

CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURALE DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, AGENT DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE (BAYOUD) DU PALMIER DATTIER

SEDRA, My. H.*

ملخص

إن عزل الفطر*، التسبب في مرض البيوض، لأول مرة من سعف النخيل الموبوء يعطي مجموعات مشيحية فطرية ذات نماذج أصلية تسمى كذلك بالشكل البري في 70 % من الحالات

وعندما ينقل الفطر أربع مرات إلى وسط غذائي اصطناعي تنخفض نسبة الأشكال الأصلية إلى 52.2 %. إذ تم هذا الانتقال على شكل جماعات خلايا فطرية. كما ترتفع هذه النسبة عندما يتم الانتقال بواسطة قطع صغيرة من المجموعات الفطرية أو انباتية البوغ المفرد المعزول منها.

هذا وقد لوحظ كذلك أن هناك علاقة بين أصل عزل السلالات ونسبة الحصول على الأشكال الفطرية النموذجية. من جهة أخرى، إذ يعتبر الوسط MALT من أحسن الأوساط الغذائية الثمانية الذي يناسب أكثر نمو الفطر وإنتاج بويقاته.

إن النتائج المقدمة والمناقشة في هذه المقالة تمكن من تعريف دور بعض العوامل في تغير الخصائص الشكلية والنموذجية للفطر.

****Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis***

كلمات جوهرية: مرض البيوض، الفوزاريوم، التغيرات الموفولوجية الفطرية، النمو المشيحي، إنتاج البويقات

RESUME

Aux premiers isollements effectués à partir des palmes atteintes de Bayoud, le *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* donne naissance à des colonies typiques "type sauvage" dans 72,4% des cas . Au 4ème repiquage sur un milieu de culture artificiel, le pourcentage des formes typiques diminue de 52,2% lorsque le repiquage des cultures se fait par transfert massif du mycélium . Ce pourcentage reste relativement élevé lorsque les colonies transférées sont obtenues par des repiquages monospores ou en petits fragments du mycélium . L'obtention des colonies typiques peut en outre dépendre de l'origine des isolats . Par ailleurs , parmi huit milieux étudiés, le milieu Malt semble le plus favorable à la fois à la croissance mycélienne et la sporulation du parasite . Les résultats présentés et discutés dans cet article ont permis de déterminer le rôle de quelques facteurs dans la variabilité des caractères morphologiques du parasite .

MOTS CLES : *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, variabilité morphologie, croissance mycélienne, sporulation .

ABSTRACT

Strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* have typical characteristics in 72.4% of the cases when they are first isolated from attacked leaves . The 4th time they are subcultured on an artificial medium, the percentage of typical forms diminishes by 52.2% when the subculture is made by massive transfers of mycelium . This percentage remains relatively high when the subculturing is made by monospores or by small fragments of mycelium . The fact to obtain typical colonies may depend on the origin of the strains . However, among 8 studied media, the medium Malt appears the most favorable for mycelial growth and sporulation . The results given and discussed in this article have permitted the determination of the role of some factors in the variability of morphological characteristics of the parasite .

KEY WORDS : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, variability, morphology of the strains, mycelial growth and sporulation.

INTRODUCTION

L'extention géographique de la fusariose vasculaire (Bayoud) sur une large superficie et l'importance des dégâts qu'elle a occasionnés au Maroc et en Algérie sur divers cultivars de palmier dattier (Perreau-Leroy, 1958 ; Djerbi, 1982), incite les chercheurs à caractériser les isolats du *Fusarium* *oxysporum* f.sp. *albedinis* d'origine différente de prélèvement.

Les études précédentes effectuées sur ce parasite ont montré que le champignon présente souvent, aux premiers isolements à partir de fragments de palmier atteint de Bayoud, des cultures typiques appelées "types sauvages" (Chettab *et al.*, 1978 ; Sedra, 1982 ; 1985 ; Djerbi *et al.*, 1985). Ces formes morphologiques sont caractérisées par un mycélium fin, frisé rasant et de couleur rose-saumon et permettent de différencier le parasite des autres *Fusarium* isolés accidentellement du matériel végétal atteint sans recours aux inoculations expérimentales de plantes de palmier.

