

Université PARIS XI, Université PARIS VI, I.N.A.P.G.

D.E.A. DE PHYTOPATHOLOGIE

1988 - 1989

ETUDE DE LA VARIABILITE SPONTANEE

CHEZ LE

FUSARIUM OXYSPORUM* f. sp. *VASINFECTUM

(ATK) SN et H. : agent de la Fusariose du Cotonnier

Komi ASSIGBETSE

**Maîtres de Stage : C. BOISSON
J.P. GEIGER**

**Stage effectué au Laboratoire de
Phytopathologie du centre ORSTOM
de MONTPELLIER. B.P. 5045
34032 - MONTPELLIER - CEDEX 1**

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Claude BOISSON qui m'a accepté dans le Laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM. Ses enseignements, sa disponibilité et sa rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse. Il m'est agréable de pouvoir lui adresser mes vifs remerciements.

J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur Jean Paul GEIGER pour l'intérêt tout particulier qu'il a accordé à mes travaux ; ses suggestions m'ont permis de mener à bien ce travail. Je lui exprime toute ma reconnaissance.

A Monsieur Jean François DANIEL j'exprime ma profonde gratitude pour le soutien pratique inappréciable qu'il m'a apporté dans mes essais.

Que tous ceux dont l'assistance ou les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail, trouvent ici l'expression de ma très profonde gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS ET DEFINITION DES TERMES

Isolat	:	résultat de l'isolement en culture <i>in vitro</i> d'un agent pathogène à partir de plants de Cotonniers fusariés.
Clone	:	descendance par voie asexuée d'une cellule uninucléée, la microconidie dans le cas du <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>
Sous-clone	:	"clone de clone" : descendance par voie asexuée d'une cellule uninucléée prélevée dans une culture préalablement clonée.
Morphotype	:	population dont tous les individus ont en commun les mêmes caractères morphologiques.
D.O.	:	Densité optique
F.O.V.	:	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>
HR	:	Humidité relative
s	:	semaine
t	:	temps
T°	:	température
U	:	Unité enzymatique
Vol	:	volume
w _I	:	indice de flétrissement

SOMMAIRE

	Pages
I - INTRODUCTION	1
II - MATERIEL ET METHODES	3
2.1 - ISOLATS	3
2.2 - MATERIEL VEGETAL	3
2.3 - MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	4
2.4 - ETUDE DE LA VARIABILITE INTRACLONALE DE LA MORPHOLOGIE ET DE POUVOIR PATHOGENE	4
2.5 - RECHERCHE DE COMPOSANTES DE L'AGRESSION PARASITAIRE	6
III - RESULTATS	9
3.1 - VARIABILITE MORPHOLOGIQUE	9
- Les types morphologiques	9
- Influence de l'âge des cultures sur l'apparition des variants morphologiques	9
- Evolution morphologique des clones maintenus en croissance continue	9
3.2 - VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE	11
- Résultats favorables à l'absence de variations au niveau du pouvoir pathogène	11
- Résultats favorables à l'existence de variations au niveau du pouvoir pathogène	12
3.3 - RECHERCHE DE QUELQUES COMPOSANTES DE L'AGRESSION PARASITAIRE DES CLONES P.A1 et RCA. A6	14
- Recherche d'activités enzymatiques dans les filtrats de culture	15
- Recherche d'activités toxiques dans les filtrats de culture	17
IV - DISCUSSION ET CONCLUSION	19
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

RESUME

La variabilité spontanée de la morphologie et du pouvoir pathogène a été analysée chez trois isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ATK) Sn. et H. et chez trois clones qui en sont issus.

Des variants classés en cinq types morphologiques sont apparus dans la descendance par microconidies des clones. Ils sont d'autant plus abondants que la culture où sont prélevées les microconidies est plus âgée. A part le type cotonneux, ces variants peuvent tous réverser vers le type dont ils sont issus. Le pouvoir pathogène des descendants des clones s'est révélé parfaitement stable, quel que soit leur type morphologique.

D'importantes variations de pouvoir pathogène se sont manifestées fortuitement dans l'isolat RCA, entre les clones qui en sont issus et dans un clone au cours du maintien en culture. Ceci montre que l'instabilité au niveau du pouvoir pathogène n'est pas uniformément répandue dans l'ensemble des isolats.

Deux clones, l'un pathogène, l'autre non pathogène ont été utilisés pour rechercher des différences éventuelles entre quelques composantes de l'agression parasitaire. Des activités inductibles d'enzymes hydrolytiques, notamment cellulolytiques et pectinolytiques ainsi que des activités toxiques ont été révélées dans les filtrats de culture. Dans certains cas, leurs modalités d'expression semblent corrélées au pouvoir pathogène des clones mais les études ne sont pas encore assez avancées pour pouvoir les considérer comme des déterminants du pouvoir pathogène.

Mots clés

<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	
Cotonnier	Variabilité
Morphologie	Pouvoir pathogène

I - INTRODUCTION

Parmi les Champignons agents de maladies vasculaires, le genre *Fusarium* est l'un des plus fréquents et des plus dommageables pour les cultures (NELSON *et al.*, 1981).

Il rassemble de nombreuses espèces phytopathogènes dont le *Fusarium oxysporum* (SCH) SN. et H. qui est l'espèce parasite la plus fréquente et la plus importante de la microflore fongique des sols cultivés (MESSIAEN et CASSINI, 1968). L'espèce *F. oxysporum* comporte un ensemble de formes identiques morphologiquement mais présentant des spécificités parasitaires parfois très étroites, dénommées pour cette raison formes spécialisées. Le *F. oxysporum* f. *sp. vasinfectum* (ATK) Sn. et H. est l'agent responsable de la fusariose du Cotonnier. Cette trachéomyose est répandue dans toutes les grandes régions de culture du Cotonnier et cause souvent des dégâts très importants (HILLOCKS, 1984).

L'instabilité des cultures sur le plan morphologique est un phénomène commun dans le genre *Fusarium*. Elle a amené NELSON (1981) à distinguer différents morphotypes. Elle pose par ailleurs des problèmes au niveau de la reconnaissance des espèces qui est basée uniquement sur des caractères morphologiques. Récemment, l'étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADN nucléaire ou ribosomal dans plusieurs espèces de *Fusarium* a permis de tester la validité de la spéciation basée sur les caractères morphologiques et d'évaluer la distance plus ou moins grande entre les espèces (GUADET *et al.*, 1987 - MANICOM *et al.*, 1987).

L'instabilité des *Fusarium* se manifeste également au niveau du pouvoir pathogène, notamment par l'acquisition et ou la sélection rapide de nouveaux caractères de virulence par suite de l'introduction de nouveaux cultivars (BUXTON, 1958 - BOUHOT, 1980). Ces variations permettraient, selon BOISSON (communication personnelle), d'expliquer l'initiation des épidémies dans les conditions naturelles et l'hétérogénéité des résultats obtenus parfois dans les tests de sensibilité / résistance des espèces végétales en cours de sélection.

Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'expliquer cette instabilité des *Fusarium* : mutations chromosomiques, recombinaisons mitotiques via le cycle parasexuel ou présence d'éléments génétiques transposables (NELSON *et al.*, 1981 - DABOUSSI *et al.*, 1987). Expérimentalement, des variants peuvent être retrouvés par simple tri dans des populations naturelles (BOISSON et LAHLOU, 1983 - DABOUSSI *et al.*, 1987), par mutagenèse artificielle, ou par transformation à l'aide de fragments d'ADN (DABOUSSI *et al.*, 1989 - MALARDIER *et al.*, 1989).

Comme tous les *Fusarium oxysporum*, la forme spécialisée *vasinfectum* (F.O.V.) est instable en culture, les variations portant à la fois sur la morphologie et sur le pouvoir pathogène. ARMSTRONG et ARMSTRONG (1958 à 1980) et IBRAHIM (1966) ont ainsi défini 6 races de F.O.V. en utilisant plusieurs cultivars appartenant à différentes espèces de Cotonniers. Plus récemment, des travaux de SOUOP (1986) et de ASSIGBETSE (1988) ont confirmé l'existence d'une variabilité de grande amplitude de la morphologie et du pouvoir pathogène dans la descendance par microconidies de clones appartenant à plusieurs isolats de F.O.V.

Lorsque les caractères phénotypiques servant de marqueurs sont facilement identifiables et le déterminisme génétique simple (mutants au site de la nitrate réductase du *F. oxysporum*, les mutants étant par ailleurs chlorate-résistant) il est possible d'utiliser, comme l'ont fait entre autres DABOUSSI *et al.* (1989), les techniques de la biologie moléculaire pour étudier le déterminisme des variations. Pour des caractères plus difficilement repérables tels que ceux du pouvoir pathogène, il n'est pas possible d'entreprendre des études semblables si l'on ne possède pas des variants "stabilisés" (c'est à dire qui ne varient plus) de pouvoir pathogène fort, faible ou nul. De tels variants ont été obtenus dans le cas du *Verticillium dahliae* (LAHLOU et BOISSON 1984 ; BOISSON, 1988). Les quelques résultats obtenus précédemment avec le F.O.V. sont encourageants. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier la variation intraclonale spontanée de la morphologie et du pouvoir pathogène chez ce champignon avec un double objectif : apprécier l'amplitude de cette variation spontanée et tenter de la maîtriser afin d'obtenir des variants "stabilisés".

Au cas où notre entreprise serait couronnée de succès, nous devrions rapidement être en possession de variants issus d'un même clone, les uns pathogènes, les autres non pathogènes. De toute évidence, un tel matériel serait d'un grand intérêt pour étudier les supports biochimiques du pouvoir pathogène.

Des études physiopathologiques nombreuses ont été réalisées sur les fusarioses vasculaires (synthèse dans KERN, 1972 - NELSON *et al.*, 1981 - PEGG, 1981) et notamment sur la fusariose du Cotonnier (GHANI, 1964 - MAHJOUR, 1985). Les résultats obtenus par les différents auteurs sont, cependant, quelquefois contradictoires.

D'une manière générale, les *Fusarium* produisent des enzymes pectinolytiques, cellulolytiques et des substances toxiques, mais il ne semble pas y avoir de relation stricte entre cette synthèse ou la nature de ces substances excrétées (sauf dans certains cas pour l'acide fusarique) et la virulence des agents pathogènes.

Nous avons abordé les études de physiopathologie avec le matériel en notre possession sans avoir pu, faute de temps, aller jusqu'au bout de l'expérimentation.

Dans ce mémoire, après la description des matériel et méthode, nous exposerons les résultats obtenus sur la variabilité morphologique, sur la variabilité du pouvoir pathogène et sur les supports biochimiques du pouvoir pathogène.

II - MATERIEL ET METHODE

2.1 - ISOLATS DE F.O.V.

