

Etude *in vitro* de l'activité antagoniste de quelques microorganismes à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*.

Haiat Essalmani^{a*}, Houria Lahlou^b

^a Département des Sciences de la vie. Faculté des Sciences et Techniques

B.P. 416, Tanger, Maroc

Tél: (212) 039393954/55 – Fax: (212) 039393953

E-mail: hessalmani@hotmail.com

^b Faculté des Sciences de Rabat

Résumé – Cette étude *in vitro* montre une activité antagoniste de *Rhizobium leguminosarum*, *Trichoderma harzianum* ADS, *Trichoderma harzianum* Bg et *Rhizopus stolonifer* à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. Ces antagonistes manifestent des actions inhibitrices et des modes d'actions différents vis à vis de ce pathogène. Ainsi, si les propriétés inhibitrices de *R. leguminosarum* et des *T. harzianum* sont liées à la sécrétion de substances antibiotiques ce n'est pas le cas pour *R. stolonifer* qui semble agir par compétition nutritive liée à une occupation rapide du milieu. Les substances inhibitrices de *R. leguminosarum* sont de nature protéique et ont une action létale sur les conidies de *Fusarium oxysporum*. Cependant, celles de *T. harzianum* ne sont pas de nature protéique et comprennent des gaz à action fongistatique et probablement d'autres substances qui seraient à l'origine de la faible action fongicide sur les conidies. L'action inhibitrice des quatre antagonistes est non spécifique car elle peut être exercée sur d'autres champignons tels que *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Verticillium albo-atrum* et *Absidia glauca*. D'ores et déjà l'utilisation de ces antagonistes peut être entrevue dans le cadre d'une lutte biologique préventive contre plusieurs maladies dans la mesure ou leur innocuité à l'égard de l'hôte aura été prouvée.

Antagonisme / *in vitro* / *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* / filtrat s / gaz / *Rhizobium leguminosarum* / *Trichoderma harzianum* / *Rhizopus stolonifer*

Summary – This investigation shows the *in vitro* antagonist action of *Rhizobium leguminosarum*, *Trichoderma harzianum* ADS, *Trichoderma harzianum* Bg and *Rhizopus stolonifer* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. The antagonists inhibition on mycelial growth and the mode of action are different. The antagonistic properties of *R. leguminosarum* and the *T. harzianum* strains against *F. oxysporum* are related to the excretion of antibiotic substances. The antimicrobial activity of *R. leguminosarum* is of protein nature and has fungicidal action on conidia of *F. oxysporum*. However, the active products of the *T. harzianum* strains are not of protein nature and have a lower fungicidal action. A fungistatic action that is considered to be by volatile metabolites is also observed. Our study show that the mechanism by which *R. stolonifer* inhibits the mycelial growth of *F. oxysporum* is not antibiosis but probably is competition for nutrients that is related to the rapid spread in culture medium. The four antagonists have not a specific action because they can inhibit

* Correspondence and reprints.

mycelial growth of other fungi such as *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Verticillium albo-atrum* and *Absidia glauca*. These results suggest that these antagonists may be efficient for controlling different diseases caused by soil borne plant pathogens.

Antagonism / in vitro / *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* / filtrate / gas / *Rhizobium leguminosarum* / *Trichoderma harzianum* / *Rhizopus stolonifer*

INTRODUCTION

Les fusarioses vasculaires causées par des formes spéciales de *Fusarium oxysporum* affectent des espèces de plantes appartenant à toutes les familles botaniques à l'exception des graminées (Alabouvette *et al*, 1998). La lentille est l'une des espèces pour laquelle *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* constitue une menace dans plusieurs parties du monde (Kamboj *et al*, 1990). Quelques microorganismes antagonistes sont proposés pour lutter contre ce pathogène tels que *Trichoderma viride* Pers, *Streptomyces* sp (Mehrotra & Claudius, 1972), *Trichoderma harzianum* et *Arachniotus* sp (Aslam, 1989), *Pseudomonas* sp (Erskine *et al*, 1990) et *Bacillus* sp, *Trichoderma* sp, *Penicillium oxalicum* (Alhassan, 1998).

Ce travail constitue une première étape dans la mise au point d'une méthode de lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la lentille au Maroc. Il consiste à isoler *in vitro* après un criblage des microorganismes qui montrent une activité antagoniste à l'encontre de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* puis d'explorer leur mode d'action, de caractériser les substances inhibitrices lorsque celles-ci sont secrétées dans le milieu de culture, et enfin de tester la spécificité de l'activité inhibitrice en confrontant les antagonistes à un ensemble de champignons saprophytiques et/ou pathogènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

- Le pathogène : L'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* est isolé de l'épicotyle d'une plante flétrie de lentille, dans la région de Marchouche connue pour la culture de cette plante. Il est cloné et le clone le plus pathogène sur une variété locale, sensible de lentille (L 24 de *Lens culinaris*) est retenu pour l'expérimentation.

- Les antagonistes : A l'issue d'un criblage préliminaire trois antagonistes fongiques et un antagoniste bactérien ont retenu notre attention en raison de leur activité antagoniste élevée : *Trichoderma harzianum* ADS, *Trichoderma harzianum* Bg, *Rhizopus stolonifer* et *Rhizobium leguminosarum*, isolés de sols résistants à la fusariose vasculaire de la lentille.

Les antagonistes fongiques sont cultivés sur milieu potato dextrose agar (PDA, Difco) à 25 °C et l'antagoniste bactérien sur milieu YEM (K₂HPO₄, 0,5g ; Mg SO₄ 7 H₂O, 0,2g ; NaCl, 0,1g ; Mannitol, 10g ; Extrait de levure, 1g ; Agar, 20g pour un litre d'eau distillée) à 30 °C.

