

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**LA SOUCHE I-1237 DE *TRICHODERMA ATROVIRIDE* REDUIT L'IMPACT DE *PYTHIUM* SUR LA
PRODUCTION DE CAROTTE**

P. LETOUSEY⁽¹⁾, E. MOUNIER⁽¹⁾, M. CADIOU⁽¹⁾, P. HEYSCH⁽¹⁾, F. BOULISSET⁽¹⁾, J. DETOC⁽¹⁾ et E. PAJOT⁽¹⁾

⁽¹⁾AGRAUXINE Lesaffre Plant Care, 2 & 4 rue Henri Becquerel, 49070 Beaucozéz, FRANCE
patricia.letousey@agrauxine.fr

RÉSUMÉ

Les productions végétales sont sujettes à de nombreuses attaques de champignons pathogènes d'origine tellurique, aboutissant à une réduction significative des rendements et de la qualité des productions. Les solutions de traitement chimique conventionnelles sont largement répandues sur le marché. Bien qu'efficaces, ces produits sont source d'importants problèmes éco-toxicologiques, conduisant à une demande en produits de traitement à faible risque. Face à cet enjeu, Agrauxine a développé le produit de traitement Tri-Soil®WP, dont la substance active est le microorganisme *Trichoderma atroviride* I-1237. Les essais préliminaires au laboratoire, basés sur des tests de confrontation *in vitro* à l'encontre de *Pythium* spp., ont permis de déterminer que *T. atroviride* I-1237 dispose d'un bon potentiel en tant qu'agent de biocontrôle. Au champ, cette étude a mis en évidence l'efficacité de *Trichoderma atroviride* I-1237 à l'encontre de la maladie de la tache de la carotte, causée par *Pythium* spp., en atteignant des taux de protection équivalents à ceux obtenus avec la référence chimique. Cette étude révèle que cette souche spécifique de *Trichoderma atroviride* est une alternative viable aux traitements conventionnels, et peut désormais faire partie des plans de gestion intégrée des maladies d'origine tellurique.

Mots-clés : *Trichoderma atroviride* I-1237, Antagoniste, Culture de carotte, *Pythium* spp., Tri-Soil®WP.

ABSTRACT

***TRICHODERMA ATROVIRIDE* STRAIN I-1237 REDUCES THE IMPACT OF *PYTHIUM* IN CARROT CROP PRODUCTION**

Vegetables crop production is subject to the attack of several fungal soilborne pathogens, significantly reducing yields and quality. Fungi responsible for these diseases are present in most French agricultural soils. Chemical control products against these diseases are widely available in the market; although they are efficient, residues on the crop and eco-toxicological concerns have led to a demand for low-risk products. Agrauxine has developed the microbiological product Tri-Soil®WP, using as active substance *Trichoderma atroviride* I-1237. Preliminary lab tests to determine the mode of action of I-1237 showed a good potential for the biocontrol of soilborne diseases, based on the antagonist invasive growth on agar plates over the pathogens *Pythium* spp. In the fields, *Trichoderma atroviride* I-1237 proved its efficiency against *Pythium* cavity spot on carrots, attaining a protection level similar to the chemical reference. This specific strain of *Trichoderma atroviride* demonstrated that it is a suitable alternative for conventional treatments and can therefore be part of an integrated management program of vegetable crop soilborne diseases.

Keywords: *Trichoderma atroviride* I-1237, Antagonist, Carrot crop, *Pythium* spp., Tri-Soil®WP.

INTRODUCTION

Les pathogènes telluriques des végétaux peuvent réduire significativement le rendement et la qualité des cultures. Ces pathogènes survivent souvent dans le sol durant plusieurs années, et chaque culture peut être sensible à plusieurs espèces. De ce fait, la lutte contre les maladies d'origine tellurique s'avère particulièrement problématique pour la conduite des cultures. L'adéquation entre les pathogènes, leurs plantes cibles et les conditions agro-environnementales existantes sur la parcelle détermine le développement de ces pathogènes et leur impact sur la culture. La gestion des maladies telluriques est conditionnée par la connaissance approfondie de chacun de ces paramètres, et s'appuie sur la lutte chimique conventionnelle, sur la résistance intrinsèque des variétés végétales cultivées ainsi que sur des mesures prophylactiques.