Le *F.O.V.* est un Deutéromycète qui produit 3 types de spores : microconidies, macroconidies et chlamydo-spores (BOOTH, 1977). Parmi les cinq isolats utilisés (tableau 1) F.O.V.P., F.O.V.C I et F.O.V.RCA ont servi de support à la majorité des essais. Tous les isolats à l'exception de l'isolat RCA étaient pathogènes sur Cotonnier au début de l'expérimentation.

Tableau n° 1 : Isolats de F.O.V. utilisés

ISOLATS	ORIGINE	Type morphologique
F.O.V. CI	Côte d'Ivoire	Duveteux
F.O.V. P	Paraguay	Duveteux
F.O.V. RCA	Centrafrique	Ras
F.O.V. Pu	Pérou	Ras
F.O.V. BN	Bénin	Ras

2.2 - MATERIEL VEGETAL

Un cultivar sensible de Cotonnier ISA 205 H (*Gossypium hirsutum*) a été constamment utilisé dans les essais d'inoculation. Les cultivars ASHMOUNI et SAKEL (*Gossypium barbadense*) et SHI-XI-YA1 (*G. arboreum*) ont servi uniquement à la détermination des races de F.O.V. correspondant aux différents isolats. Les graines de Cotonnier ont été gracieusement fournies par J.C. FOLLIN, phytopathologiste à l'IRCT (Institut de Recherche sur le Cotonnier et Textile).

2.3 - MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

- **Le milieu solide** est à base de bouillon de Pomme de terre gélosé (PDA) (Annexe I). Il est réparti selon les besoins, en tubes à essais de 20 ou en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

- **Milieux liquides** : il s'agit de milieu minimum MM (Annexe 1) auquel on ajoute selon les cas, du Glucose (2 %), de la Pectine (2 %), de la Carboxy-méthyl-Cellulose (CMC 1 %) ou un broyat de plants de Cotonnier (10g/100 ml). Les milieux de cultures répartis dans des fioles de Roux contenant 100 ml de milieu sontensemencés avec 1 ml de suspension de spores à une concentration de 10^6 spores/ml.

Toutes les cultures sont incubées à l'obscurité à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à une humidité relative supérieure à 60 %.

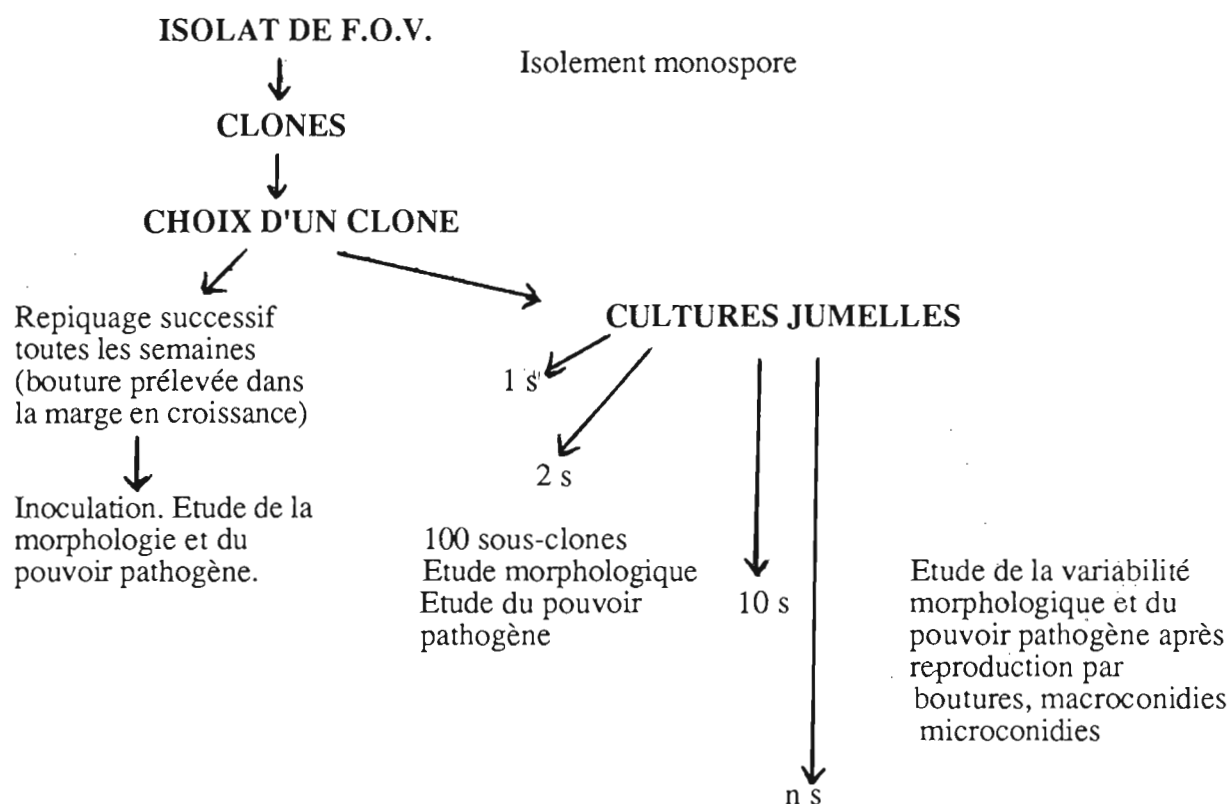
2.4 - ETUDE DE LA VARIABILITE INTRACLONALE DE LA MORPHOLOGIE ET DU POUVOIR PATHOGENE

2.4.1 - Méthode d'étude de la variabilité

Après avoir sélectionné un clone (CIA4 pour F.O.V.CI, PA1 pour F.O.V.P et RCA A6 pour F.O.V. RCA) dont les caractéristiques sont celles de l'isolat dont il provient (morphologie et pouvoir pathogène), celui-ci est traité de deux façons (figure 1) :

- repiquage par bouturages successifs chaque semaine de façon à le maintenir en croissance continue,
- bouturage dans 30 tubes (cultures jumelles) et conservation dans la chambre de culture à 25°C .

Périodiquement, une culture de chaque traitement est inoculée au Cotonnier ; la culture jumelle est également analysée à travers sa descendance par microconidies (morphologie et pouvoir pathogène). Cet essai permet de comparer le devenir de cultures issues d'un même clone, de plus en plus âgées, maintenues en vie saprophytique active (croissance continue) ou en conservation sur un substrat de volume fini.

Figure 1**Méthode d'étude de la variabilité intraclonale des clones de F.O.V.****2.4.2. - Technique d'évaluation du pouvoir pathogène**

L'inoculation est réalisée par trempage racinaire de jeunes plantes de Cotonnier dans une suspension de spores de F.O.V.

Des graines de Cotonnier préalablement désinfectées à l'hypochlorite de calcium (trempage 5 mn dans une solution à 5 %) sont prégermées en boîtes de Pétri pendant 24 heures à 25° C. Elles sont ensuite mises en pépinière en chambre climatique (T° : 28° ; HR : 70 % photopériode 12 heures, éclairage artificiel de 4000 lux) dans du terreau.

L'inoculum est obtenu après lavage de la surface d'une culture d'origine polyspore âgée de 4 jours provenant de l'étalement d'une suspension de spores. Ce mode d'obtention de l'inoculum permet d'éviter d'éventuelles variations morphologiques, phénomène bien connu chez le *Verticillium dahliae* (BOISSON et LAHLOU 1983). La concentration de l'inoculum est déterminée à l'aide de la cellule de MALASSEZ puis ajustée à 10⁶ spores/ml.

L'inoculation des plantes issues de pépinières est faite par trempage rapide du système racinaire dans la suspension de spores (BOUHOT et ROUXEL, 1970) ; en général, 15 plantes par condition ont été utilisées.

La fusariose du Cotonnier se manifeste au travers de symptômes de flétrissement des feuilles et de la plante, de chlorose et de nécrose foliaires suivis de la mort de la plante. Trois types de symptômes sont évalués :

- symptômes foliaires,
- symptômes vasculaires (brunissement des vaisseaux du bois)
- présence du champignon dans les vaisseaux de la plante (réisolement du champignon à partir des tiges).

Un indice de flétrissement, w_I (FOLLIN, 1986), est utilisé pour évaluer le degré de pathogénéicité des isolats et clones.

$$w_I = \frac{30 N_2 + 50 N_3 + 100 N_4}{N_1 + N_2 + N_3 + N_4}$$

- avec :
- N_1 : nombre de feuilles saines.
 - N_2 : nombre de feuilles présentant des symptômes légers (moins du 1/3 de limbe atteint)
 - N_3 : nombre de feuilles présentant des symptômes graves (plus du 1/3 de limbe atteint)
 - N_4 : nombre de feuilles nécrosées ou mortes.

2.5 - RECHERCHE DE QUELQUES COMPOSANTES DE L'AGRESSION PARASITAIRE CHEZ LES CLONES PA1 ET RCA A6

2.5.1 - Recherche d'activités enzymatiques dans les filtrats de culture **Préparation des filtrats de culture**

Les filtrats de culture des 2 clones sont obtenus après centrifugation (6000 t/mn ; 20 mn ; 4°C) des cultures faites en milieux liquides. Ils sont ensuite filtrés sur verre fritté n° 7 et mis en oeuvre pour les tests d'activité enzymatique et de toxicité ; le restant des filtrats peut éventuellement être conservé à - 30°C. Le mycélium est séché au four Pasteur à 110°C pendant 24 heures, puis pesé.

Mesure des activités enzymatiques

Les filtrats de culture étant non purifiés, nous avons d'abord utilisé le test API-ZYM (Technique en Annexe II) pour révéler le spectre d'activités enzymatiques extracellulaire produit par les deux clones sur les différents milieux.

Les activités osidases ont été mises en évidence, plus spécifiquement, par la technique API-OSIDASE . Les cupules API ont été tamponnées avec 50 µl de tampon acétate 0,05 M à pH

4,6. On répartit ensuite dans les cupules 50 ul de filtrat de culture. Après incubation des galeries à 35°C pendant 2 heures, les réactions enzymatiques sont révélées par addition, dans chaque cupule, d'une goutte de NaOH 0,25 N.

Les activités pectinolytiques (PMG) et CM-Cellulose ont été recherchées sur des substrats : pectines et CM-Cellulose en milieu tamponné (tampon acétate 0,05 M, pH 4,6) selon la méthode viscosimétrique d'une part et la technique basée sur la mesure du pouvoir réducteur du milieu réactionnel (résultant de l'accumulation de mono ou oligosaccharides réducteur accompagnant l'hydrolyse des polysides), d'autre part. La première est réalisée à l'aide d'un viscosimètre de BROOKFIELD plongé dans un bain-marie thermostaté à 40°C et contenant le milieu réactionnel suivant : 20 ml CM-Cellulose à 1 % (Sigma) ou 20 ml pectine de citron à 2 % (Sigma) et 1 ml de filtrat de culture. La seconde (dosage des sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse du polymère) est effectuée dans un milieu réactionnel (volume final : 2 ml) contenant les substrats à une concentration égale à 0,1 % pour la CM-Cellulose et 0,2 % pour la pectine de citron. Ce milieu réactionnel est agité durant l'incubation (4 heures) à 35°C. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml de réactif à l'acide dinitro-salicylique (DNS). Le mélange est porté à 100°C durant 5 mn puis refroidi rapidement dans un bain d'eau glacée. La densité optique (D.O.) est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm L'activité enzymatique est exprimée en millimoles du sucre monomère libéré (équivalent glucose) par ml de filtrat de culture par heure.