– Les champignons retenus pour l'étude de l'effet antagoniste : *Absidia glauca* a été fourni par un laboratoire d'orsay ; *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea* sont des pathogènes du raisin (Benkhemmar et al, 1992) et *Verticillium albo-atrum* est un pathogène de la tomate variété Marmande (Lahlou, 1983).

Mise en évidence de l'antagonisme

– Confrontation directe : L'activité antagoniste est évaluée par l'inhibition de la croissance radiale selon la méthode décrite par Omoifo & Ikotun (1987) pour les champignons et Michael & Nelson (1972) pour les bactéries. Quatre boîtes de Pétri, contenant chacune 25 ml de milieu de culture, sont ensemencées avec quatre explants de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* déposés à quatre points équidistants. Ensuite, soit un explant de l'antagoniste fongique est déposé au centre de la boîte, soit 100 µl d'une préculture de l'antagoniste bactérien est ensemencé en deux stries perpendiculaires. Après sept jour de culture, l'inhibition de la croissance radiale du thalle de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* est évaluée par la formule suivante :

$$\frac{r_2 - r_1}{r_2} \times 100$$

r_1 et r_2 représentent le rayon du thalle le plus proche et le plus du loin du centre de la boîte de Pétri, respectivement.

Antibiose

Filtrat de culture

– Préparation : Après culture de l'antagoniste fongique pendant une semaine sur milieu PG (pomme de terre 200 g/l et glucose 20 g/l) et du *Rhizobium* sur milieu YEM (trois jours), deux centrifugations de 30 mn chacune à 8 000 tours/mn sont effectuées, le pH du surnageant recueilli est ajusté à 7,9. Le filtrat ainsi obtenu est stérilisé à travers le filtre millipore 0,22 µm.

– Effet inhibiteur, traitement thermique et enzymatique : Le filtrat de culture est introduit dans un erlen en mélange avec du milieu Czapeck (Na NO₃, 2 g ; K₂ HPO₄, 1 g ; K cl, 0,5 g ; Mg SO₄ 7 H₂O, 0,5 g ; Fe SO₄ 7 H₂O, 0,01 g ; Saccharose 20 g pour un litre d'eau distillée, pH7,9) en quantité suffisante pour atteindre 100 ml et obtenir les concentrations suivantes (V / V) : 0, 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 5, 8 et 20 %.

Le traitement thermique consiste à autoclaver le filtrat à 120 °C pendant 20 mn. Le traitement enzymatique est effectué en ajoutant la trypsine ou la pepsine au filtrat à une concentration de 2 mg / ml et en laissant agir pendant deux heures à 37 °C. Le pH du filtrat est ajusté à 8 pour la trypsine et à 3 pour la pepsine.

Le filtrat traité ou non est incorporé au milieu Czapeck à 0,5 %. Le témoin est constitué par le milieu Czapeck sans filtrat. Dans chaque cas quatre erlens sont utilisés et chacun est inoculé par un explant de *F. oxysporum* f. sp. *lentis*. Après sept jour d'incubation à l'obscurité à 25 °C le mycélium est recueilli après filtration sur papier Wattman n° 1 et séché à l'étuve à 80 °C pendant trois à quatre heures. L'inhibition de la croissance pondérale estimée représente la quantité du mycélium inhibée en présence du filtrat traité ou non par rapport à celle recueillie en absence du filtrat.

Le dosage des protéines synthétisées et diffusées dans le milieu de culture est réalisée en utilisant la méthode de Bradford (1976).

Substances volatiles

Le système en boîte de Pétri permet d'exposer *F. oxysporum* f. sp. *lentis* aux substances volatiles produites par *T. harzianum*. Un explant de quatre mm de diamètre d'une préculture de *Trichoderma* (sept jours) est placé dans une boîte de Pétri contenant le PDA. Après quatre jours de croissance, le couvercle est remplacé par le fond d'une boîte de Pétri dans laquelle a été placée un implant d'une préculture du champignon testé. Les deux parties ainsi réunies sont entourées par du parafilm de façon à former une enceinte étanche. Les boîtes témoins ne sont pas confrontées au *Trichoderma*. Les effets des substances volatiles sont évalués après estimation de la croissance mycélienne en présence et en absence de *Trichoderma*. Dix confrontations pour chaque cas sont effectuées.

Mise en évidence des propriétés fongicides ou fongistatiques

La méthode suivie est inspirée de Henni (1987). Elle consiste à tuer la culture de l'antagoniste par 0,5 ml de chloroforme pur, de placer une feuille de cellophane sur cette culture après évaporation complète du chloroforme et d'y étaler 100 conidies de *F. oxysporum*. Dans les boîtes témoins le même nombre de conidies est étalé sur milieu gélosé mais sans l'antagoniste. La cellophane est ensuite transférée sur un nouveau milieu après 48 h d'incubation à 25 °C. En cas de germination l'action des substances inhibitrices est supposée fongistatique dans le cas contraire elle est fongicide.

Chacune des expériences précitées est répétée au moins trois fois. Tous les résultats expérimentaux sont comparés par l'analyse des variances au seuil de probabilité 5 %, en utilisant le test de student.

RÉSULTATS

Confrontation directe

Antagonistes-Fusarium

Les quatre antagonistes ont un effet inhibiteur élevé sur la croissance mycélienne de *F. oxysporum* (Fig. 1) mais l'activité inhibitrice la plus forte qui est de l'ordre de 65 % et 73 % est observée pour *T. Harzianum* ADS et *R. leguminosarum* respectivement.