Cependant, il est souvent difficile de généraliser ces résultats à la population naturelle du parasite et de conserver la forme sauvage en laboratoire. Sedra et Djerbi (1985) ont montré que les cultures monospores permettent non seulement de conserver le type sauvage mais aussi de le restituer à partir de cultures atypiques "dégénérées". Lorsque les conditions de culture sont défavorables, le champignon présente un polymorphisme très marqué (Sedra, 1982). Plusieurs auteurs ont rapporté que les critères morphologiques sont instables chez certains *Fusarium* (Oswald, 1949 ; Snyder et Hansen, 1954 ; Follin et Laville, 1966 ; Booth, 1971).

Il serait très important d'apprécier la stabilité des caractères typiques du champignon d'abord sur un grand nombre d'isolats issus de différentes régions et lors des repiquages successifs sur des milieux de cultures. Ensuite, il est intéressant de connaître s'il existe des variations entre les isolats dans la croissance mycélienne et la sporulation.

MATERIEL ET METHODES

Etude des caractères morphologiques du parasite en fonction de l'origine des isolats

Cette étude a été réalisée sur 36 isolats prélevés de dix variétés et de cinq clones de palmiers situés dans différentes régions phoénicoles (Tableau I). Douze fragments de palmes atteintes par isolat ont été incubés à 25° C sur milieu PDA acidifié (soit 432 isolements au total). Les cultures sont exposées à la lumière fluorescente continue et décrites après six jours d'incubation. Pour simplifier les notations nous distinguons deux formes morphologiques : une forme typique des colonies caractérisée par un mycélium fin, frisé ras et couleur rose-saumon avec de nombreuses sporodochies produites le long des hyphes mycéliennes et une forme dite atypique qui ne présente pas au moins un de ces caractères définis.

Etude de l'effet du nombre et du mode de repiquage sur la morphologie du parasite

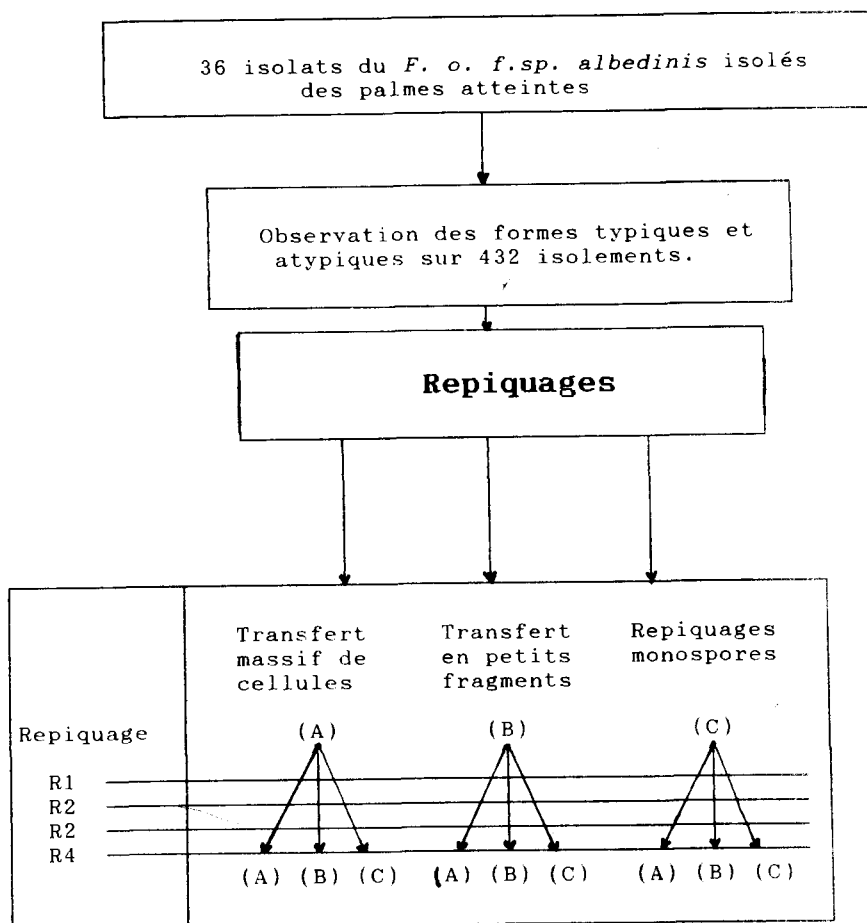
Dans cette étude, trente six cultures typiques et atypiques du champignon sont comparées pendant quatre repiquages successifs sur le même milieu et avec trois modes de repiquage : transfert massif des cellules, transfert en petits fragments du mycélium (>1mm) et transfert des cellules isolées par repiquages monospores. 30 cultures par type de transfert ont été repiquées quatre fois successives (Figure 1). Le taux de maintien des cultures typiques exprimé en pourcentage a été évalué en fonction du nombre et du mode de transfert des cultures.