L'activité Pectine Méthylesterase (PME) a été mesurée par la méthode de titration automatique continue à 30°C (HANCOCK et al., 1964). A 50 ml d'un substrat de pectine de citron à 1 % (pH : 5,9 ; degré d'estérification 74 %) est ajouté 1 ml de filtrat de culture. Le mélange réactionnel est alors titré en continu durant 90 mn avec du NaOH (0,00998 N), au pH enregistré au temps zéro. L'activité exprimée en Unité/ml où 1 unité correspond au volume de filtrat nécessaire pour obtenir la libération d'un microéquivalent de $-H^+$ (provenant de la déstérification de l'ester méthylique en C_6) par mn. L'activité PME est calculée par la formule :

$$\text{Activité en U/ml} = \frac{\text{Volume (ml) NaOH} \times \mathbf{N}_{\text{NaOH}} \times 10^3}{t \text{ (mn)} \times \text{Vol (ml) filtrat}}$$

Où \mathbf{N} est la normalité de la solution de soude utilisée.

Les différentes activités sont ensuite rapportées au poids du mycélium sec produit par les cultures afin de permettre une comparaison de l'effet de la composition des milieux sur l'excrétion enzymatique.

2.5.2 - Recherche d'une activité toxique dans les filtrats de culture

La toxicité des filtrats de culture des clones PA1 et RCA A6 a été recherchée sur les feuilles de Cotonnier à l'aide du test de flétrissement. Ce test a été réalisé systématiquement par absorption racinaire et caulinaire (racines coupées). Dans les 2 cas, les plantules âgées de 15 jours sont trempées dans les filtrats de culture dilués au demi par de l'eau stérile (volume final : 20 ml). Les plantules sont placées en chambre climatique (T° : 28°C ; HR : 70 % ; photopériode 12 heures). L'activité phytotoxique est appréciée 24 heures après le début du test et notée suivant la gravité des symptômes selon l'échelle suivante :

- O : pas de symptômes
 - +
 - ++
 - +++
- : légers symptômes de flétrissement
- : flétrissement prononcé des feuilles et épïnastie des plantules
- : dessèchement complet ou nécrose des feuilles

Les tests témoins sont réalisés dans des conditions comparables et mettent en oeuvre des milieux de culture non ensemencés et de l'eau stérile.

L'effet phytotoxique des filtrats a été également étudié par dépôt de gouttelettes de filtrats de culture sur la face supérieure de feuilles de Cotonnier scarifiées.

Enfin, l'activité biologique des filtrats a été recherchée au travers du test d'inhibition de la croissance de bactéries du genre *Bacillus* cultivées sur milieu LPGA (Annexe I). 30 ul de filtrats sont déposés dans des trous de 0,5 cm de diamètre faits dans le milieu gélosé ensemencé avec les bactéries. Le témoin est réalisé en substituant de l'eau stérile aux filtrats de culture. L'activité toxique est révélée par l'apparition des halos d'inhibition autour des dépôts de filtrats de culture.

Sp : Sporochial
D : Duveteux
C : Cotonneux
R : Ras

III — RESULTATS

3.1 - VARIABILITE MORPHOLOGIQUE

Elle a été étudiée, comme indiqué au chapitre matériel et méthode, dans la descendance par microconidies (100 dans chaque cas) de cultures jumelles de plus en plus âgées, issues d'un clone de chacun des isolats CI.A4, P.A1 et RCA.A6.

La morphologie des thalles maintenus en croissance continue par repiquage hebdomadaire a également été l'objet d'observations régulières.

Les types morphologiques

Plusieurs grands types morphologiques ont été observés parmi les descendants des trois clones. Ils ont été classés en suivant les descriptions de NELSON (1981). Leurs caractéristiques précises sont indiquées en Annexe III. L'aspect du mycélium aérien permet de les identifier comme suit :

type sporodochial : (photo 1 - annexe VII) mycélium duveteux peu épais, parsemé d'amas muqueux de couleur orangée représentant des pionnotes (organe donnant naissance à des macroconidies)

type duveteux : (photo 2 - annexe VII) mycélium aérien peu épais et relativement peu dense

type cotonneux : (photo 1b - annexe VIII) mycélium aérien épais et très serré

type ras : (photo 1 a - annexe VIII) pas de mycélium aérien, aspect muqueux

Influence de l'âge des cultures sur l'apparition des variants morphologiques

Nous entendons par variant morphologique toute culture dont la morphologie est différente de celle du clone d'origine. Rappelons que CI.A4 et P.A1 sont duveteux en début d'expérimentation, RCA. A6 ras.

Les résultats d'un essai qui a duré près de cinq mois sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 Les variations morphologiques observées dans la descendance par microconidies de cultures jumelles d'âge croissant

	CI.A4				P.A1				RCA.A6			
	SP	D	C	R	SP	D	C	R	SP	D	C	R
1 semaine	0	94	4	2	0	100	0	0				100
3 sem.		87	5	8		100						100
5 sem.		78	12	10		100						100
7 sem.		62	21	17		100						100
9 sem.	3	24	18	48		100						100
11 sem.		3	1	96		87	8	4				100
13 sem.		8	3	89	8	54	38	6				100
15 sem.	4	3	0	93	3	59	31	7		63		37
17 sem.		4	2	94		70	25	5		51		49
19 sem.		3	2	92		64	18	18		70		30

Pour le clone Cl.A4, le type d'origine (duveteux) reste très abondant dans la descendance des cultures jeunes (jusqu'à 7 semaines) ; les types cotonneux et surtout ras sont de plus en plus fréquents et, à partir des cultures âgées de plus de 9 semaines, le type ras est très nettement le plus abondant. Il est remarquable de trouver, dans deux descendances (cultures âgées de 9 et 15 semaines) des cultures de type sporodochial.

Pour les clones P.A1 et RCA.A6, les descendants conservent le phénotype d'origine tant que l'âge des cultures est inférieur à 9 et 13 semaines respectivement. Les types cotonneux et ras apparaissent, tout en restant minoritaires, dans les sous-clones de P.A.1 issus de cultures âgées de plus de 9 semaines. Le type sporodochial a été retrouvé dans les descendants des thalles âgés de 13 et 15 semaines. Le type duveteux apparaît et devient le plus abondant dans la descendance des cultures de RCA.A6 âgées de plus de 13 semaines.

Deux conclusions importantes ressortent des résultats précédents.

De toute évidence, la variabilité morphologique se manifeste d'autant plus fréquemment que la culture jumelle dont on étudie les descendants est plus âgée. Ceci est conforme aux faits déjà connus chez les *Fusarium* (NELSON, 1981) ou chez le *Verticillium dahliae* (BOISSON et LAHLOU, 1982).

En revanche, il est plus surprenant de retrouver dans la descendance de cultures âgées, le type sporodochial pour les clones Cl.A4 et P.A1, le type duveteux pour le clone RCA.A6. Ces phénotypes correspondent à ceux des isolats d'origine au moment de leur obtention à partir de tiges de Cotonniers fusariés (Cl.A4 et P.A1) ou de leur sortie de la mycothèque de l'IRCT pour RCA.A6. Cette "réversion" vers le type d'origine a été décrite pour le type sporodochial (NELSON, 1981) ; le type ras avait été considéré par FOLLIN et LAVILLE (1966) comme le terme ultime de l'évolution, ce que ne confirment pas les observations faites avec RCA. A6.

Evolution morphologique des clones maintenus en croissance continue

Les cultures sont, rappelons-le, repiquées chaque semaine à partir de boutures prélevées dans le front de croissance.

Pour Cl.A4 et P.A1, il s'est produit, à partir du 9ème transfert, une modification importante puisque les thalles retrouvent leur faculté de production de pionnotes. Cette aptitude est conservée jusqu'à la fin de l'expérience. Pour RCA.A6, à partir du 10ème repiquage, les thalles retrouvent l'aspect duveteux qu'avait initialement l'isolat RCA (SOUOP, 1986).

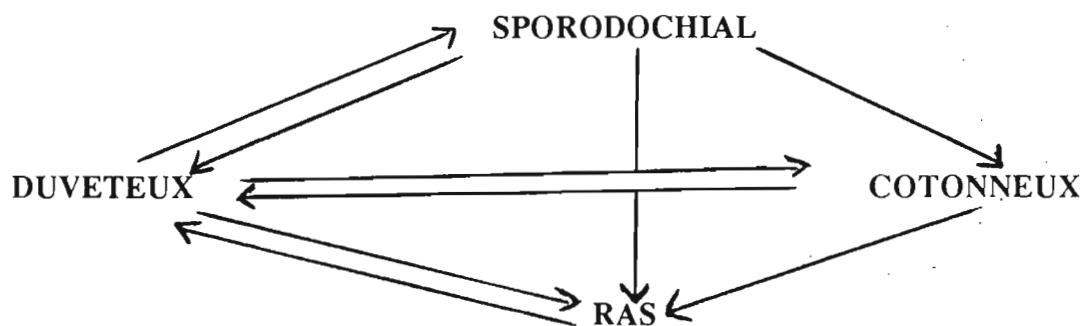
Ces réversions obtenues par maintien des cultures en croissance continue sont assez surprenantes mais avaient déjà été signalées antérieurement (WELLMAN et BLAISDELL, 1941).

Pour compléter ces observations, il faut noter que les variations décrites précédemment dans la descendance de cultures par microconidies se produisent de la même façon dans la descendance par macroconidies. D'autre part, les variants appartenant aux différents types

morphologiques, bouturés ou multipliés par microconidies redonnent fréquemment le type d'origine mais aussi des thalles correspondant aux différents types morphologiques décrits.

De l'ensemble de l'expérimentation, il ressort donc que microconidies et macroconidies portent des informations codant pour des variations morphologiques dont l'origine n'est pas cernée actuellement, variations qui s'expriment dans les thalles régénérés. Ces variations sont la plupart du temps réversibles (figure 2) de sorte qu'il est impossible de les maîtriser.

Figure 2 : Evolution morphologique chez 3 clones de F.O.V.



3.2 - VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE

Résultats favorables à l'absence de variations au niveau du pouvoir pathogène

Les cultures maintenues en croissance continue et les cultures jumelles utilisées pour l'étude de la variabilité morphologique ont été inoculées toutes les deux semaines sur Cotonnier ce qui représente 10 inoculations réparties sur environ 5 mois. Simultanément, quelques sous-clones (une cinquantaine pour l'ensemble de l'expérimentation) ont été également inoculés.

