

## Induction, par *Trichoderma harzianum*, de la résistance des plantes de lentille contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*

Haiat ESSALMANI<sup>1°</sup> & Houria LAHLOU<sup>2</sup>

(Reçu le 20/05/2003; Révisé le 19/09/2003; Accepté le 06/12/2003)

تنشيط مقاومة العدس ضد فطر الذبول *Fusarium oxysporum* بواسطة *Trichoderma harzianum*

يبين هذا البحث أن الفطر المضاد *Trichoderma harzianum* يحمي كلياً العدس ضد فطر الذبول *Fusarium oxysporum*. إفرازات الفطر المضاد احمي أيضاً العدس بفعالية عالية بالرغم من فصل فطر الذبول عن الفطر المضاد وإعطاء كل واحد منهما في مكان مختلف لجذور النباتات، لم يفقد الفطر المضاد حمايته للعدس في حين فقدت إفرازات الفطر المضاد حمايتها للعدس بعد فصلها عن الفطر المضاد، هذه النتائج تشير إلى أن الفطر المضاد يمكنه حماية العدس دون تأثيره المباشر على فطر الذبول وذلك بتنشيط المقاومة لدى العدس. إفرازات الفطر المضاد لا تساهم في هذا التنشيط لأنها لا تحمي العدس إلا بتأثيرها المباشر على فطر الذبول نفسه.

**الكلمات المفتاحية:** *Trichoderma harzianum* - الذبول - تنشيط - المقاومة - العدس

### Induction, par *Trichoderma harzianum*, de la résistance des plantes de lentille contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*

La souche antagoniste *Trichoderma harzianum* T-ADS protège totalement les plantes de lentille contre l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* MR84. Le filtrat de culture de *Trichoderma harzianum* T-ADS est également capable de protéger les plantes à un niveau élevé. Malgré son inoculation séparée de l'agent pathogène, *Trichoderma harzianum* protège encore les plantes tandis que son filtrat de culture ne les protège plus. Ces résultats suggèrent que l'antagoniste T-ADS protège les plantes même en absence de son interaction directe avec le pathogène, sans doute par induction de la résistance des plantes. Les métabolites sécrétés dans le filtrat de culture de cet antagoniste ne sont pas responsables de cette induction mais agissent directement sur le pathogène.

**Mots clés:** *Trichoderma harzianum* - Fusariose - Induction - Résistance - Lentille (*Lens culinaris*)

### Induction, by *Trichoderma harzianum*, of resistance in lentil to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*

The antagonistic strain *Trichoderma harzianum* T-ADS protected totally lentil plants against infection by the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* MR84. Culture filtrate of this antagonistic fungus was able to protect the plants at a high level. Even if it was inoculated separately of the pathogen, *Trichoderma harzianum* protected the plants while culture filtrate did not protect them. These results suggest that the strain T-ADS protect the plants without its interaction with pathogen, due probably to the induction of plant resistance. Metabolites excreted in culture filtrate were not responsible of this induction but acted directly on the pathogen.

**Key words:** *Trichoderma harzianum* - Fusarium wilt - Induction - Resistance - Lentil (*Lens culinaris*)

<sup>1</sup> Département des Sciences de la vie. Faculté des Sciences et Techniques. Laboratoire de Biotechnologie et Pathologie. B.P. 416 Tanger, Maroc; Tel: (212) 039393954 / 55. Fax: (212) 039393953.

