

Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

HENNI J., C. BOISSON * et J.P. GEIGER *

Département de Biologie, Université d'Oran, Es-Senia, Algérie

* Laboratoire de Phytopathologie Tropicale, ORSTOM, Montpellier, France

Résumé. La variabilité morphologique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a été recherchée à deux niveaux: au sein d'une population de conidies provenant du thalle d'un isolat (variabilité interclonale) et au sein d'une population de conidies provenant d'un thalle issu d'un clonage monospore (variabilité intraclonale). Enfin, cette variabilité a été étudiée sur des cultures jeunes et âgées. L'ensemble des essais a été réalisé sur deux isolats. Les résultats mettent en évidence l'existence d'une variabilité morphologique importante, mais également des réponses différentes suivant les deux isolats. La variabilité interclonale n'a été observée que chez l'un des isolats et semble être une propriété constitutive de l'isolat. La variabilité intraclonale se manifeste chez les deux isolats, mais uniquement au sein d'une population de conidies récoltées sur des thalles âgés. Dans ce dernier cas, on observe une forte augmentation de la fréquence d'apparition d'un morphotype considéré comme sénescé sans, toutefois, que cette forme soit irréversiblement acquise: on note un taux non négligeable de réversion vers des morphotypes considérés comme juvéniles.

Summary. MORPHOLOGICAL VARIABILITY IN *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI*. The morphological variability of two isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* was investigated both within inter- and intraclonal populations of conidia from young and old cultures. Data show the occurrence of pronounced interclonal variability in conidia from one of the isolates only, whereas the two isolates displayed intraclonal variability. Nevertheless, this intraclonal variability was evidenced on old cultures only. A high percentage of the resulting sub-cultures were of a senescent type. However reversion from this type to a juvenile one was also observed, indicating that senescence was not permanently acquired.

Introduction

La variabilité morphologique a été étudiée dans différentes formes spécialisées du *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2 (Awuah and Lorbeer, 1988), f. sp. *cepae* (Abawi and Lorbeer, 1965; 1971), f. sp. *cubense* (Waite and Stover, 1960; Follin et Laville, 1966), f. sp. *lycopersici* (Wellman and Blaisdell, 1941), f. sp. *melonis* (Miller, 1945, 1946). Les variations décrites portent sur des caractères culturels (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du milieu), sur les caractéristiques biométriques des spores (taille, cloisonnement, forme, etc...) et des organes fructifères qui leur donnent éventuellement naissance (sporodochies et pionnotes), enfin sur

la présence ou l'absence de sclérotés. Les morphotypes dits sporodochial et pionnotal sont caractérisés par la présence d'organes massifs, respectivement sporodochies, sclérotés et pionnotes; lorsqu'ils sont absents, le thalle est constitué d'un mycélium dont l'aspect (duveteux, cotonneux, ras muqueux...) définit les morphotypes mycéliens correspondants.

Les isolements pratiqués à partir de matériels naturellement infectés produisent le plus souvent des morphotypes sporodochial ou mycélien duveteux que l'on peut considérer comme représentant le phénotype sauvage (Abawi and Lorbeer, 1965, 1971; Messiaen et Cassini, 1981; Nelson, 1981; Awuah and Lorbeer, 1988). Le

maintien en culture de ces isolats conduit en général à des variations se manifestant par la perte des sporodochies, puis par la raréfaction du mycélium aérien (évolution vers le type ras) ou par l'apparition plus ou moins rapide du type pionnotal (Wellman and Blaisdell, 1941; Abawi and Lorbeer, 1965, 1971; Awuah and Lorbeer, 1988). Cependant, le type sauvage de départ peut, la plupart du temps, être maintenu en culture, pourvu que les repiquages soient faits à partir de microconidies prélevées dans des thalles jeunes (Follin et Laville, 1966). Par ailleurs, certains morphotypes sont considérés comme particulièrement stables et, notamment, les morphotypes duveteux et ras (Wellman and Blaisdell, 1941; Miller, 1946).

Dans la majorité des cas, les modifications morphologiques qui se produisent dans les cultures de *Fusarium* sont stables et peuvent être d'origine cytoplasmique ou d'origine nucléaire. Des arguments existent en faveur de l'une ou de l'autre des hypothèses selon les cas (Burnett, 1984).

