a, b, c):** conidiophores avec phialides ; **(d):** filaments mycéliens avec clamydospores **(c)** et phialides **(ph).**

Figure 9. Isolement de *Trichoderma* à partir des racines **(A),** rhizosphère **(B)** et à partir de 5 cm de profondeur de substrat de culture des plants d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies *Trichoderma asperellum* MW074099.

Figure 10. Culture des plants de blé et d'orge sous serre issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et des semences témoins. **A :** cultures de blé dur témoin, **B :** cultures de blé dur enrobé, **C :** Cultures d'orge témoin, **D :** cultures d'orge enrobé, **E :** cultures de blé tendre témoin, **F :** Cultures de blé tendre enrobé, **G:** Cultures de blé (dur et tendre) et orge après 45 jours de la mise en culture. **a :** Plant de blé dur enrobé, **b :** Plant de blé dur témoin, **c :** Plant d'orge enrobé, **d :** Plant d'orge témoin, **e :** Plant de blé tendre enrobé, **f :** Plant de blé tendre témoin.

Figure 11. Plants de blé et d'orge après 3 mois de culture sous serre issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et des semences témoins. **a :** Plant d'orge enrobé, **b :** Plant d'orge témoin, **c :** Plant de blé dur enrobé, **d :** Plant de blé dur témoin, **e :** Plant de blé tendre enrobé, **f :** Plant de blé tendre témoin.

Figure 12. Développement des plants de blé et d'orge après 5 mois de culture sous serre issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et des semences témoins. **a :** plant d'orge enrobé, **b :** plant d'orge témoin, **c :** plant de blé dur enrobé, **d :** plant de blé dur témoin, **e :** plant de blé tendre enrobé, **f :** plant de blé tendre témoin.

Figure 13. Masses racinaires des plants du blé et d'orge issus des semences enrobées par le produit formulé à base des conidies de *Trichoderma asperellum* MW074099 et des semences témoins. **a :** Masse racinaired'orge enrobé, **b :** Masse racinaire d'orge témoin, **c :** Masse racinaire de blé tendre enrobé, **d :** Masse racinaire de blé tendre témoin, **e :** Masse racinaire de blé dur enrobé, **f :** Masse racinaire de blé dur témoin.

Revendications

1- Nouveau produit enrobant biofongicide, biofertilisant et biostimulant destiné à enrober les semences avant le semis dont la matière active est formée par les conidies d'une souche marocaine de *Trichoderma asperellum* enregistrée sous le code *Trichoderma asperellum* MW074099 et caractérisée par l'empreinte génétique suivante :

GCGGGAGGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCA
GGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTA
TTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTAT
TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGA
TCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGG
CGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCG
CGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA

2- Nouveau produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le substrat déterminé pour la production des conidies en masse est le substrat composite à base de Pulpe de betterave, de Bagasse de la canne à sucre et de Maïs broyé.

3- Procédé de la production en masse des conidies du produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* selon les revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que la production est réalisée en trois étapes :

a/ Une quantité de substrat composite (50% de Pulpe de betterave, 40% de Bagasse de la canne à sucre et 10% de maïs broyé) est déposée dans des plateaux en inox, humidifiée avec l'eau distillée et autoclavée à 121°C pendant 20 mn.

b/ Le substrat composite est inoculé avec 2 mL d'une suspension de conidies à la concentration de 10^7 conidies.mL^{-1} préparée à partir des cultures jeunes de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, âgées de 7 jours, et mélangé à l'aide d'une spatule pour assurer la répartition des conidies de *Trichoderma* sur le substrat ;

c/ Les boites contenant le substrat inoculé, sont incubées à 28°C et à l'obscurité.

4- Procédé de la production en masse des conidies de *T. asperellum* du produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant selon les revendications 1, 2 et 3, est caractérisée par le fait

que le même substrat de culture est exploité trois fois, à intervalle de 7 jours, pour collecter les conidies.