Antagonistes-Champignons

La figure 2 montre la présence d'un antagonisme à l'encontre d'autres champignons que *F. oxysporum* mais dont l'intensité est plus ou moins élevée. A l'exception de la confrontation réalisée entre *Rhizopus* et *Alternaria*, toutes les autres confrontations effectuées entre les antagonistes et *Absidia* ou *Alternaria* manifestent des actions inhibitrices inférieures à celles exercées sur *Fusarium*. Les confrontations réalisées entre les antagonistes et *Verticillium* ou *Botrytis* révèlent des actions inhibitrices supérieures à celles exercées sur *Fusarium* sauf pour *R. leguminosarum*.

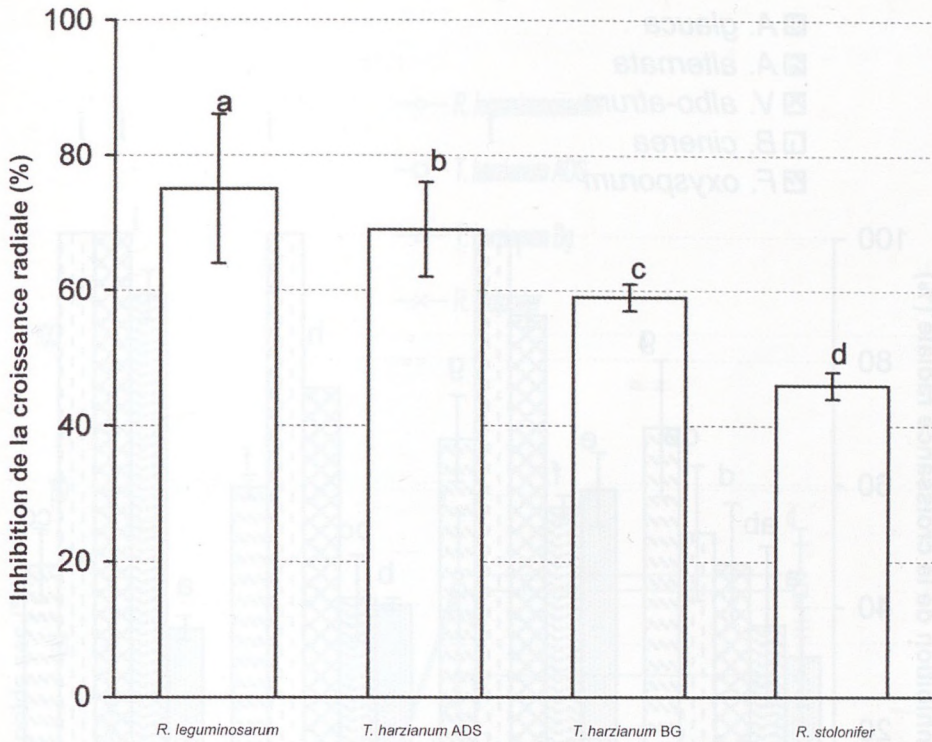


Fig. 1. Action des antagonistes (*R. stolonifer*, *T. harzianum* ADS et Bg, *R. leguminosarum*) sur la croissance radiale de *F. oxysporum* f. sp. *lentis*.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

Antibiose

Filtrat de culture

Effet inhibiteur : L'action de différentes concentrations du filtrat de culture des antagonistes sur la croissance pondérale de *F. oxysporum* est reportée dans la figure 3. A partir de la concentration 0,1 % l'action inhibitrice du filtrat de *T. harzianum* ADS et de *R. leguminosarum* augmente brutalement pour atteindre un maximum à 0,25 %. Le filtrat de *T. harzianum* Bg ne commence à montrer un effet inhibiteur qu'à partir de la concentration 0,25 %. L'inhibition de la croissance mycélienne à 0,5 % est faible et ne dépasse pas 30 %. Cependant le filtrat de culture de *R. stolonifer* est inefficace. Il est à noter que même avec des filtrats plus âgés (15 j) et des doses beaucoup plus fortes (5 %, 10 % et 20 %) l'action inhibitrice de *R. stolonifer* ne s'est pas manifestée (résultats non présentés).

Sensibilité thermique et enzymatique : Il n'y a pas d'effet du traitement thermique sauf pour *R. leguminosarum* dont l'activité inhibitrice est totalement détruite. Par ailleurs, le traitement enzymatique montre que (Fig. 4) la trypsine réduit de moitié l'activité inhibitrice du filtrat de *R. leguminosarum* et la pepsine la détruit totalement alors que ces deux protéases n'ont aucun effet sur l'action inhibitrice de *T. harzianum* ADS et *T. harzianum* Bg.