En préalable à une étude sur la variabilité du pouvoir pathogène, nous avons ici étudié les variations de la morphologie observées au cours du vieillissement dans les descendance inter- et intra-clonales chez deux isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Matériels et méthodes

Agent pathogène. Deux isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* d'origines géographiques différentes ont été utilisés. Le premier, IF (isolat de France), provient de la collection INRA de la Station de Pathologie végétale de Montfavet; le second, IA (isolat d'Algérie), a été isolé par l'un des auteurs en juin 1988 sur tomate fusariée dans la région d'Oran. Après inoculation sur des variétés différentielles, ces deux isolats se sont révélés appartenir à la race '1'.

Les isolats sont des cultures pures du *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenues à partir de tomates fusariées. Les cultures issues d'isolements monospores à partir des isolats sont des clones. En effet, il a été montré (Buxton, 1956; El Ani, 1968) que les microconidies de *F. oxysporum* sont uninuclées et haploïdes, rarement binuclées ou multinuclées; dans ces derniers cas, les noyaux proviennent tous d'un

unique noyau au départ. Les cultures obtenues à partir des clones par isolement monospore sont des sous-clones.

Les isolements monospores sont réalisés de la manière suivante: une suspension de microconidies est étalée en stries sur du milieu PDA (pomme de terre - dextrose - agar); après 24 heures de germination, les jeunes thalles issus d'une microconidie unique sont prélevés stérilement puis déposés séparément en boîtes de Petri. La morphologie de chacun des clones est observée; une semaine plus tard, chaque clone est repiqué en tube sur milieu PDA.

Le milieu de culture habituellement utilisé est du PDA contenant 200 g de bouillon de pomme de terre, 20 g de glucose et 15 g de gélose par litre. Il est autoclavé à 120°C pendant 40 mn. Les cultures sont incubées en chambre climatisée à 25°±0,5°C avec une humidité relative supérieure à 70%.

Méthode d'étude de la variabilité de la morphologie au cours du vieillissement:

Variabilité interclonale. Au début de l'expérimentation, les cultures de IA et IF ont été bouturées en tube. Quelques jours plus tard, des isolements monospores ont été réalisés à partir des jeunes thalles: 150 clones de chacun des isolats dénommés IA.A1, IA.A2, ... IF.A1, IF.A2, ... ont été obtenus et observés pour déterminer leurs caractéristiques morphologiques.

Après quelques semaines de croissance à 25°C, des cultures ont été stockées au réfrigérateur à 4°C environ. A l'âge de 18 mois, deux d'entre elles ont été utilisées pour un nouveau clonage. 150 clones de chacun des isolats dénommés IA.B1, IA.B2, ... IF.B1, IF.B2, ... , ont ainsi été obtenus et observés.

Variabilité intraclonale. Les clones IA.A1 et IF.A1 obtenus à partir des cultures jeunes de IA et IF, dont la morphologie est identique à celle des cultures-mères, ont été repiqués dans 25 tubes de 18 mm de diamètre à partir de petites boutures prélevées dans la marge en croissance des thalles âgées de 10 jours. Ces cultures nommées, de par leur mode d'obtention, "cultures jumelles", sont conservées en chambre climatisée à 25°C et plus de 70% d'humidité relative.

Vingt jours plus tard (soit un mois après la mise en germination des conidies à l'origine des clones IA.A1 et IF.A1), une culture jumelle de chaque clone est utilisée pour faire de nouveaux isollements monospores; 150 sous-clones sont ainsi réalisés. La même opération est réalisée lorsque les cultures jumelles sont âgées de 6 mois et 20 jours (soit 7 mois après la mise en germination des conidies à l'origine des clones IA.A1 et IF.A2), puis de 11 mois et 20 jours (soit 12 mois après la mise en germination des conidies).

La méthode ainsi utilisée permet d'étudier la morphologie de clones issus de chacun des isolats jeunes et âgés de 18 mois et de sous-clones issus des clones IA.A1 et IF.A1 âgés de 1, 7 et 12 mois et d'apprécier la variabilité de la morphologie dans la descendance par voie asexuée d'isolats et clones jeunes et âgés.

Résultats

Description des morphologies rencontrées. Dans les essais réalisés, seuls des morphotypes mycéliens ont été rencontrés; nous n'avons jamais trouvé, dans les cultures, d'organes de fructification tels que sporodochies ou pionnotes ou d'organes massifs tels que des sclérotés.