5- Procédé de la formulation du produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *Trichoderma asperellum* destiné à l'enrobage des semences selon les revendications de 1 à 4 caractérisé par le fait d'ajouter à 1 L de la suspension des conidies de la souche de *Trichoderma asperellum* MW074099, ajustée à la concentration 2,5 à 4 10^{10} conidies.mL^{-1}, les additifs suivants: amidon poudre (4 - 16%), solution de gélatine (4 - 16%), huile de paraffine (0,5 - 5%), huile de glycérine (0,5 - 5 %), huile de table (0,5 - 6%), Tween 20 (0,1- 3%), $CaCl_2$ (0,5- 5%) et Talc (1- 8%).

6- Nouveau produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* destiné à l'enrobage des semences selon les revendications de 1 à 5 caractérisé par le fait que son pH, à 28°C, a varié entre 6,4 et 5,32 et sa viscosité entre 22,6 et 18,5 mPa après 3 à 12 mois de conservation à température ambiante.

7- Procédé de production et de formulation d'un kit d'enrobage destiné à être mélangé avec le produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* selon les revendications de 1 à 6 au moment de l'enrobage des semences avant semis, caractérisé par le fait qu'il est constitué par les ingrédients suivants : une bouillie de graines de lin (solution S1), une solution visqueuse à base de gélatine (solution S2), un colorant liquide à base de bulbes de betterave rouge et un colorant en poudre à base de bulbes de betterave rouge séchés. En plus de l'argile blanc et du talc.

8- Procédé d'enrobage des grains de blé et d'orge caractérisé par le fait de mélanger le produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *Trichoderma asperellum* selon les revendications de 1 à 6 et les ingrédients du kit d'enrobage selon la revendication 7, permettant d'obtenir des grains traités destinés au semis.

9- Nouveau produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* destiné à l'enrobage des semences selon les revendications de 1 à 8 caractérisé par le fait que *Trichoderma asperellum*a inhibé significativement différents pathogènes tel que *Fusarium roseum, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Curvularia spicefera, Bipolaris sorokiniana* 1 et *B. sorokiniana* 2 soit par contact direct soit par antibiose.

10- Nouveau produit biofongicide, biofertilisant et biostimulant à base de *T. asperellum* destiné à l'enrobage des semences selon les revendications de 1 à 9 caractérisé par le fait que l'enrobage des semences par le produit de *Trichoderma asperellum* a stimulé la masse racinaire et la partie aérienne et a permis également à coloniser les racines par *Trichoderma* et leur composantes par rapport aux semences non enrobées.