Tableau I : Morphologie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* en fonction de l'origine des isolats.

Cultivar d'isolement	Nombre de palmiers par cultivar	Situation Géographique	Nombre d'isolement	Pourcentage des colonies typiques
Boufeggous	2	Drâa	24	66,6 b
	7	Tafilalet	84	34 c
Ahardane	6	Zagora (INRA)	72	60 b
Jihel	4	Drâa	48	10,8 d
Iklane	2	Zagora (INRA)	24	66,6 b
Azigzao	2	Zagora (INRA)	24	50 b
Bouslikhène	1	Zagora (INRA)	12	100 a
	1	Tafilalet	12	66,6 b
Ftimi	2	Zagora (INRA)	24	50 b
Mekt	2	Zagora (INRA)	24	100 a
Aguelid	1	Zagora (INRA)	12	16,6 d
Outoukdime	1	Zagora (INRA)	12	100 a
Clone A	1	Zagora (INRA)	12	100 a
Clone B	1	Drâa	12	100 a
Clone C	1	Bani	12	100 a
Clone D	1	Drâa	12	100 a
Clone E	1	Tafilalet	12	100 a
Moyenne				72,4 a

- Colonie typique du parasite = colonies de couleur rose-saumon du mycélium fin et frisé avec de nombreuses sporodochies produites le long des hyphes mycéliennes.
- clones A, B, C, D et E : Palmiers issus de semis naturel dénommés "khalts" et sélectionnés pour leur qualité dattière. Les chiffres suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (test de Newman et Keuls). le nombre d'isolats du parasite par cultivar correspond à celui de palmiers par ce même cultivar.

Fig 1 : Schéma général du protocole expérimental pour l'étude de l'effet du type de repiquage sur les caractères morphologiques du *F. o. f.sp. albedinis*.



Etude de la croissance mycélienne et de la sporulation du parasite sur différents milieux .

- étude de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne de douze isolats du *F.o. f.sp.albedinis* d'origines différentes (Tableau II) a été comparée sur huit milieux : à base d'extrait de pomme de terre (4 types PDA), de légumes (V8) (Rouxel et Bouhot, 1971) , de malt et 2 sont des milieux minéraux (Czapek et Komada (1975)). Pour chaque isolat et chaque milieu, dix boîtes de Petri sont ensemencées avec des pastilles ($\phi = 8\text{mm}$) prélevées sur un mycélium frontal d'une culture du parasite âgée de sept jours . Les boîtes sont incubées à 23-25°C sous éclairage fluorescent continu . Le diamètre moyen des colonies est mesuré tous les deux jours pendant dix jours .

Tableau II : Origine des isolats de *F. o. f. sp. albedinis* étudiés pour leurs croissance mycélienne et sporulation sur différents milieux .

cultivar d'isolement	nombre d'isolats	situation géographique
Boufeggous	5	Drâa, Bani et Tafilalet
Jihel	2	Drâa
Bouslikhène	1	Zagora (INRA)
Bouskri	1	Drâa

- étude de l'influence du milieu de culture sur la sporulation du parasite.

