

THÈSE

présentée

à l'U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées

UNIVERSITE D'ORLÈANS

pour obtenir

le titre de Docteur-Ingénieur

par

Claude DECLERT

Infection latente des plantules de Tomate par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) SNYDER & HANSEN ;
Recherche de réactions corrélatives de leur sensibilité
ou de leur résistance

Soutenue le 12 avril 1972 devant la Commission d'Examen

MM. HARTMANN Président
HARADA Examineur
PAULET Examineur

INFECTION LATENTE DE PLANTULES DE TOMATE PAR *Fusarium*
oxysporum f.sp. *lycopersici* (Sacc.) SNYDER & HANSEN ;
RECHERCHE DE REACTIONS CORRELATIVES DE LEUR SENSIBILITE
OU DE LEUR RESISTANCE

SOMMAIRE

	Page
AVANT PROPOS	3
I. - INTRODUCTION	5
II. - HISTORIQUE	8
1°- Influence de l'infection sur le bilan hydrique des plantes atteintes	8
2°- Théorie de l'intoxication des plantes malades	12
3°- Hyperauxinie des plantes infectées	15
III. - OBJECTIFS RETENUS POUR LES PRESENTES RECHERCHES	20
A. - Infection artificielle. Infection latente	20
B. - Analyse de plantules en infection latente	21
C. - Analyse des filtrats de culture	21
D. - Etude des interactions hôte-parasite	21
IV. - MATERIEL ET TECHNIQUES	22
A. - Matériel Végétal	22
1°- Plantules de Tomate	22
a) Culture en tubes à essai	23
b) Culture en boîtes de Petri	23
c) Culture sur lame	24
2°- Culture du <i>Fusarium</i>	24
B. - Techniques	26
1°- Extraction et séparation de régulateurs de croissance des plantes infectées	26
2°- Extraction et séparation des métabolites de cultures de <i>Fusarium</i>	26
3°- Infection artificielle des plantules de Tomate	27
4°- Croissance des racines et rhizogénèse	28
5°- Analyses biochromatographiques	29
a) "Test mesocotyle d'Avoine"	29
b) Méthode des plantules de Tomate	29

	Page
C. - Analyse statistique des résultats	31
1°- Test biochromatographique de NITSCH et NITSCH	31
2°- Rhizogénèse des plantules de Tomate	32
a) Transformation des bornes des classes en variable réduite et calcul des effectifs théoriques	33
b) Comparaison des deux distributions par le test χ^2 ...	33
3°- Calcul de la régression de l'indice moyen d'élongation relative des racines de plantules de Tomate sur la dose d'auxine	34
V. - INFECTION LATENTE DE PLANTULES RESISTANTES ET SENSIBLES	35
1°- Infection latente. Résistance et sensibilité	35
2°- Mise en évidence d'un cas de réduction de la sensibilité des plantules	38
3°- Modifications induites par la présence de chlorure de sodium dans le milieu de culture	42
a) Germination des graines	42
b) Croissance des plantules	43
c) Croissance globale des plantules	44
d) Modifications de la rhizogénèse	45
e) Modifications de la croissance de la racine	46
VI. - ANALYSE DES PLANTULES EN INFECTION LATENTE	47
1°- Analyse de plantules en début d'infection latente	47
2°- Analyse de plantules en cours d'infection latente	50
VII. - ANALYSE DES FILTRATS DE CULTURE DE L'AGENT PATHOGENE	54
1°- Extraction des filtrats et séparation des divers consti- tuants	54
2°- Influence de la durée de la culture sur les substances isolées	57
3°- Analyse biochromatographique des extraits	58
4°- Discussion	61
VIII. - INTERACTIONS HOTE-PARASITE	62
1°- Action de substances de croissance sur la rhizogénèse et la croissance de la racine	62
2°- Croissance de la racine des plantules après la contami- nation artificielle	65

	Page
3°- Influence de l'infection artificielle sur la rhizogénèse des plantules	66
4°- Influence de l'infection artificielle sur la croissance de la racine	67
5°- Discussion. Conclusion	69
IX. - DISCUSSION GENERALE	71
1°- La nouvelle synthèse de BECKMAN	71
2°- Pouvoir pathogène, spécificité et résistance	74
3°- Interactions hôte-parasite	76
A. - Plantes résistantes. Forte augmentation des auxines	77
B. - Plantes sensibles. Augmentation modérée des auxines	78
4°- Perspectives	78
5°- Conclusion	79
RESUME	80
LEGENDE DES FIGURES	84
BIBLIOGRAPHIE	85

AVANT-PROPOS

Ce travail, sur l'infection latente de la plantule de Tomate, regroupe un certain nombre d'expérimentations réalisées depuis 1968, successivement, dans le Laboratoire de Phytopathologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie à Tunis-Ariana, puis dans ceux de Physiologie Pluricellulaire du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette et du Département de Physiologie Végétale de l'Université d'Orléans. C'est là qu'a été mise au point la nouvelle méthode d'analyse biologique des chromatogrammes. Enfin, les études concernant les filtrats de culture du *Fusarium* ont été menées au Département de Phytopathologie de l'Institut de Recherche Agronomique du Liban à Beyrouth-Fanar.

Dès le début, M. le Professeur PAULET a bien voulu s'intéresser à ce travail et m'encourager à m'y maintenir, malgré la fortune variée dont se déroulaient les différentes étapes. Le bienveillant appui ainsi que l'amitié confiante, qu'il n'a cessé de me témoigner au cours de ces cinq dernières années, ont été, lors des moments difficiles, le recours m'interdisant d'envisager l'abandon. Qu'il veuille bien me permettre de lui exprimer ma très profonde gratitude, et l'assurance de mon plus sincère dévouement.

L'initiation au "test" mésocotyle d'Avoine a été facilitée par l'aimable accueil que j'ai trouvé auprès de l'équipe du Laboratoire de Physiologie Pluricellulaire de Gif-sur-Yvette. Je remercie spécialement M. HARADA, Maître de Recherches au C.N.R.S., Directeur de ce Laboratoire, de m'avoir reçu et de m'avoir offert, outre le matériel nécessaire et les conseils judicieux, sa propre participation à cet enseignement. Je lui exprime ma bien vive reconnaissance pour avoir bien voulu suivre ce travail

et accepté de participer au jury.

Qu'il me soit permis de saluer respectueusement la mémoire de M. NITSCH qui avait bien voulu m'encourager à poursuivre les investigations entreprises.

L'excellent accueil et les encouragements de M. le Professeur G. PREVOST et de son équipe, m'ont permis de franchir avec succès certaines étapes de la culture sur lame des plantules de Tomate. J'exprime ici un très respectueux et très reconnaissant hommage à sa mémoire.

M. le Professeur HARTMANN a bien voulu accepter de présider le jury d'examen de cette thèse. L'analyse précise de ce travail et les conseils qu'il m'a prodigués m'ont été d'une grande utilité. Qu'il veuille bien agréer le témoignage de ma très vive reconnaissance.

Je remercie également MM. les Professeurs HELLER et ULRICH, qui m'ont encouragé, à l'issue de mon D.E.A. de Physiologie Végétale soutenu à la Faculté des Sciences de Tunis, à poursuivre cette étude sous la présente forme.

Je ne saurai oublier de remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à me familiariser avec les techniques -étrangères à ma spécialité de phytopathologiste- utilisées au cours des recherches, je voudrai citer particulièrement Mmes CHERUEL et KNIGHT.

I. - INTRODUCTION

Le flétrissement infectieux de la Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans., est particulièrement répandu en Tunisie, où il a fait l'objet de recherches approfondies depuis 1965, (DAVET, 1967).

L'irrigation des cultures maraîchères, largement pratiquée en raison des surcroûts de rendement qu'elle procure, peut-elle être impliquée dans l'extension de cette maladie, et ce d'autant plus que l'eau utilisée est, en général, fortement chargée en sels (VAN HOORN 1968), telle a été la question posée alors au Département de Phytopathologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie.

C'est ainsi qu'a été entreprise l'étude de l'influence des chlorures alcalins et alcalino-terreux, éléments les plus représentatifs dans les eaux "salées" de Tunisie, sur la sensibilité des plantules de Tomate à l'infection artificielle par le *Fusarium*. L'apparition des symptômes est très sensiblement retardée, voire éludée, lorsque le milieu de culture est additionné de chlorure de sodium à la concentration de 5 g/l. Les résultats de cette étude, très spéciale par le choix même du matériel végétal et de la technique -culture stérile *in vitro* de jeunes plantules issues de graines désinfectées-, auraient dû être confirmées par des expérimentations en serre et en parcelle, lesquelles malheureusement n'ont pu encore, à ce jour, être réalisées faute de moyens techniques adéquats.

Le phénomène en soi méritait d'être précisé, fût-ce en poursuivant l'étude sur un plan plus fondamental. D'une manière très théorique, les recherches pouvaient prendre trois directions différentes selon que l'on considère l'action du chlorure de sodium.

- a) sur le pouvoir pathogène du *Fusarium*.
- b) sur la résistance propre de la plante-hôte,
- c) sur l'interaction hôte-parasite au cours de la phase d'infection latente.

DAVET (1967) a signalé que la présence du Chlorure de sodium, même à des fortes concentrations (1 à 2 %) n'affecte pas la croissance du *Fusarium in vitro*. Le pouvoir pathogène du parasite dépend essentiellement de sa capacité à pénétrer jusqu'au xylème des racines et, de là, à se généraliser dans la plante. L'extension du champignon dans les vaisseaux est conditionnée par des métabolites d'un type spécial, les toxines, dont la principale est sans doute l'acide fusarique.

En collaboration avec EL MAHJOUR (1969), nous avons abordé l'étude de l'influence du chlorure de sodium sur la production d'acide fusarique par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici in vitro*.

Les éléments qui interviennent dans la capacité de résistance propre à la Tomate sont encore mal connus. La résistance à la race 1 du *Fusarium* est commandée par le gène I et celle à la race 2 par le gène I₂. Contrairement à ce qui se passe pour d'autres fusarioses, où la résistance est un caractère pré-établi, il est éminemment probable qu'elle résulte, dans le cas de la Tomate, de réactions particulières intervenant au cours de la période d'infection latente.

Les interactions hôte-parasite conditionnent, entr'autres, l'établissement des équilibres en régulateurs de croissance dans la plante. La considération de ces équilibres et de leurs troubles au cours de l'infection fusarienne, a été récemment adoptée par quelques groupes de phytopathologistes dont nous citerons seulement les plus réputés, ceux de BECKMAN, DAVIS et DIMOND aux U.S.A. et de MATTA en Italie. L'intérêt de participer à ce courant de recherches, pour stimulateur qu'il soit, a été surtout renforcé pour nous par le choix des autorités scientifiques sous la direction et les conseils desquelles ces travaux ont été menés, MM. PAULET et HARADA dont les recherches s'inscrivent dans l'une des grandes options actuelles de la Phytophysologie, celle des régulateurs de croissance.

Cette approche de la fusariose de la Tomate, débutée en Tunisie de 1966 à 1969, devait donc nous conduire à envisager sur un plan fondamental, les relations entre le pouvoir de résistance ou la sensibilité à l'infection et les régulateurs de croissance endogènes.

Avant de préciser nos objectifs de recherches (chapitre III), nous exposerons assez brièvement l'historique des théories proposées pour la résistance des plantes aux trachéomycoses.

II. - HISTORIQUE

Les trachéomycoses, maladies résultant de l'infection du système vasculaire par un champignon parasite, présentent entre elles de grandes analogies de symptômes : épinastie, flétrissement, jaunissement et nécrose des feuilles, le plus souvent en localisation "hémiplogique" et périodique le long de l'hélice foliaire.

Elles ont, en outre, la caractéristique d'être le fait de champignons peu nombreux. On distingue ainsi principalement deux groupes : les "fusarioses" impliquant l'action d'un *Fusarium oxysporum* et les "verticillioses" impliquant celle de *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* ou *Phialophora cinereascens*.

L'action de ces agents pathogènes, ainsi que les réactions grâce auxquelles les plantes-hôte parviennent à surmonter l'agression, procèdent, en général, du même schéma, c'est du moins ce que révèle l'examen attentif des très nombreuses publications jalonnant l'histoire des recherches dans ce domaine : nous en évoquerons rapidement les principales étapes.

1°- INFLUENCE DE L'INFECTION SUR LE BILAN HYDRIQUE DES PLANTES ATTEINTES.

Les symptômes de flétrissement reflètent un déséquilibre du bilan hydrique de la plante. Dans le cas de flétrissements d'origine infectieuse, on peut constater l'obstruction des vaisseaux du bois.

Dès 1899, E.F. SMITH avait relevé cet indice à l'intérieur de tiges de cotonniers et de pastèques atteints de telles maladies et il avait précisé qu'il s'agissait de gommages, de thylles et d'éléments mycéliens.

Actuellement, pour toutes les trachéomycoses on retrouve cette obstruction du système conducteur et, en particulier, pour la fusariose de la tomate, la "décoloration des faisceaux", selon les auteurs anglo-saxons, perceptible aussi bien sur les sections transversales de tige que sur celles des pétioles, constitue un indice très sérieux pour le diagnostic. CHAMBERS (1963) donne une excellente relation de l'examen microscopique de coupes réalisées sur un tel matériel.

Le transport de la sève est vraisemblablement ralenti par ces "bouchons" qui obstruent un certain nombre de vaisseaux. La transpiration, par ailleurs, pourrait être accrue en réaction à l'infection. C'est cependant la première des deux hypothèses qui a reçu davantage de justifications.

En effet, DIMOND et WAGGONER (1953,b) ont montré que :

- a) la vitesse de circulation de la sève est réduite de 96 à 98 % dans les tiges de tomate infectées,
- b) les feuilles flétries peuvent retrouver leur turgescence pourvu qu'elles soient séparées des tiges malades et que leur pétiole soit plongé dans l'eau,
- c) les stomates des feuilles sont fermés chez les plantes malades ceux des plantes voisines saines restant grand ouverts.

Pour un certain nombre de plantes, DIMOND et EDGINGTON (1960) ont observé que dans les vaisseaux obstrués la pression est insuffisante pour maintenir un flux de sève normal dans les feuilles d'où leur flétrissement.

Toutefois, SCHEFFER et WALKER (1953) ont pu noter une réduction notable de la transpiration chez les tomates infectées par le *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* et par *Verticillium* sp. D'après leurs investigations, le syndrome de la fusariose de la Tomate est lié à une repression du flux d'eau et d'éléments minéraux ascendant à travers le système vasculaire. Le déclin de la transpiration des plantes infectées commence peu avant l'apparition des symptômes et se poursuit régulièrement pendant l'évolution de la maladie. L'étude du transport de l'éosine montre qu'au moment où les symptômes apparaissent, le système vasculaire est obstrué et que le degré d'occlusion est suffisant pour expliquer le déclin de la transpiration.

Les gels et les gommes d'origine pectique, qui obstruent les vaisseaux sont, selon WAGGONER et DIMOND (1955), le résultat de l'action d'enzymes pectolytiques sécrétés par le *Fusarium*. De même, KAMAL et WOOD (1956) ont mis en évidence le rôle d'enzymes pectolytiques sécrétés par le *Verticillium dahliae* chez les Cotonniers atteints de verticilliose.