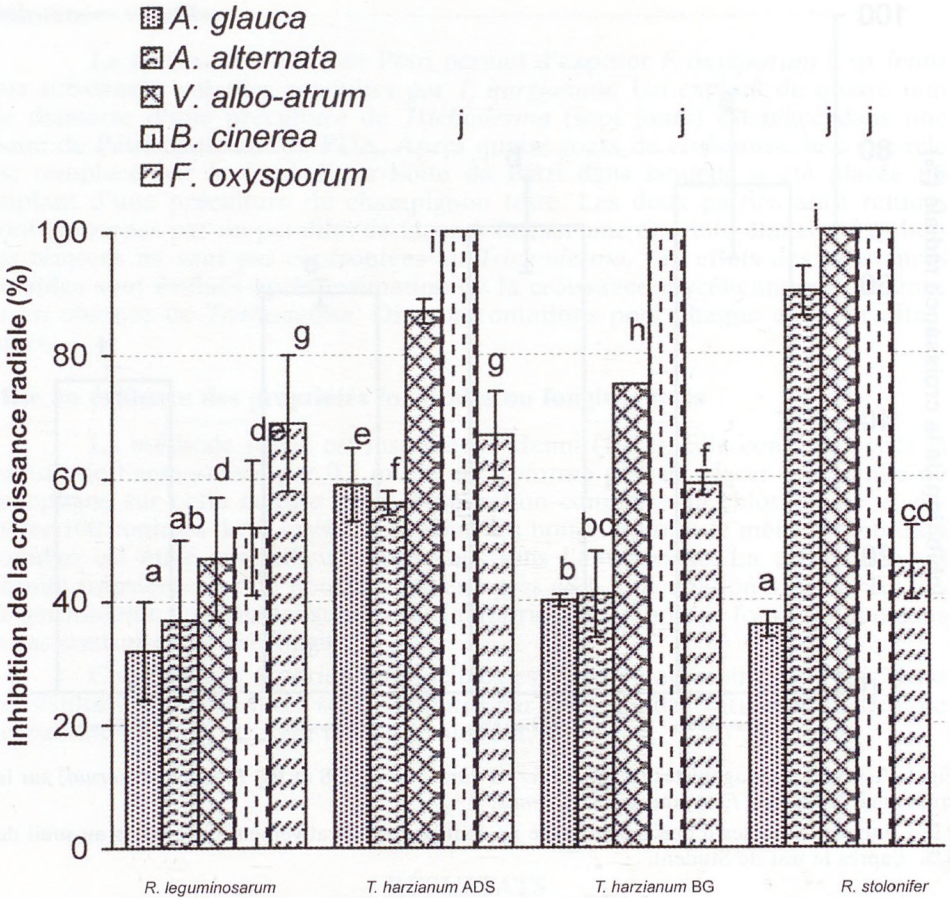


Fig. 2. Spectre d'action des antagonistes (*R. stolonifer*, *T. harzianum* ADS et Bg, *R. leguminosarum*) sur *Absidia glauca*, *Verticillium albo-atrum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* (pour comparaison), et *Botrytis cinerea*.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

Le dosage des protéines dans des filtrats, provenant des cultures des antagonistes dans des milieux composés (PG, YEM) et un milieu synthétique (Czapeck), a donné le même résultat (Tabl. I). Il indique l'absence de protéines dans le filtrat de culture des *T. harzianum* et la présence de très faible quantité dans celui de *R. leguminosarum*.

Action des substances volatiles

Trichoderma-Fusarium : La croissance de *F. oxysporum* exposé aux substances volatiles de *Trichoderma* est ralentie par rapport au témoin non exposé (Fig. 5). L'aptitude inhibitrice des substances volatiles apparaît dès le premier jour. Cette aptitude ne varie pas au cours du temps et reste significativement aux alen-