Après 8, 12, 30, et 45 jours de culture du champignon selon la méthode précitée, cinq rondelles ($\phi = 8\text{mm}$) sont prélevées sur la diagonale d'une colonie et mises en suspension dans une solution (50 ml) d'acide acétique N/10 . La solution est chauffée pendant quelques minutes pour hydrolyser la gélose permettant ainsi la libération des spores (mélange de microconidies, macroconidies et chlamydospores) . Après l'agitation de la suspension et l'estimation de la concentration sur la cellule de Malassez, les résultats obtenus sont ramenés au nombre de spores produites par cm^2 de la colonie .

RESULTATS

Caractéristiques morphologiques des isolats du parasite en fonction de leur origine .

Les résultats présentés dans le tableau 1 montrent qu'aux premiers

isolements, le pourcentage des colonies typiques semble lié à l'origine des isolats. Les isolats issus des variétés Bouslikhéne du Tafilalet ; Azigzao, Ftimi, Ahardane et Iklane (Zagora (INRA)) et enfin Boufeggous de Drâa présentent 50% à 66,6% des colonies typiques contre seulement 16,6% à 34% pour les variétés Aguelid et Jihel (Zagora (INRA)) et Boufeggous du Tafilalet .

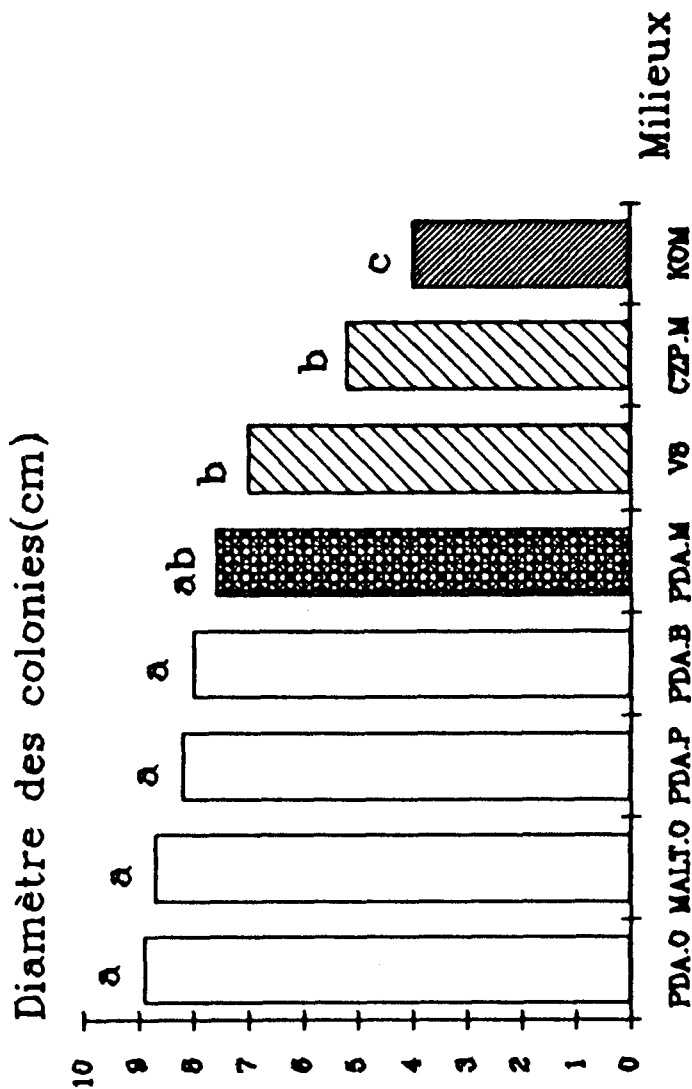
Ce pourcentage atteint 100% pour le reste des isolats prélevés d'autres variétés et clones .

Tableau III : Effet du mode de repiquage des colonies sur la variabilité morphologique des cultures du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* .