Pour la fusariose de la Tomate, COTHOSKAR, SCHEFFER, WALKER et STAHRMAN (1955) ont démontré que :

- a) des filtrats de culture de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*, extraits à l'eau, provoquent le brunissement vasculaire et le flétrissement ;
- b) le facteur actif du filtrat est thermolabile et non dialysable ;
- c) si plusieurs enzymes commerciaux sont appliqués sur des boutures, ceux ayant une activité pectique reproduisent l'action du filtrat. Il y a corrélation entre l'intensité des symptômes (brunissement vasculaire) et l'activité enzymatique.
- d) la précipitation du filtrat par l'alcool permet d'obtenir un enzyme presque actif.
- e) cet enzyme obtenu a une double activité pectine-estérase et dépolymerase, et reproduit les symptômes typiques.

La destruction du matériel pectique de la membrane cellulaire peut aboutir au flétrissement de deux façons :

- 1) Obstruction des éléments du xylème par de gros fragments arrachés à la paroi cellulaire, entraînant une raréfaction de l'eau en aval,
- 2) ou désorganisation du système conducteur, résultant de la dégradation des matériaux pectiques constitutifs.

Le flétrissement des Tomates infectées résulterait essentiellement de l'obstruction des vaisseaux par les produits de dégradation des membranes cellulaires ; l'agent pathogène secrète les enzymes pectolytiques nécessaires. Le fait que l'enzyme active est une dépolymerase au lieu d'une polygalacturonase, est très important : une polygalacturonase dégrade la membrane cellulaire en petits fragments pectiques solubles et donc incapables d'obstruer les vaisseaux. Par contre, les dépolymerases libèrent de plus gros fragments qui

augmentent la viscosité du courant de sève brute jusqu'au moment de l'obstruction complète.

BECKMAN (1961, 1962a et 1962b), étudiant le déroulement du phénomène d'infection chez le Bananier, a montré que la réaction commence par une gélification très rapide et importante : elle peut s'étendre sur 30 cm dans les quelques minutes qui suivent l'infection. Les bouchons ainsi formés contribuent à arrêter le courant de sève et, par là même, la dissémination des spores dans le xylème. Ils persistent pendant 5 à 6 jours. Chez les variétés résistantes, ils sont remplacés par des thylles qui scellent littéralement les vaisseaux en aval du site d'infection. Chez les plantes sensibles, au contraire, les gels sont fugaces, ne persistant que 2 à 3 jours ; la formation des thylles est très retardée et le *Fusarium* envahit l'hôte par ses microconidies transportées d'un bouchon de gel à un autre bouchon de gel.

De même, dans le cas de la Tomate, SCHEFFER et WALKER (1954) rapportent que le *Fusarium* n'envahit que peu (ou même pas du tout) le système vasculaire des variétés résistantes. C'est le cas des variétés Jefferson et Panamerican où la résistance est contrôlée par une seule paire de gènes, le système vasculaire est envahi, mais plus lentement que pour la variété "Bonny Best" sensible.

En résumé, dans le cadre de cette théorie, l'infection détermine un déficit du bilan hydrique de la plante par obstruction mécanique du système vasculaire. Outre son rôle dans la manifestation des symptômes, l'occlusion des vaisseaux a une grande importance comme indice de résistance ou de sensibilité à l'infection. Chez les variétés sensibles, bien qu'elle soit importante et intéresse un grand nombre de vaisseaux, le *Fusarium* se retrouve dans la presque totalité de la plante : le mécanisme est inefficace pour empêcher l'invasion par l'agent pathogène. Par contre, chez les variétés résistantes, elle est réduite et le développement du champignon dans le xylème est limité : la plante réussit à emprisonner l'agent pathogène dans une petite fraction de ses vaisseaux sans pour autant aliéner sensiblement le bon fonctionnement de son système conducteur.

2°- THEORIE DE L'INTOXICATION DES PLANTES MALADES.

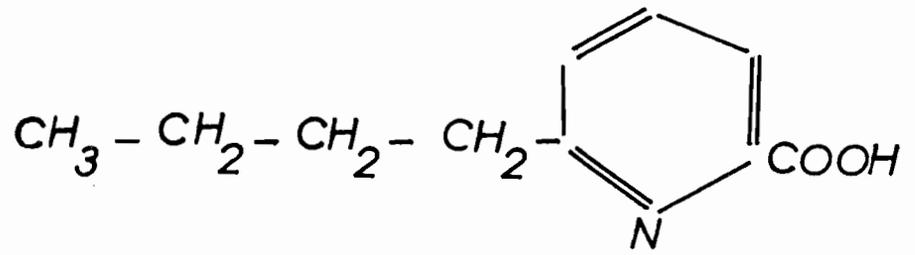
A côté de la théorie de l'obstruction des vaisseaux proposée pour expliquer le mécanisme du flétrissement des tomates infectées par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, il en est une seconde qui a connu un vif succès. il y a une vingtaine d'années, et qui, malgré de sérieuses controverses, n'est pas encore abandonnée : la théorie des toxines fusariennes, développée par E. GAUMANN.

De même que des solutions d'enzymes avaient pu provoquer le flétrissement de boutures de Tomate, des filtrats de culture de *Fusarium* ont pu reproduire des facies analogues sur boutures et sur feuilles. L'extraction, la séparation et la purification des substances actives ont été à l'origine d'importants travaux. Leur action toxique se manifeste même à des concentrations faibles, ce qui leur a valu la dénomination de "toxines" par analogie avec ces substances d'origine bactérienne. Les toxines élaborées par divers *Fusarium in vitro* sont ainsi capables de reproduire sur boutures de Tomate des symptômes proches de ceux de la fusariose (Fig. 1).

La lycomarasmine a été la première toxine isolée sous forme cristallisée à partir de cultures de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (PLATTNER et CLAUSON KAAS 1945). Quelques années après, ces mêmes chercheurs suisses découvrent sa composition chimique, dipeptide de l'asparagine et de l'acide glycyhydroxypropionique. Appliquée à des boutures de Tomate, elle induit quelques symptômes de la maladie :

- a) jaunissement progressif, brunissement et dessiccation des feuilles ;
- b) développement de taches nécrotiques noires sur le limbe ;
- c) épinastie et flétrissement des tiges, pétioles et feuilles.

Selon GAUMANN et JAAG (1947), la lycomarasmine détruirait la semi-perméabilité des membranes plasmiques des cellules et provoquerait, en conséquence, un accroissement de la transpiration. La lycomarasmine agirait surtout grâce à sa propriété d'association avec le fer (DIMOND &



acide 5n butyl picolinique
 = acide fusarique

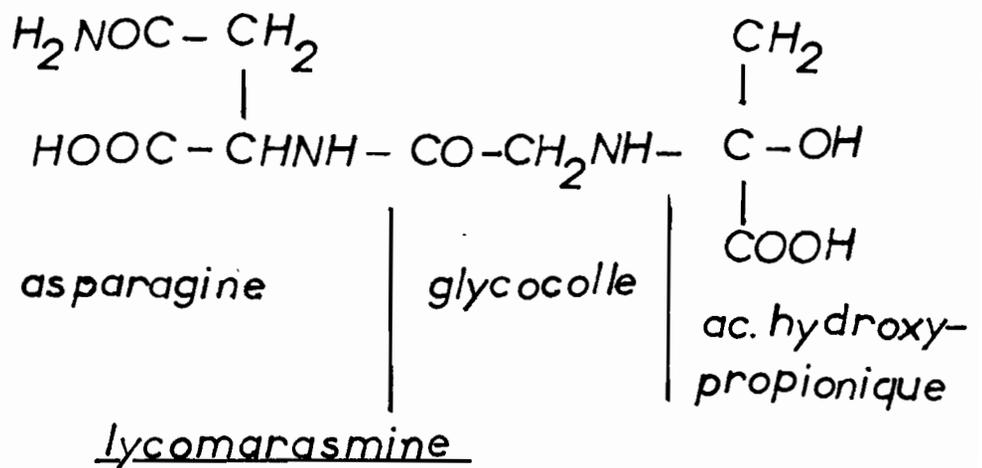


Fig. 1 - Toxines du Fusarium oxysporum
f.sp. lycopersici

WAGGONER 1953a) ; les chélates produits sont solubles. Le complexe lycomarasmine-fer est dix fois plus toxique que la lycomarasmine seule (GAUMANN 1950).

La seconde toxine, plus récemment isolée, sous sa forme cristallisée, est l'acide fusarique, produit en culture par plusieurs *Fusarium oxysporum* dont la f.sp. *lycopersici*. Sa formule chimique développée le définit comme l'acide 5-n-butyl-picolinique (GAUMANN 1952). YABUTA, KAMBE et HAYASHI l'avaient déjà obtenu en 1934 à partir de *Gibberella fujikuroi*.

Sur les boutures de Tomate, traitées à l'acide fusarique, on peut observer des taches nécrotiques au niveau des limbes foliaires et des "streaks" caulinaires. La respiration des tissus de Tomate décroît de 50 % lorsqu'on leur applique cette toxine à la concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M (NAEF-ROTH 1954). Le noyau pyrimidique interviendrait dans les phosphorylations, alors que la chaîne aliphatique bloquerait les cytochromes oxydases (PAQUIN et WAYGOOG 1957). En outre, l'acide fusarique pourrait modifier la perméabilité des membranes plasmiques selon sa concentration (BACHMANN 1956). Enfin, on lui a reconnu des propriétés d'inhibiteur de croissance (SANWAL et WAYGOOD 1961).

Une troisième toxine, isolée de cultures de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la vasinfuscarine (GAUMANN 1953) provoque le brunissement vasculaire de la tige et des pétioles ; de nature protéique, elle serait douée de propriétés enzymatiques. Une substance possédant les mêmes propriétés a été obtenue de culture de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* et de *Gibberella fujikuroi*.

Deux contradictions principales ont été relevées dans la théorie des toxines :

a) ces substances sont actives sur des boutures de Tomate ou sur des extraits de tissus (mitochondries) à des concentrations élevées, 10^{-2} à 10^{-3} . Pourtant, jusque là, on n'avait jamais pu les déceler ni les isoler dans les plantes infectées (DIMOND 1955).

b) la présence de fer libre (FeCl_3) n'augmente pas l'action inhibitrice de la lycomarasmine sur les succinoxydases, bien que l'ion Fe^{+++} puisse induire la formation de chélates solubles dix fois plus actifs que la lycomarasmine (PAQUIN et WAYGOOD 1957).

Par ailleurs, les symptômes sur des plants de Tomate carencés en fer devraient être moins sévères que sur des plants non carencés ; or, ce n'est pas le cas (SCHEFFER et WALKER 1954).

Enfin, DIMOND et WAGGONER (1953c) font remarquer que la lycomarasmine induit un flétrissement irréversible, alors que le flétrissement des feuilles de plantes malades peut disparaître lorsque les pétioles sont placés dans l'eau.

Il restait surtout à démontrer que ces toxines, obtenues *in vitro*, sont bien produites dans les plantes malades, autrement dit que ce sont des vivotoxines et qu'elles interviennent dans le phénomène d'infection (DIMOND 1955).

Certes, GOTTLIEB (1944) avait pu reproduire des symptômes de flétrissement avec des extraits de sève de plants de Tomate, atteints de fusariose, et le flétrissement était réversible, contrairement à celui provoqué par la lycomarasmine.

Lorsque KERN et KLUEPFEL en 1956 ont pu isoler l'acide fusarique de plants de Tomate infectés par le *Fusarium*, la théorie des toxines a connu un regain de faveur. Peu après, l'acide fusarique a été caractérisé chez le Cotonnier attaqué par la forme spéciale *vasinfectum* (KALYANA-SUNDARAM 1956) et chez le Bananier parasité par la forme spéciale *Cubense* (PAGE 1959).

GAUMANN (1958) signale que cet acide fusarique provoque la nécrose du tissu cortical au voisinage des faisceaux vasculaires des tiges de Tomate, de même qu'il reproduit l'épinastie des pétioles foliaires. Plus récemment, BECKMAN (1966) montre que de très faibles concentrations de cette toxine (10^{-6}M) peuvent induire la gélification au niveau des parois perforées dans le xylème des racines de Bananier traitées aseptiquement.

Ainsi, les propriétés toxiques de l'acide fusarique, susceptible de provoquer :

- a) des lésions localisées,
- b) l'inhibition de croissance des cellules du parenchyme ligneux dans les *loei* de forte activité parasitaire,
- c) des changements de perméabilité permettent le mélange des composés phénoliques et des phénol-oxydases,
- d) une réduction de la respiration ou des déviations des chaînes métaboliques,

autorisent à penser que la résistance ou la sensibilité des plantes à l'infection se fonde sur la sensibilité relative et sur les réactions différentielles des cellules-hôtes à des concentrations variées de cette toxine. La théorie des toxines vient ainsi compléter celle de l'obstruction mécanique des vaisseaux et introduit celle plus récente basée sur les régulateurs de croissance.

3° - HYPERAUXINIE DES PLANTES INFECTÉES.

Depuis une dizaine d'années, l'hypothèse de l'intervention de substances de croissance dans le phénomène d'infection par les agents de trachéomyose constitue une orientation nouvelle des recherches. Elle a permis de compléter l'explication de la résistance et de la sensibilité, ébauchée à travers les précédentes théories.

Cette hypothèse est fondée sur l'observation d'une réaction cellulaire, le développement des thylles et l'interprétation de cette réaction.

CAMEFORT (1962) donne une bonne définition de cette croissance cellulaire : "lorsque des vaisseaux cessent de fonctionner, leur lumière est fréquemment obstruée par des masses plus ou moins sphériques, les thylles ou thylloses. Les thylles résultent du développement de la membrane vers la lumière du vaisseau, au niveau des ponctuations séparant un vaisseau des cellules parenchymateuses voisines. Leur formation est due à l'activité de *cellules vivantes*. Les parois de celles-ci font hernie, au travers des

punctuations, dans la cavité du vaisseau ; une partie du cytoplasme et parfois le noyau de la cellule parenchymateuse passent dans le thylle".

DERBYSHIRE, en 1956, a signalé chez les Tomates infectées par le *Verticillium albo-atrum* la présence de thyllles. Cette hypertrophie a également été rapportée chez un bon nombre de végétaux atteints de flétrissement infectieux : Chêne, Orme, Tabac, Patate douce, Houblon, Bananier, etc ... Qu'elle soit déclenchée par un stimulus auxinique cela est fort probable. La relation thyllles-auxine a pu, en effet, être établie par PEGG et SELMAN, en 1959, lorsqu'ils ont décelé de fortes concentrations en auxine, probablement de l'acide indol acétique, dans les jeunes plants de Tomate infectés par ce même *Verticillium*.

Peu après, MATTA et GENTILE (1965) font état de l'accumulation de cette auxine chez les plants de Tomate atteints de fusariose.

L'origine de cet acide indol acétique peut se rapporter à l'activité du parasite. GRUEN (1959) a montré que les filtrats de culture du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* contiennent un stimulateur de croissance. De même, l'agent de la fusariose du Bananier est capable de synthétiser de l'acide indol acétique lorsqu'il est cultivé sur un milieu contenant du tryptophane à la concentration de 10^{-2} M (MACE 1965). Or, pour les plants de Tomate infectés par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la concentration en tryptophane libre dans les feuilles et les tiges est plus élevée que chez les plants sains.