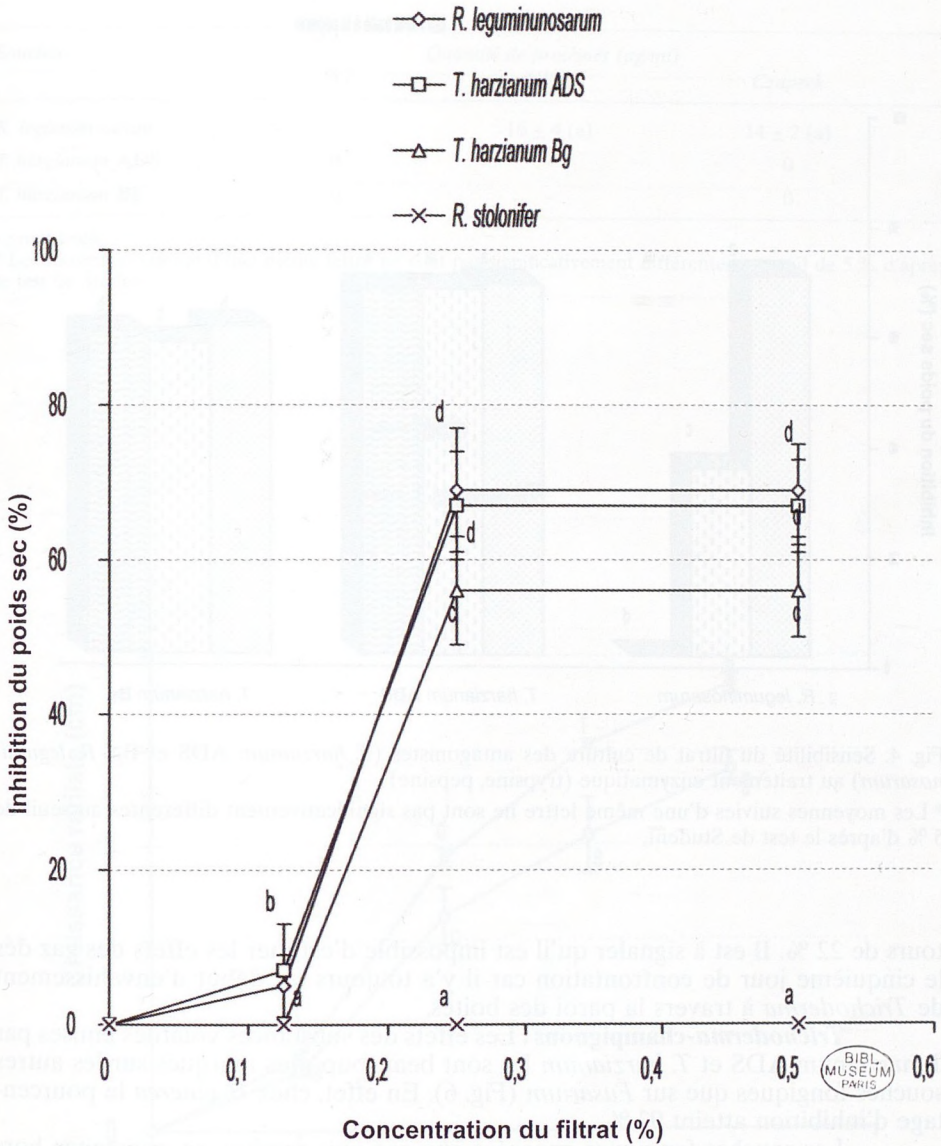


Fig. 3. Influence de différentes concentrations du filtrat de culture des antagonistes (*R. stolonifer*, *T. harzianum* ADS et Bg, *R. leguminosarum*) sur la croissance pondérale de *F. oxysporum* f. sp. *lentis*.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

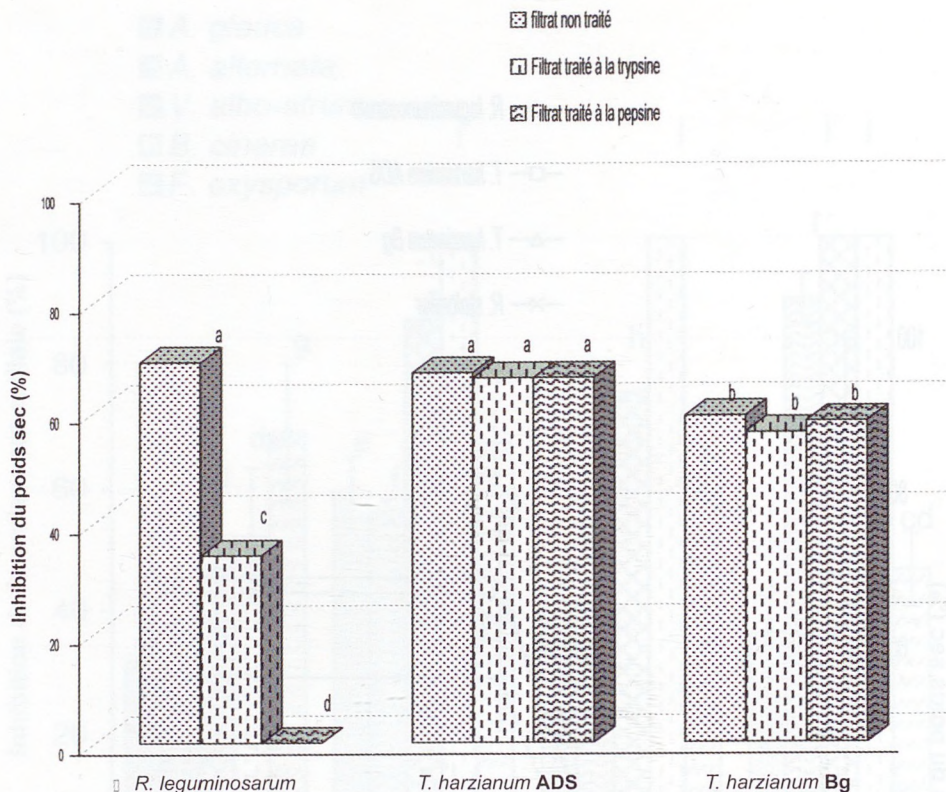


Fig. 4. Sensibilité du filtrat de culture des antagonistes (*T. harzianum* ADS et Bg, *R. leguminosarum*) au traitement enzymatique (trypsine, pepsine)

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

tours de 22 %. Il est à signaler qu'il est impossible d'estimer les effets des gaz dès le cinquième jour de confrontation car il y'a toujours un début d'envahissement de *Trichoderma* à travers la paroi des boîtes.

Trichoderma-champignons : Les effets des substances volatiles émises par *T. harzianum* ADS et *T. harzianum* Bg sont beaucoup plus marqués sur les autres souches fongiques que sur *Fusarium* (Fig. 6). En effet, chez *B. cinerea* le pourcentage d'inhibition atteint 93 %.

Les souches fongiques exposées aux gaz puis remises en croissance hors des gaz retrouvent une vitesse de croissance normale.

Action fongicide ou fongistatique

Le tableau II indique que la germination des conidies de *F. oxysporum* est légèrement affectée par les substances secrétées par *T. harzianum* ADS et *T. harzianum* Bg mais manifestent quand même une faible action fongicide. Inversement, les substances émises par *R. leguminosarum* ont une activité fongicide importante puisque la majorité des conidies sont tuées.

Tab. 1. Dosage des protéines dans les filtrats de culture des antagonistes selon les milieux de culture.

| Souches | Quantité de protéines ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------------------|--|----------------|----------------|
| | PG | YEM | Czapeck |
| <i>R. leguminosarum</i> | - | 16 ± 4 (a) | 14 ± 2 (a) |
| <i>T. harzianum</i> ADS | 0 | - | 0 |
| <i>T. harzianum</i> Bg | 0 | - | 0 |