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Rue Ibn Batouta. B.P. 1014, Rabat, Maroc

<sup>°</sup> Auteure correspondante; Email: hessalmani@hotmail.com

## INTRODUCTION

Les espèces de *Trichoderma* ont reçu une attention considérable en tant qu'agents de lutte biologique contre un certain nombre de pathogènes telluriques (Chet & Baker, 1981; Harman *et al.*, 1996). Les recherches effectuées sur les mécanismes de la lutte contre les populations pathogènes existant dans la rhizosphère conduisent à proposer que l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. réside dans la production d'enzymes extracellulaires (Elad & Kapat, 1999; Haran *et al.*, 1996; Stefanova *et al.*, 1999) et/ou de substances antibiotiques (Ghizalberti & Rowland, 1993). Cette production est associée à une possible compétition pour les nutriments de la rhizosphère (Sivan & Chet, 1993). La plupart des recherches sont focalisées sur les interactions microbiennes. Néanmoins, certaines études portant sur des modèles d'études différents ont mis en évidence une induction de la résistance chez les plantes inoculées par *Trichoderma harzianum* (De Meyer & Höfte, 1998; Howell *et al.*, 2000, Zimand & Elad, 1996).

Chez les micro-organismes, les déterminants induisant la résistance des plantes peuvent être des métabolites secrétés comme l'acide salicylique (De Meyer *et al.*, 1998). Ils peuvent également provenir de la paroi du micro-organisme. C'est le cas des lipopolysaccharides (Reitz *et al.*, 2000), des N-acétylchitooligosaccharides (Yamagushi *et al.*, 2000) ou des glycoprotéines (Lepoivre & Semal, 1989). Cependant, des oligosaccharides inducteurs peuvent également provenir de la paroi des cellules végétales elles-mêmes: des actions enzymatiques bactériennes ou fongiques sont capables de libérer des oligogalacturonides endogènes des parois de l'hôte, lesquels induisent des réactions de défense des plantes (Lepoivre & Semal, 1989).

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'antagoniste *Trichoderma harzianum* T-ADS ou ses métabolites, secrétés dans le filtrat de culture, sont capables d'induire la résistance des plantes de lentille contre le pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* MR 84. À cet égard, on comparera les effets de *Trichoderma harzianum* et du filtrat de culture de cet antagoniste dans la protection des plantes dans deux situations différentes: co-inoculation de la racine, à un même endroit, avec le pathogène et inoculation séparément à un endroit différent de la racine.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

### 1. Isolement et identification de l'antagoniste

La souche *Trichoderma harzianum* T-ADS est isolée, *in vitro*, après avoir montré un antagonisme élevé vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. L'isolement est effectué à partir d'un sol provenant de la région Ain Dalia Sghira, située au Nord du Maroc. L'identification de cette souche est réalisée après analyse des caractères morphologiques et moléculaires selon Samuels *et al.* (2002).

### 2. Préparation des inoculums et du filtrat de culture

#### 2.1. Inoculum de l'antagoniste T-ADS

Des explants de T-ADS sont déposés en boîtes de Pétri contenant le milieu PGA (200 g. l<sup>-1</sup> de pomme de terre + 20 g. l<sup>-1</sup> du glucose + 20 g. l<sup>-1</sup> d'agar). Au bout de 15 jours, le mycélium est gratté et mélangé avec de l'eau stérile. La suspension conidienne est recueillie après élimination du mycélium par filtration à travers le papier Watman n°1. La densité de la suspension est ajustée à 2. 10<sup>7</sup> conidies. ml<sup>-1</sup> après estimation de la densité initiale à l'aide de la cellule de Thoma puis dilution.

#### 2.2. Inoculum du pathogène MR 84

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* MR 84 est cultivée en étalant une suspension concentrée de conidies, provenant d'une culture mère, à la surface du milieu PGA. La suspension de conidies est recueillie quatre jours après par lavage de la culture avec de l'eau distillée stérile. Sa densité est ajustée à 2. 10<sup>6</sup> conidies. ml<sup>-1</sup> par estimation de la densité initiale à l'aide d'une cellule de Thoma puis dilution.

#### 2.3. Filtrat de culture de T-ADS

Un explant d'une préculture de T-ADS est inoculé à 250 ml d'un milieu liquide à base de pomme de terre (PG: 200 g. l<sup>-1</sup> de pomme de terre + 20 g. l<sup>-1</sup> du glucose). Au bout de 15 jours d'incubation à 25°C, le surnageant est recueilli après centrifugation à 8000 t. mn<sup>-1</sup> pendant 20 mn. On le passe à travers un filtre millipore (0,22 µm) pour éliminer toute trace de conidies. Ce surnageant représente le filtrat de culture de T-ADS.