La théorie de l'obstruction mécanique des vaisseaux par action d'enzymes pectolytiques du parasite est insuffisante pour expliquer certains faits, par exemple le développement rapide et étendu des gels chez les racines de Bananier résistant. Si le *Fusarium* est bloqué, 24 heures à peine après l'infection, par des bouchons de gel dans les vaisseaux ligneux comment ses enzymes peuvent-ils déclencher la formation ultérieure des autres bouchons en aval ?

On estime que les toxines (l'acide fusarique principalement) joueraient un rôle de stimulus pour la production d'auxine. Celle-ci, passant par les cellules du parenchyme vasculaire, court-circuiterait ainsi

les bouchons.

BECKMAN (1962), à l'occasion d'études anatomiques sur les racines du Bananier, a observé les faits suivants :

a) au voisinage immédiat du lieu d'infection, les cellules sont profondément lésées et intensément pigmentées ; on n'observe aucun thylle ;

b) au fur et à mesure que l'on s'éloigne en aval de cette zone, on note l'augmentation du nombre et de la dimension des thylls ;

c) latéralement, à une distance de plus de deux cellules, on n'observe aucun changement de coloration, mais au contraire la formation de gros thylls, contenant des noyaux d'apparence normale, et souvent différenciés par le dépôt d'épaississements secondaires. On peut penser que ces cellules ont été soumises à une stimulation anormale de croissance, sans être profondément lésées puisqu'elles manifestent une biosynthèse et une différenciation normale.

Donc, si les toxines ne sont pas transportées à grande distance à partir des segments de vaisseaux obstrués où se trouve captif le *Fusarium*, il n'en n'est pas de même de l'auxine produite par les cellules-hôtes en réponse à l'infection.

Si l'on admet que les thylls constituent un moyen pour la plante de limiter l'extension du parasite et que, d'autre part, ils résultent de l'action de stimulateurs de croissance, on peut s'attendre que l'application d'auxine réduise la sensibilité des plantes à l'infection.

Effectivement, DAVIS et DIMOND (1953) ont obtenu, par application de régulateurs de croissance (2,4-D, acide naphthalène acétique et acide indol acétique) la réduction de la sensibilité des plants de Tomate à l'infection par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

MOREAU (1956-1957) a pu protéger efficacement des jeunes plants d'oignon contre l'attaque de *Phialophora cinerescens* par pulvérisation de certains fongicides de synthèse sur le feuillage. Ces produits, doués d'activité auxinique, agiraient plutôt sur le métabolisme de la plante que sur l'agent pathogène (MOREAU 1964).

BECKMAN (1964) explique les réactions, dont les plantes atteintes de trachéomycoses sont le siège, en conciliant les différentes théories évoquées. L'origine de la sensibilité ou de la résistance aux trachéomycoses résiderait dans la capacité de la plante hôte à se laisser envahir "systématiquement" ou à limiter l'invasion. Ce blocage de l'invasion se réalise en deux temps :

a) installation de bouchons de gel, résistants à la rupture ; ce phénomène est sous la dépendance d'une action métabolique non spécifique des parasites (enzymes pectiques).

b) substitution rapide (en 3 à 4 jours chez les Bananiers résistants) de thyllles à ces gels, et cela sous l'action d'auxines ou d'hormones de blessures en provenance de cellules lésées ou stimulées par les métabolites du parasite. L'inhibition des thyllles résulte probablement d'enzymes ou de toxines du parasite ; cette éventualité est rare et coïncide avec le succès de l'infection.

Enfin, il faut noter que la résistance pourrait faire intervenir, en outre, les composés phénoliques dont la concentration est toujours fortement élevée chez les plantes atteintes de trachéomycoses (DAVIS, WAGGONER et DIMOND 1953). Les agents pathogènes, équipés en général de cellulases et de glucosidases, attaquent les composés phénoliques de l'hôte. Les glucosidases, en particulier, libèrent les orthophénols qui sont ensuite oxydés par les polyphénoloxydases de l'hôte, puis polymérisés en pigments (mélanine). Les phénols oxydés peuvent, par ailleurs, se combiner aux gels et produire des gommages, beaucoup plus résistantes à la rupture mécanique. La production de mélanine, à partir des phénols arrachés par des glucosidases à des hétérosides spécifiques des cellules-hôtes, intervient donc en compétition de la chaîne productrice de lignine, en cas d'infection, et explique que DAVIS et DIMOND (1954) aient noté la raréfaction des cellules lignifiées et leur moindre teneur en lignine chez les plantes infectées.

En résumé, les phénols pourraient normalement jouer un rôle dans le mécanisme de défense :

a) en se combinant aux gels pour former des bouchons de gomme plus résistants (BIEHN 1968) ;

b) en inhibant la croissance des parasites ou en inactivant leurs métabolites, polygalacturonase (PATIL et DIMOND 1967) ou cellulase (MAHADEVAN 1968);

c) en stimulant des phénomènes de croissance chez l'hôte, grâce à leur propriété de favoriser la transformation du tryptophane en acide indol acétique (GORDON et PALEG 1961).

d) ou en protégeant les auxines présentes par leur action compétitive sur l'A.I.A. oxydase (RABIN et KLEIN 1957, PAULET et LIORET 1966).

III. - OBJECTIFS RETENUS POUR LES PRESENTES RECHERCHES

A. - INFECTION ARTIFICIELLE, INFECTION LATENTE.

La reproduction d'une maladie est la première préoccupation de toute étude phytopathologique. La recherche des conditions nécessaires à la réalisation de l'infection artificielle de la Tomate par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* a donc été le premier objectif des travaux accomplis. Après qu'ait été mise au point une méthode permettant de la réaliser dans des conditions contrôlées, l'infection artificielle de la Tomate a été reproduite un grand nombre de fois sur des plantules groupées en lots aussi homogènes que possible.

L'état infecté ne se distingue pas de l'état non infecté tant que les symptômes ne se sont pas manifestés. On considère ainsi généralement deux phases ou deux états : l'infection latente et l'infection caractérisée. La durée de l'infection latente artificielle est accessible à l'expérimentateur puisqu'il peut connaître pour chaque plante, d'une part, la date de la contamination, c'est-à-dire, la mise en contact avec l'agent pathogène, toutes conditions ayant été remplies pour assurer le succès de la pénétration et du développement de l'agent à l'intérieur des tissus ou des organes à parasiter, et d'autre part, la date d'apparition des symptômes. La durée de la pénétration du parasite pour atteindre le site de son développement (le xylème) est à déduire -dans le cas de la Tomate attaquée par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* elle varie de 36 à 48 h-.

L'infection artificielle devait nous permettre de dégager des différences entre plantules résistantes et sensibles. La présence de chlorure de sodium ayant diminué la sensibilité à l'infection, nous avons adjoint, autant que possible, au modèle "plantules résistantes - plantules sensibles" un troisième volet, celui des "plantules à sensibilité réduite".

B.- ANALYSE DE PLANTULES EN INFECTION LATENTE.

L'hypothèse, selon laquelle l'équilibre interne des régulateurs de croissance est perturbé au cours de la période d'infection latente, a été une première base de travail, une série d'analyses devant nous permettre d'en vérifier le bien-fondé ou de la rejeter.

C.- ANALYSE DES FILTRATS DE CULTURE.

Les résultats de cette étude ayant été favorables, nous avons recherché le déclenchement de ce bouleversement dans un stimulus d'origine parasitaire. La nature de ce stimulus pouvait être enzymatique, toxique ou auxinique. C'est cette troisième hypothèse qui a été retenue. C'est ainsi qu'ont été recherchées dans les filtrats de culture du *Fusarium*, des substances douées de propriétés auxiniques.

D.- ETUDE DES INTERACTIONS HOTE-PARASITE.

La recherche de réactions particulières des plantules de Tomate vis-à-vis de l'agression par le *Fusarium* et la comparaison de ces réactions à celles provoquées par l'application des substances extraites des filtrats des cultures du champignon devait permettre de trouver le ou les "métabolites-clé" par lesquels le *Fusarium* déclenche le processus d'infection.

Ainsi, nos objectifs ont-ils été successivement définis par le déroulement des études antérieures. Certaines étapes sont encore incomplètes, mais les résultats acquis représentent des indices appréciables pour une meilleure compréhension des phénomènes d'infection.

IV. - MATERIEL ET TECHNIQUES

Les expériences ont porté sur de jeunes plantules de Tomate et sur le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, agent de la "fusariose".

A. - MATERIEL VEGETAL.

1°- Plantules de Tomate.

Les plantules de Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) sont obtenues par semis de graines sur milieu gélosé, après désinfection par trempage pendant 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel du commerce à 12-13° Chl.) et rinçage à l'eau distillée stérile. La formule de Knop est utilisée pour la composition du milieu :

Ca(NO ₃) ₂	1 g	
KNO ₃	0,25 g	
MgSO ₄ ,7 H ₂ O	0,25 g	
KH ₂ PO ₄	0,25 g	
gélose	15 g	pour 1000 d'eau

La germination des graines se produit entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour pour une incubation à 20-22°C. Plusieurs variétés ont été utilisées, notamment, la variété Marmande et la variété Poma, respectivement sensible et résistante à la race 1 du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Les lots de graines, pendant la période des expériences, provenaient soit du commerce (graines sélectionnées) soit de la fermentation de pulpe de fruits récoltés

a) Culture en tubes à essai.

Les graines sont déposées, une par tube, à la surface du milieu gélosé "en culot", fourni à raison de 7 à 8 ml par tube. Cette technique assure une culture stérile des plantules. Celles-ci se développent, pénétrant le milieu de leur radicule, tandis que l'axe hypocotylé se dresse sur 6 à 7 cm de hauteur. Les feuilles cotylédonaire se libèrent des téguments de la graine et s'épanouissent vers le 7^{ème} ou 8^{ème} jour après le semis. La première feuille apparaît distinctement le 12-13^{ème} jour. Elle croît, puis d'autres feuilles se développent avec l'allongement de l'axe épicotylé. La réserve en eau du milieu gélosé permet, en général, une culture normale pendant 6 à 8 semaines.

Ce type de culture est destiné aux expériences d'infection artificielle et principalement à la mesure de la durée de l'état d'infection latente. Cette technique se prête à l'étude de la résistance variétale, de l'agressivité des souches de *Fusarium* ou de l'influence de certains éléments minéraux ou organiques sur la sensibilité des plantules.

b) Culture en boîtes de Petri.

Cette technique rappelle celle de DAVIS (1963) puisqu'elle comporte deux phases, l'une au cours de laquelle sont produites des plantules de Tomate, l'autre destinée à l'étude du comportement d'un certain nombre de plantules sélectionnées. Mais, alors que DAVIS repique les plantules sur le plan gélosé incliné des tubes de culture, les plantules sont ici transférées dans d'autres boîtes de Petri, en nombre déterminé (5 ou 6 plantules pour des boîtes de 10 ou 12 cm de diamètre), à un stade de développement le plus homogène possible, en général 24 à 48 heures après la germination des graines. Cette culture est de courte durée (2 à 7 jours) puisque les plantules envahissent rapidement le volume disponible. La technique se prête à l'étude de la rhizogénèse et de la croissance de la racine primaire. Ces fonctions biologiques permettent l'appréciation quantitative de certains phénomènes : action toxique de certaines substances ou filtrats complexes, action parasitaire du champignon.

c) Culture sur lame.

Pour cette technique, également mise au point pour l'étude de la fusariose, le semis est encore réalisé en boîtes de Petri. Le transfert des plantules s'opère de préférence lorsque les racines ont atteint une taille de 1 à 2 cm de long soit le 3^{ème} ou le 4^{ème} jour après le semis.

Sur chaque lame est déposée une large goutte de 0,5 à 0,7 ml de milieu gélosé (le plus souvent il s'agit de milieu de Knop à 7 g/l de bacto-agar) ; la température du milieu est de l'ordre de 45° C. Une plantule y est déposée dans le sens de la longueur de la lame porte-objet, la racine étant noyée dans la goutte de milieu. Une lamelle couvre-objet (22 x 22 mm ou 22 x 30 mm) est doucement pressée sur la goutte pour recouvrir convenablement la racine et sa réserve de milieu. Les lames sont rangées verticalement dans une enceinte propre, exsiccateur ou bocal stérilisé contenant une petite réserve d'eau pour assurer une hygrométrie convenable.

Cette technique permet des investigations chronologiques par l'examen à la loupe binoculaire ou au microscope du système racinaire développé entre lame et lamelle.

2°- Culture du *Fusarium*.

Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) SNYDER & HANSEN a été cultivé le plus souvent sur milieu "bouillon de pomme de terre-gélosé" (P.d.a.) et sur milieu glucose-asparagine-levure (G.A.L.) dont la composition est la suivante :

glucose	20 g
asparagine	1,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃	0,1 g
extrait de levure	1 g
gélose	18 g pour 1000 d'eau

Pour l'étude des métabolites produits *in vitro*, le *Fusarium* est cultivé en fioles d'erlenmeyer sur milieu de Knop additionné de glucose (10 g/l) mais dépourvu de gélose. Des cultures mères sont préparées en boîtes de Petri ; des disques ("disques *inocula*") y sont découpés avec un emporte-pièce stérilisé de 0,5 mm de diamètre. L'ensemencement des fioles de cultures est réalisé en proportions définies (10 disques pour 25 ml de milieu).

Deux isollements de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ont été cultivés couramment, l'un appartenant à la race 1, l'autre à la race 2. Le "test" des deux races se fonde sur leur pouvoir pathogène : pour la race 1, il est limité aux plants de Tomate de variété Marmande, pour la race 2, il s'étend également aux plants de la variété Roma.

La "variation" du champignon a été un sérieux obstacle pour des expériences reproduites pendant des mois, voire des années. Ce phénomène est perceptible avec des cultures en boîtes de Petri sur milieu P.d.a. ou G.A.L. par l'apparition de secteurs différents (pigmentation, structure du thalle). Nous avons pu constater que le métabolisme du champignon, dans ces secteurs, est également différent ; pour éviter le risque d'introduire des substances variées avec les "disques-*inocula*", outre la précaution de rejeter les boîtes de culture présentant des signes de variation, nous avons préféré l'emploi de pastilles de papier filtre chaque fois que cela était possible. Ces pastilles, de 5,5 mm de diamètre, sont découpées avec une perforatrice de bureau. Après stérilisation, il suffit de les déposer imbibées d'eau stérile à la surface des thalles de culture du *Fusarium* pour qu'elles adsorbent les spores du champignon. La manipulation des suspensions de spores (par pipette stérile) a pu être abandonnée grâce à cette technique originale beaucoup plus rapide ("pastille *inoculum*").

B. - TECHNIQUES.

1°- Extraction et séparation de régulateurs de croissance des plantes infectées.