- : non testé.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

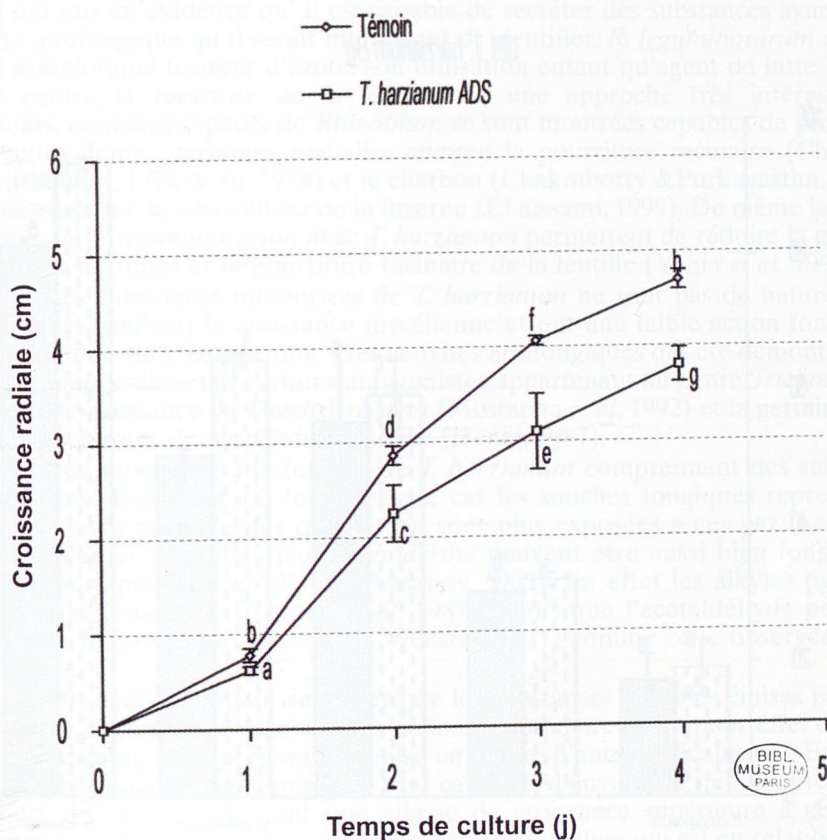


Fig. 5. Cinétique de la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* sous l'effet ou non des substances volatiles de *T. harzianum* ADS

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

Tab. 2. Effet des substances secrétées par les antagonistes sur la germination des conidies de *F. oxysporum*.

| Souches | Germination des conidies avant transfert de la cellophane (%) | Germination des conidies avant transfert de la cellophane (%) |
|-------------------------|---|---|
| Témoin | 100 ± 5 (a) | 100 ± 5 (a) |
| <i>R. leguminosarum</i> | 0 (b) | 30 ± 4 (b') |
| <i>T. harzianum</i> ADS | 69 ± 3 (c) | 69 ± 3 (c) |
| <i>T. harzianum</i> Bg | 75 ± 4 (c) | 75 ± 4 (c) |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

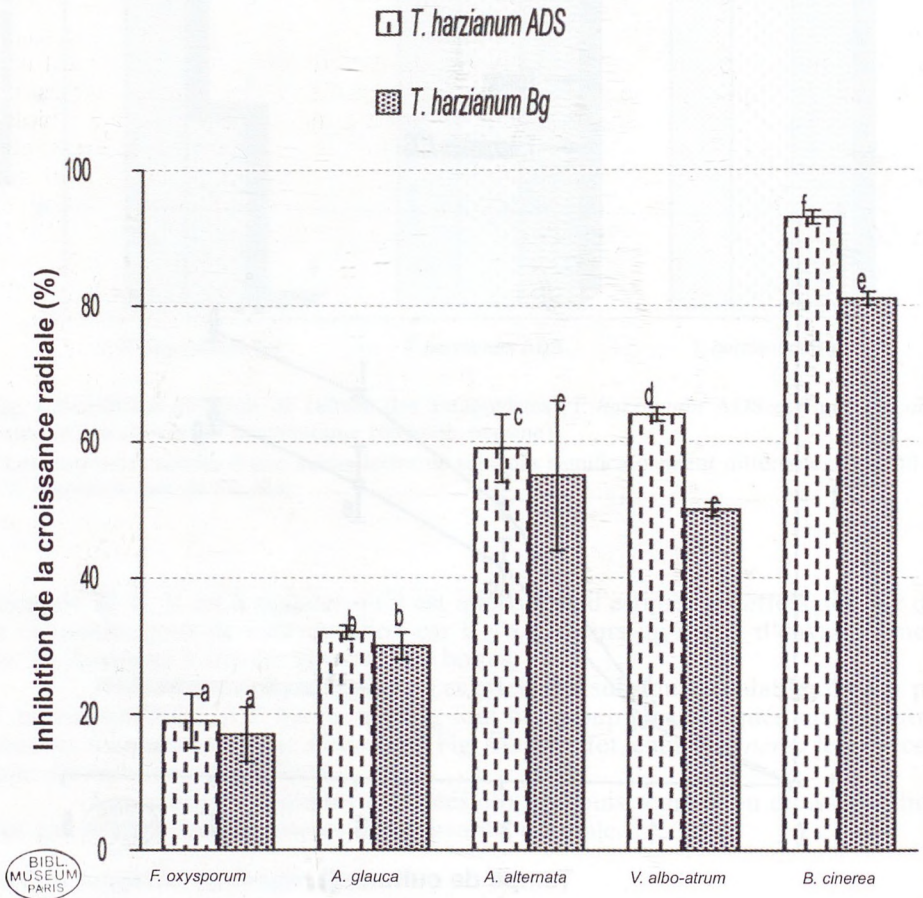


Fig. 6. Action des substances volatiles de *T. harzianum* ADS et Bg sur la croissance radiale d'*Absidia glauca*, *Verticillium albo-atrum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, et *Botrytis cinerea*.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Student.

DISCUSSION

A l'issue de ce travail il paraît que les souches isolées pour leur antagonisme élevé à l'encontre de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* ne montrent pas des activités inhibitrices et des modes d'action similaires. *T. harzianum* ADS, *T. harzianum* Bg et *R. leguminosarum* libèrent des substances qui ont des propriétés antibiotiques par contre *Rhizopus stolonifer* n'en libère pas et semble agir par compétition nutritive liée à une occupation rapide du milieu de culture.