### 3. Conditions de culture de la lentille

La variété de lentille L 24 a été fournie par l'INRA du Maroc. Elle est sensible à la souche MR 84 de l'agent pathogène. Après stérilisation, grâce à l'hypochlorite de calcium à 5 % pendant 20 minutes, les graines sont mises à germer pendant une semaine dans du papier filtre imbibé d'eau stérile. Les plantules ayant des tailles identiques sont choisies puis cultivées dans des pots contenant chacun 500 g de sable stérile où elles sont arrosées tous les deux jours à l'aide de la solution nutritive de Hoagland & Arnon (1950). Les conditions de culture sont 25°C le jour et 18°C la nuit avec une luminosité de 8000 lux et une photopériode de 16 h.

### 4. Co-inoculations à un même endroit de la racine

Quand les plantes atteignent le stade quatre feuilles (14 j), le pathogène et l'antagoniste sont inoculés dans le même pot. Les inoculations sont effectuées par arrosage du sable au niveau de la rhizosphère des plantes. Ainsi, le sable est infesté avec 10 ml du pathogène à  $2 \cdot 10^6$  conidies. ml<sup>-1</sup> et 10 ml de l'antagoniste T-ADS à  $2 \cdot 10^7$  conidies. ml<sup>-1</sup> ou 10 ml du filtrat de culture de T-ADS. Les plantes témoins n'ont reçu que de l'eau stérile. D'autres plantes témoins ne sont inoculées qu'avec l'antagoniste T-ADS, le filtrat de culture de T-ADS, l'agent pathogène MR 84 seul et/ou le milieu PG.

### 5. Inoculations à des endroits différents de la racine

La culture des plantes est effectuée dans un système formé de deux pots l'un sur l'autre. La plantule avec la moitié supérieure de la racine est mise dans le pot supérieur. La moitié inférieure de la racine, introduite à travers un petit trou, est cultivée dans le pot inférieur. Au stade quatre feuilles (14 j), 10 ml de l'agent pathogène à  $2 \cdot 10^6$  conidies. ml<sup>-1</sup> sont inoculés à la partie basale de la racine tandis que 10 ml de l'antagoniste T-ADS à  $2 \cdot 10^7$  conidies. ml<sup>-1</sup> ou 10 ml du filtrat de culture de T-ADS sont inoculés à la partie apicale de la racine.

Pour tous les traitements, l'incidence de la fusariose est estimée, tous les 15 jours, par le pourcentage des plantes mortes. Sa gravité est évaluée, au 60<sup>ème</sup> jour après inoculation, par le poids sec des plantes.

### 6. Recherche de la souche MR 84 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* et de l'antagoniste T-ADS, dans le sable

Pour vérifier l'absence d'une interaction entre l'antagoniste T-ADS et la souche MR 84 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* ou entre celui-ci et le filtrat de culture, le pathogène et l'antagoniste sont recherchés tous les 15 jours dans la rhizosphère des plantes qui se trouvent dans les pots où ils n'ont pas été inoculés comme les pots inférieurs dans le cas du pathogène et les pots supérieurs dans le cas de l'antagoniste.

Une série de dilution au 1/10<sup>ème</sup> est réalisée à partir d'une suspension de solution mère contenant 1 g de sable, prélevé à partir de la rhizosphère des plantes, dans 9 ml d'eau stérile. Un ml de la suspension diluée est étalé à la surface du milieu Komada (1975) pour rechercher *Fusarium* et à la surface du milieu PDA additionné de streptomycine (0,1 g. l<sup>-1</sup>) pour rechercher *Trichoderma*.

La lecture des résultats est effectuée après une semaine d'incubation à 25 °C, à l'obscurité.