Cependant, chacun des fongicides utilisés détruit un large spectre de champignons telluriques, qu'ils soient pathogènes ou non. Ce mode d'action non spécifique est source d'importantes perturbations de la flore fongique non pathogène du sol, dont la présence est primordiale pour le fonctionnement de l'écosystème des sols cultivés. De plus, l'action des fongicides disponibles sur le marché se heurte à un développement important de résistance chez les pathogènes, réduisant à terme l'efficacité des traitements. Pour ces raisons, ainsi que pour améliorer la préservation de la santé des consommateurs et des agriculteurs, le plan européen Ecophyto a été mis en place, avec pour objectif de parvenir à une réduction de 50% de l'utilisation des produits phytosanitaires. Dans ce contexte, le développement de produits de traitement basés sur l'action de microorganismes antagonistes aux pathogènes s'impose comme une solution durable et incontournable dans la lutte contre les maladies du sol.

Cette étude a été menée sur carotte (*Daucus carotta*), une culture sensible à de nombreux pathogènes telluriques, tels que les microorganismes des genres *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia* spp. ou *Pythium* spp. La maladie de la tache, ou cavity spot, est l'une des maladies les plus problématiques, causant d'importantes altérations qualitatives sur la racine, partie récoltée de la plante. Cette maladie est causée par un cortège fongique appartenant au genre *Pythium* spp. En France, la seule matière active enregistrée pour lutter contre les maladies causées par les microorganismes du genre *Pythium* spp. est le Mefenoxam. Plusieurs études ont montré les inconvénients liés à l'usage de cette substance active : (i) l'application répétée du Mefenoxam réduit son efficacité à l'encontre de la maladie de la tache sur carotte (Farrar *et al.*, 2002) et (ii) l'apparition, chez *Pythium ultimum*, de résistance au Mefenoxam a été observée sur des cultures de pommes de terre (Taylor *et al.*, 2002).

En conséquence, plusieurs produits de traitement, basés sur l'action de microorganismes antagonistes aux pathogènes telluriques, ont été développés. Les microorganismes du genre *Trichoderma* spp. figurent parmi ceux utilisés dans ces nouveaux produits de traitement. Les capacités antagonistes de ces champignons filamenteux du sol sont bien connues, et en font l'un des agents de biocontrôle les plus utilisés à l'heure actuelle. L'activité antagoniste des *Trichoderma* spp. est basée sur une combinaison de plusieurs modes d'action : importantes capacités de compétition trophique (Chet I., 1987), sécrétion d'enzymes de dégradation des parois cellulaires (Woo *et al.*, 1999) et antibiose (Grayston *et al.*, 1996 ; Schirmbosck *et al.*, 1994). L'efficacité de l'usage de *Trichoderma* spp. dans la lutte contre les pathogènes telluriques a été démontrée sur plusieurs cultures (Leta and Selvaraj, 2013 ; Escande *et al.*, 2002 ; Wilson *et al.*, 2008 ; Monteros-Barrientos *et al.*, 2011 and Gravel *et al.*, 2005).

Dans cette étude, plusieurs méthodes d'expérimentation *in vitro*, *in planta* et au champ ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de la souche I-1237 de *Trichoderma atroviride* dans la lutte contre *Pythium* spp., sur cultures de carottes.

MATERIEL ET METHODES

Tout au long de cette étude, deux souches de champignon, *Trichoderma atroviride* I-1237 et *Pythium ultimum*, ont été utilisées, et cultivées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Biokar Diagnostics, France). La souche de *Pythium ultimum* provenait de la collection de la FREDON (Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles), France.