Les expériences de caractérisation semblent indiquer que les substances inhibitrices de *R. leguminosarum* sont de nature protéique, elles sont secrétées en très faibles quantités (ordre des µg/ml) et ont une action fongicide sur les conidies de *F. oxysporum*. Ces substances pourraient être des antibiotiques. Si certaines études ont montré que *Rhizobium* secrète des substances à activité antibactérienne (Roslyckey, 1967 ; Schwinghamer, 1970 ; Triplett & Barta, 1987 ; Wilson *et al*, 1998), ce travail et également d'autres travaux (Drapeau *et al*, 1973 ; El aïssami, 1999) ont mis en évidence qu'il est capable de sécréter des substances ayant une activité antifongique qu'il serait intéressant d'identifier. *R. leguminosarum* est un agent symbiotique fixateur d'azote, son utilisation entant qu'agent de lutte biologique contre la fusariose de la lentille est une approche très intéressante. D'ailleurs, certaines espèces de *Rhizobium* se sont montrées capables de protéger les plantes contre certaines maladies comme la pourriture racinaire (Chou & Schmitthenner, 1974 & Tu, 1978) et le charbon (Chakraborty & Purkayastha, 1984) de Soja ainsi que la verticilliose de la luzerne (El aïssami, 1999). De même la combinaison de *R. leguminosarum* avec *T. harzianum* permettent de réduire la gravité de la fonte de semis et la pourriture racinaire de la lentille (Yehia *et al*, 1994).

Les substances inhibitrices de *T. harzianum* ne sont pas de nature protéique. Elles inhibent la croissance mycélienne et ont une faible action fongicide sur les conidies de *F. oxysporum*. Des activités antifongiques ont été démontré par les substances émises par certains antagonistes appartenant au genre *Trichoderma* affectant la croissance de *Drechslera teres* (Mostapha *et al*, 1992) et la germination des microscélérotés de *Verticillium dahliae* (Henni, 1987).

Les substances inhibitrices de *T. harzianum* comprennent des substances volatiles ; leur effet est fongistatique car les souches fongiques reprennent leur croissance normale dès qu'elles ne sont plus exposées à ces gaz. Les substances volatiles produites par *Trichoderma* peuvent être aussi bien fongicides que fongistatiques (Bilal, 1956 & khasanov, 1962). En effet les alkyles pyrones ont un effet fongicide (Claydon *et al*, 1987) tandis que l'acétaldéhyde possède une action fongistatique (Dennis & Webster, 1971) comme celle observée dans cette étude.

On peut cependant supposer que les substances volatiles émises par nos souches de *Trichoderma* auraient une action préliminaire ayant pour effet d'affaiblir le pathogène cible préparant la mise en œuvre d'autres mécanismes. En effet ces souches poussent rapidement et sont capables d'envahir le milieu après quatre jours de culture, elles ont une vitesse de croissance supérieure à celle de *F. oxysporum*. A côté de cette occupation rapide du milieu qui est en relation avec la compétition nutritive ces souches libèrent des pigments jaunes qui sont soupçonnés être des antibiotiques. En effet, *T. harzianum* s'est montré capable de produire un certain nombre d'antibiotique telsque : la trichodermine (Khasanov, 1962), la suzukaciline, l'alamethicine, la dermadine, la penicilline, la trichothicine et les trichorzianines (Vial, 1989).

Le phénomène d'antagonisme observé vis à vis de *F. oxysporum* est caractérisé par un mode d'action non spécifique vu les effets inhibiteurs des antagonistes sur d'autres champignons parmi lesquels ceux qui sont pathogènes sur les plantes de la vigne et de la tomate. Disposer d'un spectre d'action large contre les pathogènes est parmi les critères fondamentaux qui caractérisent l'antagoniste idéal (Baker & Cook, 1982). En effet, grâce à son spectre large d'antagonisme *T. harzianum* s'est révélé efficace dans la lutte biologique contre des agents phytopathogènes comme *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne (O'Neill *et al.* 1996 & Harman *et al.* 1996) et de la tomate (Eden *et al.* 1996), *Rhizoctonia solani* responsable des fontes de semis (Hadar *et al.* 1979 & Cliquet & Scheffer, 1996) et *Chondrosterum purpureum* agent de plomb des arbres fruitiers (Grosclaude, 1979 & Ricard, 1983).

A la lumière de ces investigations réalisées *in vitro* il s'avère que *T. harzianum*, *Rhizopus stolonifer* et *R. leguminosarum* pourraient être des agents de contrôle biologique efficaces capable de réduire la sévérité de la fusariose de la lentille, la pourriture grise de la vigne et la verticilliose de la tomate, dans la mesure ou leur innocuité à l'égard de l'hôte aura été prouvée.