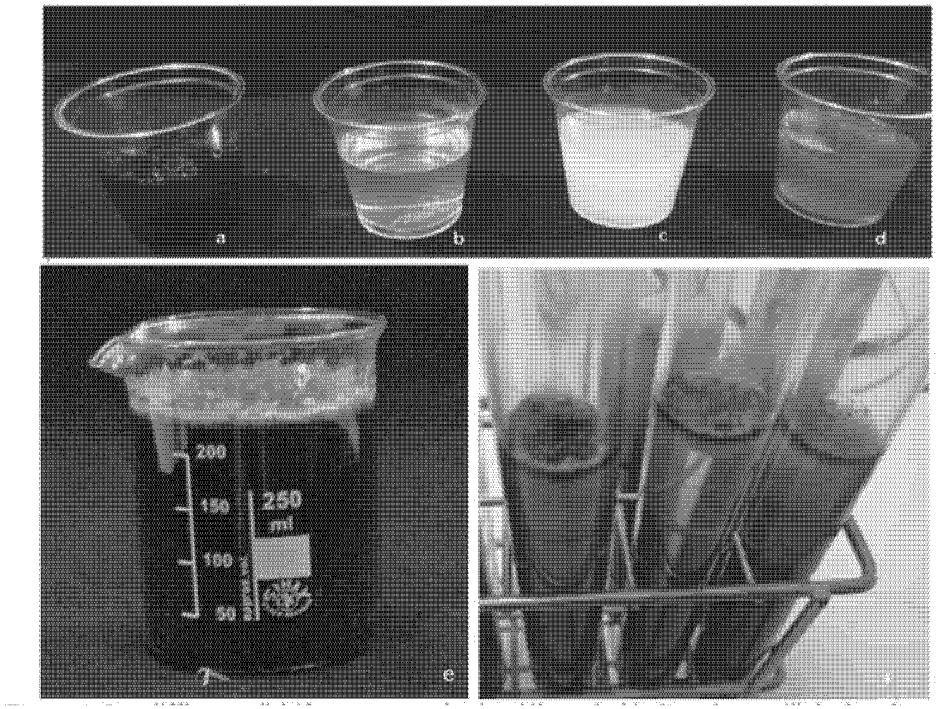


FIGURE 1

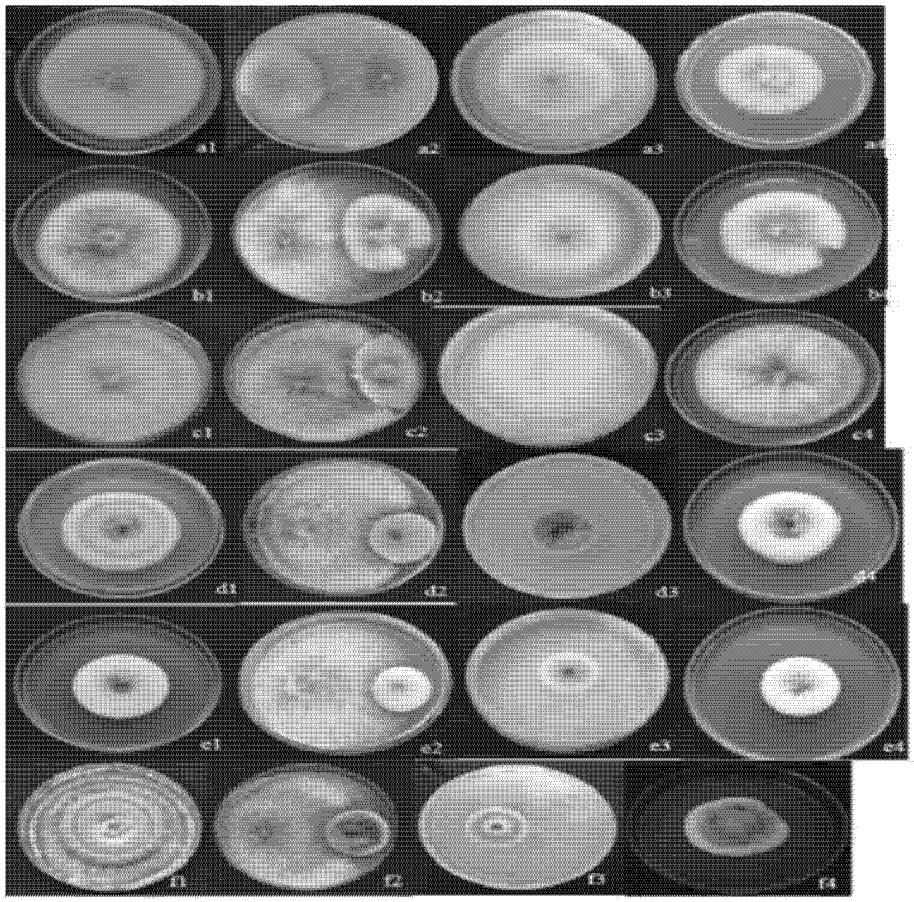


FIGURE 2

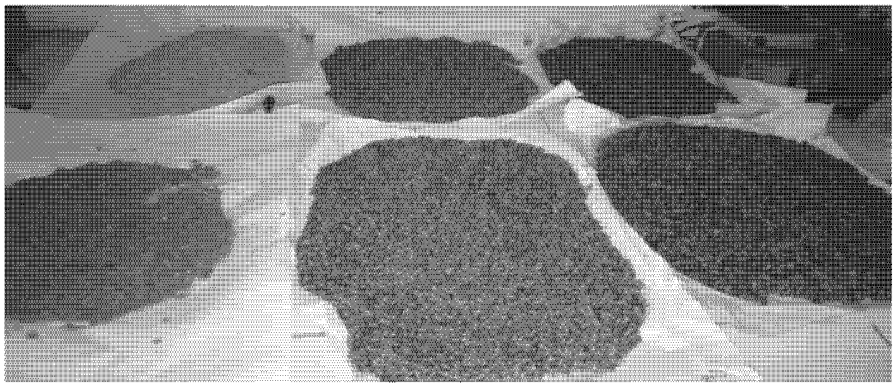