### 7. Analyses statistiques

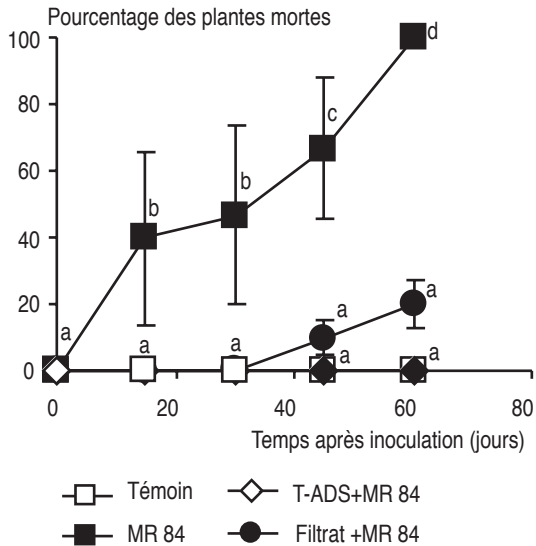
Les expériences utilisant les différents traitements sont répétées deux fois, avec 30 plantes pour chaque traitement. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide de statistica software (1997). Les résultats expérimentaux sont comparés par analyse de variance suivie du test de Newman-Keul.

## RÉSULTATS

### 1. Inoculations à un même endroit de la racine

L'inoculation des plantes de lentille avec l'agent pathogène MR 84 seul provoque un flétrissement des plantes puis leur mort. La mortalité des plantes augmente avec le temps de culture (Figure 1). Au 60<sup>ème</sup> jour après inoculation, la totalité des plantes sont mortes. La co-inoculation de *Trichoderma* T-ADS au niveau du même site d'infection que l'agent pathogène assure une protection totale des plantes durant les deux mois qui suivent l'inoculation, car toutes les plantes restent saines comme les plantes témoins. Le filtrat de culture de *Trichoderma* T-ADS est également capable de protéger les plantes de

lentille contre leur attaque par le pathogène MR 84. Malgré une augmentation de la mortalité des plantes à partir de 30 jours après inoculation, les pourcentages de mortalité restent similaires à celui des plantes témoins.



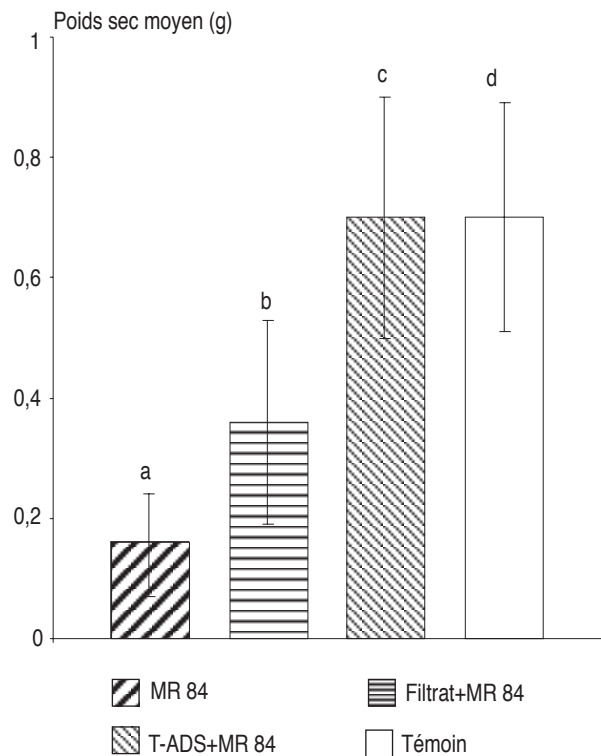
**Figure 1. Évolution du pourcentage de plantes mortes dans le cas des co-inoculations de l'agent pathogène MR 84 et de *Trichoderma harzianum* T-ADS ou de son filtrat de culture, à un même endroit du système racinaire**

\*Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman-Keul)

Ces résultats sont confirmés par les mesures des poids secs moyens des plantes (Figure 2). Ainsi, le poids des plantes inoculées avec le pathogène seul est faible. Ce poids est amélioré avec les autres traitements. Il est similaire aux poids des plantes témoins lorsque celles-ci sont traitées avec *Trichoderma* T-ADS. Le poids des plantes traitées avec le filtrat de culture est supérieur aux poids des plantes inoculées avec le pathogène seul, mais reste inférieur au poids des plantes témoins.