Les sous-clones issus de CIA4, P.A1 et RCA.A6 ont toujours conservé le même pouvoir pathogène que le clone d'origine puisque l'indice de flétrissement, WI est toujours égal à 100 % pour les descendants de CIA4 et PA1, à zéro pour les descendants de RCA.A6. Les variations morphologiques qui affectent certains de ces sous-clones n'ont donc aucune répercussion sur leur pouvoir pathogène.

Les résultats des inoculations à partir des cultures jumelles et des cultures maintenues en croissance continue sont consignés dans les figures 3 et 4. De toute évidence, le pouvoir pathogène reste stable et identique à celui du clone de départ (WI = 98 à 100 % pour CIA4 et P.A1 ; WI = 0 pour RCA.A6).

Figure 3: Pouvoir pathogène des cultures jumelles d'âges croissants

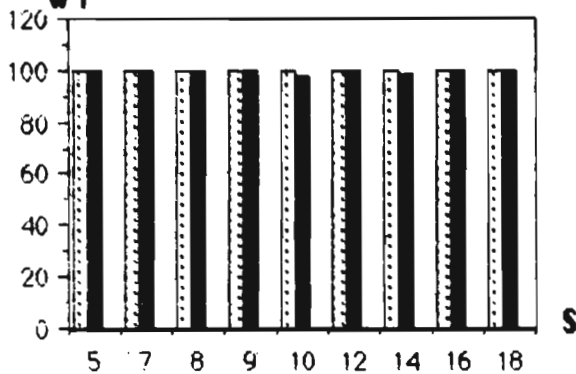
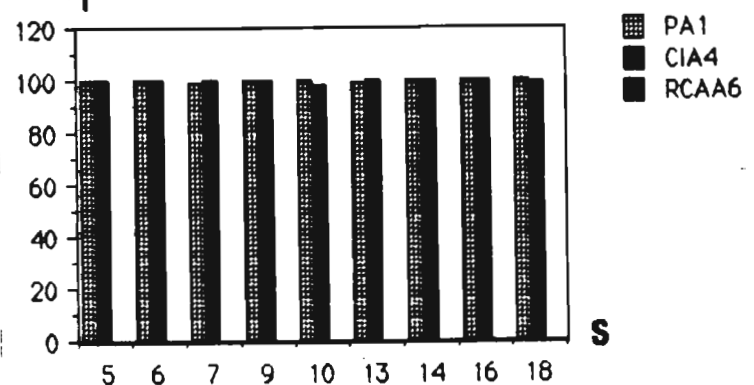


Figure 4: Pouvoir pathogène des cultures issues de repiquages successifs



L'indice de flétrissement, pour chaque condition, représente la moyenne des mesures effectuées sur 15 Cotonniers, 2 semaines après inoculation.

Toute cette longue et pénible expérimentation est donc restée sans résultat, puisqu'elle avait été mise en place dans l'espoir de mettre en évidence des variations du pouvoir pathogène comme l'avaient fait avant nous SOUOP (1986) sur F.O.V. et LAHLOU et BOISSON (1984) sur *Verticillium dahliae*. Comme nous le verrons maintenant, le résultat de cette expérimentation n'est pas aussi négatif qu'il paraît de prime abord.

Résultats favorables à l'existence des variations au niveau du pouvoir pathogène

L'isolat RCA, précédemment étudié par SOUOP (1986) n'a pas montré de variation dans l'étude systématique du pouvoir pathogène exposé ci-dessus. En revanche, c'est dans cet isolat qu'ont été observées fortuitement des variations importantes du pouvoir pathogène.

Avant de décrire les observations récentes, il faut revenir un peu en arrière sur l'historique de cette souche.

L'isolat RCA du F.O.V. a été conservé plusieurs années en collection au laboratoire de Phytopathologie de l'IRCT à MONTPELLIER, avant d'être utilisé par SOUOP en 1986. Celui-ci a entr'autres expériences, testé le pouvoir pathogène (inoculation par piqûre) de 20 sous-clones issus de cultures jumelles d'âges différents et trouvé parmi eux, deux sous-clones non pathogènes. A la suite d'un début d'incendie, la collection de souches de l'IRCT a été perdue. En

avril 88, au début de notre premier stage, nous avons récupéré un "rescapé" de RCA sans savoir s'il s'agissait de l'isolat ou d'un des clones obtenu par SOUOP ; inoculé, par trempage, au Cotonnier, cette culture rebaptisée RCA 1, s'est révélée pratiquement non pathogène (WI = 4 ; 2 et 4 semaines après inoculation). Conservée en culture en tube à 25°C et réutilisée cinq mois plus tard pour une inoculation, en même temps que d'autres isolats, sur des variétés de Cotonniers plus ou moins sensibles à la fusariose, RCA1 a provoqué quelques légers symptômes deux semaines après inoculation et des symptômes très marqués (WI = 60 %) un mois après inoculation. Des tiges de Cotonniers malades a été isolée une nouvelle souche de FOV nommée RCA2.

Repris en début d'expérimentation pour le présent stage, RCA2 a confirmé son pouvoir pathogène (WI = 74 % deux semaines après inoculation) alors que RCA1 demeurait non pathogène.

Cinq clones obtenus par isolement monospore à partir de RCA2 se révèlent non pathogène pour l'un d'entre eux (C3 : WI = 0), très pathogènes pour les 4 autres (WI = 80 à 100 %). Les clones C3 et C5, respectivement non pathogène et très pathogène, qui sont sûrement très proches sur le plan génétique, avaient été choisis pour les études ultérieures de physiopathologie. Malheureusement, le clone C5, inoculé après deux mois de conservation en culture, s'est révélé non pathogène (WI = 0) ce qui a été confirmé par un nouvel essai d'inoculation.

Cet historique détaillé du comportement de RCA et de ses descendants montre que des variations très marquées du pouvoir pathogène sont apparues justement dans l'isolat sur lequel nous n'avons pas prévu d'étude systématique et que ces variations peuvent s'exercer simultanément dans des sens opposés, augmentation ou diminution du pouvoir pathogène. L'enseignement le plus important à tirer de ce comportement de RCA est sans aucun doute que la variabilité du pouvoir pathogène dépend de toute évidence de la souche utilisée. Dans nos essais, les isolats CI et P apparaissent très stables alors que l'isolat RCA est très variable.

Des différences de pouvoir pathogène entre les isolats sont également apparues lorsqu'on utilise simultanément plusieurs espèces et cultivars de Cotonnier. Les résultats consignés dans le tableau 3 font apparaître trois types de comportement :

- l'isolat RCA1 n'étant pas agressif, toutes les réactions enregistrées sont de type résistance.
- l'isolat BN1 n'est pathogène que sur *Gossypium hirsutum* .
- les isolats CI, P et Pu attaquent à la fois *G. hirsutum* et les deux variétés de *G. barbadense* mais pas le *G. arboreum* .

Tableau n° 3**Variabilité du pouvoir pathogène suivant l'origine des isolats**

Espèces et cultivars		<i>G. hirsutum</i>	<i>G. barbadense</i>		<i>G. arboreum</i>
Isolats	Origine	ISA 205 H	Ashmouni	Sakel	SHI-XI-YA1
CI	C. Ivoire	S	S	S	R
P	Paraguay	S	S	S	R
Pu	Pérou	S	S	S	R
BN1	Bénin	S	R	R	R
RCA1	Ctr Afrique	R	R	R	R

S : Sensible
R : Résistant.

L'isolat BN1 diffère donc à la fois de l'autre isolat africain CI et des isolats originaires d'Amérique du Sud P et Pu.

Les cultivars de Cotonniers constituent la gamme d'hôtes normalement utilisés pour la détermination des races de FOV (EBBELS, 1975 - ARMSTRONG et ARMSTRONG, 1980). Les tableaux de détermination des races donnés par ces auteurs ne concordent malheureusement pas et nous ne pouvons dans ces conditions caractériser les races auxquelles appartiennent les isolats utilisés. Ce travail important devra faire l'objet d'une mise au point préalable et être entrepris à partir d'une collection d'isolats de FOV plus large que celle que nous possédons actuellement.

3.3 - RECHERCHE DE QUELQUES COMPOSANTES DE L'AGRESSION

PARASITAIRE DES CLONES PA1 et RCA A6

Recherche d'activités enzymatiques dans les filtrats de culture

Tests API-ZYM et OSIDASE

Tous les tests enzymatiques ont été réalisés sur des filtrats de culture, seuls les enzymes extracellulaires seront donc identifiés.

Débutant cette étude, il nous paraissait important de rechercher la nature des enzymes excrétés, dans différentes conditions de culture, par les deux clones, avant d'entreprendre des mesures quantitatives. Pour ce faire nous avons utilisé deux types de "galeries" : API - ZYM,

d'une part, permettant d'identifier plusieurs catégories d'enzymes (phosphatase, estérases, lipases, protéases, glycosidases) et API - Osidase, d'autre part, permettant de détecter 20 osidases différentes dont certaines (b-glucosidases, arabinase, fucosidase, mannosidase, xylanase ...) sont connues pour intervenir dans la biodégradation des polymères des parois des végétaux (TOUZE, 1972).

Les quatre milieux de culture utilisés ont été choisis pour vérifier l'inductibilité des enzymes (répression catabolique par le glucose, induction spécifique pour la CM - Cellulose et la Pectine). Le milieu "broyat" de Cotonnier" est mis en oeuvre parce qu'il apporte l'ensemble des éléments (substrats, polymères ...) que le champignon trouve dans la plante, *in vivo* ; on doit donc s'attendre à ce qu'il développe le plus largement, sur ce milieu, ses capacités en matière de synthèse d'enzymes extracellulaires.

De manière générale les deux clones excrètent un très large spectre d'enzymes dont la plupart sont inductibles (Annexe III). Qualitativement aucune différence notable ne peut être relevée entre le clone pathogène et le clone non pathogène.

Les recherches au niveau des osidases (Annexe IV) confirment les résultats précédents. On peut noter que parmi les osidases identifiées la b-N-acétyl glucosaminidase semble être constitutive. Le spectre des osidases excrétés par les 2 clones est plus riche dans les filtrats de cultures effectuées sur le milieu "broyat de Cotonnier". Quantitativement des différences entre clone semblent exister ; elles devront cependant être confirmées par des dosages précis permettant d'exprimer ces activités en fonction des masses mycéliennes, très différente d'un milieu de culture à l'autre (sur milieu CM - Cellulose le développement des deux clones est particulièrement faible ; les activités enzymatiques spécifiques, rapportées au poids mycélien, sont donc beaucoup plus élevées que ne le laisse supposer la simple lecture visuelle des "galeries").

Enzymes pectinolytiques et cellulolytiques

L'activité de ces enzymes dans les filtrats de culture a été mesurée de manière quantitative selon les deux techniques classiques : viscosimétrie et pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus par dosage viscosimétrique (4 dosages) concernant les activités pectinolytiques et cellulolytiques des filtrats, n'indiquent aucune présence de l'une ou l'autre enzyme. Un dosage effectué à pH 7,8 a également fourni des résultats négatifs. On pourrait donc penser que l'activité enzymatique est trop faible pour être mise en évidence ou bien qu'elle est de "type EXO" n'entraînant ainsi qu'une faible diminution du degré de polymérisation du substrat.