Quatre types de thalles mycéliens ont été décrits dans l'ensemble des essais.

a - Morphotype duveteux (Fig. 1a) : il est représenté par un mycélium aérien assez court, mais dense, portant de très nombreuses microconidies. Les chlamydo-spores et les macroconidies se forment tardivement. Le mycélium intramatriel et le milieu peuvent être colorés ou non. Le morphotype duveteux peut présenter un sous-type bouclé (Fig. 1b).

b - Morphotype cotonneux (Fig. 1c) : le mycélium aérien est très abondant, épais et dense. Sa couleur blanche (ou mauve-rosé) est, du fait de l'abondance du mycélium, beaucoup plus franche que dans le type duveteux. Ce mycélium cotonneux est très peu sporifère et ne produit que des microconidies, tardivement et en faible quantité. Le morphotype cotonneux peut présenter deux sous-types, le premier sous-type bouclé (Fig. 1d), le second, le mycélium se réunit en mèches (Fig. 1e).

c - Morphotype ras muqueux (Fig. 2a et 2b) : la rareté ou l'absence totale de

mycélium aérien donne à la culture un aspect muqueux comme si elle était envahie par des bactéries. Les microconidies sont très abondantes, les macroconidies rares, les chlamydo-spores abondantes, mais tardives. Le morphotype muqueux peut présenter deux sous-types. Dans le premier sous-type, le mycélium se réunit en mèches abondamment ramifiées et prend un aspect arbusculaire (Fig. 2c). Dans le sous-type patch, il apparaît après 2 à 3 semaines de culture, des touffes parfois envahissantes de mycélium cotonneux en forme de dômes (Fig. 2d).

d - Morphotype ras sénescant (Fig. 2e) : l'aspect du thalle est à peu près le même que celui du ras muqueux, mais la croissance radiale est faible et le front de croissance irrégulier et festonné. La culture est en général très fortement colorée.

Il faut enfin noter que la pigmentation des thalles et du milieu peut varier à l'intérieur des types: incolore - mauve - rose - rouge - lie de vin.

Les cultures des isolats IA et IF ont, en début d'expérimentation, des morphologies différentes: IA est muqueux et coloré en rose lie de vin; IF est duveteux et coloré en mauve plus clair.

Variabilité interclonale. Les 150 clones issus de la culture jeune de l'isolat IA sont tous identiques entre eux et à la culture mère. En revanche, dans les 150 clones issus de IF, on trouve trois types mycéliens représentés en proportions importantes, certains étant pigmentés, d'autres non (Tableau I).

Lorsque la culture mère est âgée de 18 mois, la seule variabilité observée dans les clones de IA concerne la pigmentation: 8 clones sur 150 ne sont pas pigmentés, mais tous appartiennent au morphotype muqueux. La majorité des clones issus de IF sont de morphotype muqueux blanc (79%) dont quelques-uns de sous-type patch (8%); on retrouve toutefois 21% de clones qui se rangent dans le même morphotype que la culture mère, mais qui, dans leur majorité, ne sont plus pigmentés en rose (Tableau II).

Variabilité intraclonale. Lorsque les thalles sont âgés d'un mois, les 150 sous-clones réalisés par isolement monospore sont tous identiques entre eux et à la culture mère: ras et fortement pigmentés (rose, lie de vin) pour IA.A1 et ses sous-clones duveteux, peu pigmentés (mauve clair) pour IF.A1 et ses sous-clones.