FIGURE 3

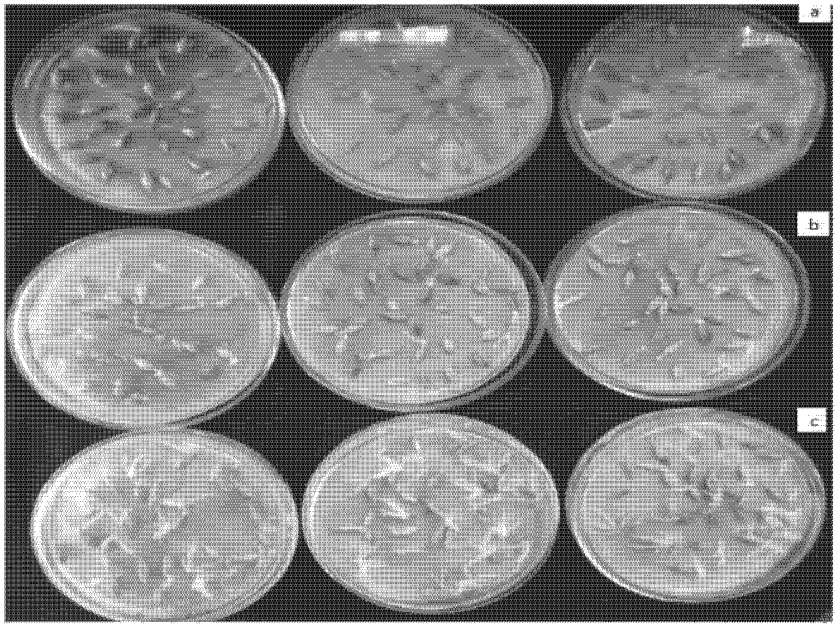


FIGURE 4

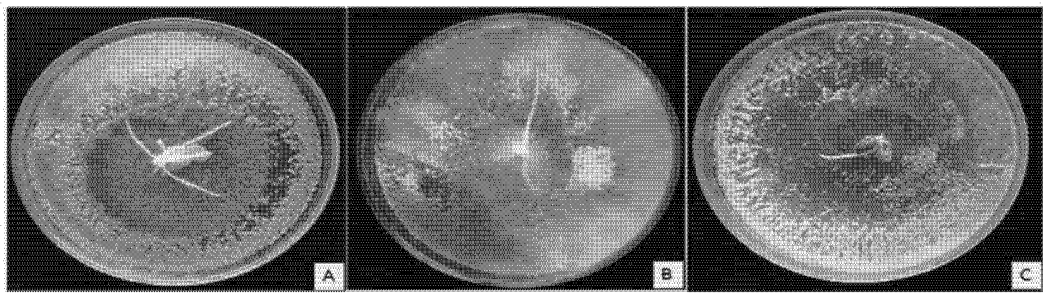


FIGURE 5