ESSAIS *IN VITRO*

Dans un premier temps, des essais portant sur l'antagonisme des deux souches ont été menés *in vitro*. (i) Des tests de confrontation en boîte de Pétri ont été menés : des disques de 5 mm de *T. atroviride* et *P. ultimum* ont été placés à la surface du milieu PDA, de part et d'autre d'une boîte de Pétri de diamètre 8 cm. Les boîtes ont été incubées à 25°C durant 14 jours, en l'absence de lumière. La croissance des microorganismes a été mesurée à intervalles réguliers. (ii) L'effet antagoniste des composés volatils produits par *T. atroviride* a été évalué en déposant deux boîtes de Pétri l'une sur l'autre, couvercle ôté ; la boîte inférieure contenant un explant de 5 mm de *T. atroviride*, déposé sur milieu PDA, la boîte supérieure un explant de 5 mm de *P. ultimum*, déposé sur milieu PDA. La croissance de la colonie de *Pythium* a été mesurée à intervalles réguliers.

ESSAIS *IN PLANTA* EN CONDITIONS CONTROLEES

Dans un second temps, deux gammes de tests *in planta* ont été menées. (i) Test de germination de graines de carotte (F1 Bangor Bio, Graines Baumaux, France) en sol contaminé par le pathogène. Le sol contaminé par le pathogène est préparé en mélangeant au milieu de culture du mycélium de *P. ultimum* poussé sur milieu PDA. Le produit de biocontrôle Tri-Soil®WP (société Agrauxine, France), dont la substance active est *T. atroviride* I-1237, est mélangé au substrat sur certaines modalités (concentration allant de 1 à 5 g/L). Les graines de carotte ont été semées à la surface du sol contaminé et recouvertes d'une fine couche du même sol. La germination des graines et la croissance des plantules ont été suivies durant deux semaines. (ii) En chambre de culture, des graines de carotte ont été semées dans des bacs de 10 L de substrat contaminé par *P. ultimum*, préparé comme décrit précédemment. La croissance des plants est suivie durant 3 mois. Les paramètres évalués sont le pourcentage de racines saines à la récolte et le nombre de carotte par classe de qualité sanitaire.

ESSAIS AU CHAMP

Dans un troisième temps, des essais au champ ont été mis en place, selon un référentiel BPE, par des sociétés indépendantes, prestataires de service en essais agronomiques (SILEBAN, Barfleur, France). Les essais étaient composés d'un lot non traité (témoin), ainsi que de deux lots traités, respectivement avec (i) Santhal® (substance active Mefenoxam, Syngenta, Suisse), dose 0,5 L/ha, appliqué deux fois, successivement au stade BBCH 11, puis 7 semaines plus tard et (ii) Tri-Soil®WP (substance active *T. atroviride* I-1237, Agrauxine, France), appliqué une fois au moment du semis, à la dose de 5 kg/ha. Chaque essai a comporté quatre répétitions. Aucun problème particulier n'a été rencontré lors de la préparation ou l'application des bouillies de traitement.

ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les données ont été analysées statistiquement à l'aide du Logiciel Statgraphic centurion XVI (Statpoint technologies Inc., Warreton, Virginia, USA). Lorsque cela était possible, les pourcentages de germination des graines de carotte et, lors des essais au champ, les pourcentages de carottes saines ont été comparés par une ANOVA, et les différences significatives ont été déterminées selon la procédure de Tukey (HSD) avec $p=0,05$. Alternativement, un test de Kruskal-Wallis avec $p<0,05$ fut utilisé.

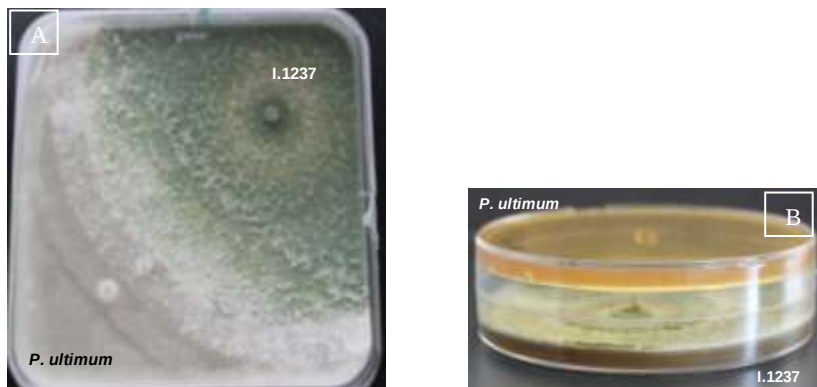
RESULTATS ET DISCUSSION

ESSAIS *IN VITRO*

A l'issue des tests de confrontation *in vitro*, l'effet antagoniste de *T. atroviride* I-1237 sur la croissance du champignon pathogène *P. ultimum* est montré en Figure 1. Ces expérimentations révèlent que la souche I-1237 de *Trichoderma atroviride* permet de réduire fortement et significativement la croissance radiale de *P. ultimum*.