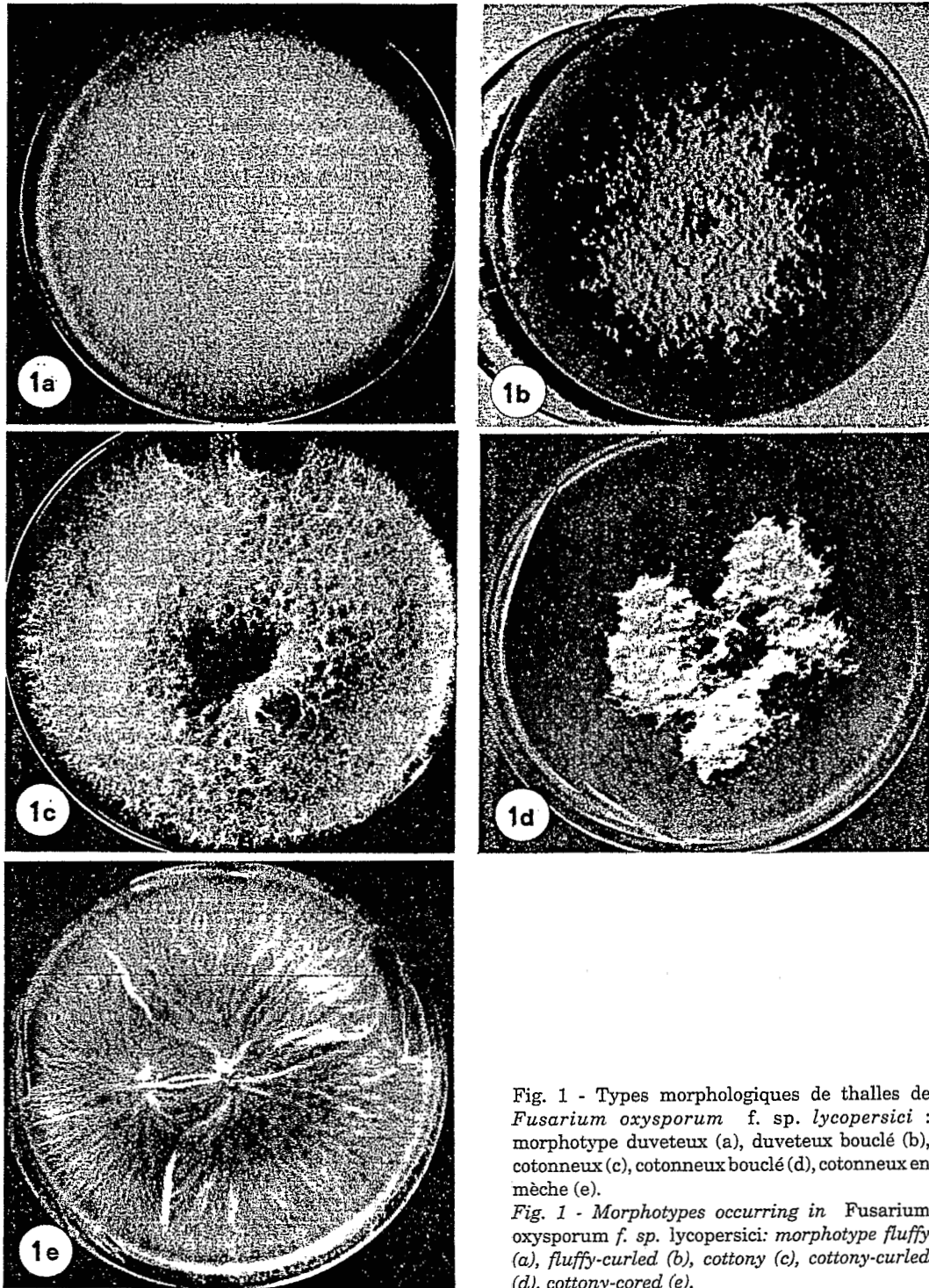


Fig. 1 - Types morphologiques de thalles de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : morphotype duveteux (a), duveteux bouclé (b), cotonneux (c), cotonneux bouclé (d), cotonneux en mèche (e).

Fig. 1 - Morphotypes occurring in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: morphotype fluffy (a), fluffy-curled (b), cottony (c), cottony-curled (d), cottony-cored (e).