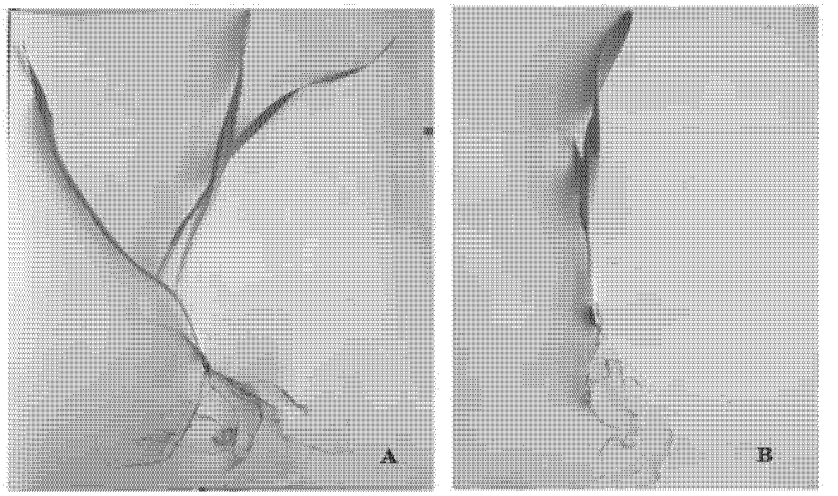


FIGURE 6

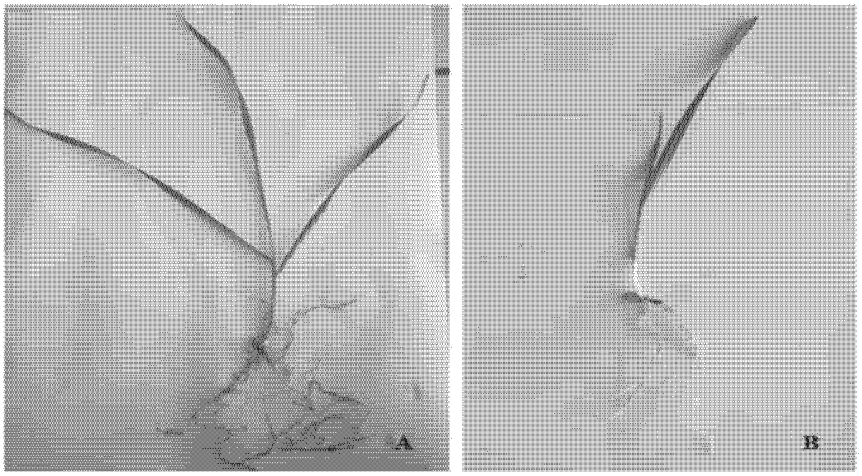
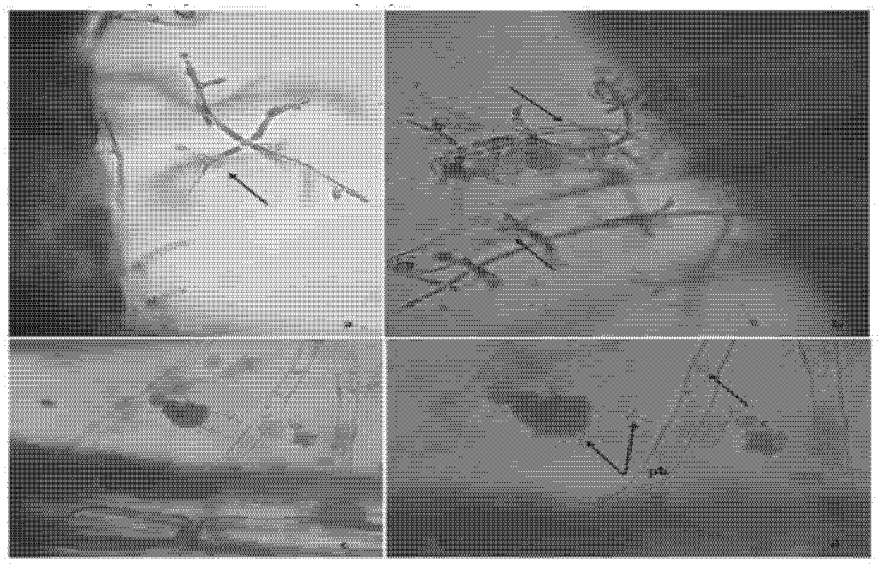