Nombre de repiquages	Repiquage par transferts massifs de cellules (A)		Repiquage par transferts en fragments (B)		Repiquages monospores (C)	
	NT	%CT	NT	%CT	NT	%CT
1er repiquage	432 A	56,7	360 A	24,2	372 A	79,5
	186 B	64,5	186 B	86,0	156 B	93,0
	186 C	96,7	186 C	94,6	186 C	97,8
2ème repiquage	216 A	33,8	216 A	20,3	252 A	44,0
	186 B	49,4	186 B	87,0	156 B	88,4
	186 C	88,4	186 C	91,3	186 C	96,2
3ème repiquage	216 A	5	216 A	14,8	432 A	59,2
	180 B	34,9	180 B	85,5	156 B	82,0
	168 C	59,5	168 C	88,8	156 C	97,4
4ème repiquage	78 A	2,6	- A	-	87 A	60,0
	108 B	24,2	108 B	61,1	108 B	71,7
	108 C	55,5	108 C	69,1	108 C	96,3

- NT : nombre de transferts des colonies; %CT : pourcentage des colonies typiques .
- Colonies initialement prélevées des cultures obtenues au premier isolement du parasite de palmes atteintes de Bayoud (A), au 1er repiquage en petits fragments (B) ou 1er repiquage par isolements monospores (C) .
- Au cours des repiquages successifs nous avons transféré à chaque fois 50 % de colonies typiques et 50 % des colonies atypiques .
- Les colonies typiques du parasite sont décrites dans le tableau II .

Fig. 2 : Croissance mycélienne de *F.o. f.sp. albedinis* en fonction de milieu de culture. Chaque point correspond au diamètre moyen de 10 colonies calculé, après 10 jours de culture, à partir de 10 valeurs (moyennes des isolats). Les histogrammes affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p=0.05$ (test de NEWMAN & KEULS). Milieux à base d'extrait de pomme de terre (PDA.O, PDAP, PDA.B, et PDA.M), de légumes (V8), de malt (MALT.O), et d'éléments minéraux (Czapex (CZP.M) et KOMADA (KOM)).



Effet du nombre et de mode de repiquage des cultures *in vitro* sur la morphologie du champignon .

Le Tableau I indique qu'aux premiers isollements à partir de palmes atteintes de Bayoud, les colonies typiques et atypiques représentent respectivement 72.4% et 27.6% en moyenne sur un total de 432 isollements . Les différents groupes morphologiques des colonies ont été décrits et suivis au cours des repiquages successifs .

Le tableau III montre que le taux de maintien des formes typiques des colonies est d'autant plus élevé que la taille des prélèvements du mycélium est plus petite (Planche I, Photos 1 et 2) . Lorsque les repiquages des cultures sont réalisés par transferts massifs, le pourcentage des cultures typiques du parasite diminue de 56.7% au 1ère repiquage à 2.6% au 4ème repiquage . Il demeure par contre relativement élevé lorsque les colonies transférées sont initialement obtenues par repiquages monospores ou en petits fragments . Lorsque les transferts des colonies sont effectués dès le départ en petits fragments ou en cellules isolées, le pourcentage des colonies typiques se maintient au 4ème repiquage à un niveau élevé allant de 60% à 97.8% .

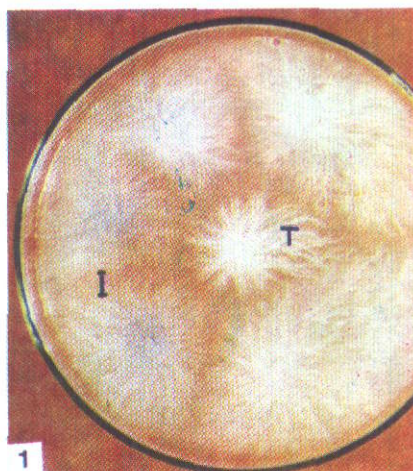
Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne et la sporulation du parasite

L'analyse statistique des résultats n'a pas révélé de différences significatives au seuil $p=0.05$ entre les isolats du parasite pour leur croissance mycélienne sur chaque milieu (résultats non présentés) . Par contre, la figure 2 montre que la croissance du parasite est significativement différente en fonction des milieux de culture (Planche I, Photo 3) . Les milieux les plus favorables sont globalement à base d'extrait de pomme de terre et de malt. Le milieu de Komada apparaît le moins favorable . Par ailleurs, les milieux Czapek et malt suivi de celui de Komada et du V8 se sont révélés les meilleurs pour la production des spores du champignon (moyenne des isolats) (Figure 3) . D'autre part, sur le milieu Komada, une différence significative de sporulation a été observée entre les isolats (Figure 4) . Il est aussi remarquable que la moyenne optimale de sporulation est globalement atteinte à la 3ème semaine de culture .