L'inoculation des plantes avec le pathogène et le milieu de culture PG (contrôle) ne les protège pas. En effet, toutes les plantes sont mortes au 60<sup>ème</sup> jour après inoculation et ont le même poids sec que les plantes inoculées avec le pathogène seul (résultats non présentés).

Toutefois, les inoculations de *Trichoderma* T-ADS ou du filtrat de culture ou du milieu PG, sans le pathogène (contrôles), n'ont aucun effet néfaste sur les plantes, car celles-ci restent toutes saines et présentent le même poids sec que les plantes témoins (résultats non présentés).



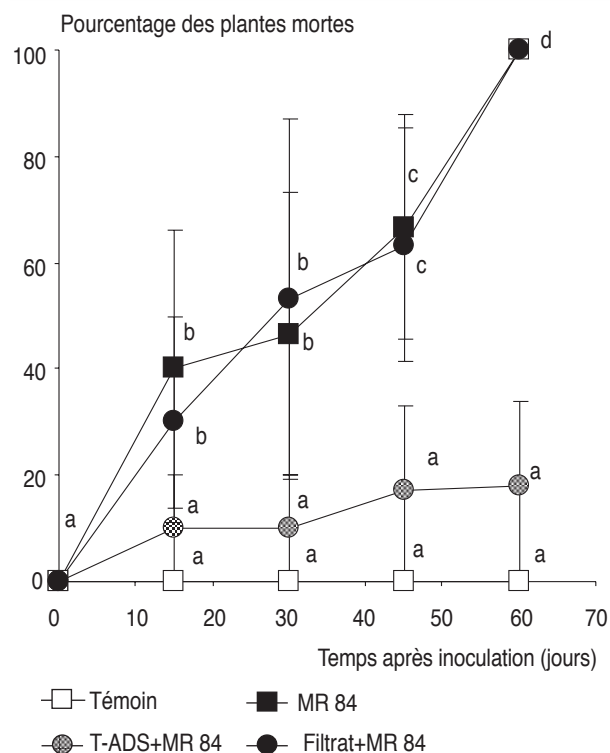
**Figure 2. Gravité de la fusariose estimée, au 60<sup>ème</sup> après inoculation, par le poids sec moyen des plantes. Co-inoculations de l'agent pathogène MR 84 et de *Trichoderma harzianum* T-ADS ou de son filtrat de culture, à un même endroit du système racinaire**

\*Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman-Keul)

## 2. Inoculations à des endroits différents de la racine

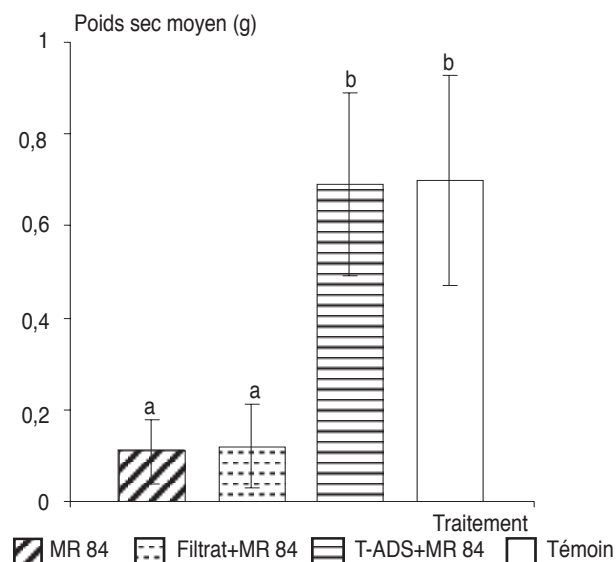
Malgré l'inoculation de *Trichoderma* T-ADS séparément de l'agent pathogène, il semble que cet antagoniste maintienne sa protection pour les plantes (Figure 3). Ainsi, le pourcentage des plantes mortes reste statistiquement comparable à celui des plantes témoins, durant les deux mois suivant les inoculations. Cependant, après inoculation du filtrat de culture de T-ADS séparément du pathogène, la protection des plantes est perdue. La mortalité des plantes évolue de la même manière que celle des plantes inoculées avec le pathogène seul.