Les opérations sont effectuées sur des plantules de Tomate entières, après une culture en tubes ou en boîtes de Petri. Le matériel est lyophilisé sous vide après action brutale du froid (azote liquide versé sur les plantules) ou action prolongée d'un froid moins intense (séjour de 12 heures dans un congélateur à -20°C, technique du ("deep-freezing")). Après la lyophilisation, les échantillons de plantules sont réduits en poudre par broyage. Pour chaque lot, 200 mg de poudre sont soumis à l'extraction à basse température (bain de glace) par le méthanol distillé, et cela à trois reprises successives. Les extraits sont évaporés à sec, sous vide, dans un évaporateur rotatif et repris ensuite par 0,8 ml de méthanol.

Pour la chromatographie des extraits, nous avons adopté la méthode de NITSCH et NITSCH (1955). Les spots sont réalisés sur des bandes de papier Whatmann 3 MM de 4 cm de large avec 0,2 ml d'extrait (chaque chromatogramme correspond donc à 50 mg de matière lyophilisée). Les chromatogrammes, maintenus 6 heures dans les vapeurs du solvant ("équilibre"), sont ensuite développés avec le solvant isopropanol-eau : 4 : 1 (contenant des traces d'ammoniaque pure). Lorsque le front du solvant atteint 20 cm, le développement est arrêté et les chromatogrammes sont mis à sécher à 18-20°C.

2°- Extraction et séparation des métabolites de cultures de *Fusarium*.

Les cultures réalisées en fioles d'erlenmeyer sur 50 ou 100 ml de milieu sont débarrassées du thalle par filtration sur papier filtre, puis des spores par centrifugation (5.500 tours/minute pendant 15 minutes). Les filtrats sont réunis en un seul volume pour subir l'extraction.

Les opérations font intervenir successivement l'acétate d'éthyle sur les filtrats acidifiés (pH 3,5) par HCl dilué, puis l'éther acétique sur la phase aqueuse alcalinisée (pH 8,5-9) par un apport de potasse diluée.

Les extraits "acétate d'éthyle" (A) et "ether acétique" (B) sont évaporés à sec dans des boîtes à tare laissées ouvertes, à la température du Laboratoire. Ces extraits, plus ou moins cristallisés, sont repris par l'acétate d'éthyle pour la chromatographie.

Le spot initial correspond à 20-25 ml de culture du *Fusarium*. Une bonne séparation des substances présentes a été obtenue par des couches minces (chromatogrammes Macherey-Nagel prêts à l'emploi sur résine synthétique) de cellulose, développées par une solution de potasse à 1 %. L'examen des chromatogrammes secs en lumière blanche ne révèle rien. Il est nécessaire de les observer en lumière ultra-violette (366 et 254nm) pour contrôler la séparation des substances ; la mesure de la position des spots fluorescents permet le calcul du R_f .

3°- Infection artificielle des plantules de Tomate.

La méthode d'infection dépend du type de culture des plantules. Pour les plantules cultivées en tubes, l'*inoculum* est versé dans chaque tube à raison de 0,1 à 0,2 ml d'une suspension de spores de *Fusarium*. Cette suspension est obtenue par agitation manuelle de flacons contenant une solution de saccharose à 10 g/l et des fragments de thalle du champignon ("disques *inocula*"). L'infection artificielle réalisée ici ne blesse pas le système racinaire des plantules.

Pour les plantules cultivées en boîtes de Petri, l'*inoculum* ("disque" ou "pastille") est déposé sur les racines après le transfert. Les poils absorbants sont plus ou moins lésés lors du prélèvement des plantules : l'infection artificielle concerne alors, des organes avec blessures superficielles.

Dans certaines expériences, l'apex des racines est excisé avant la contamination.

Pendant l'incubation, les plantules sont conservées à 28°C et sous éclairage de lumière du jour ou éclairage artificiel avec une photopériode de 12 heures. Le succès de la contamination peut se contrôler par le développement des thalles de *Fusarium* le long des racines et sur le

milieu gélosé à leur voisinage, formant dès le 3^{ème} jour, un fin réseau arachnéen. La réussite de l'infection se traduit par l'apparition des symptômes :

- pour les infections sans blessures, flétrissement brutal et généralisé du feuillage, s'achevant par la dessiccation complète de la plantule en 3-4 jours.

- pour les infections avec blessures, les premiers symptômes apparaissent au niveau des racines qui se colorent en rouge carmin (réaction typique du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), et sont rapidement pourries, se rompant lorsqu'on extrait les plantules des boîtes de Petri.

4°- Croissance des racines et rhizogénèse.

Au début des expérimentations, nous avons mesuré la longueur de la racine des plantules ébouillantées et déposées linéairement sur une feuille de papier filtre. Plus tard, toutes les 24 heures, la position des apex a été marquée à l'encre de chine sur le revers des boîtes de Petri. La mesure, par emploi d'une règle graduée en mm, des allongements successifs indique la vitesse d'élongation journalière. L'obtention de vitesses de l'ordre de plusieurs mm par jour nous a permis d'envisager la possibilité de mesures au 1/10 mm/heure,

a) en améliorant la précision de la visée de la position de l'apex, cela par l'emploi d'un réticule optique monté dans l'oculaire du microscope,

b) en supprimant le marquage et en le remplaçant par la lecture des coordonnées de la platine porte-objet du microscope (donnée en 1/10 mm avec le vernier).

Il est évident que cette méthode de mesure ne s'applique plus à des cultures en boîtes de Petri, mais bien à des cultures sur lames.

Le même raisonnement nous a permis d'atteindre des mesures d'allongement en microns. Pour peu que l'on puisse, en effet, observer l'apex des racines à l'objectif x 40, le facteur limitant étant l'épaisseur du milieu, il suffit de repérer le déplacement d'une cellule de la coiffe le long de l'échelle graduée du micromètre, déplacement très perceptible sur

une durée de quelques minutes, pour pouvoir exprimer la vitesse d'allongement en microns/minute.

Le nombre de racines secondaires émises sur chaque racine primaire exprime l'intensité de la rhizogénèse. Le dénombrement des racines secondaires peut être effectué sur des plantules cultivées en boîtes de Petri ou sur lames porte-objet.

5°- Analyses biochromatographiques.

a) "Test mésocotyle d'Avoine".

La pratique de cette méthode d'analyse des chromatogrammes, mise au point par NITSCH et NITSCH (1956), est actuellement des plus généralisée et nous ne la détaillerons pas.

L'Avoine utilisée pour nos expérimentations appartient à la variété "Nu Prime".

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, permettant de localiser et de doser (par comparaison des effets à ceux d'une gamme de concentrations croissantes d'A.I.A.) les substances stimulant ou réprimant l'allongement des fragments de mésocotyle.

b) Méthode des plantules de Tomate.

Fondée sur les techniques précédemment décrites, concernant la mesure de l'allongement de la racine primaire des plantules en culture sur lame, nous avons mis au point une méthode d'analyse des chromatogrammes.

Cette méthode a été appliquée à l'étude des métabolites produits en culture par le *Fusarium*, séparés par chromatographie en couche mince de cellulose.

Chaque bande correspondant à 1/10 d'unité R_f est grattée, et la poudre de cellulose est traitée par 0,5 ml d'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle est absorbé par 5 pastilles de papier filtre (pour 5 répétitions, soit 5 plantules). Ces pastilles, après évaporation du solvant, sont reprises autant de fois qu'il est nécessaire pour épuiser le volume d'acétate d'éthyle. Chaque pastille est ensuite glissée entre la lame et le collet de la plantule de Tomate. La technique de la culture sur lame

a été modifiée pour faciliter la mise en place de la pastille. Les plantules sont placées directement sur les lames et leurs racines recouvertes de prismes rectangulaires de 10 x 20 mm, découpés dans des couches minces de milieu de Knop gélosé (15 à 18 g/l de gélose). La racine réalise une cavité conique par déformation du revêtement de gélose où se glisse facilement la pastille imbibée de la substance à analyser. Les facteurs de croissance du type auxines inhibent l'élongation de la racine des plantules de Tomate.

De même qu'avec la méthode du mésocotyle d'Avoine, les résultats de l'analyse sont présentés sous forme d'histogrammes ; à titre de référence, l'action d'une gamme de quantités croissantes d'acide indol acétique sur les plantules de Tomate est également citée pour chaque chromatogramme.

C. - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.

1°- Test biochromatographique de NITSCH et NITSCH.

Dans ce test, chaque fraction de chromatogramme ($1/20 R_f$) réagit sur 10 segments de mésocotyle, dont la longueur moyenne est à rapporter à celle des témoins (segments de mésocotyle mis en contact avec les fractions "T" et "O", "T" bande de 1 cm de large prélevé à 5 cm au-dessus du front et "O" premier cm inférieur du chromatogramme). L'analyse statistique des séries obtenues consiste en la comparaison deux à deux de la moyenne "témoin" à celle de chaque " R_f ", par le test "t" de Student (HELLER 1968).

Exemple : Analyse des extraits lyophilisés de plantules de Tomate de variété Marmande cultivées sur Knop :

Mesures individuelles de la longueur des segments de mésocotyle (en mm)	T	O	R_f 0,05
	47	51	55
	45	50	50
	47	49	60
	48	51	65
	49	50	50
	46	52	54
	47	55	56
	48	52	57
	45	47	62
	45	47	64
	<hr/>		<hr/>
$\sum X^2$	971		573
$\sum X$	47.281		33.091
C	47.142		32.832
	<hr/>		<hr/>
$\sum X^2 - C$	139		259
s^2	7,315		28,777
$s^2_{\bar{x}}$	0,365		2,877
\bar{x}	48,5		57,3

$$\text{D'où } t = 8,8 : 1,79 = 4,91$$

$$\text{Pour 28 degrés de liberté } t_{0,05} = 2,05$$

$$t_{0,01} = 2,76$$

Donc $t = 4,91$ est très significatif.

Lorsque la différence des deux moyennes n'était pas significative, nous n'avons pas porté sur l'histogramme la valeur de l'allongement moyen des segments de mésocotyle.

2°- Rhizogénèse des plantules de Tomate.

Les expériences développant cette technique ont été analysées par le même test "t" de comparaison de la moyenne du traitement et de la moyenne du témoin. Les résultats étant distribués en classes successives définies par le nombre de racines secondaires : 0, 1, 2, 3, ... n, nous avons vérifié que la distribution des effectifs pouvait être ajustée à la loi normale.

Exemple : Distribution de la rhizogénèse des plantules de Tomate de variété Roma contaminées (tableau XXIV).

Distribution observée	
Classes	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Effectifs	0 4 4 14 13 16 16 11 8 9 0 2 1 1 0 0 1
	Moyenne théorique $\mu = 5,37$
	Ecart-type $\sigma = 2,67$

Formule de transformation de la variable :

$$X = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

a) Transformation des bornes des classes en variable réduite et calcul des effectifs théoriques.

		P	P_X	Px 100
X_0	- 2,123	0,486	0,014	1,4
1	- 1,749	0,459	0,027	2,7
2	- 1,374	0,415	0,044	4,4
3	- 1	0,341	0,074	7,4
4	- 0,625	0,234	0,107	10,7
5	- 0,250	0,099	0,135	13,5
6	+ 0,123	0,049	0,150	15,0
7	0,498	0,191	0,142	14,2
8	0,872	0,308	0,117	11,7
9	0,247	0,395	0,087	8,7
10	1,621	0,447	0,052	5,2
11	1,996	0,477	0,030	3,0
12	2,370	0,491	0,014	1,4
13	2,745	0,497	0,006	0,6
14	3,119			
15	3,494			
16	3,818	0,500	0,003	0,3

En regroupant les classes extrêmes pour réajuster leur effectif à un nombre supérieur à 5, on a donc 10 classes.

b) Comparaison des deux distributions par le test χ^2 .

Classes	0	1	3	4	5	6	7	8	9	10	+10
Observé	8	14	13	16	16	11	8	9	0	5	
Théorique	8,5	7,4	10,7	13,5	15,0	14,2	11,7	8,7	5,2	5,3	
0 - C	0,5	6,6	2,3	2,5	1	3,2	3,7	0,3	5,2	0,3	

$$\Sigma \frac{(O-C)^2}{C} = 14,055 \text{ pour } 10 - 3 \text{ degrés de liberté}$$

$$\chi^2 = 14,1$$

Cette distribution d'effectifs est donc assimilable à une distribution normale et on est donc en droit d'utiliser le test "t" pour comparer les moyennes de deux séries de dénombrement de racines secondaires (rhizogénèse)

3°- Calcul de la régression de l'indice moyen d'élongation relative des racines de plantules de Tomate sur la dose d'auxine.

La régression a été calculée par rapport au log. décimal de la dose : avec cette précaution, nous avons pu voir que seul le terme linéaire est significatif, les termes quadratiques et cubiques n'ayant pas d'influence significative.

Exemple : régression pour les doses 5, 50 et 500 millimicrogrammes d'acide indol acétique.

	Témoin	dose 5	dose 50	dose 500
Y = q x 100	219	67	21	15
	161	61	42	27
	191	115	73	45
	191	166	33	38
	172	115	42	27
	183	178	32	23
	200	130	25	37
X = log.dose	7	17	27	37
S X = 616		S Y = 2.0606		SX.SY = 1.605.296
$\bar{X} = 22$		$\bar{Y} = 93,1$		S XY = 37.592
$(SX)^2 = 379.456$		$(SY)^2 = 6.791.236$		
$SX^2 = 17.052$		$SY^2 = 378.630$		
$Sx^2 = 3.500$			a = 217,15	
$Sy^2 = 136.086$			b = - 5,64	
$Sxy = -19.740$				

$$r = \frac{- 19.740}{\sqrt{3.500 \times 136.086}} = - 0,90$$

ce qui est très satisfaisant comme indice de régression.

V. - INFECTION LATENTE DE PLANTULES RESISTANTES ET SENSIBLES

L'infection artificielle de plantules de variétés différentes par une même souche de *Fusarium* permet de les comparer du point de vue de leur sensibilité ; de même, par action de plusieurs souches de *Fusarium* sur des plantules d'une même variété, on peut distinguer l'appartenance des souches à l'une ou l'autre race de la forme spéciale *lycopersici* (cette variété "test" est la variété Roma).

1°- Infection latente. Résistance et sensibilité.

L'application de la technique de contamination artificielle à des plantules de Tomate en culture stérile (en tubes à essai), permet la réalisation de l'état d'infection latente. Lorsque les symptômes apparaissent, les plantules sont en état dit d'"infection caractérisée" et ne tardent pas à succomber. Dans les conditions choisies pour l'infection artificielle, la durée de l'infection caractérisée est sensiblement la même. Au contraire, la durée de l'état d'infection latente peut caractériser le pouvoir de résistance ou la sensibilité à l'infection. Pour un ensemble de plantules, on peut l'exprimer par l'inverse de la moyenne des inverses des délais individuels de survie, que nous désignons sous le terme "délai moyen de survie" ou D.M.S. (cette méthode des inverses, conseillée par LISON, permet de considérer les effectifs dans leur totalité, y compris les plantules qui ne présentent pas de symptômes à la fin de l'essai).

L'infection artificielle de plantules des deux variétés de Tomate, Roma résistante à la race 1 et Marmande sensible à la race 1, fait apparaître une différence importante entre les deux valeurs de ce paramètre (tableau I), (Figure 2).