FIGURE 7



FIBURE 8

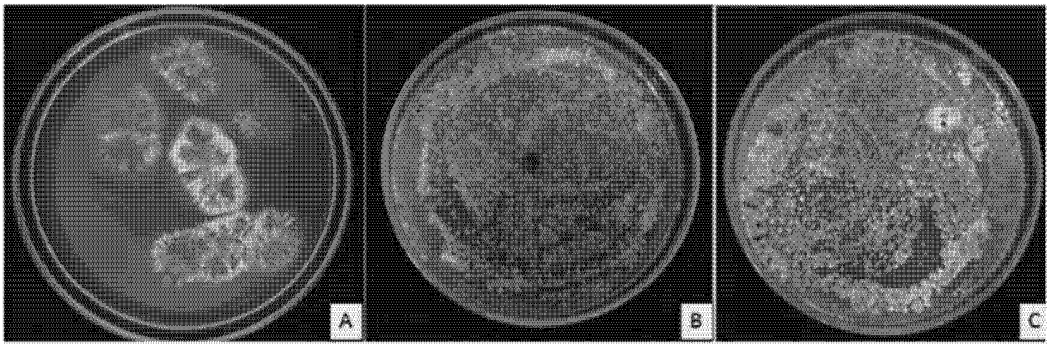


FIGURE 9



FIGURE 10

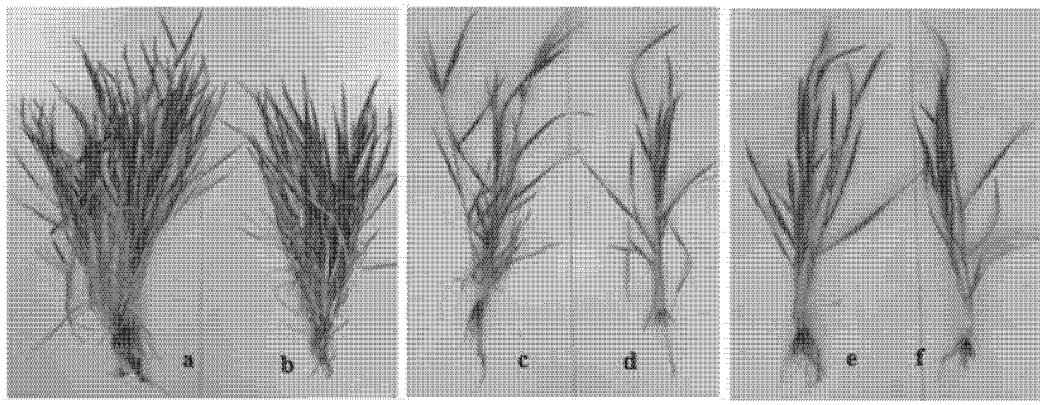


FIGURE 11

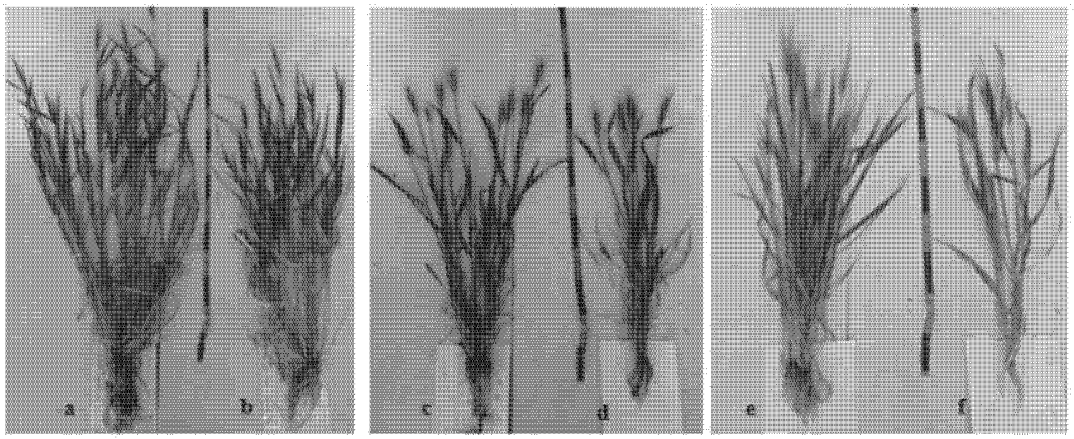


FIGURE 12

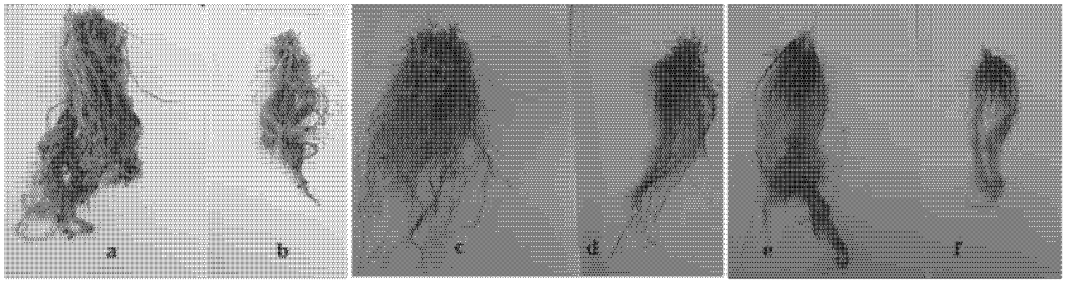


FIGURE 13

MA 57931A1

ROYAUME DU MAROC
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE

OMPIC

المملكة المغربية
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية

RAPPORT DE RECHERCHE AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 57931	Date de dépôt : 19/09/2022
Déposant : OCP SA	
Intitulé de l'invention : Bioproduit enrobant des semences à base de Trichoderma asperellum, bioprotecteur, biostimulant et biofertilisant & kit d'enrobage avant semis.	

Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com, et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.

Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :

Partie 1 : Considérations générales
- ☒ Cadre 1 : Base du présent rapport
- ☐ Cadre 2 : Priorité
- ☐ Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés

Partie 2 : Rapport de recherche

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité
- ☒ Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté
- ☒ Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention
- ☐ Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité
- ☒ Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Examinateur: BRINI Abdelaziz	**Date d'établissement du rapport** : 11/11/2022
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

Partie 1 : Considérations générales

Cadre 1 : base du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
  30 Pages
- Revendications
  10
- Planches de dessin
  5 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A01C1/06, A01N63/38 ; C05F11/08, A01P3/00 ; C12N1/14
CPC : A01C1/06, A01N63/38 ; C05F11/08, C12N1/14; C12R1/885