Figure 1 : Tests de confrontation en boîte de Pétri entre *P. ultimum* et *Trichoderma atroviride* I-1237, sur milieu PDA. (A) Confrontation directe ; (B) Confrontation indirecte.

Figure 1: *In vitro* antagonistic assays between *P. ultimum* and *Trichoderma atroviride* I-1237, on PDA medium. (A) Direct confrontation ; (B) Indirect confrontation.



Les tests de confrontation entre *Trichoderma atroviride* I-1237 et le pathogène *P. ultimum* ont été menés en boîte de Pétri durant une période d'incubation de 2 semaines à 25°C, afin d'évaluer l'effet de la souche I-1237 à l'encontre du pathogène. Les boîtes de Pétri furent photographiées à la fin du test de confrontation. Dans tous les cas, à la fin de cette durée d'incubation, le mycélium de chacun des deux champignons avait recouvert la totalité de la surface de milieu gélosé sur les boîtes de Pétri contrôle, inoculées par un seul des deux champignons.

A l'issue des tests de confrontation directe, la figure 1A montre que le mycélium de *Trichoderma atroviride* I-1237 recouvre le mycélium de *P. ultimum*. Dans les tests de confrontation indirecte (Figure 1B), le diamètre des colonies de *P. ultimum* se révèle inférieur lors d'une croissance en présence de *T. atroviride* sans contact entre les deux mycéliums, et ce par rapport au témoin (sans *Trichoderma*). La diminution relevée de la croissance du pathogène fut de 15% lors de ce test de confrontation. Des résultats similaires impliquant *Trichoderma* spp. avaient déjà été rapportés dans la littérature scientifique, par exemple suite à la confrontation, sur un milieu de culture identique, entre *T. harzianum* et *P. ultimum* (Monteros-Barrientos *et al.*, 2002).

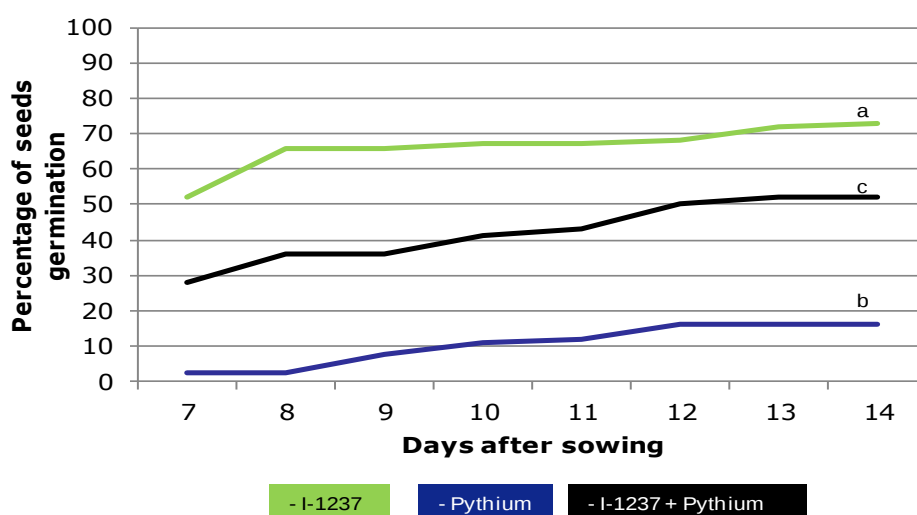
L'activité antagoniste de *T. atroviride* I-1237 observée au cours de ces expérimentations *in vitro* peut être attribuée à la combinaison de 2 paramètres : la compétition spatiale (Figure 1A) et l'antibiose (Figure 1B). Ces résultats illustrent le potentiel de *Trichoderma atroviride* I-1237 en tant qu'agent de biocontrôle à l'encontre de *Pythium ultimum*.