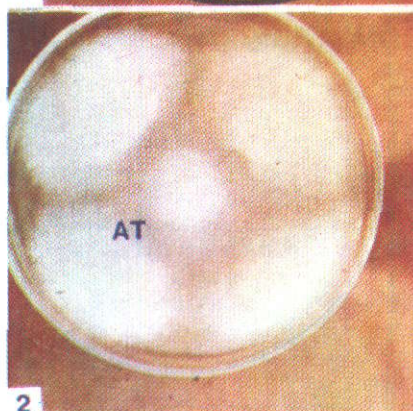
DISCUSSION

Les résultats obtenus sur la caractérisation morphologique de 36 isolats confirment ceux que nous avons trouvés dans les travaux antérieurs (Sedra, 1982; 1985 ; Djerbi *et al.*, 1985) . Cependant, il a été constaté que l'origine des isolats est un facteur non négligeable dans la variabilité de la morphologie des cultures . Au moins dans le cas des isolats étudiés, des différences ont été observées entre isolats issus de la même variété mais provenant de régions différentes . Il a été aussi constaté que, contrairement à l'obscurité, la lumière fluorescente continue, favorise le développement de colonies typiques du champignon (résultats non publiés) .

Indépendamment des isolats, il apparaît que plus le nombre de repiquages par transfert massif du mycélium augmente et plus la perte de la forme typique des colonies s'accroît .



1



2



3

Planche I : Croissance mycélienne et caractéristiques morphologiques du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

Photo 1 et 2 : Cultures typiques du *F. o.* f.sp. *albedinis* (T), atypiques (AT) et intermédiaires (I) sur le milieu PDA. P. Les cultures typiques sont caractérisées par des colonies de couleur rose-saumon, un mycélium fin et frisé avec de nombreuses sporodochies produites le long des hyphes mycéliennes.

Photo 3 : Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne du *F. o.* f. sp. *albedinis*. Cultures âgées de 6 jours développées sur 8 milieux : à base d'extrait de pomme de terre (PDA. P, PDA. O, PDA. M, PDA. B), de légumes V8, Czapeck (CZP. M), Malt (MALT. O) et Komada (KOM). PDA préparé au laboratoire PDA. P, industriel : marques oxoid (PDA. O), BBL (PDA. B), Merk (PDA. M).

Fig. 3 : Sporulation *F.o. f.sp. albedinis* en fonction de temps et de milieu de culture. Chaque point correspond à la moyenne de 10 comptages (moyennes des isolats). Les points (21 jours) affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p=0.05$ (test de NEWMAN & KEULS).