La figure 4 montre que les plantes traitées avec le pathogène et le filtrat de culture ont le même poids que les plantes inoculées avec le pathogène seul. Les plantes traitées avec le pathogène et l'antagoniste T-ADS ont des poids similaires aux plantes témoins.



**Figure 3.Évolution du pourcentage de plantes mortes après inoculations séparées de l'agent pathogène et de *Trichoderma harzianum* T-ADS ou de son filtrat de culture**

\*Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman-Keul)



**Figure 4.Gravité de la fusariose estimée, au 60<sup>ème</sup> après inoculation, par le poids sec moyen des plantes. L'agent pathogène MR 84 est inoculé séparément de l'antagoniste T-ADS ou de son filtrat de culture**

\*Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Newman-Keul)

### 3. Recherche du pathogène MR 84 et de l'antagoniste T-ADS dans le sable

On a vérifié, tout le long de l'expérience, l'absence des interactions entre la souche pathogène et l'antagoniste T-ADS ou entre celle-ci et le filtrat de culture de T-ADS. Les résultats des recherches de la souche pathogène MR 84 et de l'antagoniste T-ADS montrent leur absence dans le sable prélevé du pot où chacune de ces souches n'a pas été inoculée.

### DISCUSSION & CONCLUSIONS

Récemment, le changement dans l'attitude du public envers l'utilisation des pesticides chimiques et des fumigants comme le bromide de méthyle (Programme de l'environnement, 1995) a poussé les chercheurs à trouver d'autres alternatives comme l'utilisation des biopesticides non polluants de l'environnement. Un intérêt particulier a été accordé à la capacité des micro-organismes bénéfiques à induire la résistance des plantes (Yedida *et al.*, 1999). Au sein de ces micro-organismes, les champignons saprophytes comme *Trichoderma harzianum* n'ont reçu qu'une faible attention (Ghizalberti & Rowland, 1993).

Dans la présente étude, la capacité de la souche *Trichoderma harzianum* T-ADS à induire la résistance des plantes est évaluée par un système formé de deux pots l'un sur l'autre. Dans un pot, il y a inoculation du pathogène MR 84. Dans l'autre pot, est inoculé l'antagoniste ou son filtrat de culture. Cette approche nous a permis de visualiser les effets de l'antagoniste en absence de son interaction avec le pathogène. La méthode de "split root", telle qu'elle a été conçue dans d'autres travaux (trois pots), nécessite un système racinaire bien développé comme chez les plantes de pomme de terre et de tomate (Hasky-Gunther *et al.*, 1998, Olivan *et al.*, 1995). Cette méthode est difficile à réaliser chez la lentille vu son système racinaire réduit.

Néanmoins, le système adopté est adéquat. D'une part, on a vérifié au cours de la culture des plantes que l'agent pathogène et l'antagoniste sont restés dans les compartiments où ils ont été inoculés. D'autre part, les résultats de l'inoculation du pathogène MR 84 et du filtrat de culture, à un même endroit de la racine, diffèrent des résultats obtenus après leur inoculation à des endroits séparés de la racine. Ceci est en faveur de la fiabilité du système.