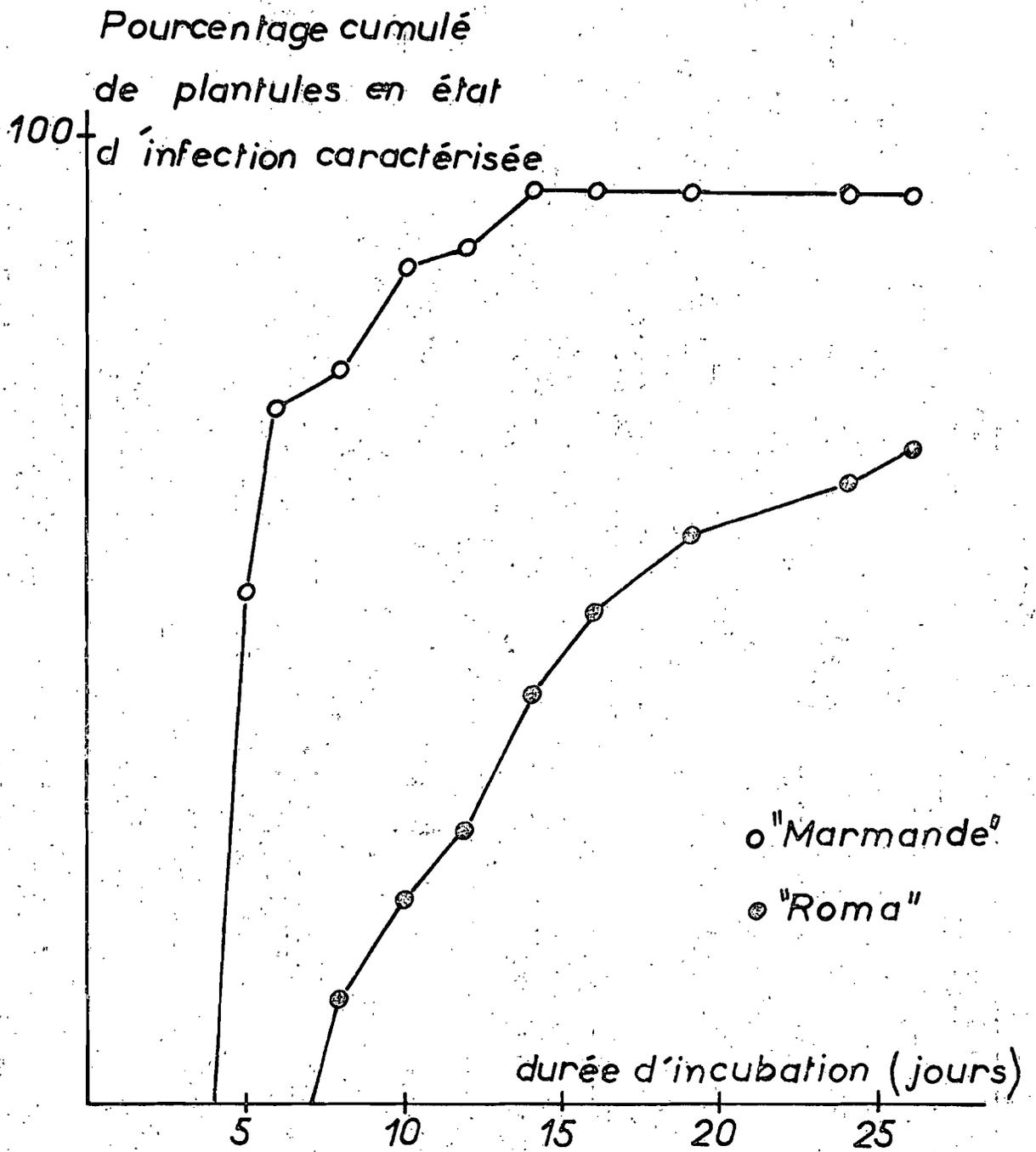


Fig.2 -

DELAI DE REPARITION DES SYMPTOMES SUR DES
PLANTULES DE POINSE COMPARATIVES, PAR PRESENCE,
DE VARIETE RESISTANTE (Roma) ET SENSIBLE
(Marmande).

délai d'incubation t (en jours)	Inverse 1/t	Effectifs malades x			
		Roma x_R	$x_R \cdot 1/t$	Marm. x_M	$x_M \cdot 1/t$
5	0,200	0		21	4,200
6	0,166	0		7	1,260
8	0,125	5	0,625	2	0,250
10	0,100	5	0,500	4	0,400
12	0,083	3	0,249	1	0,083
14	0,071	7	0,497	2	0,142
16	0,062	4	0,248	0	
19	0,052	4	0,208	0	
24	0,42	2	0,084	0	
26	0,038	2	0,076	0	
sans symptômes		15		2	
			2,499		6,355

TABLEAU I. - Délai moyen de survie de plantules de Tomate Marmande et Roma, infectées artificiellement par une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de race 1.

Calcul du D.M.S.

$$\text{ROMA} : \frac{47}{2,499} = 18,8 \text{ jours}$$

$$\text{MARMANDE} : \frac{38}{6,355} = 5,9 \text{ jours}$$

De même, les réactions des plantules d'une même variété de Tomate à deux races de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, vis-à-vis desquelles elle est résistante et sensible, sont traduites par une différence appréciable du délai moyen de survie (Tableau II) (Figure 3).

délai d'incubation t (en jours)	Inverse 1/t	effectifs malades x			
		x2 (race 2)	x2/t	x1 (race 1)	x1/t
15	0,066	4	0,264	3	0,198
17	0,058	5	0,290	4	0,232
19	0,052	3	0,156	0	
20	0,050	3	0,150	2	0,100
22	0,045	3	0,135	0	
23	0,043	2	0,086	1	0,043
24	0,042	1	0,042	0	
25	0,040	3	0,120	0	
			1,243		0,573
Effectifs contaminés		24		24	
Délai moyen de survie			19,6 jours		43,4 jours

TABLEAU II. - Calcul du délai moyen de survie pour des plantules de variété Roma, contaminées par les isolements n° 3.467 (race 2) et n° 3.468 (race 1).

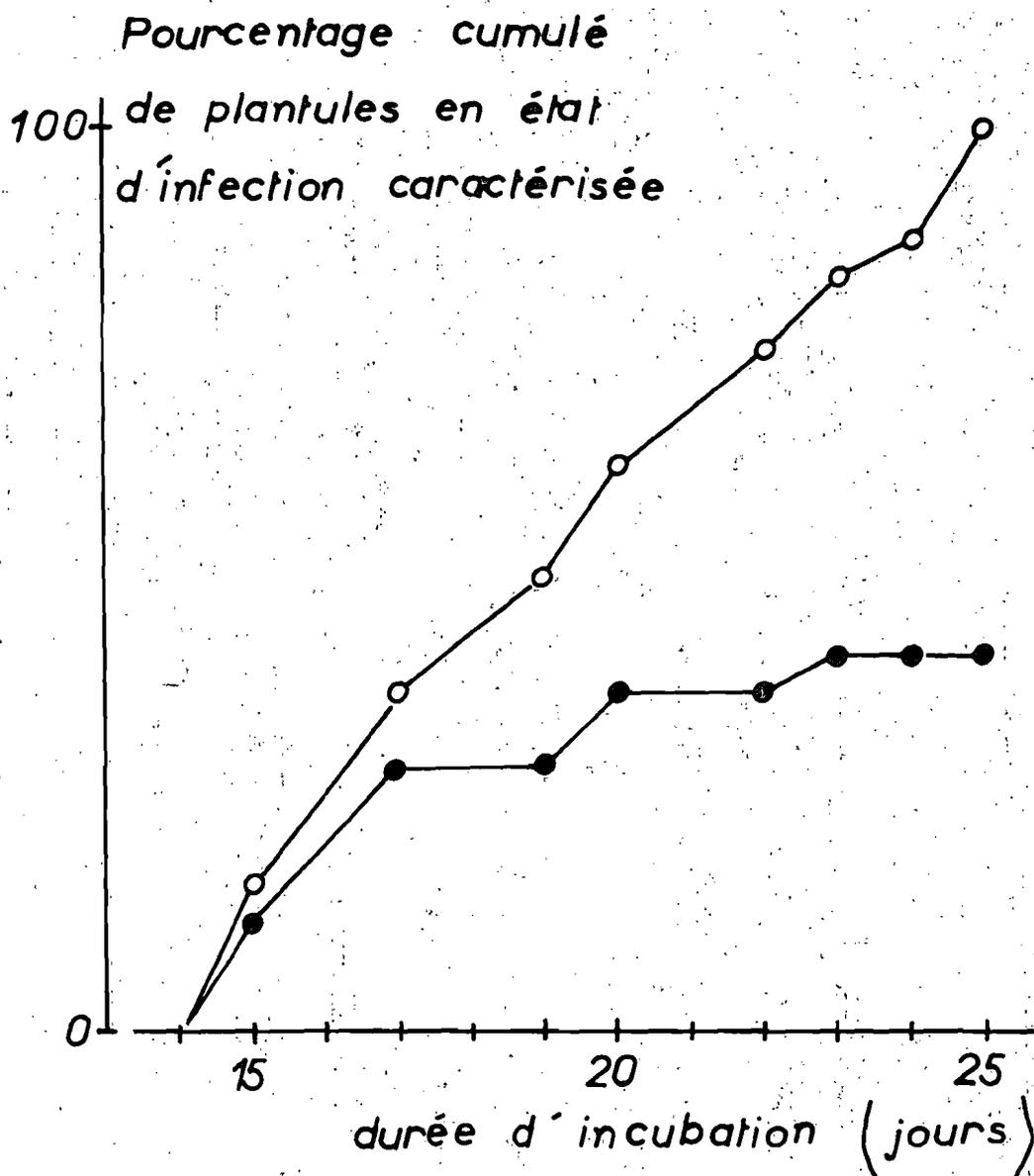


Fig.3 - DELAIS D' APPARITION DES SYMPTOMES CHEZ DES PLANTULES DE TOMATE, LE VARIÉTÉ "roma" , CONTAMINÉES PAR UNE CULTURE DE FUSARIUM DE RACE 1 (●) ET UNE AUTRE DE RACE 2 (○) .

2°- Mise en évidence d'un cas de réduction de la sensibilité des plantules

L'infection artificielle de plantules de Tomate, cultivées sur milieu de Knop gélosé, additionné de chlorure de sodium à des concentrations croissantes, révèle un gradient homologue pour les délais moyens d'apparition des symptômes (D.M.S.) (Tableau III) (Figure 4).

L'effet le plus notable ayant été obtenu pour la concentration de 5 g/l, nous avons vérifié qu'à cette concentration, les symptômes sont également inhibés pour des plantules d'autres variétés soumises à l'infection artificielle (Tableau IV) (Figure 5).

Durée d'incubation (en jours)	Gradient de chlorure de sodium			
	0	1	2,5	5
5	3	0	0	0
10	29	11	5	2
15	40	45	21	12
20	43	50	27	24
25	49	50	46	46
Effectifs contaminés	49	50	46	75
D.M.S. (en jours)	11,3	14,1	17,8	32,2

TABEAU III. - Evolution chronologique de l'état sanitaire de plantules de Tomate après leur infection artificielle par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (effectifs cumulés de plantules mortes).

- influence d'un apport de NaCl au milieu de culture en concentration de 0 ; 1 ; 2,5 ; 5 g/l
- plantules de variété Roma
- *Fusarium* = isolement rapporté à la race 2.

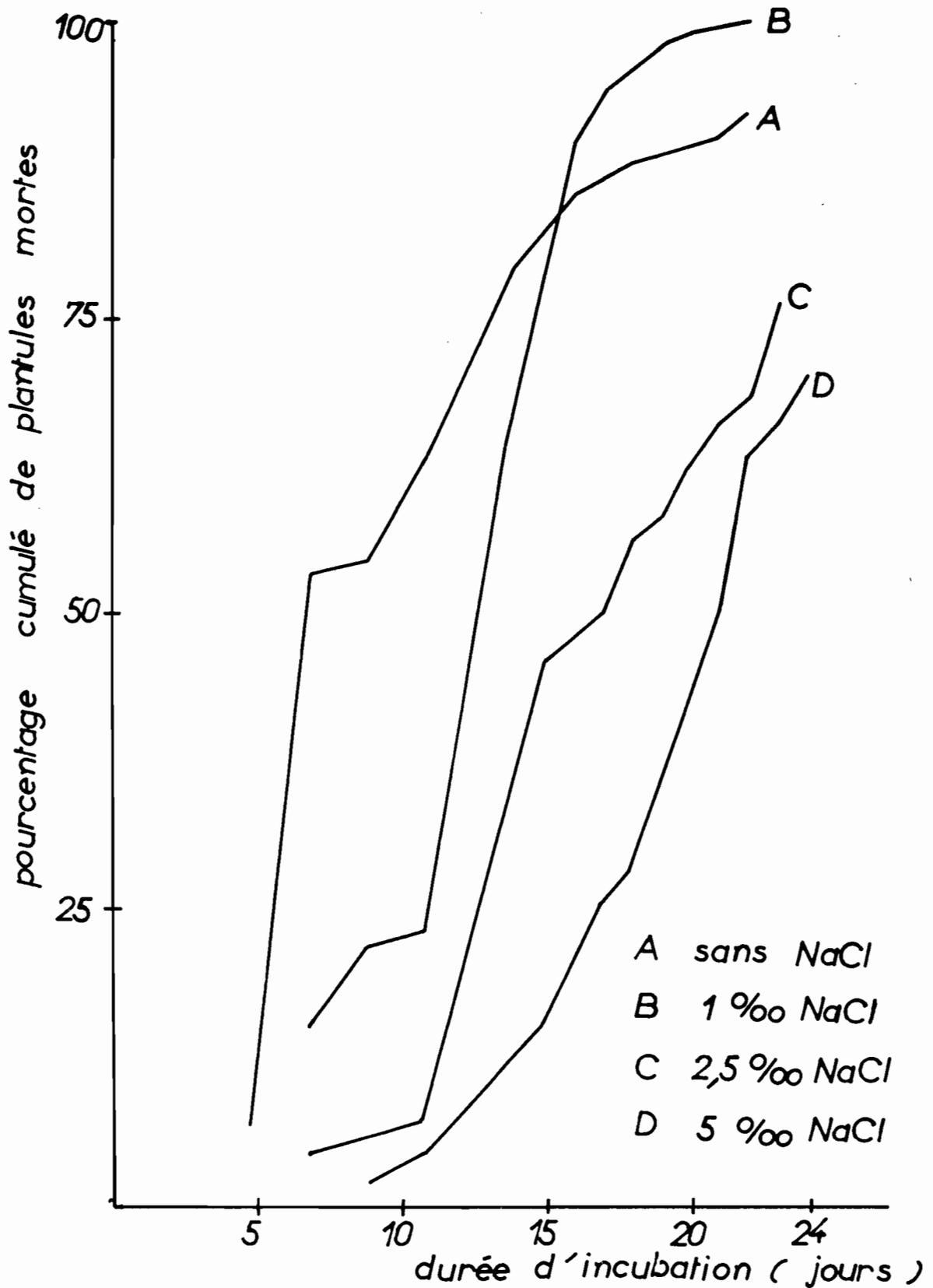


Fig.4 - Influence de concentrations croissantes de chlorure de sodium sur la sensibilité des plantules de Tomate "Roma" à l'infection artificielle par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