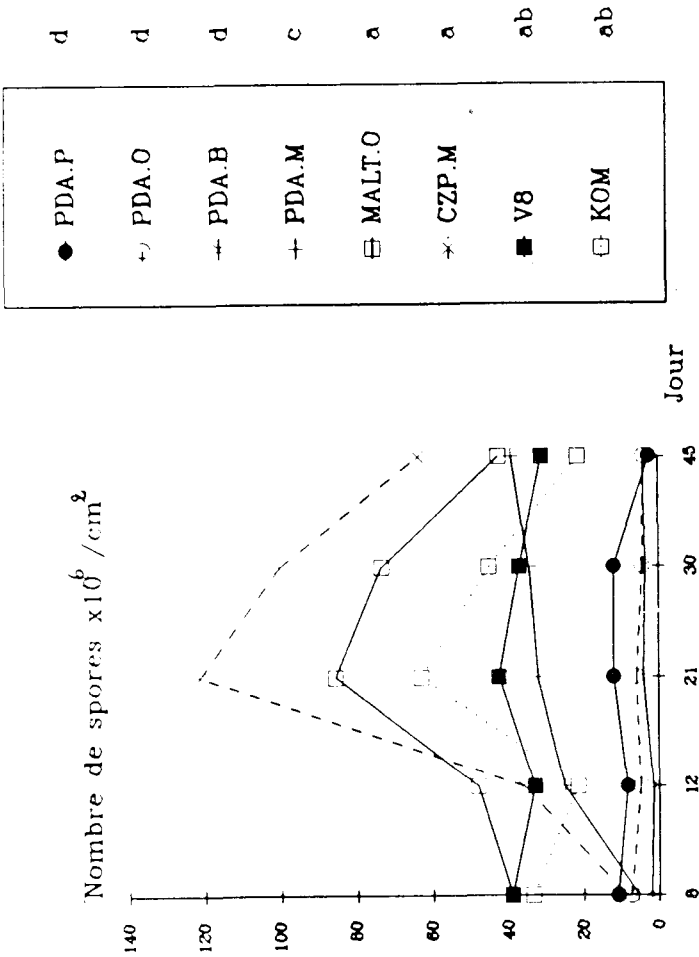
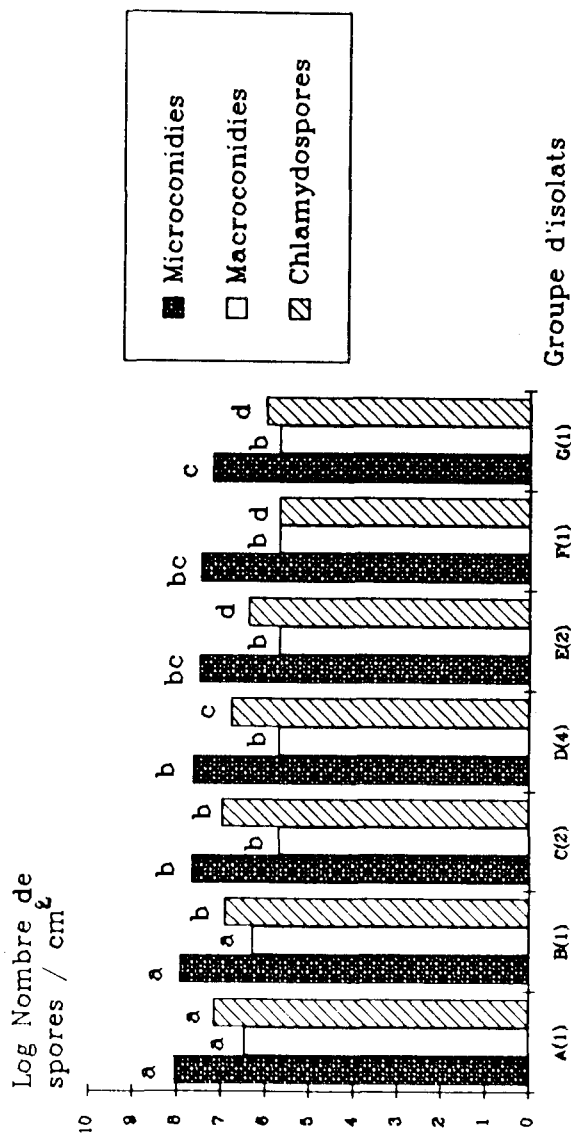


Fig. 4 : Sporulation de *F.o. f.sp. albedinis* à 21 jours appréciée en fonction des isolats sur milieu de KOMADA .
 O : nombre d'isolats par groupe. Les histogrammes affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p=0.05$ (test de NEWMAN & KEULS).



En revanche, à l'aide des transferts monospores, le pourcentage des colonies typiques évalué à 79,5% au 1er repiquage n'a diminué que de 19,5% au 4ème repiquage . Ce type de transfert peut être intéressant dans les opérations de purification et de détermination . Dans le cas du *F.o.* f.sp. *cubense*, Follin et Laville (1966) ont montré qu'il est possible de passer d'un type morphologique à un autre soit par mutation des cultures soit au cours de leurs repiquages successifs . Ils ont ajouté que les microconidies et les extrémités d'hyphes jeunes du mycélium permettent de conserver le type initial de la culture.