ESSAIS *IN PLANTA* EN CONDITIONS CONTROLEES

Les lots de graines de carotte furent semés sur des sols contenant différents inocula en champignon pathogène (*P. ultimum*) ou antagoniste (*T. atroviride* I-1237) : inoculum de *T. atroviride* (contenu dans le produit Tri-Soil®WP), inoculum de *P. ultimum*, inoculum constitué d'un mélange de *T. atroviride* et *P. ultimum*, et absence d'inoculum fongique pour le lot contrôle. La germination des graines de carottes fut suivie durant deux semaines (Figure 2).

Figure 2. : Evolution temporelle du pourcentage de germination de graines de carotte, suite à un test *in planta* en conditions contrôlées. Plusieurs modalités de traitement ont été appliquées: Traitement par *Trichoderma atroviride* I-1237 (-) ; *Pythium ultimum* (-) ; *T. atroviride* I-1237 et *P. ultimum* en mélange (-). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA, $p < 0,05$).

Figure 2 : Carrot seed germination temporal monitoring, during an *in planta* trial under controlled conditions. Carrot seeds were sown in soil inoculated with various fungi inocula: with *T. atroviride* I-1237 (-), with *P. ultimum* (-) and with the mixed *T. atroviride* I-1237 and *P. ultimum* (-). Different letters indicate statistical differences (ANOVA test, $p < 0,05$).

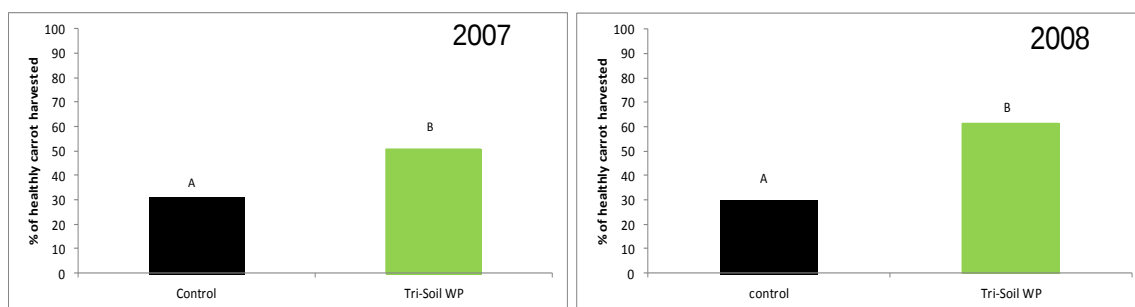


Un taux de germination de 70% fut relevé sur les graines du lot contrôle (résultat non présenté). Un taux de germination similaire fut observé sur le lot de graines semé en présence de l'agent de biocontrôle *T. atroviride* I-1237. Sur le lot de graines semé en présence de *P. ultimum*, seul un taux de germination de 18% fut relevé, marquant une fonte de semis liée au pathogène. Sur le substrat contenant à la fois les inocula de *T. atroviride* I-1237 (Tri-Soil®WP) et *P. ultimum*, 51% des graines semées germèrent. Cette expérimentation a permis de mettre en évidence l'efficacité de *T. atroviride* I-1237 dans la protection de graines de carotte à l'encontre de la fonte de semis causée par *P. ultimum*, ce même en cas de contamination importante du substrat de culture par le pathogène.

La deuxième série d'expérimentations *in planta* fut menée durant deux années consécutives, en chambre de culture et selon des normes BPE, par des prestataires de service indépendants. Les graines de carotte furent semées sur un substrat contaminé par le pathogène *P. ultimum*. Le pourcentage de carottes en bon état sanitaire fut relevé à la fin de l'expérimentation, lors de la récolte. Toutes les répétitions menées montrèrent que le taux de carottes commercialisables était de 30% sur le lot contrôle. Ce pourcentage était doublé sur le lot dont le substrat avait été inoculé par Tri-Soil®WP (Figure 3).