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	MA41534B2 ; AGRICULTURAL AND TRADING COMPANY [MA] ; 29-11-2019 Document en entier	1-6 ,9-10
A	EP1400586B1; UNIVERSIDAD DE BARCELONA [ES]; 04-11-2009; Document en entier	1-6 ,9-10
A	CN107058126A ; UNIV NORTHEAST FORESTRY [CN] ; 18-08-2017 Document en entier	1-6 ,9-10
A	EP3194564A1 ; US AGRICULTURE [US] ; 26-07-2017 Document en entier	1-6 ,9-10
A	WAFA KHIRALLAH et al "Variability and Genetic Structure of a Natural Population of Trichoderma spp. Isolated from Different Substrates in Morocco", ANNUAL RESEARCH & REVIEW IN BIOLOGY,vol 17, no. 1, 10-01-2017, page 1-11.	1-6 ,9-10

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« **X** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
-« **Y** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
-« **A** » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« **P** » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
-« **E** » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté

- Remarques de forme

1. Les revendications 1, 5 et 6 doivent être rédigées comme suit « ***produit bio-fongicide et bio-stimulant destiné à l'enrobage des semences avant semis caractérisé en ce qu'il comprend***… ». Egalement, les revendications 5 et 6 doivent être replacées sous la revendication 1 et renumérotées en conséquence respectivement en revendication 2 et 3, tout en supprimant l'ancienne revendication 2.

2. La revendication 7 doit être rédigée comme suit « ***Enrobage des grains de blé et d'orge caractérisé en ce qu'il comprend le produit bio-fongicide et bio-stimulant selon les revendications 1-3 mélangé aux ingrédients suivants : une bouillie de graines de lin…*** », tout en supprimant l'ancienne revendication 8.

3. Les revendications 9 et 10 peuvent être rédigées de la façon suivante « ***Utilisation du produit….pour la lutte contre les pathogènes…*** ».

Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention

La présente demande ne remplit pas les conditions d'unité d'invention (article 38) et concerne plusieurs inventions ou groupes d'inventions qui ne sont pas liées par un concept inventif général, nommément :

- Invention 1 : Concerne les revendications 1-6, 9-10 (complètement)
- Invention 2 : Concerne les revendications 7-8 (complètement) ;

Le concept inventif général est considéré comme étant le produit bio-fongicide et bio-stimulant à base de Trichoderma Asperellum. Ce concept est évident (non inventif), sur la base du document D1 (MA41534B2) constituant l'art antérieur le plus proche (voir le détail dans le cadre 7 ci-dessous), d'où la présente invention n'est pas unitaire.

La présente recherche concerne les revendications 1-6, 9-10 relatives à l'invention 1.

Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 1-6, 9-10 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications aucune Revendications 1-6, 9-10	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-6, 9-10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : MA41534B2
D2 : EP1400586
D3 : CN107058126A
D4 : EP3194564A1
D5 : WAFA KHIRALLAH et al "Variability and Genetic Structure of a Natural Population of Trichoderma spp. Isolated from Different Substrates in Morocco", ANNUAL RESEARCH & REVIEW IN BIOLOGY,vol 17, no. 1, 10-01-2017, page 1-11.

1. Nouveauté

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1-6 et 9-10, d'où l'objet de celles-ci est nouveau conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue un produit bio-fongicide et bio-stimulant comprend une souche de trichoderma asperellum codée RAB98369 et des additifs comprenant saccharose (1-12%), CaCl2(1-15%), Tween20 (0.1-1.8%), gélatine (0.1-2.2%), glycérine (1-18%), paraffine (1-18%), talc (1-16%). Egalement, ce document décrit un procédé de production en masse de ladite souche T. asperellum sur un substrat de betterave sucrière et son utilisation pour la lutte contre les pathogènes verticillium dahliae et botrytis cinerea et la stimulation du développement de la tomate et du fraisier.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que le produit bio-fongicide et bio-stimulant destiné à enrober les semences avant le semis comprend une souche de Trichoderma Asperellum présentant des séquences différentes.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre est la fourniture d'un produit bio-fongicide et bio-stimulant alternatif à base de la souche de Trichoderma Asperellum.

La solution proposée est évidente pour la raison suivante :

En absence d'effet inattendu ou surprenant, la sélection de ladite souche de Trichoderma Asperellum ayant des séquences différentes est considéré comme arbitraire et ne repose sur aucun esprit inventif, sachant que ce champignon (Trichoderma Asperellum) est connu par ces propriétés phytosanitaires action sur la croissance de même que sur les pathogènes (voir les documents D1 à D5).

A titre d'exemple, le document D2 divulgue une culture biologique pour la lutte contre les maladies de plantes causées par la Rizhoctonia solani et/ou le Fausarium oxysporum dans un milieu de culture comprenant un isolat de trichoderma asperellum, ainsi que le procédé de préparation de ladite culture biologique. Ledit milieu de culture est choisi parmi la tourbe, compost d'écorce de bois, compost de déchets des jardins…etc.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 n'implique pas d'activité inventive conformément à

l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, au vu de D1.

En ce qui concerne les revendications 2, 3 et 4, la manière dont une souche donnée de champignons est cultivé n'a a priori et en l'absence de preuve du contraire, pas d'impact sur l'organisme lui-même. Ainsi, l'homme du métier est en mesure d'optimiser les conditions de culture qui sont aisément à sa portée. Spécifiquement, la prise en considération d'un substrat connu pour la croissance de champignons du même genre est évidente. Les résultats présentés dans la présente demande ne démontrent d'ailleurs pas que ces substrats sont étonnamment sensiblement supérieurs aux autres.

Par suite, les revendications 2-6 et 9-10 ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications à laquelle elles se réfèrent, définissent un objet satisfaisant aux exigences concernant l'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13 au vu du document D1.

3. Application industrielle

L'objet des revendications 1-6, 9-10 est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.