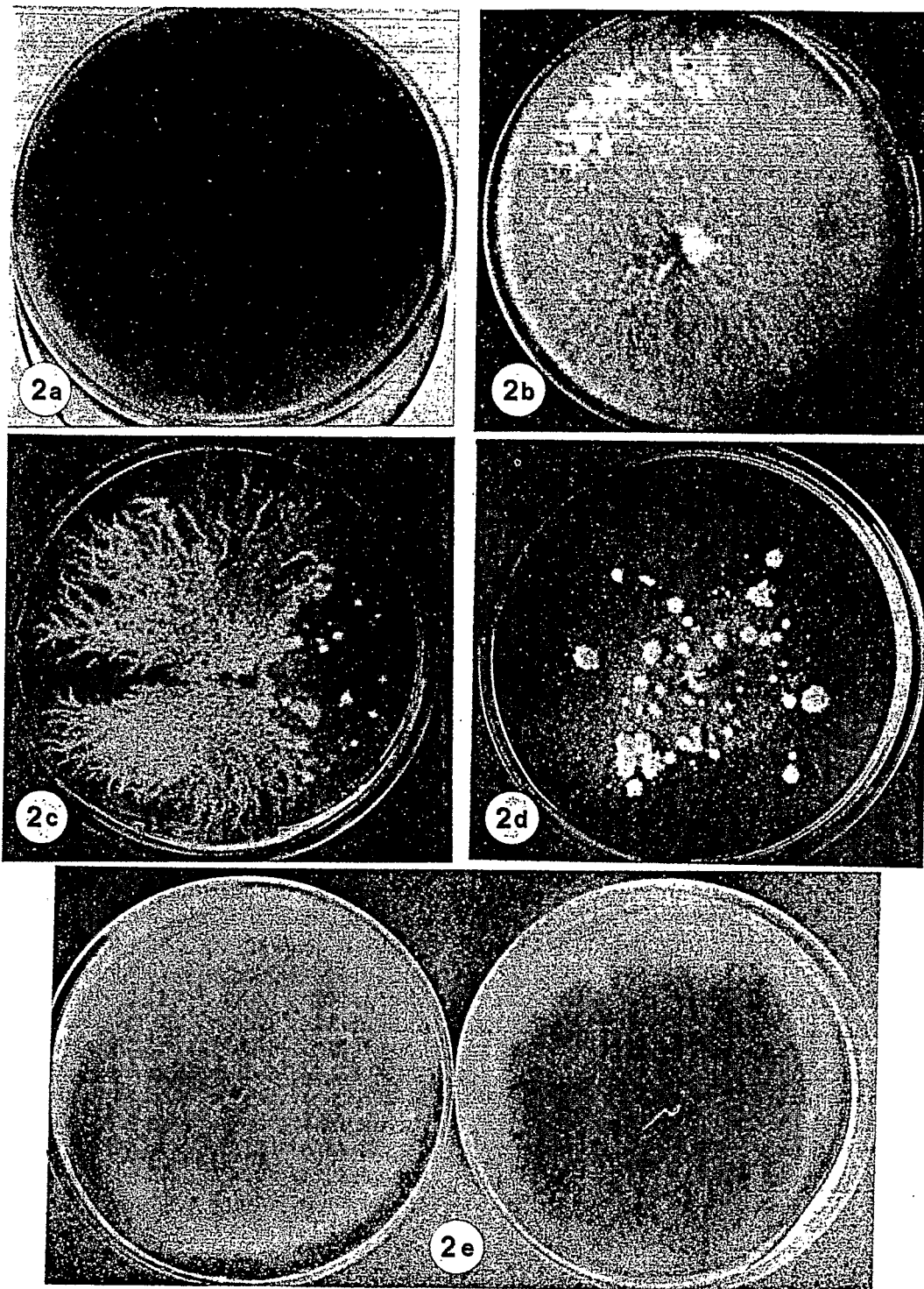


Fig. 2 - Principaux morphotypes "ras muqueux" de thalles de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : pigmenté (a), incolore (b), arbusculeux (c), patch (d), sénéscent (e).

Fig. 2 - Slimy morphotypes occurring in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: coloured (a), colourless (b), arbusculous (c), patch (d), senescent (e).

TABLEAU I. - Types morphologiques de 150 clones issus de cultures jeunes des isolats IA et IF.

TABLE I. - *Morphotypes of 150 clones from young cultures of IA and IF isolates (interclonal variability).*

Isolat	Morphotype	Pigmentation	Nombre de clones	%
IA	Ras muqueux	mauve	150	100
	Cotonneux	rose	27	23,3
		blanc	8	
IF	Duveteux	rose	65	43,3
	Ras muqueux	rose clair	43	33,4
		blanc	7	

Une importante variabilité se manifeste dans les sous-clones obtenus à partir des thalles âgées de 7 mois (Tableau III); la descendance de IA.A1 est constituée en majorité de morphotypes muqueux ras (85%) dont la moitié environ est du sous-type patch; les autres sous-clones sont de

TABLEAU II. - Types morphologiques de 150 clones issus de cultures des isolats IA et IF âgées de 18 mois.