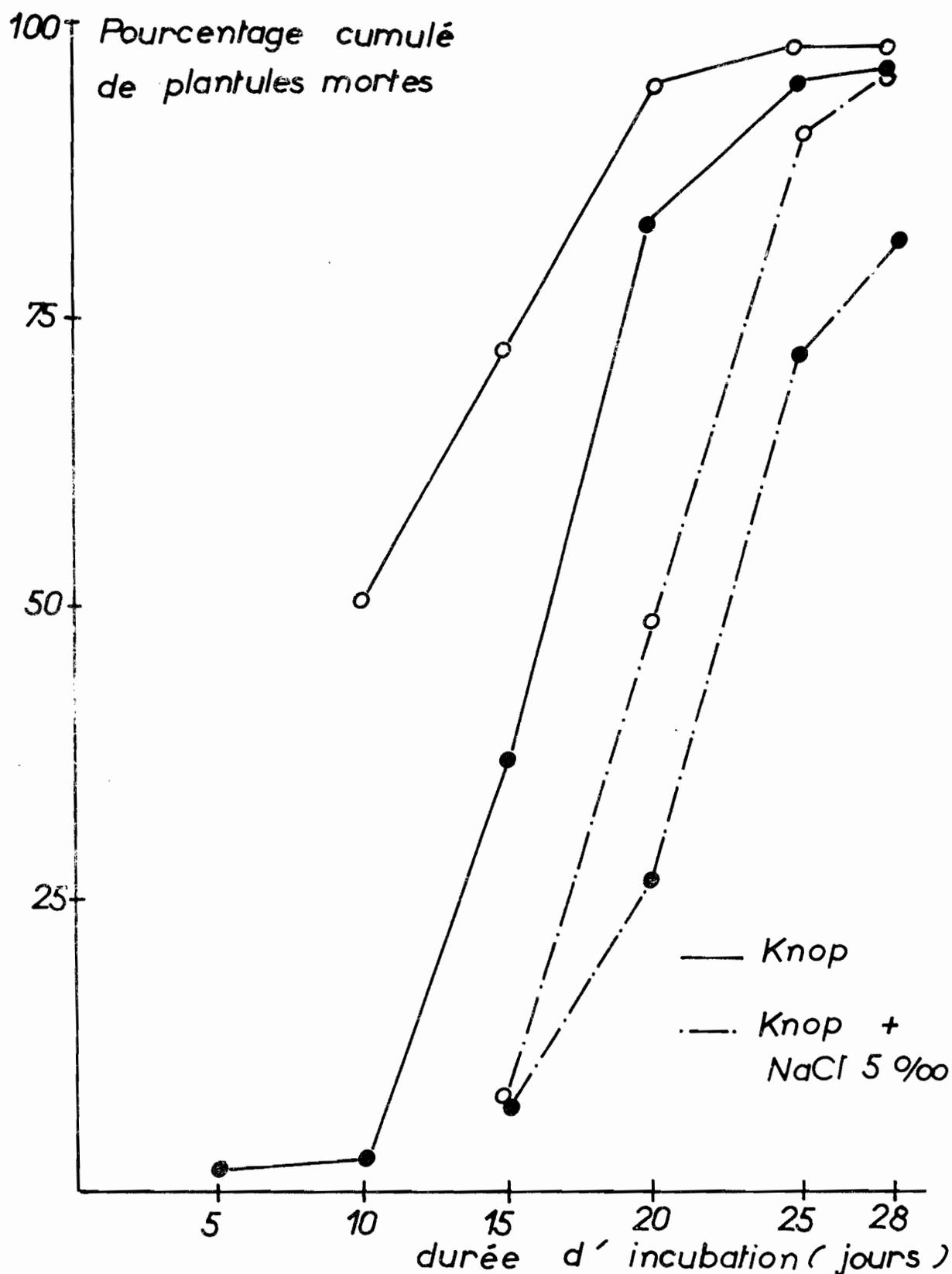


Fig.5- Influence du chlorure de sodium sur la sensibilité des plantules de Tomate "Canatella" (●) et "Monita" (o) à l'infection par *Fusarium*.

Durée d'incubation (en jours)	Variété MONITA		Variété CANATELLA	
	Knop	Knop + NaCl	Knop	Knop + NaCl
5	0	0	1,8	0
10	51,4 (°)	0	2,7	0
15	72,9 (°)	7,6	37,9 (°)	6,6
20	93,7 (°)	47,9	83,3 (°)	27,5
25	97,2	90,9	95,3	70,8
Effectifs contaminés	72	72	72	72
D.M.S.	13,7	23,8	18,1	29,4

(°) Différence significative au test "t".

TABLEAU IV. - Evolution chronologique de l'état sanitaire de plantules de Tomate après leur infection par le *Fusarium oxysporum* (pourcentage cumulé de plantules mortes par lot).

- influence de la présence de chlorure de sodium (5 g/l dans le milieu de culture).
- plantules de variété Monita et Canatella.
- *Fusarium oxysporum* = isolement rapporté à la race 2 de la f.sp. *lycopersici*.

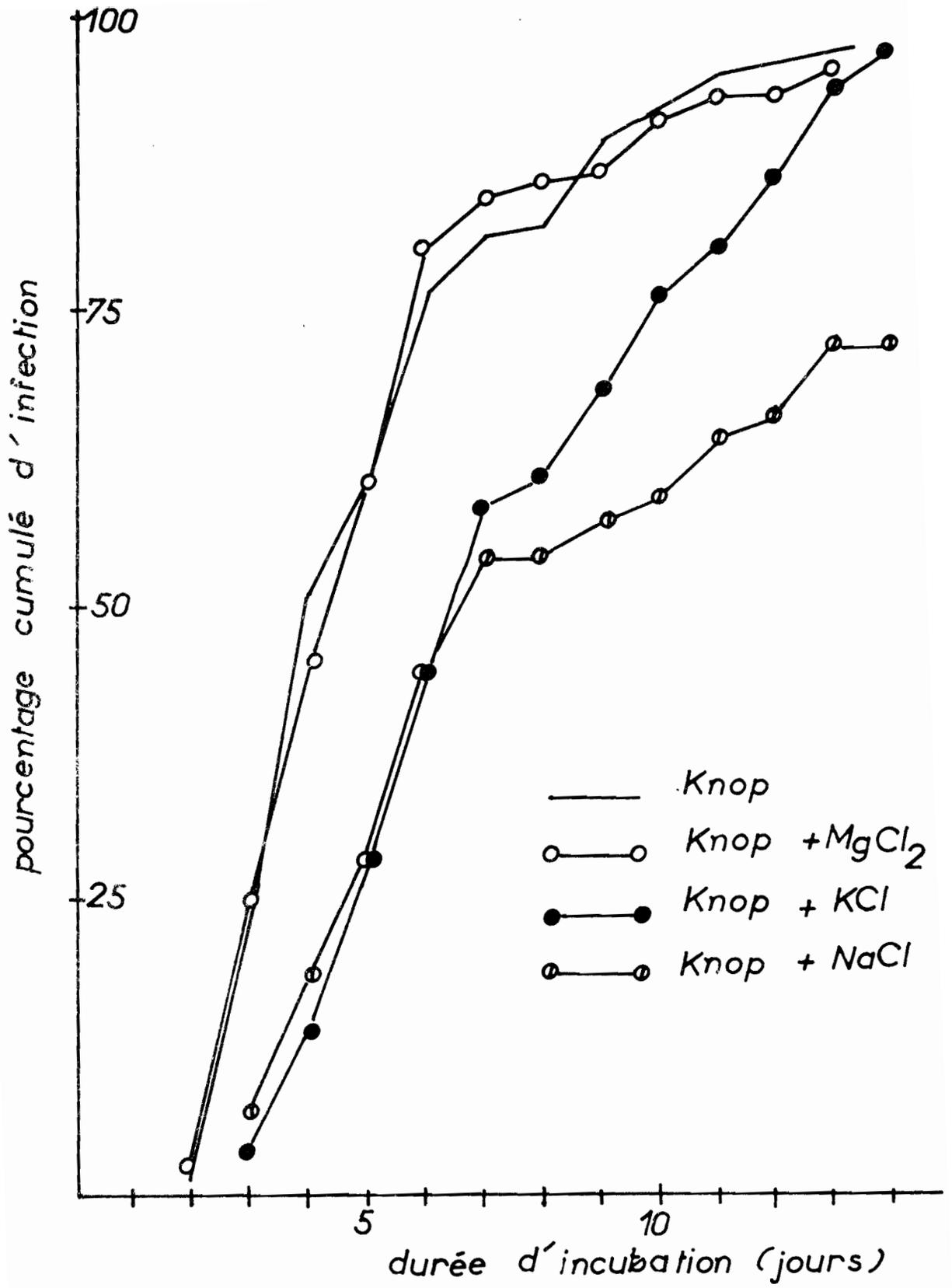


Fig.6- Influence de divers chlorures en addition au milieu de culture sur la sensibilité des plantules à l'infection

Nous avons pu constater, par ailleurs, que l'action essentielle est à rapporter au sodium. En effet, la comparaison des effets des trois chlorures magnésien, potassique et sodique, ajoutés à la même concentration en Cl^- soit respectivement 4,064 ; 6,364 ; 5 g/l ; aux constituants de la liqueur de Knop pour le milieu de culture des plantules de Tomate, montre (Tableau V) que l'inhibition de l'infection est surtout apparente pour le chlorure de sodium, moins marquée pour le sel de potassium, mais absente pour le sel de magnesium (Figure 6).

Durée d'incubation (en jours)	Milieu de culture			
	Témoin	Knop + MgCl_2	Knop + KCl	Knop + NaCl
2	1	2	0	0
3	23	25	4	7
4	50	40	15	18
5	60	60	27	28
6	76	80	44	44
7	81	84	59	54
8	82	86	61	54
9	89	87	67	57
10	92	91	76	59
11	95	93	80	64
12	96	93	80	64
13	96	93	86	66
D.M.S.	4,6	4,7	7,1	8,0

TABLEAU V. - Evolution chronologique de l'état sanitaire de plantules de Tomate après leur contamination par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (pourcentage cumulé de plantules mortes par lot).
 - influence de l'addition au milieu de culture de MgCl_2 , KCl et NaCl en concentration isotonique équivalente à 5 g/l de NaCl
 - plantules de variété Roma.
 - *Fusarium oxysporum* rapporté à la race 2 de la f.sp. *lycopersici*

POURCENTAGE D' INHIBITION DE LA
GERMINATION DE CHLAMYDOSPORES DE
USTILAGO MAYDIS

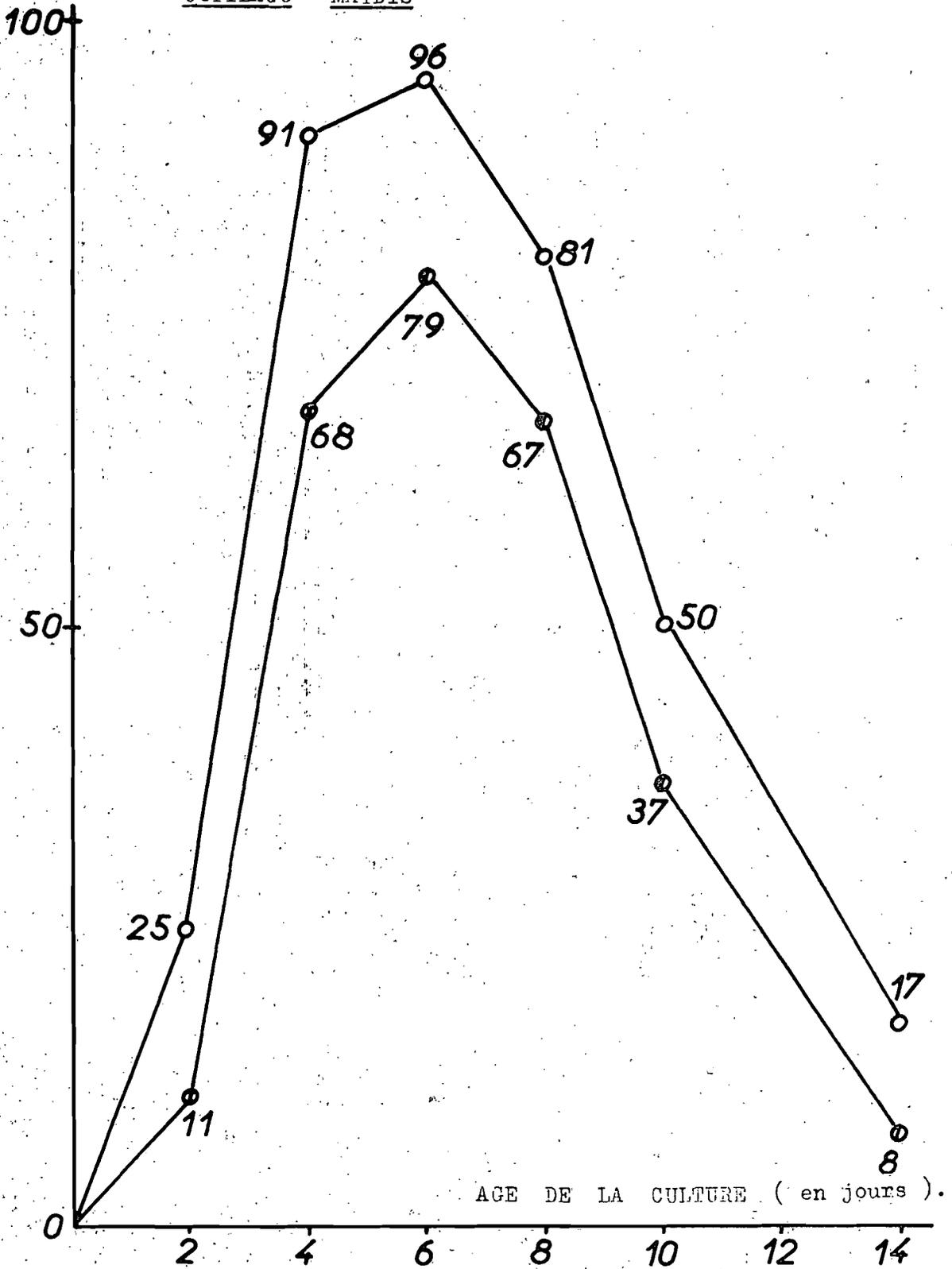


Fig.7.- CINÉTIQUE DE LA PRODUCTION D'ACIDE FUSARIQUE PAR FUSARIUM
OXYSPORUM f.sp. LYCOPERSICI, EN CULTURE IN VITRO SUR MILIEU DE
KNOP (○) ET SUR MILIEU DE KNOP ADDITIONNÉ DE NaCl à 5 g/l (●)

Ainsi, chez les plantules de Tomates cultivées *in vitro* et infectées artificiellement par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, l'adjonction de chlorure de sodium à la concentration de 5 g/l diminue à la fois la vitesse d'apparition des symptômes morbides et le taux de mortalité ; en conséquence, le délai moyen de survie est prolongé, ce qui équivaut à une réduction de la sensibilité des plantules à l'infection.