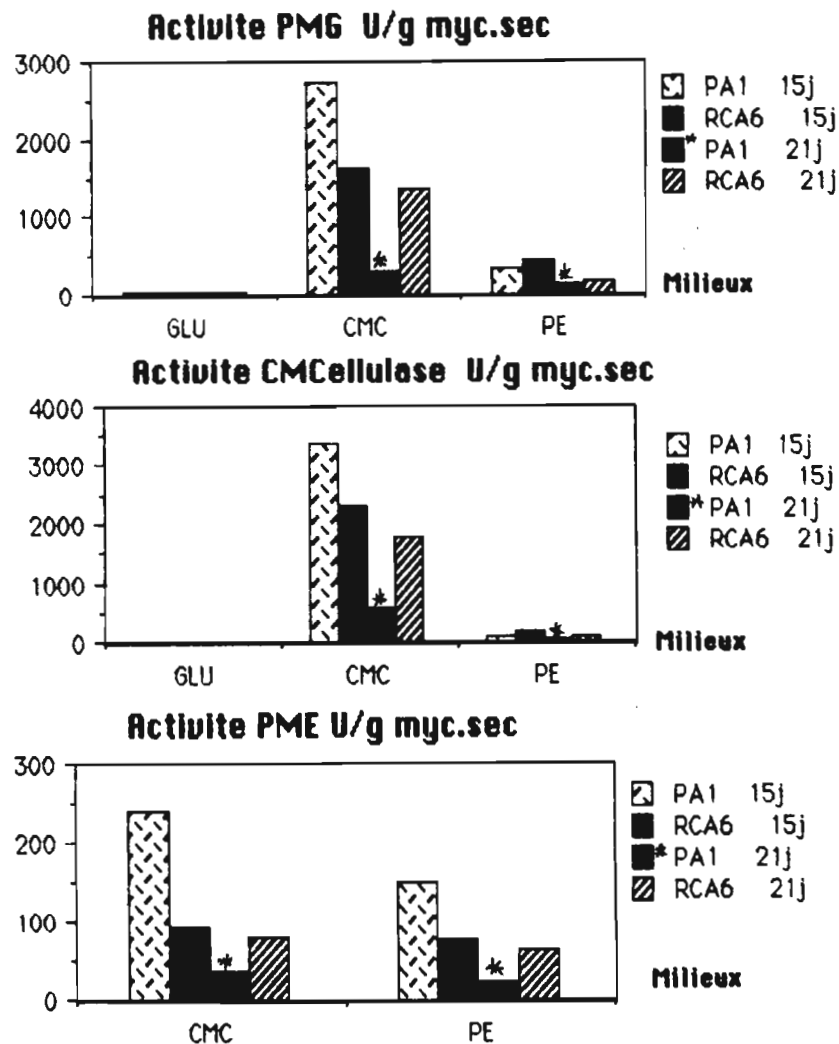
Concernant l'activité pectinolytique, cette étude devra être complétée par l'utilisation de substrats autres que la pectine de citron hautement méthylée. En effet on peut penser qu'il est nécessaire que la pectine soit d'abord déméthylée par une pectine méthyl estérase (PME) avant d'être dépolymérisée par une polygalacturonase, enzyme n'agissant que très faiblement sur la pectine elle-même.

La mesure de l'activité enzymatique par dosage des sucres réducteurs a, par contre, révélé d'importantes activités PMG et CM-Cellulase chez les 2 clones (Fig. 5). Le clone pathogène PA1 a produit plus abondamment et plus précocement les deux types d'enzymes que le clone non pathogène ; ceci pourrait avoir une incidence sur leur comportement parasitaire comme l'avaient déjà montré BARTHE *et al.* (1977) chez *Colletotrichum lagenarium*. L'excrétion précoce des enzymes d'agression est, en effet, considérée comme un facteur favorable au développement du processus pathogénique dans la mesure où, dans ces conditions, la plante hôte ne disposerait que d'une période très réduite pour réagir à l'attaque parasitaire.

Concernant les modalités d'action des deux enzymes, la comparaison des mesures viscosimétriques et des mesures de pouvoir réducteur est en faveur d'une dégradation des substrats selon le mode "exo" (attaque en bout de chaîne et "libération" de mono- et d'oligomères).

Figure 5

Activités Pectinolytique et Cellulolytique des filtrats de cultures des clones PA1 et RCA A6 de FOV



Enfin, ces activités enzymatiques sont très fortes dans les milieux CMC, faibles dans les milieux pectine et presque nulles dans les milieux glucose. Ce résultat indique clairement que les activités PMG et CM-Cellulase des filtrats sont inductibles.

L'activité Pectine méthylestérase (PME) est également présente dans les filtrats des clones (fig. 5). Cet enzyme est inductible puisque son activité est très forte sur milieux CMC et pectine et nulle dans un milieu glucose. Par ailleurs, l'activité PME est importante et apparaît précocement chez le clone pathogène. Ceci vient renforcer l'hypothèse précédemment émise selon laquelle la synthèse précoce abondante des enzymes PMG, PME et CM-Cellulase pourrait jouer un rôle dans la différence de comportement parasitaire des 2 clones; elle pourrait également renforcer l'hypothèse selon laquelle la PME devrait agir sur la pectine pour la transformer en acide pectique ou en acide polygalacturonique avant dépolymérisation.

Recherche d'activités toxiques dans les filtrats de culture

Les résultats du test de flétrissement réalisé sur les plantules de Cotonnier sont présentés en Annexe V. Ces résultats révèlent effectivement la présence de substances toxiques dans les filtrats des clones pathogène et non pathogène puisque 24 heures après le début du test, on a pu noter dans les 2 cas des symptômes de flétrissement des feuilles, d'épinastie des plantules et de nécroses foliaires. Les symptômes de nécrose sont très prononcés avec les filtrats sur glucose et le sont d'autant plus avec le filtrat du clone non pathogène. Les dépôts de gouttelettes de filtrats des 2 clones sur les feuilles ont également entraîné des nécroses foliaires localisées (Photo - Annexe 9). Aucun symptôme similaire n'a été retrouvé sur les témoins. D'après ces essais, il ne semble pas exister de corrélation entre la toxicité des filtrats et le pouvoir pathogène des clones.

D'après les observations, l'activité toxique semble maximale dans les filtrats de culture sur milieu glucose ; il convient cependant de rappeler que c'est sur ce milieu que le développement mycélien est le plus important.

La toxicité des filtrats de culture a également été mesurée à l'aide du test d'inhibition de la croissance des *Bacillus* (Tableau 4). Cette technique a permis de différencier les 2 clones : seul le filtrat du clone pathogène PA1 exerce une action toxique sur ces *Bacillus*, action qui se manifeste par la présence d'un halo d'inhibition autour des dépôts de filtrat (photo 2 - Annexe 8). Ce résultat nous fait avancer l'hypothèse de la présence de toxines, notamment l'acide fusarique ou la lycomarasmine, toxines souvent mises en évidence grâce à leur action inhibitrice sur *Bacillus subtilis* et qui ont été déjà retrouvées chez le *F.O.V.* (MEYER 1967 ; MESSIAEN et MAS 1969 ; MAHJOUB 1985).

Tableau n° 4 :**Activité toxique des filtrats de 2 clones de F.O.V. sur des *Bacillus***

BACTERIES - FILTRATS	PA1	RCA A6
<i>B. brevis</i>	++	----
<i>B. cereus</i>	++	----
<i>B. licheniformis</i>	++	----
<i>B. megatherium</i>	++	----
<i>B. mycoïdes</i>	++	----
<i>B. subtilis</i>	++	----
<i>B. tumefaciens</i>	++	----
<i>B. thuregiensis</i>	++	----

++ : présence de halos d'inhibition (test positif)

---- : absence de halos (test négatif)

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude de l'instabilité spontanée chez le F.O.V. a montré que la variation morphologique se manifeste de façon identique dans l'ensemble des isolats et clones étudiés : on retrouve les mêmes types morphologiques sauf pour l'isolat RCA et le clone RCA.A6 qui n'ont jamais fourni le type sporodochial, et la variation évolue de la même manière.

Quelques différences apparaissent au niveau du pouvoir pathogène des isolats quand on les inocule aux cultivars de Cotonniers habituellement utilisés pour caractériser les races de F.O.V. Les résultats n'ont malheureusement pas permis d'identifier les races auxquelles appartiennent nos isolats. Cette connaissance serait pourtant d'une grande importance tant sur le plan pratique que théorique. L'étude devrait être poursuivie à condition d'utiliser une collection d'échantillons plus large pour représenter correctement les populations correspondant aux différentes zones géographiques.

Le travail exposé dans le présent mémoire a porté plus particulièrement sur la variabilité intraclonale.

Il est apparu que les variants morphologiques sont d'autant plus abondants que les cultures sont plus âgées. Ils appartiennent à différents types qui généralement ne sont pas stables. En effet, à l'exception du type cotonneux qui n'a jamais réversé mais a quelquefois évolué vers le type ras, tous les autres variants peuvent réverser vers le type dont ils sont issus.

Le pouvoir pathogène des descendants des clones Cl. A4 et P.A1 s'est révélé très stable et ceci quel que soit le mode de culture : culture continue par des repiquages hebdomadaires ou maintien en culture en tubes pendant des périodes allant jusqu'à 5 mois. Comme simultanément se manifestent d'importantes variations morphologiques, la conséquence est que les deux types de variation sont tout à fait indépendants l'un de l'autre, ce que d'autres auteurs avaient déjà constaté (TOLMSOFF, 1972 - PUHALLA *et al.*, 1981).

De ces études, il ne faudrait pas conclure que le pouvoir pathogène du F.O.V. est stable. En effet, dans l'isolat RCA et dans certains clones qui en sont issus, des variations importantes ont été observées (augmentation du pouvoir pathogène de l'isolat RCA - perte de pouvoir pathogène du clone RCA2. C5). En revanche, la descendance du clone RCA.A6 s'est révélée très stable.

En conclusion, les caractéristiques essentielles de la variabilité chez le F.O.V. sont les suivantes : abondance des variants surtout de ceux qui portent sur l'aspect morphologique ; réversibilité ; en ce qui concerne le pouvoir pathogène, différence entre les isolats, certains pouvant varier abondamment et d'autres être parfaitement stables.

Ces caractéristiques permettent d'éliminer certaines hypothèses sur le déterminisme des variations, notamment la mutation spontanée.

Elles correspondent par contre à ce que l'on peut attendre de variations dues à des éléments génétiques transposables, hypothèse mise en avant pour tenter d'expliquer les instabilités génétiques observées chez le *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (DABOUSSI *et al.*, 1987). Les variants que nous utilisons sont malheureusement plus difficilement identifiables que les mutants au site de la nitrate-réductase, objets des études réalisées sur le *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (DABOUSSI *et al.*, 1989).