TABLE I. - *Morphotypes of 150 clones from 18 month-old cultures of IA and IF isolates (interclonal variability).*

Isolat	Aspect du mycélium aérien	Nature de la pigmentation	Nombre de clones	%
IA	Ras muqueux	mauve	8	100
		blanc	142	
	Duveteux	rose lie de vin	7	21,3
blanc		25		
IF	Ras muqueux	blanc	106	70,7
	Ras muqueux - sous-type patch	blanc	12	8,0

TABLEAU III. - Types morphologiques de 150 sous-clones issus de cultures des clones IA.A1 et IF.A1 âgés de 7 mois.

TABLE III. - *Morphotypes of 150 sub-clones from 7 month-old cultures of IA.A1 and IF.A1 clones (intraclonal variability).*

Clone	Morphotype	Pigmentation	Nombre de clones	%
	Duveteux	rose lie de vin	12	14,7
		blanc	10	
	Ras muqueux	non coloré	63	42,0
IA.A1	sous-type patch			
	Ras muqueux	mauve	54	43,3
	Duveteux	rose clair	52	34,7
		blanc	68	45,3
	Ras muqueux	non coloré	63	42,0
IF.A1	sous-type patch			
	Ras muqueux	rose lie de vin	5	3,3
	Cotonneux	rose clair	23	16,7
		blanc	2	

type duveteux (15%) pigmenté en rose-lie de vin ou incolore. La descendance de IF.A1 comprend près de la moitié de morphotypes muqueux (48,6%) dont une grande partie du sous-type patch; les autres sous-clones appartiennent aux morphotypes duveteux et cotonneux.

Les résultats sont de même nature pour les sous-clones issus des thalles âgés de 12 mois. Les sous-clones de IF.A1 sont de type ras muqueux (46%), souvent de sous-type patch, de type duveteux (40%), plus rarement de type cotonneux (4,2%). Ceux de IA.A1 sont en grande majorité de type ras muqueux (93,3%) dont quelques-uns de sous-type patch; les autres sont duveteux (6,6%) (Tableau IV).

Discussion

La première conclusion qu'il convient de tirer est que la morphologie des isolats étudiés du *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* est très instable. La

TABLEAU IV. - Types morphologiques de 150 sous-clones issus de cultures des clones IA.A1 et IF.A1 âgés de 12 mois.

TABLE IV. - *Morphotypes of 150 sub-clones from 12 month-old cultures of IA.A1 and IF.A1 clones (intraclonal variability).*

Clone	Morphotype	Pigmentation	Nombre de cultures	%
IA.A1	Duveteux	rose lie de vin	3	6,7
		non coloré	7	
	Ras muqueux	non coloré	18	12,0
	sous-type patch			
	Ras muqueux	mauve	11	81,3
		non coloré	111	
IF.A1	Duveteux	rose clair	53	40,0
		non coloré	7	
	Ras muqueux	mauve	5	36,7
	sous-type patch	non coloré	50	
	Ras muqueux	non coloré	29	19,3
	Cotonneux	rose clair	6	4,0

variabilité se manifeste aussi bien entre les clones provenant d'un même isolat (variabilité interclonale) qu'entre les sous-clones issus d'un même clone (variabilité intraclonale). Il faut toutefois préciser qu'il n'y a pas de variabilité interclonale chez IA sauf en ce qui concerne la pigmentation. Quand elle existe, la variabilité interclonale se manifeste même dans la descendance de cultures jeunes. Cela signifie que les microconidies récoltées dans la thalle jeune sont hétérogènes et que, du point de vue morphologique, la culture est en quelque sorte constituée d'une mosaïque de cellules ayant des potentialités différentes. Autrement dit, la variabilité morphologique est une propriété constitutive de l'isolat.

La variabilité intraclonale ne se manifeste pas dans la descendance des cultures jeunes (1 mois dans nos essais), mais apparaît dans la descendance des cultures âgées. C'est une propriété non constitutive qui se développe *de*

novo au cours du vieillissement du thalle. La régénération par la microconidie efface en quelque sorte l'hétérogénéité observée entre les clones provenant d'un même isolat: le thalle issu d'une microconidie est homogène et donne naissance à des microconidies ayant toutes les mêmes potentialités au niveau morphologique. Mais au cours du vieillissement, la différenciation affecte différemment les cellules de sorte qu'une hétérogénéité peut être détectée dans des thalles âgées quand on analyse leur descendance par microconidies.