Figure 3. : Pourcentage de carottes présentant un bon état sanitaire à la récolte suite à des essais *in planta* en conditions contrôlées. Des graines de carottes ont été semées dans des pots de 10L de substrat inoculé par *Pythium ultimum*. Deux modalités de traitement ont été mises en place : traitement Tri-Soil®WP, et sans traitement (témoin). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA $p < 0,05$).

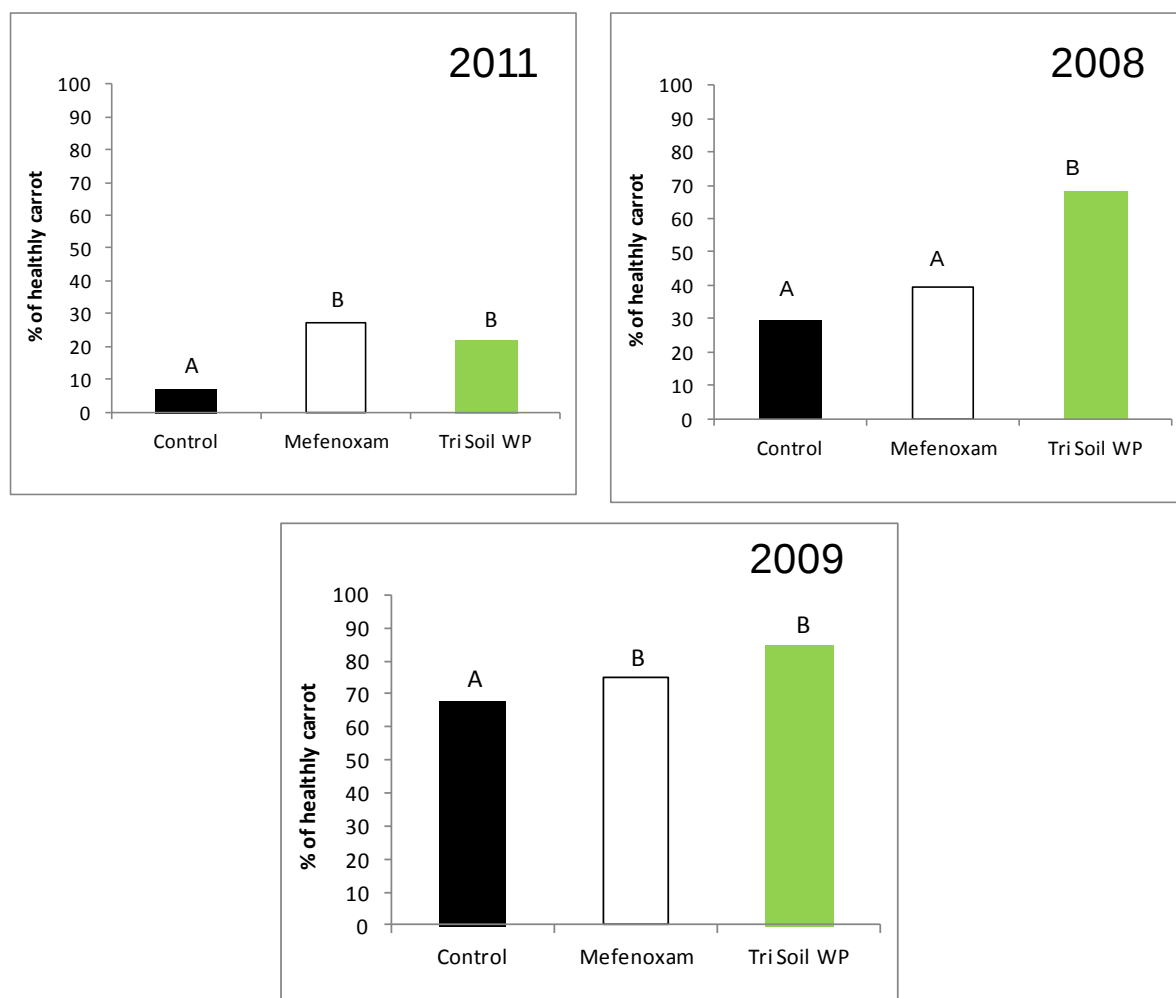
Figure 3 : Percentage of healthy carrots at harvest, after an *in planta* trial under controlled conditions. Carrot seeds were sown in pots containing 10 liters of substrate contaminated with *P. ultimum*. Two different conditions were tested: treatment with Tri-Soil®WP, or without any treatment (negative control). Different letters indicate statistical differences (ANOVA test, $p < 0,05$).