Les résultats présentés ont montré aussi que le milieu n'influe pas énormément sur la morphologie du champignon . Par contre, sa croissance mycélienne et sa sporulation sont plus ou moins affectées selon les milieux . Le milieu Malt semble le meilleur pour la croissance et la sporulation ; alors que les milieux tels que Czapek et Komada sont plus favorables à la sporulation qu'à la croissance mycélienne . Compte tenu de ces résultats, il serait très important de voir si les quelques variations observées dans la morphologie dues à un tel facteur s'accompagnent d'une variabilité dans le pouvoir pathogène . D'autre part, la caractérisation morphologique des souches du *F.o.* f.sp. *albedinis* isolées à partir du sol s'impose pour connaître cette fraction de la population du parasite qui est soumise éventuellement à des variations ou mutations dans le milieu complexe comme le sol ou des tissus des plantes connus comme porteurs sains du champignon .

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Besri M. (Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II Rabat) pour ses remarques précieuses et ses suggestions enrichissantes, Mr. Frira D., Assari K. et Chadly F. pour l'aide technique et la réalisation des essais . Mes remerciements vont également à mes collègues du Centre Régional du Haouz-pré-sahara (Marrakech) pour leurs remarques et observations .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOOTH, C. 1971 . The genus *Fusarium*, Commow . Mycol. Inst. Kew, Surry-England . 237p.

CHETTAB, H., D. DUBOST et A. KADA 1978 . Remarques sur l'identification de *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal de la fusariose du palmier dattier, Bull. Agr. Sahar., 1 :

DJERBI, M. 1982 . Bayoud en Algérie, problèmes et solutions . FAO . Regional Project For Palm and Dates Research . Centre in the Near East and North Africa Baghdad . Iraq, 45pp .

DJERBI, M. SEDRA My H. et EL IDRISSI, A.M. 1985 . Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud . Ann. Inst. Nat. Agr. Tunisie, note de Recherche n°1, 58 : 1-8.

FOLLIN, J.C. et LAVILLE, E. 1966 . Variations chez le *Fusarium oxysporum cubense* : Comportement des lignées issues des différents organes de multiplication . Fruits, vol., 21 : 261-268 .

KOMADA, H. 1975 . Development of a selective Medium for quantitative Isolation of *Fusarium oxysporum* from Natural Soil. Rev.of. Plant Protect. Res, 8 : 114-125 .

ORWALD, J.M. 1949 . Cultural variation, taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* species associaed with cereal root rot . Phytopathology, 39 : 359-376 .

PEREAU-LEROY, P. 1958 . Le palmier dattier au Maroc . Inst. Franc. de Recher. Fruit. Outre-Mer (I.F.R.C.) . 142pp .

ROUXEL, F. et BOUHOT, D. 1971 . Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol . IV. Nouvelles mises au point concernant l'analyse sélective et quantitative des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol . Ann. Phytopathol., 3 : 71-188 .

SEDRA, My. H. 1982 . Contribution à l'étude *in vitro* du polymorphisme du *Fusarium oxysporum* f. sp.*albedinis*, agent causal du Bayoud, maladie vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) . C.E.A., Univ. Cadi Ayyad, Marrakech. Maroc .

SEDRA, My. H. 1985 . Potentiel infectieux et réceptivité de quelques sols de palmeraie à la fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud) causée par *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* (Kill. et Maire) . Malençon . Thèse 3ème cycle (Agronomie), IAV H II, Rabat, Maroc .

SEDRA, My. H. et DJERBI, M. 1985 . Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification in vitro du *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal du Bayoud . Ann. Inst. Nat. Agr. Tunisie. Note de Recherches n°2 : 1-12.

SNYDER, W. C. et H. N. HANSEN . 1954 . Variation and specialization in the genus *Fusarium* . Ann. N.Y. Acord, Sci., 60 : 16-23 .