Quelle que soit la morphologie d'origine de l'isolat ou du clone (duveteux pour IF et IF.A1, ras muqueux pour IA et IA.A1), on observe (Tableaux I, II et IV) dans la descendance par microconidies de cultures âgées, une tendance très nette à l'apparition (IF et IF.A1) ou au maintien (IA et IA.A1) du morphotype ras muqueux. Ceci correspond à une opinion souvent exprimée selon laquelle ce type ras muqueux est une forme mycélienne "dégradée" caractéristique des cultures âgées.

Mais, inversement, quand l'isolat et le clone sont de type ras muqueux (IA et IA.A1), il apparaît dans la descendance par microconidies de cultures âgées, des thalles appartenant aux morphotypes duveteux et cotonneux. Ceci correspondrait, d'après l'interprétation précédente, à une véritable réversion d'un type "sénescant" vers un type "juvenile". Cela démontre en tout cas, que, dans la descendance par microconidies, il n'y a pas de morphotype qui soit totalement stable. Comme cela a été constaté pour d'autres *Fusarium* ou pour le *Verticillium dahliae*, il est incontestable qu'au cours du vieillissement, il y ait une évolution, dans les morphotypes mycéliens, vers le morphotype ras muqueux; mais il est toujours possible, dans la descendance de ce morphotype, de retrouver des proportions non négligeables de thalles de type duveteux ou cotonneux.

Il faut enfin noter que la disparition de la pigmentation se produit fréquemment au cours du vieillissement. Compte tenu de l'expérimentation mise en place, il n'est pas possible de savoir si cette perte est définitive ou non.

Littérature citée

- ABAWI G.S. and J.W. LORBEER, 1965. Cultural variability and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*, 55, 1051.
- ABAWI G.S. and J.W. LORBEER, 1971. Populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in organic soils in New York. *Phytopathology*, 61, 1042-1048.

- AWUAH R.T. and J.W. LORBEER, 1988. Nature of cultural variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* Race 2. *Phytopathology*, 78, 385-389.
- BURNETT J.H., 1984. Aspects of *Fusarium* genetics. In : The applied mycology of *Fusarium*. *British Mycological Society Symposium*, 7, (M.O. MOSS and J.E. SMITH, editors), Cambridge University Press, 39-69.
- BUXTON E.W., 1954. Heterocaryosis and variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Snyder et Hansen). *J. gen. Microbiol.*, 10, 71-84.
- ELANI A.S., 1968. The cytogenetics of the conidium in *Microsporium gypseum* and of pleomorphism and the dual phenomenon in fungi. *Mycologia*, 60, 999-1015.
- FOLLIN J.C. et E. LAVILLE, 1966. Variations chez le *Fusarium oxysporum* f. *cubense* (agent causal de la maladie de Panama du bananier). *Fruits*, 21, 261-268.
- MESSIAEN C.M. et R. CASSINI, 1981. Taxonomy of *Fusarium*. In : *Fusarium*. Diseases, biology and taxonomy (P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN and R.J. COOK, editors). The Pennsylvania State University Press, 427-445.
- MILLER J.J., 1945. Studies on the *Fusarium* of muskmelon wilt. I - Pathogenic and cultural studies with particular reference to the cause and nature of variation in the causal organism. *Can. J. Res.*, 23, 16-43.
- MILLER J.J., 1946. Cultural and taxonomic studies on certain *Fusaria*. I - Mutation in culture. *Can. J. Res.*, 24, 188-212.
- NELSON P.E., 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In : Fungal wilt diseases of plants. (M.E. MACE, A.A. BELL and C.H. BECKMAN, editors), Academic Press, New York, 51-80.
- WAITE B.H. and R.H. STOVER, 1960. Studies on *Fusarium* wilt of Bananas. VI - Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. *Can. J. Bot.*, 38, 985-994.
- WELLMAN F.L. and D.J. BLAISDELL, 1941. Pathogenic and cultural variation among single-spores isolates from strain of the tomato-wilt *Fusarium*. *Phytopathology*, 31, 103-120.

Accepted for publication: October 10, 1993