ESSAIS AU CHAMP

Ces essais furent menés afin d'évaluer l'efficacité de Tri-Soil®WP dans le contrôle des maladies de la carotte liées à *Pythium* spp., et notamment vis-à-vis de la maladie de la tache (cavity spot), et ce sur les trois années 2008, 2009 et 2011 (Figure 4).

Figure 4. : Pourcentage de carottes présentant un bon état sanitaire à la récolte, lors d'essais menés au champ en 2008, 2009 et 2011. Trois modalités de traitement furent mises en place : traitement au Tri-Soil®WP, traitement au Mefenoxam (référence chimique, Santhal, Syngenta, France), absence de traitement (témoin). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA, $p < 0,05$).
 Figure 4 : Percentage of healthy carrots at harvest, after experimental trials under field conditions, in 2008, 2009 and 2011. Three treatments were assessed: Tri-Soil®WP, Mefenoxam (chemical reference, Santhal, Syngenta, France), control (without treatment). Different letters indicate statistical differences (ANOVA test, $p < 0,05$).



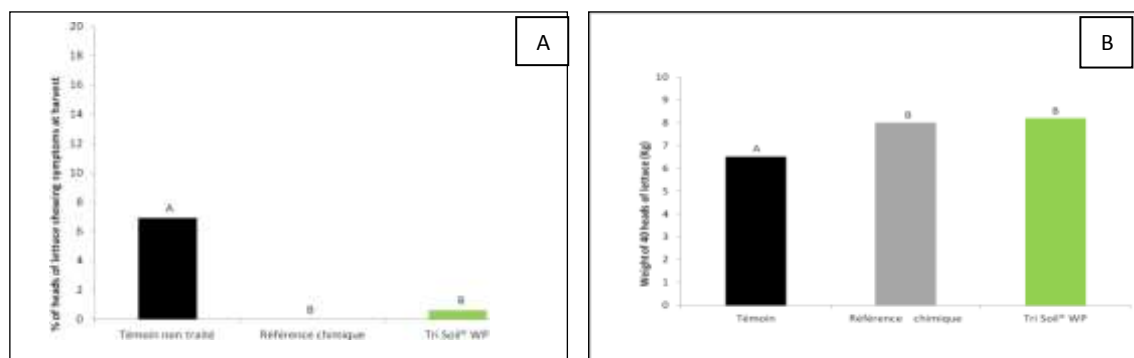
Concernant la proportion de racines de carottes atteintes, tous les traitements testés, excepté le lot traité par Mefenoxam en 2008, montrèrent une diminution significative de l'incidence de la maladie en comparaison avec le lot témoin, non traité.

D'une manière générale, l'efficacité observée pour les traitements fut meilleure sur les lots traités par Tri-Soil®WP que sur les lots traités par la référence chimique, et ce même en cas de pression parasitaire particulièrement élevée comme cela fut le cas pour l'essai mené en 2011. Tri-Soil®WP provoque une augmentation significative de la proportion de carottes présentant un bon état sanitaire à la récolte, en comparaison avec le témoin non traité. Dès lors, il apparaît que Tri-Soil®WP permet une protection efficace à l'encontre de la maladie de la tache sur carotte, en conditions de production.

Ces résultats, démontrant l'efficacité de Tri-Soil®WP dans le cadre d'essais au champ sur carotte, concordent avec ceux obtenus dans le même temps dans le cadre d'essais sur salade (Figure 5). En effet, ces essais ont permis de mettre en évidence une réduction importante et significative du pourcentage de salades présentant des symptômes d'infection par *Rhizoctonia* spp. (Figure 5A), réduction d'ampleur comparable à celle observée lors du traitement avec la référence chimique. De plus, on observe, par rapport au lot non traité, une augmentation significative de la masse des salades traitées par Tri-Soil®WP, comme cela est observé avec la référence chimique (Figure 5B). Ces résultats au champ sur carotte et salade confortent le positionnement de Tri-Soil®WP en tant que produit de gestion des maladies d'origine tellurique.