L'examen général des variations chez le F.O.V. fait apparaître un autre caractère intéressant. Il semble que l'ancienneté de l'isolat ou du clone soit favorable à la variabilité. C'est le cas de l'isolat RCA qui a été conservé longtemps en collection. Pour les clones, CI.A4 et P.A1, les variants morphologiques ont été plus abondants et sont apparus plus tôt en 1989 qu'en 1988 juste après leur isolement. Tout se passe donc comme si des potentialités de variation s'accumulaient au cours du temps et rendaient les isolats ou clones de plus en plus variables quand ils vieillissent ; ceci a déjà été décrit chez le *Septoria nodorum* (HOOKER, 1957).

Des activités enzymatiques - PMG et CM-Cellulase de type "exo", PME et osidases ont été retrouvées dans les filtrats des 2 clones. Elles sont plus fortes et sont détectées plus précocement dans les filtrats du clone pathogène. Mais ces résultats ne suffisent pas pour démontrer l'implication de ces enzymes dans la pathogénicité. Déjà Mc DONNELL (1962), PEGG (1981) et VIRK *et al.* (1982) n'avaient pas trouvé de rapport entre les activités pectinolytiques et cellulolytiques des *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi* et *F. oxysporum* f. sp. *sesami* et leur virulence. Il serait souhaitable de montrer le rôle de ces enzymes dans le pouvoir pathogène de F.O.V. en les recherchant plutôt directement au niveau des interactions Cotonnier / F.O.V.

Les filtrats des 2 clones présentent des activités phytotoxiques. En effet, les symptômes de flétrissement et de nécroses foliaires observés sur les plants traités par les filtrats, correspondent à une perte d'eau, conséquence de l'augmentation de la perméabilité des membranes cytoplasmiques. La toxicité du filtrat du clone pathogène sur les *Bacillus* en particulier *B. subtilis* pourrait indiquer la présence de toxines du genre acide fusarique ou la lycomarasmine, toxines déjà mises en évidence chez la plupart des *Fusarium oxysporum* (KUO et SCHEFFER, 1964 ; MAHJOUB, 1985). Des techniques de purification et de dosage de nos filtrats nous permettront de révéler la nature et le rôle de tous ces composés biologiquement actifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARMSTRONG J.R. et ARMSTRONG G.M., 1958 - A race of the cotton-wilt *Fusarium* causing wilt of yelredo soybean and flue-cured tobacco. Plant Disease Reporter 42, 147-151.
- ARMSTRONG G.M. et ARMSTRONG J.K., 1960 - American, Egyptian and Indian cotton-wilt fusaria. Cotton Growing Review 1975,52,303.
- ARMSTRONG G.M. et ARMSTRONG J.K., 1978 - A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. Plant Disease Reporter 62, 421-423.
- ARMSTRONG G.M. et ARMSTRONG J.K., 1980 - Race 6 of the cotton-wilt *Fusarium* from Paraguay. Plant Disease 64, 596.
- ASSIGBETSE K.B., 1988 - Etude de la variabilité intraclonale du pouvoir pathogène et de la morphologie dans la descendance par microconidies de trois isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* agent causal de la fusariose du cotonnier. Mémoire DAT ESAT CNEARC (1987-1988) 62 p.
- BARTHE J.P. et REME A.M., 1977 - Polygalacturonase et pathogénie chez *Colletotrichum lagenarium* (PASS) EL et H. 13ème colloque de la SFP. Mai 1977. In Ann. Phytopathologie, 1977, 9 (4) 541-551.
- BOISSON C. 1988 - Intérêts des variants hyalins du *Verticillium dahliae* pour la sélection des variétés de tomates résistantes à la Verticilliose. C.R. 2ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes - ANPP - Bordeaux 1988, 527-534.
- BOISSON C. et LAHLOU H., 1982 - Etudes du polymorphisme intraclonal chez le *Verticillium albo-atrum*, forme à microsclérotos. II - Influence de l'âge des thalles sur leur descendance par microconidies. Can. J. Bot. Vol. 60, p. 19-25.
- BOISSON C. et LAHLOU H., 1983 - Etude du polymorphisme intraclonal chez le *Verticillium albo-atrum*, forme à microsclérotos. II - L'aptitude à varier chez les variants morphologiques. Can. J. Bot., Vol. 61 (12) 3536-3542.
- BOOTH C., 1977 - "*Fusarium*". Laboratory guide to the identification of the Major species. Commonwealth Mycological Institute - Kew - England. 58 p.
- BOUHOT D., 1981 - Some aspect of the pathogenic potentialities in formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* on cucurbitaceae. In "*Fusarium*" : Diseases, biology and taxonomy. 318-328. (The Pennsylvania State University Press. University Park and London.
- BOUHOT D. et ROUXEL F., 1970 - Deux techniques de détermination du pouvoir pathogène des *Fusarium oxysporum*. Annales de Phytopathologie 2, 591-594.
- BUXTON E.W., 1958 - A change of pathogenic race in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* induced by root exudat from a resistant host. Nature, 1981 : 1222-1224.
- DABOUSSI M.J., DEVOS C., GERLINGER C. et BRYGOO Y. 1987 - Etude d'instabilités génétiques chez *Fusarium oxysporum*. In : 1er Congrès de la S.F.P. 1987, P. 21.

- DABOUSSI M.J., DJEBALLI A., GERLINGER C., BLAISEAU P.L., BOUVIER I., CASSAN M., LEBRUN M.H., PARISOT D. et BRYGOO Y., 1989 - Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans* Curr. Genet. (1989) 15 : 00-00, 4 p.
- EBBELS, D.L., 1975. *Fusarium* wilt of cotton : A review with special reference to Tanzania. Cotton Grow. Rev. 52 : 295-339.
- FOLLIN J.C., 1986 - La sélection du Cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) pour la résistance aux maladies présentes en Afrique au Sud du Sahara. Supplément à Coton et Fibres Tropicales 1986, 30 p.
- FOLLIN J. C. et LAVILLE E., 1966. Variation chez le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (agent causal de la maladie de Panama du Bananier). Comportement des lignées issues des différents organes de multiplication. Fruits 21 (6) 261-268.
- GUADET J., JULIEN J., LAFAY J. F. et BRYGOO Y., 1987 - Taxonomie des *Fusarium* : Arbre phylogénétique. In Congrès de la S.F.P. RENNES 1987.
- GHANI Y., 1964 - Studies on *Fusarium* wilt of Cotton. Production of pectinases, cellulases and growth promoting substances. Phytopathol. medit. III, 2, 71-72.
- HANCOCK J.G., MILLAR R.L. et LORBEER W.J., 1964. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Botrytis allii*, *B. cinerea* in vitro and in vivo. Phytopathology : 54, 929-931.
- HILLOCKS R.J., 1984 - Production of cotton varieties with resistance to *Fusarium* wilt with special reference to Tanzania. Tropical Pest Management 30, 234-246.
- HOOKER A.L., 1957 - Cultural variability in *Septoria avenae* through successive single-macrospore transfers. Phytopathology 47 : 460-468.
- IBRAHIM F.M., 1966 - A new race of cotton wilt *Fusarium* in the Sudan Gezira. Cotton Browing Review 1975, 52, 303.
- LAHLOU H. et BOISSON C., 1984 - Variabilité intracloonale du pouvoir pathogène du *Verticillium albo-atrum* R. et B. forme à microscélérotés, vis-à-vis de la Tomate. In : Les Colloques de l'INRA, 26, 70-78.
- KERN H., 1972 - Phytotoxins produced by *Fusaria* . In Phytotoxins in Plant Diseases Ed. by WOOD et GRANITI PP. 35-48. Acad. Press London, New York.
- KUO M.S. et SHEFFER R.P., 1964. Evaluation of fusaric acid as a factor in development of *Fusarium* wilt. Phytopathology. 54, 104-144.
- MAHJOUR M., 1985 - Susceptibilité variétale du melon à la fusariose vasculaire. Approche biochimique et ultrastructurale - Thèse d'Etat (1985) 171 p.
- MALARDIER L., DABOUSSI M.J., JULIEN J., ROUSSEL F., SCAZZOCCHIO C. et BRYGOO Y., 1989 - Closing of the nitrate reductase gene (nia D) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum* . Gene 78 (1989) 147-156.
- MANICOM B.Q., BAR-JOSEPH M., ROSNER A., VIGODSKY-HAAS H. et KOTZE J.M., 1987 - Potential Applications of Random DNA Probes and Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Taxonomy of the *Fusaria* . Phytopathology 77 (5) 669-672.
- Mc DONNELL K., 1962 - Relationship of pectic enzymes and pathogenicity in the *Fusarium* wilt of Tomatoes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 45 (1) 55-62.

- MESSIAEN C.M. et CASSINI R., 1968 - recherches sur les Fusarioses. IV - La Systématique des *Fusarium* . Ann. Epiphyties 19 (3) 387-454.
- MESSIAEN C.M. et MAS P., 1969 - Recherches sur les Fusarioses - VI - Mise au point sur l'activité parasitaire du *Fusarium oxysporum* et sur les divers facteurs rendant les plantes plus ou moins sensibles aux fusarioses vasculaires Ann. Phytopathology, 1 (3) 401-426.
- MEYER J.A., 1967 - Ecologie et pathogénie du *Fusarium oxysporum* . Ann. Epiphyties, (18) 2, 241-248.
- NELSON P.E., 1981 -Life cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum* . In Fungal wilt diseases of plants. MACE M., BELL A. et BECKMAN C. 1981 - Ed. Academic Press. 51-78.
- NELSON P.E., TOUSSON T.A. et COOK R.KJ., 1981 - "*Fusarium* " . Diseases, Biology and Taxonomy. Penn. Stat. Univ. Press. (1981) 457 p.
- PEGG G.F., 1981- Biochemistry and physiology of pathogenesis - In : MACE M.E., BELL A.A. et BECKMAN C.H. (1981) Fungal wilt diseases of plants. Ed. Academic Press 640 p.
- PUHALLA J.E. et BELL A.A., 1981 - Genetics and Biochemistry of wilt pathogens. In : MACE M.E., BELL A.A. et BECKMAN C.H. (1981) Fungal wilt diseases of plants. Ed. Academic Press. 640 p.
- SOUOP D., 1986 - Etude de la variabilité intraconale du pouvoir pathogène et de la morphologie dans la descendance par microconidies de quatre isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* : agent causal de la Fusariose du Cotonnier. Mémoire de D.A.T. CNEARC (1985-1986) 42 p.
- TOLMSOFF W.J., 1972 - Diploidization and heritable gene repression as major sources for variability in morphology metabolism and pathogenicity for *Verticillium* species. Phytopathology. 62 (4) 407-413.
- TOUZE A., 1972 - La dégradation enzymatique des parois cellulaires des végétaux par les parasites fongiques. Phytopathology 1972, 4 (3) 285-293.
- VIRK K.S. et GEMAWAT P.D., 1983 - Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* . Indian, J. mycol. and Plant. Pathol. 13 (3) 357-359.
- WELLMAN F.L. et BLAISDELL D.J., 1941 - Pathogenic and cultural variation among single spore isolates from strains of the tomato-wilt *Fusarium* . Phytopathology, 31 (2) 103-120.