Des effets analogues ont été signalés pour d'autres éléments chimiques, le calcium notamment (CORDEN 1967, EDGINGTON & WALKER 1958) et certains oligoéléments, fer, manganèse et zinc (JONES et WOLTZ 1967). De même, certains facteurs peuvent-ils se montrer limitants pour le succès de l'infection artificielle :

a) pendant l'incubation, température (WALKER 1954) et éclairage (DAVIS 1963);

b) avant la contamination artificielle, pratique de blessures sur les racines (DAVIS 1963).

Lorsque les conditions ne sont pas convenablement respectées, le taux de mortalité des plantules est réduit.

Où se situe l'action du chlorure de sodium ? Sur l'hôte ou le parasite, ou simultanément sur les deux protagonistes ?

Sur le champignon parasite, la réduction du pouvoir pathogène pourrait résulter de l'influence du chlorure de sodium sur l'aptitude à synthétiser d'une part, les enzymes pectolytiques et cellulosiques et d'autre part, les toxines. Nous avons pu constater avec EL MAHJOUB (1969) que la production d'acide fusarique, contrôlée au "test" germination de chlamydospores d'*Ustilago maydis*, était inférieure de 10 à 20 % par rapport aux conditions témoin (absence de chlorure de sodium), la vitesse de synthèse, maximum au 6^{ème} jour de culture, n'étant pas modifiée par ailleurs (Figure 7).

Sur la plante hôte, le chlorure de sodium exerce des effets sur la morphologie des divers organes et même sur certaines fonctions physiologiques fondamentales. D'où un certain nombre de modifications dans les "cultures" de plantules sur milieu "salé".

3°- Modifications induites par la présence de chlorure de sodium dans le milieu de culture.

Si la culture *in vitro* des plantules de Tomate sur milieu de Knop gélosé s'obtient aussi facilement, qu'on ajoute ou non du chlorure de sodium à la formule minérale, l'apport de ce sel à la concentration de 5 g/l entraîne, néanmoins, un certain nombre de différences.

a) Germination des graines.

Le taux de germination des graines est peu altéré, mais la vitesse en est sensiblement diminuée (Tableau VI).

Durée d'incubation (en jours)	Knop	Knop + NaCl
2	3,2	0
3	89,0	9,4
4	94,9	49,3
5	94,9	69,2
6	95,4	83,7
9	96,3	89,5
Nombre de graines semées	219	276

TABLEAU VI. - Germination comparée de deux lots de graines de Tomate, l'un semé sur milieu de Knop gélosé, l'autre sur ce même milieu additionné de chlorure de sodium (5 g/l). Expression par le pourcentage cumulé de graines germées. Incubation à 22°C et à l'obscurité. Graines de la variété Roma.

b) Croissance des plantules.

La taille des plantules est réduite lorsqu'elles sont cultivées sur milieu additionné de chlorure de sodium. En effet, la longueur moyenne de l'axe hypocotylé est significativement inférieure à celle mesurée sur les plantules témoin. Les mesures, rapportées dans le Tableau VII, ont été faites 10 jours après le semis.

Classes de longueur (en cm)	Knop	Knop + NaCl
3	0	12
4	0	104
5	4	436
6	39	251
7	156	18
8	136	2
9	25	0
Moyenne	7,38 (°)	5,20

(°) différence significative au test "t".

TABLEAU VII. - Distribution des mesures de longueur d'axe hypocotylé de plantules de Tomate, cultivées *in vitro* sur milieu de Knop additionné ou non de chlorure de sodium.

c) Croissance globale des plantules.

Lorsque les plantules sont extraites au même âge physiologique (compté à partir de la germination et non du semis) on n'observe pas de différence significative pour le poids frais moyen et pour le poids sec moyen entre celles qui ont été cultivées sur milieu témoin (Knop) et celles qui proviennent de milieu "salé" (Knop + chlorure de sodium à 5 g/l) (Tableau VIII).

	Knop	Knop + NaCl
Poids frais	301 \pm 24,7	296 \pm 35,2 (NS)
Poids sec	10,23 \pm 1,63	9,76 \pm 1,91 (NS)

(NS) = différence non significative au test "t".

TABLEAU VIII. - Poids moyen, exprimé en mg, de plantules de Tomate de variété Roma, cultivées sur milieu de Knop gélosé avec ou sans chlorure de sodium (5 g/l).

d) Modifications de la rhizogénèse.

La rhizogénèse des plantules de Tomate est réduite par l'addition de chlorure de sodium au milieu de culture, pour des concentrations supérieures à 2,5 g/l (Tableau IX) (Figure 8)

Milieu de culture	Nombre moyen de racines secondaires
Témoin = Knop	5,10 \pm 0,33
Knop + NaCl 1 g/l	5,34 \pm 0,31
Knop + NaCl 2,5 g/l	4,96 \pm 0,34
Knop + NaCl 5 g/l	2,76 \pm 0,28 (°)
Knop + NaCl 10 g/l	0,56 \pm 0,12 (°)

(°) différence significative avec le témoin

TABLEAU IX. - Influence de l'addition de chlorure de sodium en concentrations croissantes aux constituants du milieu de Knop sur la rhizogénèse des plantules de Tomate.

- Plantules de variété Marmande examinées au 6^{ème} jour.

La concentration de 5 g/l inhibe donc de façon significative, la rhizogénèse. A 10 g/l le chlorure de sodium est toxique : un faible pourcentage de plantules parvient à se développer.

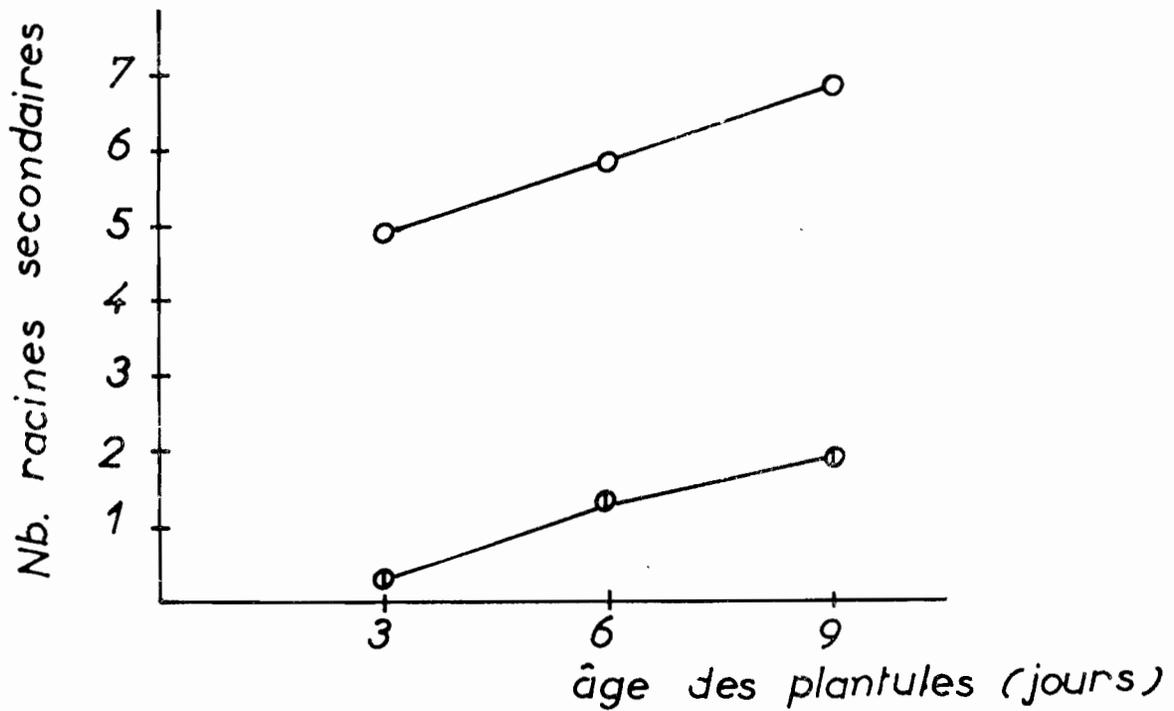
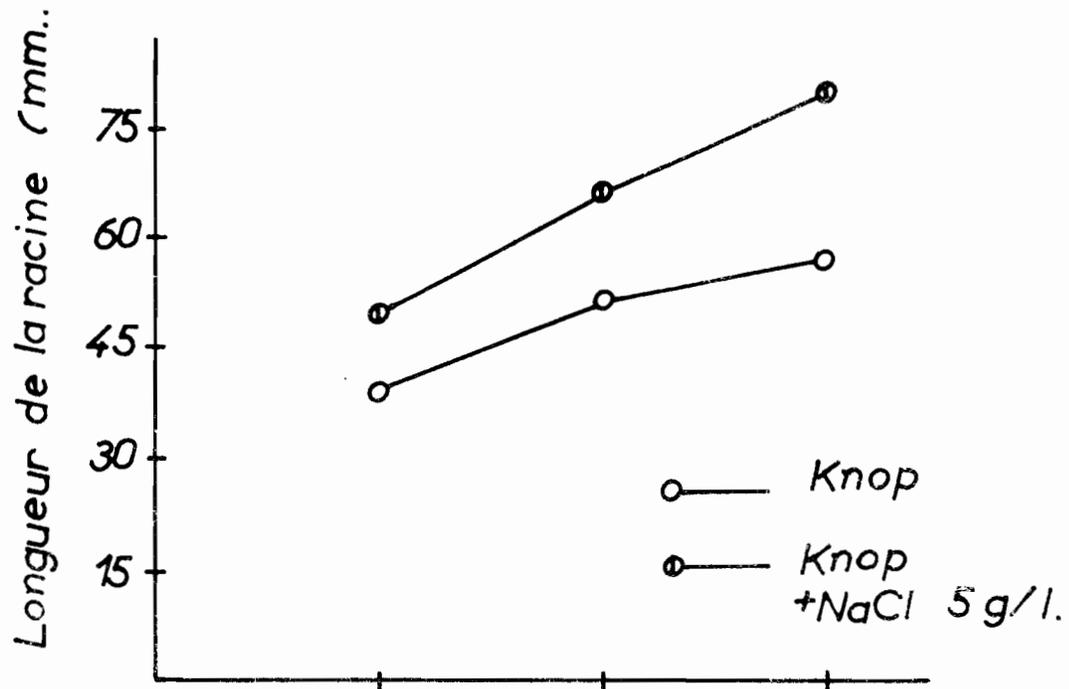


Fig.8 - Influence du chlorure de sodium sur la croissance de la racine et la rhizogénèse.

e) Modifications de la croissance de la racine.

La longueur de la racine de plantules de Tomate est toujours accrue lorsque le milieu de culture est additionné de chlorure de sodium à 5 g/l (Tableau X) (Figure 8)

Milieu de culture	Age de la culture (en jours)		
	3	6	9
Knop	39,95 \pm 0,76	50,90 \pm 1,11	56,77 \pm 1,75
Knop + NaCl	49,68 \pm 1,12	65,34 \pm 1,33	78,77 \pm 1,86

TABLEAU X. - Influence de l'addition de chlorure de sodium (5 g/l) au milieu de Knop gélosé sur la cinétique de l'allongement de la racine primaire.

- plantules de variété Marmande
- Longueur de la racine primaire en mm.

Nous avons pu voir successivement que des plantules de variété résistante ont un délai moyen de survie plus long que celles d'une variété sensible lorsqu'elles sont infectées par la même souche de *Fusarium*. D'autre part, le délai moyen de survie varie dans le même sens pour une même variété de Tomate selon que les plantules sont infectées par des souches non virulentes (ex : race 1 pour Roma) ou par des souches virulentes (race 2 pour Roma).

Ainsi, l'augmentation du délai moyen de survie que l'on enregistre pour les plantules infectées artificiellement, lorsque le milieu de culture est additionné de chlorure de sodium, peut traduire une augmentation du pouvoir de résistance à l'infection. Puisque la culture sur milieu "salé" entraîne d'autres modifications pour les plantules, portant notamment sur la vitesse de germination des graines, la taille de l'axe hypocotylé, la rhizogénèse et la croissance de la racine, il nous a paru intéressant d'en rechercher la cause dans une modification des équilibres en substances de croissance.

VI. - ANALYSE DES PLANTULES EN INFECTION LATENTE

Dans l'intention de rechercher les modifications éventuelles de l'équilibre naturel en régulateurs de croissance qui accompagnent l'état d'infection latente par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* chez les plantules de Tomate, plusieurs lots de plantules ont été lyophilisés et préparés pour l'analyse (méthode biochromatographique de NITSCH et NITSCH).

L'analyse a été appliquée d'une part, à des plantules récemment contaminées, d'autre part, à des plantules en cours d'infection latente et proches du stade d'infection caractérisée (un certain nombre d'entr'elles parmi les lots "infectés" ayant déjà succombé).

1°- Analyse de plantules en début d'infection latente.

En vue d'étudier l'influence du facteur variétal (résistance d'ordre génétique) sur l'état d'infection latente, quatre lots ont été prévus :

- a) plantules de variété Marmande "témoin" (non infectées).
- b) plantules de variété Marmande infectées artificiellement par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 1.
- c) plantules de variété Roma "témoin".
- d) plantules de variété Roma infectées par la même souche de *Fusarium*.

Les plantules, cultivées en boîtes de Petri sur milieu de Knop gélosé, sont sacrifiées après 6 jours d'incubation. Elles sont lyophilisées et les poudres sont soumises à l'action de méthanol distillé pour l'extraction des substances de croissance.

La séparation des substances extraites est obtenue par chromatographie ascendante sur papier ; le volume d'extrait méthanolique déposé sur chaque chromatogramme correspond à 50 mg de poudre lyophilisée. Les résultats sont exprimés sur les histogrammes de la figure 9.

Nous constatons (Tableau XI) que les quantités totales de stimulateurs de croissance décelées par chromatogrammes sont de l'ordre de 150 millimicrogrammes d'acide indol acétique.

	Stimulations	Inhibitions
Marmande témoin	3,1 (°)	1,8
Marmande x <i>Fusarium</i>	3,4	0,6
Roma témoin	4,2	0,3
Roma x <i>Fusarium</i>	3,1	1,1

(°) sensiblement équivalent à l'effet de 30 microgramme/l d'A.I.A.

TABLEAU XI. - Valeurs totales par chromatogramme des stimulations et des inhibitions d'élongation des fragments de mésocotyle d'Avoine (en mm).

On peut ainsi remarquer le caractère opposé des réactions globales chez les plantules des deux variétés à l'infection par le *Fusarium* : pour "Marmande", légère augmentation des effets de stimulation et réduction des effets d'inhibition. Au contraire, pour "Roma" il y a diminution des effets de stimulation et augmentation des effets d'inhibition.