RÉFÉRENCES

- ALABOUVETTE C., SCHIPPERS B., LEMANCEAU P. & BAKKER P. A. H. M., 1998 — Biological control of Fusarium wilts towards development of commercial products. In: BOLAND G. J. and KUYKENDALL L. D. (Eds), *Plant-Microbe interactions and Biological Control*, pp. 15-35.
- ALHASSAN S., 1998 — Biological Control of lentil wilt in Syria. Thesis of Master Science in agriculture engineering, Syrie.
- ASLAM M. S., 1989 — Studies on the biological control of lentil wilt. Thesis, department of plant Pathology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- BAKER K. F. & COOK R. J. 1982 — Biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*. St. Paul, MN.
- BENKHEMMAR O., LAHLOU H., BOMPEIX G., DUPONT J., EL MNIAI H. & BOUBEKRI C., 1992 — Les contaminants fongiques du raisin de table marocain conservé au froid. *Cryptogamie, Mycologie* 13 (4) : 327-335.
- BILAI V. I., 1956 — Volatile antibiotics in fungi of the genus *Trichoderma*. *Microbiology, Moscw.* 25: 458-465.
- BRADFORD M., 1976 — A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- CHAKRABORTY U. & PURKAYASTHA R. P. 1984 — Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 285-289.
- CHOU L. G. & SCHMITTHENNER A. F., 1974 — Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mossea* on Soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Disease* 58: 221-225.
- 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.
- CLIQUET S. & SCHEFFER R. J., 1996 — Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* using *Trichoderma harzianum* as industrial film coatings on seeds. *European Journal of plant pathology* 102: 247-255.

- DENNIS C. & WEBSTER J., 1971-antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological society* 57(1): 41-48.
- DRAPEAU R., FORTIN J. A. & GAGNON C., 1973 — Antifungal activity of *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany* 5: 681-682.
- EDEN M. A., HILL R. A. & STEWART A., 1996 — Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology* 45: 276-284.
- EL AÏSSAMI A., 1999 — Impact de l'adaptation de *Verticillium albo-atrum* d'origine tomate à la luzerne sur les mécanismes d'action de parasite et bioprotection des plantes fourragères contre la verticilliose. Thèse de Doctorat d'état, Université Mohamed V, Rabat.
- ERSKINE W., BAYAA B. & DOLLI M., 1990 — Effect of temperature and some media and biotic factors on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, and its mode of seed transmission. *Arab Journal of Plant Protection* 8: 34-37.
- GROSCLAUDE C., 1979 — Activité du *Trichoderma harzianum* vis à vis du *Sterium purpureum*. XXIV^e colloque sur les antagonismes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes, bordeaux, France.
- HADAR Y., CHET I. & HENIS Y., 1979 — Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69 (1): 64-68.
- HARMAN G. E., LATORRE B., AGOSIN E., SAN-MARTIN R., RIEGEL D. G., NIELSEN P. A., TRONSOMO A. & PEARSON R. C., 1996 — Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7(3): 259-266.
- HENNI J. E., 1987 — Evaluation de l'efficacité de certains champignons antagonistes vis-à-vis de *Verticillium Dahliae* klebahn. *Cryptogamie, Mycologie* 8 (3) : 203-207.
- KAMBOJ R. K., PANDEY M. P. & CHAUBE H. S., 1990 — Inheritance to *Fusarium* wilt in Indian lentil germplasm (*Lens culinaris* Medik). *Euphytica* 50: 113-117.
- KHASANOV O. K., 1962 — The antibiotic properties of fungi of the genus *Trichoderma* Pers, found in the swamp soil of Usbekistan. *Usbekshil Biologicheskll Zhmnal, Tashkent* 6: 62-67.
- LAHLOU H., 1983 — Variabilité intraclonale de la morphologie et du pouvoir pathogène du *Verticillium albo-atrum* R et B. forme à microsclérotos. Thèse de Doctorat d'état, université Mohamed V, Rabat.
- MEHROTRA R. S. & CLAUDIUS G. R., 1972 — Biological control of root rot and wilt disease of *lens culinaris* Medik. *Plant and soil* 3: 657-664.
- MICHAEL A. H. & NELSON P. E., 1972 — Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum* from carnation. *Phytopathology* 42: 315.
- MOSTAPHA M., BARRAULT G & ALBERTINI L. 1992 — Lutte biologique contre *Drechslera teres*: action *in vitro* de microorganismes antagonistes sur la croissance mycélienne et la germination. *Cryptogamie, Mycologie* 13 (2) : 125-133.
- OMOIFO C. & IKOTUN T., 1987 — Inhibition of growth of some plant pathogens by antagonistic microorganisms. *Journal of Basic Microbiology* 27: 515-519.
- O'NEILL J. M., ELAD Y., SHTIENBERG D. & COHEN A., 1996 — Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. *Biocontrol Science and Technology* 6: 139-146.
- RICARD J., 1983 — Décennie de traitements curatifs des arbres fruitiers contre la maladie du plomb par les *Trichoderma* IMI 206039 et 206040. XXIV^e colloque sur les antagonismes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes, bordeaux, France.
- ROSLYCKY E. B., 1967 — Bacteriocin production in the *Rhizobium* bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 13: 431.
- SCHWINGHAMER E. A., 1970 — Antagonism between strains of *Rhizobium trifolii* in culture. *Soil Biology and Biochemistry* 3: 355-363.
- TRIPLETT E. W. & BARTA T. M., 1987 — Triflotoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain T 24 on clover. *Plant Physiology* 85: 335-342.

- TU J. C. 1978 — Protection of soybean from severe Phytophthora root rot by *Rhizobium*. *Physiological Plant Pathology* 12: 233-240
- VIAL I., 1989 — Critères de qualité de la production d'un biopesticide à base de *Trichoderma harzianum* RIFAL. Mémoire, Ecole Nationale des Ingénieurs des travaux agricoles, Bordeaux, France.
- WILSON R. A., HANDLEY B. A. & BERINGER J. E., 1998 — Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (3): 413-417.
- YEHIA A. H., SAYED A. A., EL-GOWLLY A. & SOLIMAN G. E., 1994 — Effect of *Trichoderma harzianum* controlling Damping-off and root rot of lentil plants in relation to plant growth parameters and yield component. *Fifth Arab Congress of Plant Protection*. 105 p.