ANNEXE I

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Composition du milieu minimum (MM)

KH ₂ PO ₄	1 g
Mg SO ₄	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.1 g
Na NO ₃	2 g
eau	1000 ml

Composition des milieux liquides de culture

1	-	MM	+	Glucose (2 %)
2	-	MM	+	Carboxymethyl - Cellulose (1 %)
3	-	MM	+	Pectine de citron (2 %)
4	-	MM	+	Broyat de plantes (10 %)

Milieu PDA (PDA de Biomérieux - réf. 51411)

Infusion de Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Gélose	5 g
Eau	1000 ml

Milieu LPGA (culture des Bactéries pour les tests de toxicité)

Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
Glucose	5 g
Agar-agar	15 g
Eau	1000 ml
PH 7	

ANNEXE II

DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA TECHNIQUE API ZYM (= 2520)

Les galeries API ZYM utilisées sont composées de 20 cupules contenant chacune un substrat spécifique et tamponné.

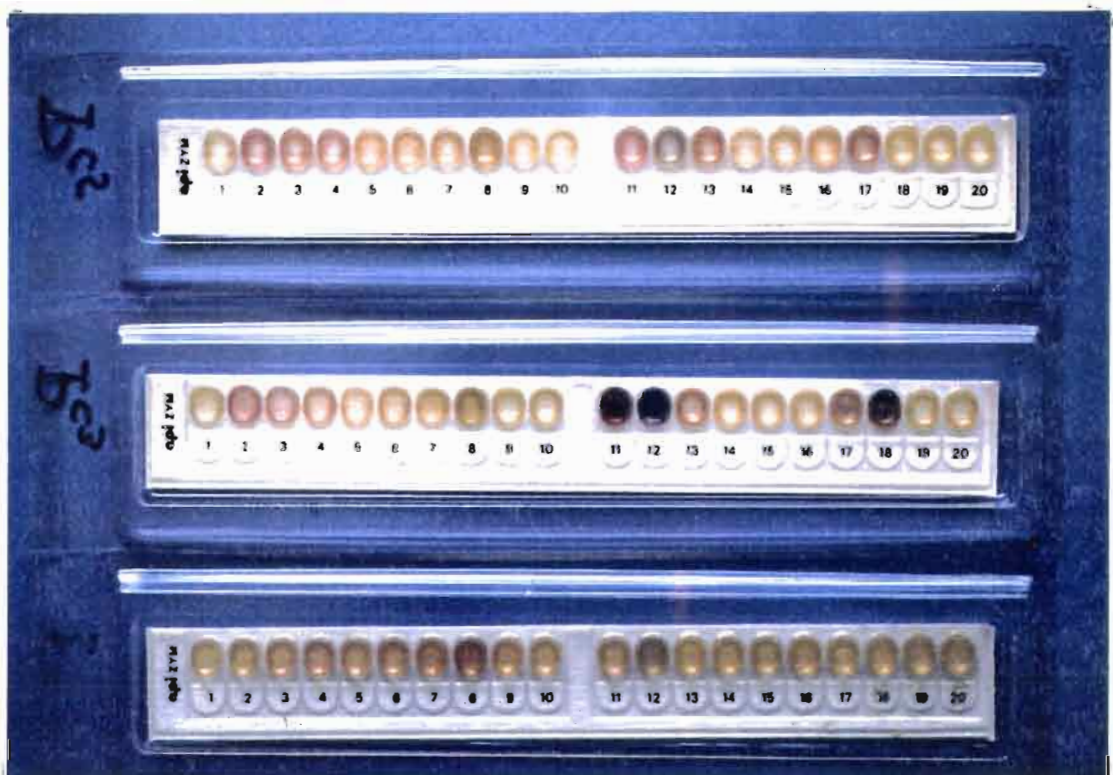
Préparation de la galerie :

- on répartit dans la galerie 65 ul de filtrat de culture
- la galerie est mise à incuber à 37° pendant 4 heures.

Lecture de la galerie :

Après incubation on ajoute une goutte de réactif ZYM A (mouillant) et une goutte de réactif ZYM B (Forest Blue B 13) dans chaque cupule. On laisse les colorations se développer, puis une note visuelle est donnée suivant l'intensité des réactions obtenues selon une échelle proposée par le fournisseur.

Exemple de réactions API ZYM obtenues :



ANNEXE III

CARACTERISTIQUES DES VARIANTS MORPHOLOGIQUES DE 3 CLONES DE F.O.V.

CIA4

Aspect du mycélium (texture)	Couleur du mycélium	Pigmentation du thalle	Crois. Asp. marge de la culture	Sporulation			Types d'organes fructifères			Morpho types
				m	M	CH	SP	Pi	Scl	
Duveteux	Blanc reflet mauve	Mauve Violette	Forte diffuse	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Sporodochial
Duveteux	Blanc reflet mauve	Violette Mauve	Forte diffuse	++	+	++	+	-	-	Duveteux
Cotonneux	Blanc reflet violet	Violette	Forte diffuse	+++	+++	+++	+++	-	-	Cotonneux
Ras intramatriciel	---	Absente	Forte diffuse	+++	+++	+++	++	-	-	Ras

PA1

Aspect du mycélium (texture)	Couleur du mycélium	Pigmentation du thalle	Crois. Asp. marge de la culture	Sporulation			Types d'organes fructifères			Morpho types
				m	M	CH	SP	Pi	Scl	
Duveteux	Blanc	Mauve Brune Absence	Forte diffuse	+++	+++	+++	++	-	-	Duveteux
Duveteux	Blanc	Mauve Brune	Forte diffuse	+++	+++	+++	++	+++	+++	Sporodochial
Cotonneux	Blanc reflet violet	Violette	Forte diffuse	++	+	++	+	-	-	Cotonneux
Ras intramatriciel	---	Mauve absence	Forte diffuse	+++	+++	+++	++	-	-	Ras

RCA A6

Aspect du mycélium (texture)	Couleur du mycélium	Pigmentation du thalle	Crois. Asp. marge de la culture	Sporulation			Types d'organes fructifères			Morpho types
				m	M	CH	SP	Pi	Scl	
Ras intramatriciel	-	Mauve Rouge	Forte diffuse	+++	+++	+++	+++	-	-	Ras
Ras avec mycélium duveteux	Blanc	Violette	Forte diffuse	+++	+++	+++	+++	-	-	Duveteux

Type de spore

m = microconidie
M = macroconidie
CH = chlamydospore

Abondance des spores

+ = faible
++ = abondant
+++ = très abondant
- = absence

Types d'organes fructifères

m SP = sporodochies
M Pi = pionnotes
CH Scl = sclérotés

ANNEXE IV

RESULTATS DU TEST API ZYM EFFECTUE A PARTIR DE FILTRATS DE CULTURES
DES CLONES CI.A4 ; P.A1, RCA. A6 SUR MILIEU MINIMUM AVEC DIFFERENTES
SOURCES DE CARBONE

a) Filtrats CMC

Activités enzymatiques	PA1	RCA A6
Esterase (C4)	++	+
Esterase lipase (C8)	+++	++
Trypsine	+++	-
β.D. glucosidase	++++	++++
β.D. glucosaminidase	++++	++++

b) Filtrats broyat

Activités enzymatiques	PA1	RCA A6
Phosphatase alcaline	++	++
Esterase (C4)	+	+
Esterase lipase (C8)	+++	+++
Leucine arylamidase	++	+++
Trypsine	++++	++++
Phosphatase acide	+	+
β. D. galactosidase	+++	+++
β. D. glucosidase	++++	++++
β.D. glucosaminidase	++++	++++
β. D. fucosidase	++	-

c) Filtrats Pectine

Activités enzymatiques	PA1	RCA A6
Esterase (C4)	+++	++
Esterase lipase (C8)	++	++
Trypsine	+++	+++
Phosphatase acide	++++	+
Phosphatase hydrolase	++++	+
β.D. glucosidase	+	++
β.D. glucosaminidase	++++	++++

d) Filtrats Glucose

Activités enzymatiques	PA1	RCA A6
Esterase (C4)	+++	+++
Esterase lipase (C8)	+++++	+++++
Lipase (C14)	++	++
Leucine arylamidase	+++	++
Trypsine	+++	++++
Phosphatase acide	+	++
β.D. glucosidase	++	+
β.D. galactosidase	++++	++++
β.D. glucosaminidase	++++	++++

- : absence d'activité enzymatique
- + : quantité de substrat hydrolysé (estimation visuelle d'après une échelle de lecture
- + : 5 nanomoles
- ++ : 10 nm
- +++ : 20 nm
- ++++ : >/ 40 nm

ANNEXE V - RESULTATS TEST OSIDASE EFFECTUE A PARTIR DE FILTRATS DE CULTURES DES CLONES CI.A4 ; P.A1, RCA.A6 SUR MILIEU MINIMUM AVEC DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE

Filtrats provenant du milieu

Glucose

Activités enzymatiques	8e jour		15e jour		24 jour	
	PA1	RCA6	PA1	RCA6	PA1	RCA6
β.D. glucosidase	+	+	+	++	+++	++
β.D. glucosaminidase	+++	+++	++++	+++	+	+

C M C

Activités enzymatiques	8e jour		15e jour		24 jour	
	PA1	RCA6	PA1	RCA6	PA1	RCA6
β.D. galactosidase	++	+	+	+	+	+
β.D. glucosidase	++++	+++	++++	++++	+++	+++
β.D. glucosaminidase	++++	+++	++++	++++	+++	+++
β.D. xylosidase	+	+	+	+	+	+

Pectine

Activités	8e jour		15e jour		24 jour	
	PA1	RCA A6	PA1	RCAA6	PA1	RCAA6
α.D. galactosidase	++	++	+	+	+	+
β.D. galactosidase	+	-	+	+	-	-
α.L. rhamnosidase	++	+	+++	+	+	++
β.L. arabinosidase	+++	++	+++	+	+	+
β.D. glucosidase	++++	+++	++++	++++	+++	++++
β.D. glucosaminidase	++++	+++	+	+	+	+
β.D. xylosidase	+	+	+	+	+	+

Broyat

Activités	8e jour		15e jour		24 jour	
	PA1	RCA A6	PA1	RCAA6	PA1	A6
β.D. galactosidase	++++	+++	++	++	+	+
β.D. galactosidase	++	++	+	+	+	+
α.L. arabinosidase	++	++	++	++	++	++
β.D. glucosidase	++++	+++	++++	++++	+++	+++
β.D. glucosaminidase	++++	++++	++++	+	+	+
α.L. fucosidase	++	-	+	+	+	-
β.D. xylosidase	+	+	+	+	+	+

- : absence d'activité enzymatique
 + : activité faible
 +++ : forte activité

++ : activité moyenne
 ++++ : très forte activité

ANNEXE VI TOXICITE DES FILTRATS DE CULTURE SUR LES PLANTES DE COTONNIER

Filtrats clones		Glucose	Pectine	CMC	Broyat
PA1	c	++	+++	++	+
	R	++	+++	++	+
RCAA6	C	+++	+++	++	+
	R	+++	++	++	+

13e jour

Filtrats clones		Glucose	Pectine	CMC	Broyat
PA1	c	+++	+	+++*	+
	R	+	+	+++*	+
RCAA6	C	+++	++	+++	++
	R	+++	+	+++	++

24e jour

Filtrats clones		Glucose	Pectine	CMC	Broyat
PA1	c	+++	+	++	+
	R	++	+	++	+
RCAA6	C	+++	++	+++	++
	R	+++	+	+++	++

Témoins

Filtrats	Glucose	Pectine	CMC	Broyat	Eau
c	0	+	+	0	0
R	0	0	0	0	0

C = racines coupées
O = pas de symptômes
++ = flétrissement prononcé
***** = flétrissement foliaire et épinastie des plantules

R = avec racines
+ = léger flétrissement
+++ = dessèchement complet, nécrose

ANNEXE VII

TYPES MORPHOLOGIQUES OBSERVES CHEZ LES CLONES DE F.O.V.