La protection conférée aux plantes par *Trichoderma* T-ADS, en présence et en absence de son interaction avec l'agent pathogène, est similaire. En effet, l'incidence et la gravité de la fusariose n'ont pas changé dans les deux cas. Il apparaît vraisemblable que la souche T-ADS protège les plantes même en n'agissant pas directement sur le pathogène. Cette protection ne peut être due qu'à une induction de la résistance des plantes.

Une bonne protection des plantes contre le pathogène est également observée après leur traitement avec le filtrat de culture de l'antagoniste T-ADS. Cette protection n'est pas due aux substances se trouvant dans le milieu PG puisque celui-ci ne confère aucune protection aux plantes. L'effet protecteur du filtrat est bien dû aux substances secrétées par l'antagoniste lui-même. Mais, cet effet n'est possible que si le filtrat se trouve en interaction directe avec le pathogène, car en absence de cette interaction l'effet protecteur du filtrat disparaît. En effet, l'incidence et la gravité de la maladie sont similaires à celles qui sont obtenues après inoculation du pathogène seul. Il semble que les métabolites secrétés dans le filtrat n'induisent pas de réactions de défense des plantes, mais agissent directement sur le pathogène.

Dans des expériences réalisées *in vitro*, le filtrat de culture de T-ADS inhibe la croissance mycélienne avec un pourcentage de 70% (Essalmani & Lahlou, 2002). Les métabolites secrétés par cette souche peuvent être des substances volatiles et/ou des antibiotiques. En effet, la souche T-ADS secrète des gaz ayant une activité antagoniste et des pigments jaunes qui sont soupçonnés être des antibiotiques. Parmi les substances secrétées par *T. harzianum* et qui ont une activité inhibitrice il y a des substances volatiles de types alkyles pyrones (Claydon *et al.*, 1987), acétaldehyde (Dennis & Webster, 1971) et des antibiotiques comme la trichodermine (Khasanov, 1962), la suzukaciline, l'alaméthicine, la dermadine, la pénicilline, la trichotocine et la trichorzianine (Vial, 1989).

L'induction de la résistance des plantes par *Trichoderma* T-ADS ne se fait pas par des métabolites secrétés *in vitro*, mais peut-être que l'induction est réalisée par d'autres substances qui ne sont secrétées qu'en présence de la plante (*in vivo*) ou par des structures localisées au niveau de la paroi des cellules. En effet, Il est possible qu'il y

ait sécrétion de substances extracellulaires probablement des enzymes qui peuvent dégrader la paroi des plantes et seraient à l'origine de la libération des oligosaccharides pouvant être des éliciteurs endogènes de la résistance des plantes. Cette hypothèse pourrait être plausible car dans d'autres travaux, l'observation en microscopie électronique de coupes très fines de racines traitées avec *Trichoderma harzianum* a mis en évidence la pénétration de cet antagoniste à l'intérieur des racines tout en restant confiné dans l'épiderme et le cortex externe (Yedida *et al.*, 1999).

Ces résultats suggèrent qu'au moins de faibles quantités d'enzymes hydrolytiques comme la cellulase sont produites par le champignon. La dégradation de la paroi de la plante par ces enzymes peut donner des fragments éliciteurs de la résistance des plantes.

Si la paroi de l'antagoniste T-ADS possède des éliciteurs responsables de l'induction de la résistance des plantes, cela suggère l'établissement d'une certaine interaction entre le champignon et la plante, impliquant une reconnaissance moléculaire entre les deux partenaires. Ainsi, Il a été mis en évidence que des lectines des plantes du blé s'attachent spécifiquement au sommet et au septum de *Trichoderma viride* (Mirelman *et al.*, 1975).