Figure 5 : Résultats des essais au champ de Tri-Soil®WP à l'encontre des symptômes liés à *Rhizoctonia* spp. sur laitue. (A) : Pourcentage de laitues présentant des symptômes lors de la récolte ; (B) : Masse de 40 têtes de laitues. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA, $p < 0,05$).

Figure 5 : Tri-Soil®WP field experimental trials against *Rhizoctonia* spp. symptoms on lettuce crop. (A): Percentage of lettuce expressing *Rhizoctonia* spp. symptoms at harvest ; (B) : Weight of 40 heads of lettuces at harvest. Different letters indicate statistical differences (ANOVA test, $p < 0,05$).



CONCLUSION

D'après les résultats obtenus lors des tests préliminaires menés *in vitro*, ainsi que lors des tests menés *in planta* et au champ, il apparaît que *Trichoderma atroviride* I-1237 présente de bonnes capacités de biocontrôle à l'encontre de *Pythium* spp. sur culture de carotte. Cette action antagoniste peut être attribuée à deux paramètres : la compétition spatiale et l'antibiose. Au cours de cette étude, les capacités de la souche I-1237 de *Trichoderma atroviride* en tant qu'agent de biocontrôle ont été caractérisées, dans le cadre de la protection de cultures de carotte à l'encontre de la maladie de la tache, comme cela avait également été constaté sur salade. Le nouveau produit Tri-Soil®WP, ayant comme substance active cette souche d'intérêt, peut à présent être intégré dans les itinéraires techniques, dans le cadre du développement d'une agriculture moins consommatrice d'intrants.

BIBLIOGRAPHIE

- Chet I. (1987). *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a Biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Wiley & Sons, NY.
- Escande A. R., Laich F. S. and Pedraza M. V. (2002). Field testing of honeybee-dispersed *Trichoderma* spp. to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). Plant Pathol., 51:346-351.
- Farrar J. J., Nunez J. J. and Davis R. M. (2002). Repeated soil applications of fungicide reduce activity against cavity spot in carrots. California Agriculture, 56-2:76-79.
- Gravel V., Martinez C., Antoun H. and Tweddell R. J. (2005). Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. BioControl, 50:771-786.
- Grayston S.J., Vaughan D. and Jones D. (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Appl. Soil. Ecol. 5:29-56.
- Leta A. and Selvaraj T. (2013). Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Trichoderma* Species for the Control of Onion White Rot (*Sclerotium cepivorum* Berk). Plant Pathol. and Microbiol, 4-1:159-164.
- Monteros-Barrientos M., Hermosa R., Cardoza R. E., Gutiérrez S. and Monte E. (2011). Functional Analysis of the *Trichoderma harzianum* *nox1* Gene, Encoding an NADPH Oxidase, Relates Production of Reactive Oxygen Species to Specific Biocontrol Activity against *Pythium ultimum*. Applied and Environ. Microbiol. 77- 9:3009-3016.
- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y. L., Hayes C. K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G. E. and Kubicek C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and paptaiabol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Applied and Environ. Microbiol. 60-12:4364-4370.
- Taylor R. J., Salas B., Secor G. A., Rivera V. and Gudmestad N. C. (2002). Sensitivity of North American Isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to Mefenoxam (Metalaxyl). The American Phytopathol Society, 86-7:797-802.
- Taylor R.J., Salas B., Secor G.A., Rivera V. and Gudmestad N.C. (2002). Sensitivity of north American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). Plant disease 797:802.
- Wilson P. S., Ketola E. O., Ahvenniemi P. M., Lehtonen M. J. and Valkonen J. P. T. (2008). Dynamics of soilborne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum*: effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. Plant Pathol, 57:152-161.
- Woo S. L., Donzelli B., Scala F., Mach R. L., Harman G. E. Kubicek C. P., Del Sorbo G. and Lorito M. (1999). Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects Biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:419-429