Photo 1 : Type Sporodochial



←→: Lionnotes

(Culture âgée de 4 semaines)

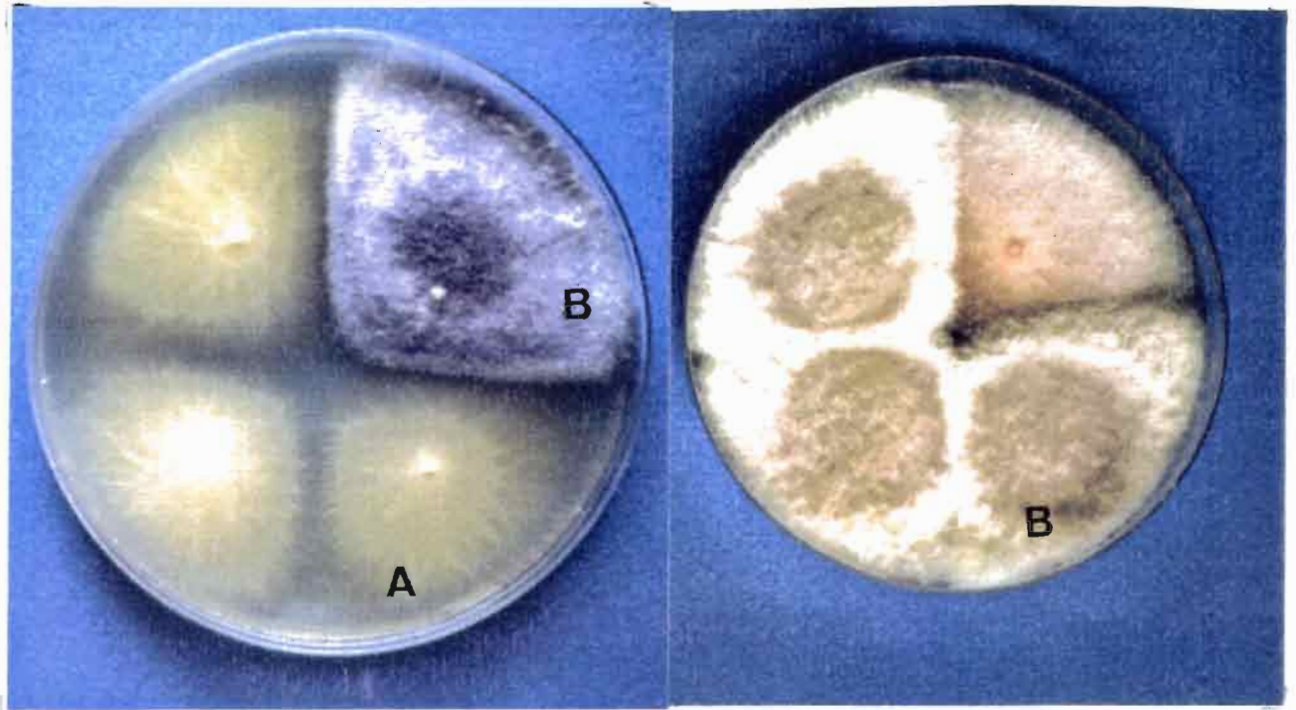
Photo 2 : Type duveteux



(Culture âgée de 4 semaines)

ANNEXE VIII

Photo 1 : Types morphologiques Cotonneux et Ras

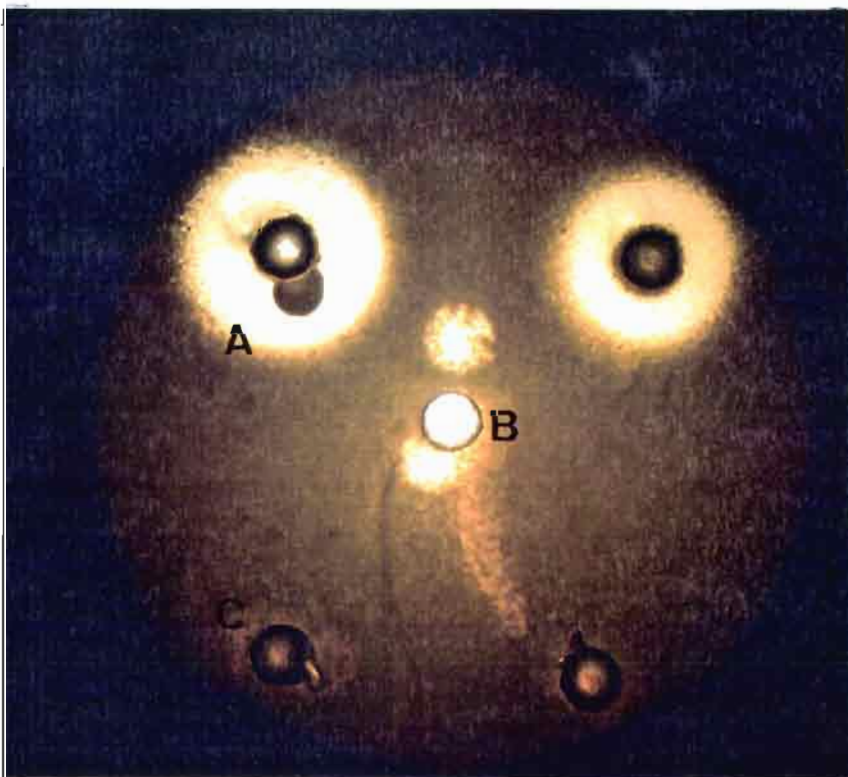


A = type ras

(cultures âgées de 4 semaines)

B = type cotonneux

Photo 2 : Toxicité des filtrats sur glucose des clones PA1 et RCA A6 sur des *Bacillus* (24 heures après le début du test).



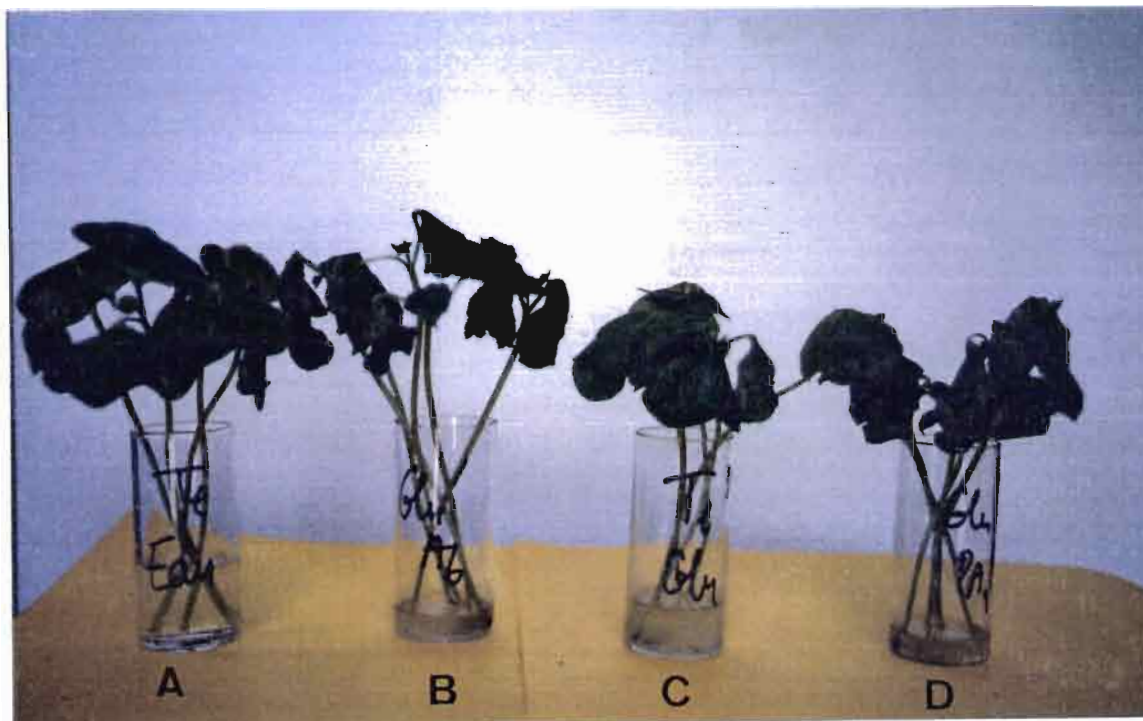
A = halos d'inhibition de la croissance de *B. subtilis* sur le filtrat de PA 1.

B = témoin avec de l'eau

C = réaction obtenue avec le filtrat RCA A6.

ANNEXE IX

TEST DE TOXICITE SUR PLANTULES DE COTONNIER AGEES DE 2 SEMAINES



A : Témoin avec Eau.

B : Symptômes provoqués par le filtrat du clone RCA A6 (24 heures après le test)

C : Témoin glucose

D : Symptômes provoqués par le filtrat du clone PA 1 (24 heures après le test)



Epinastie des plantules 48 heures après le début du test



Nécroses foliaires 48 heures après le début du test

SUMMARY

A study of the spontaneous variability of the morphology and pathogenicity within three isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ATK) - and within three clones originated from them has been undertaken.

Variants, classified in five morphological types were obtained by microconidies in the descending clones. Older were the culture, more numerous were the variants. Except the cottony type, the variants reversed towards the original type.

For each morphological type, the pathogenicity of the descendants of the clones were stable.

Important variations in pathogenicity were observed for the isolate RCA, its clones and within on clone during its keeping in culture.

This observation indicates that instability in pathogenicity depends on the isolate.