Dans la présente étude il semble que *Trichoderma harzianum* T-ADS protège les plantes de lentille contre le pathogène *Fusarium oxysporum* MR 84 en agissant par antibiose et par induction de la résistance des plantes. En absence de l'antibiose, ce dernier mécanisme est capable d'assurer une bonne protection des plantes. Pour confirmer la présence d'un ou de plusieurs éliciteurs chez la souche antagoniste T-ADS, il convient de poursuivre cette étude par la purification des molécules inductrices de la résistance des plantes et l'évaluation de leur capacité élicitrice.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Chet I & Baker R (1981) Isolation and biological potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290
- Claydon N M, Allan M, Hanson J R & Avent A G (1987) Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the british mycological society* 88: 505-513

- De Meyer G & Höfte M (1998) Induction of systemic resistance by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 is a salicylic acid dependent phenomenon in tobacco. *IOBC Bull* 33: 173-195
- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y & Hoffe M (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 104: 279-286
- Dennis C & Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the british mycological society* 57:41-48
- Elad Y & Kapat A (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 105: 177-189
- Essalmani H & Lahlou H (2002) Étude *in vitro* de l'activité antagoniste de quelques micro-organismes à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Cryptogamie, Mycologie* 23: 221-234
- Ghizalberti E L & Rowland G Y (1993) Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* 56: 1799-1804
- Haran S, Schikler H & Chet I (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2321-2331
- Harman G E, Latore B, Agosin E, San-Martin R, Riegel DG, Nielson P A, Tronsmo A & Pearson R C (1996) Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biol Control* 7 (3): 259-266
- Hasky-Gunther K, Hoffmann-Hergarten S & Sikora R A (1998) Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systemically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G 12) and *Bacillus sphaericus* (B 43). *Fundam appl Nematol* 21: 511-517
- Hoagland DR & Arnon D I (1950) The water-culture method for growing plant without soil. Circ. 347, Berkeley Calif. Agric. Exp. Station. Univ. Calif
- Howell C R, Hanson L E, Stipanovic R D & Puckhaber L S (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252
- Khasanov O K, (1962) The antibiotic properties of fungi of the genus *Trichoderma* Pers, found in the swamp soil of Uzbekistan. *Usbekshell Biologicheskll Zhurnal, Tashkend* 6: 62-67
- Komada H, (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res* 8: 114-125
- Lepoivre P & Semal J (1989) Les relations hôtes-parasites In: Traité de pathologie végétale, J. Semal (Ed), 248-302
- Mirelman D, Galun E, Sharon N & Lotan M (1975) Inhibition of fungal growth by wheat-germ agglutinin. *Nature* 256: 414-416
- Olivan C, Steinberg C & Alabouvette C (1995) Evidence of induced resistance in tomato inoculated by non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *The polish phytopathological society* 427-430.
- Programme de l'environnement des Nations Unis (1995) Report of Methyl Bromide Technical Options Committee, Montreal protocol on substances that deplete ozone layer, United Nations Ozone secretariat, Nairobi, Kenya
- Reitz M, Rudolph K, Schroder I, Hoffmann-Hergarten S, Hallmann J & Sikora RA (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3515-3518
- Samuels GJ, Dodd S L, Gams W, Castlebury LA & Petrini O (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170
- Sivan A & Chet I (1993) Integrated control of *Fusarium crown* and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *Crop Prot* 12: 380-386
- Statistica Statsoft Inc. (1997) Statistica release 5.1. Tulsa, OK, USA
- Stefanova M, Leiva A, Larrinaga L & Coronado M F (1999) Actividad metabolica de cepas de *Trichoderma* spp. Para el control de hongos fitopatogenos del suelo. *Rev Fac Agron* 16: 509-516
- Vial L (1989) Critères de qualité de la production d'un biopesticide à base de *Trichoderma harzianum* RIFAI. Mémoire, École Nationale d'Ingénieurs des travaux agricoles, Bordeaux, France
- Yamaguchi T, Ito Y & Shibouya N (2000) Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends Glycosci Glycotechnol* 12: 113-120

Yedida I, Benhamou N & Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65 (3): 1061-1070

Zimand GY & Elad Y (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 86: 1225-1260