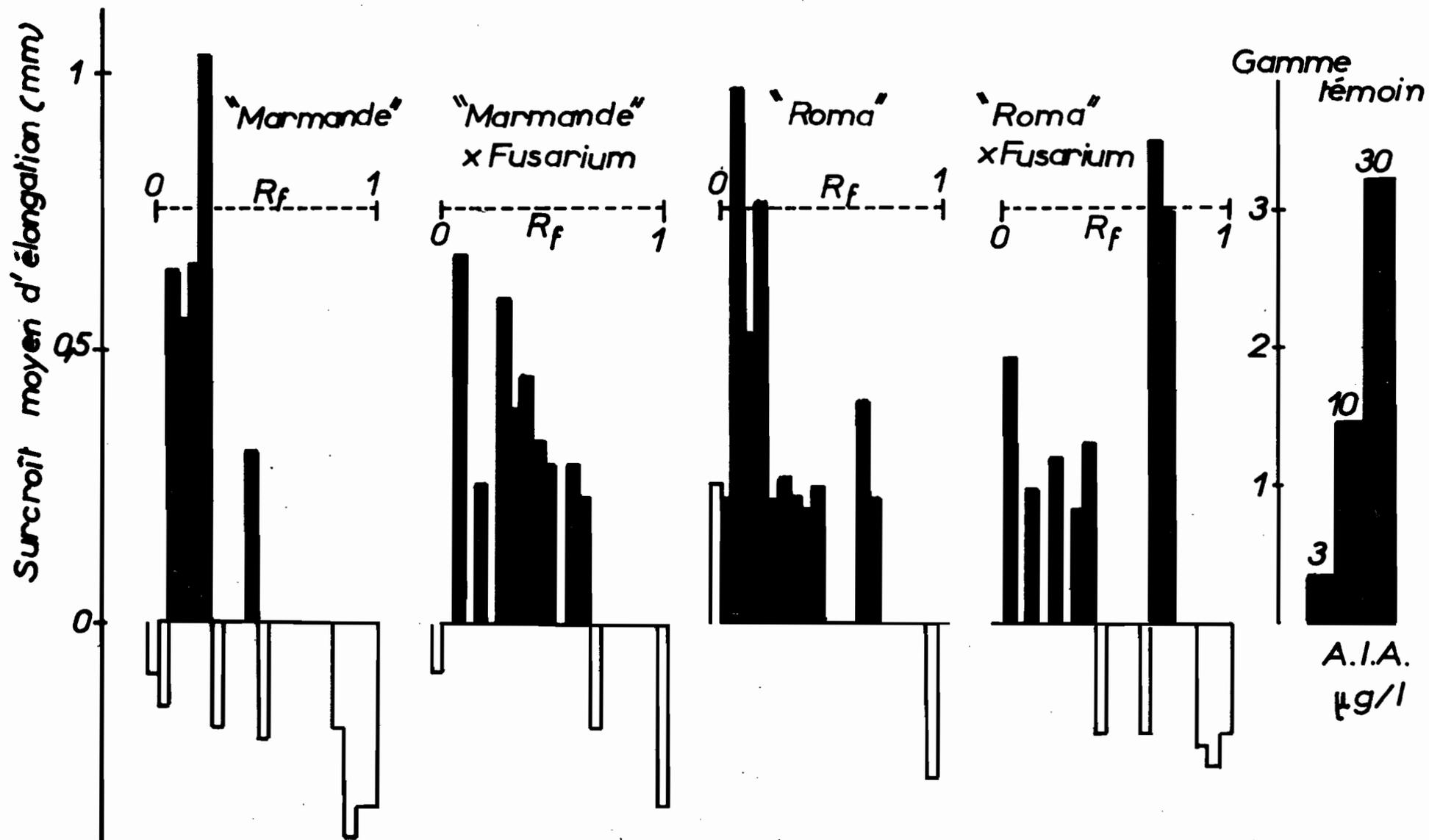


Fig.9- Histogrammes représentant les substances de croissance isolées de plantules de Tomate

Les histogrammes révèlent la présence de cinq groupes de substances localisés aux R_f suivants :

A	à	0,025 - 0,075
B		0,125 - 0,225
C		0,275 - 0,375
D		0,425 - 0,525
E		0,575 - 0,675

La confrontation des résultats d'analyse des plantules "témoin" montre certaines différences pour ces substances qui sont absentes (0) présentes (+) ou abondantes (++) (première colonne du Tableau XII). Il est surtout intéressant de comparer l'évolution des substances avec l'état d'infection : elles peuvent diminuer (-), se maintenir (0) ou augmenter (+) (deuxième colonne du Tableau XII).

	MARMANDE		ROMA	
"A"	(0)	(0)	(+)	(+)
"B"	(++)	(-)	(+)	(-)
"C"	(0)	(+)	(+)	(0)
"D"	(+)	(+)	(+)	(-)
"E"	(0)	(+)	(+)	(+)

TABLEAU XII. - Comparaison des teneurs en substances de croissance chez les plantules de Tomate Marmande et Roma, et évolution (2^{ème} colonne) avec l'infection artificielle par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

On remarque ainsi que les trois substances "A", "C" et "E" sont présentes sur l'histogramme d'analyse des plantules ROMA alors qu'elles manquent sur celui des plantules MARMANDE.

Le passage de l'état sain à l'état d'infection latente semble surtout marqué par une augmentation très nette des quantités de la substance "E" chez "Roma". Le même phénomène s'observe également chez "Marmande", bien que la quantité décelée y soit moindre. La substance "B" décelée au R_f 0,125 - 0,225 paraît diminuer chez les plantules de l'une et de l'autre variété.

2°- Analyse de plantules en cours d'infection latente.

Un schéma d'expérience factorielle a été adopté pour cette recherche, permettant d'opposer des plantules de variété Marmande (sensible) à des plantules de variété Roma (résistante), des plantules "témoin" à des plantules "infectées", et enfin, des lots cultivés sur milieu de Knop gélosé additionné ou non de chlorure de sodium (5 g/l).

Le développement hétérogène des 8 lots de cet essai (150 graines par lot) - la germination des graines ayant été retardée sur milieu additionné de chlorure de sodium-, n'a permis de réaliser l'infection par le *Fusarium* (souche de race 1) que trois semaines après le semis. L'incubation, à 28°C a été prolongée 15 jours. Pour chaque lot, 48 plantules, d'apparence saine, ont été extraites de leur tube, lyophilisées et réduites en poudre. Le test biochromatographique de NITSCH et NITSCH a été appliqué à des extraits méthanoliques obtenus à partir de 50 mg de poudre.

Les résultats, présentés sur les figures 10 et 11, sont repris globalement sur le tableau XIII.

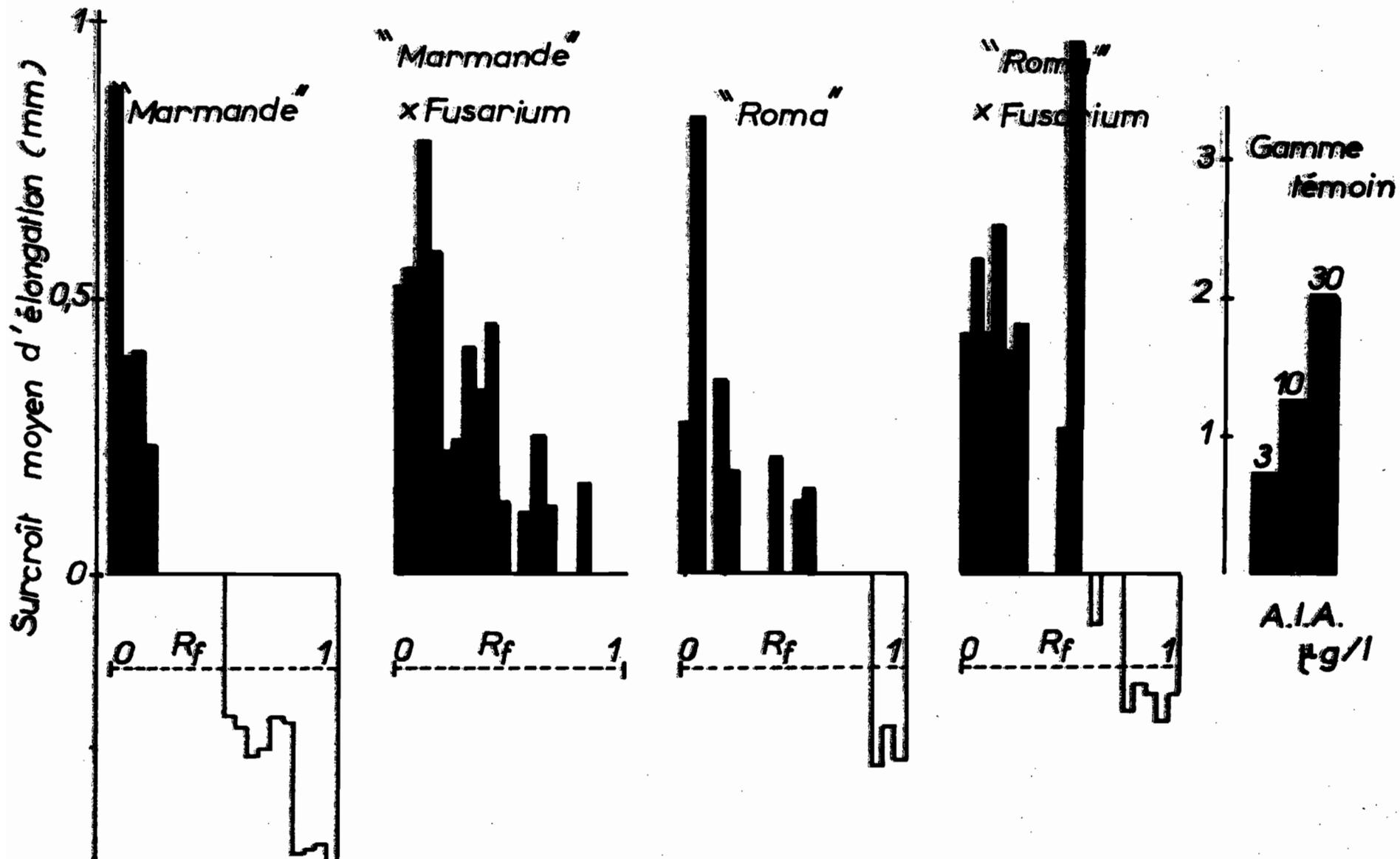


Fig.10- Histogrammes représentant les substances de croissance isolées de plantules de Tomate (milieu de culture = Knop)

Surcroît moyen d'élongation (mm)

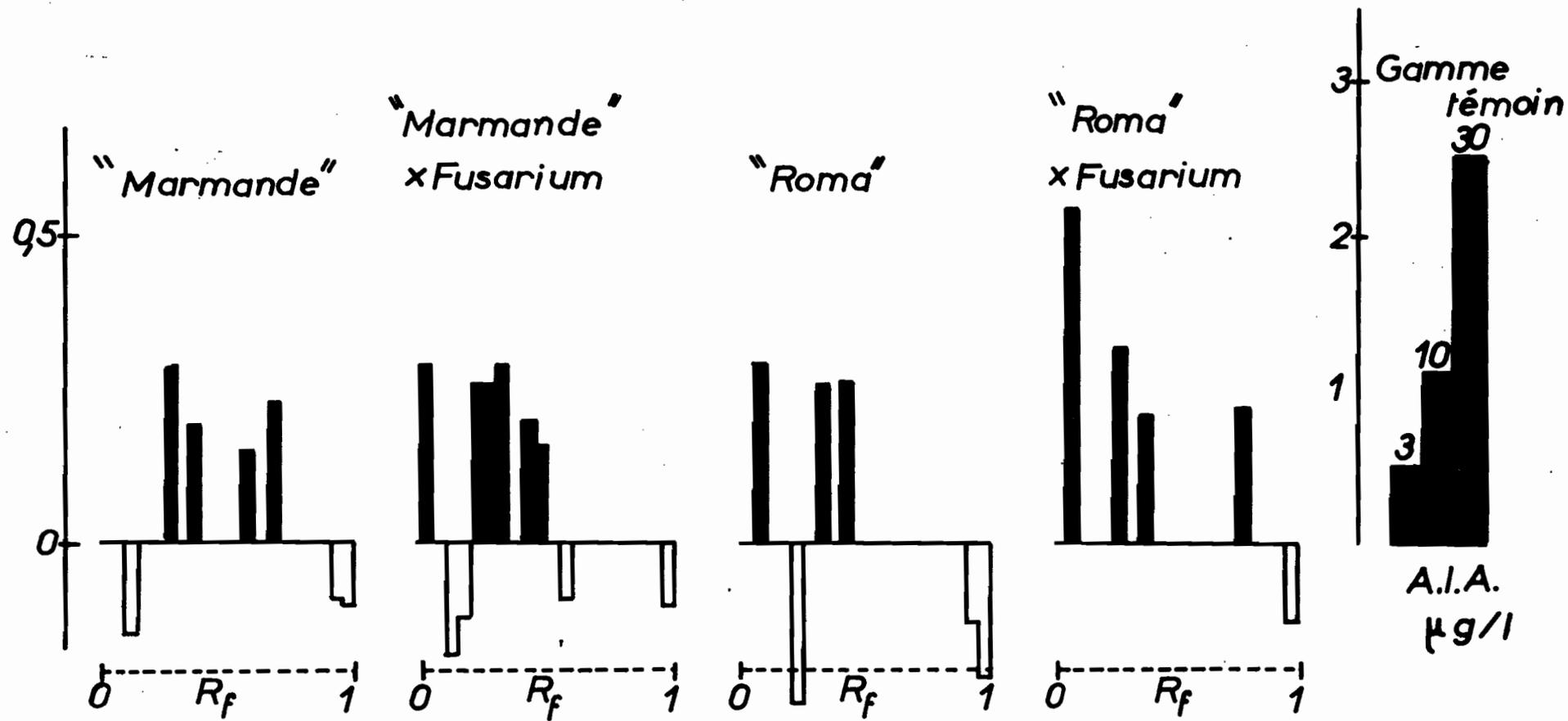


Fig. 11 - Histogrammes représentant les substances de croissance isolées de plantules de Tomate (milieu de culture = Knop + 5‰ NaCl)

	Stimulations	Inhibitions
<u>Milieu de Knop</u>		
Marmande témoin	1,9 (°)	3,6
Marmande x <i>Fusarium</i>	4,7	0
Roma témoin	2,1	0,9
Roma x <i>Fusarium</i>	4,0	1,2
<u>Milieu Knop + NaCl</u>		
Marmande témoin	0,9 (°°)	0,3
Marmande x <i>Fusarium</i>	1,5	0,5
Roma témoin	0,8	0,6
Roma x <i>Fusarium</i>	1,2	0,3

(°) sensiblement équivalent à l'effet de 30 microgrammes/l d'A.I.A.

(°°) sensiblement équivalent à l'effet de 6-7 microgrammes/l d'A.I.A.

TABLEAU XIII. - Valeurs totales par chromatogramme des stimulations et des inhibitions d'élongation des fragments de mésocotyle d'Avoine (en mm).

Ce tableau souligne que :

- a) la présence de chlorure de sodium dans le milieu de culture entraîne une diminution de la détection des effets de stimulation de l'ordre de 75 %.
- b) l'infection des plantules est toujours marquée par l'augmentation des effets de stimulations.
- c) le facteur variété ne paraît pas avoir une influence sur les effets de stimulations, du moins à ce niveau de l'effet global.

Par ailleurs, notons que les effets de stimulation sont sensiblement du même ordre que dans l'essai précédent, soit 30 millicrogrammes d'A.I.A. pour "Marmande".

L'examen détaillé des histogrammes permet de distinguer la présence de six substances localisées aux R_f suivants :

"A"	0,025 - 0,075
"B"	0,125 - 0,175
"C"	0,275 - 0,325
"D"	0,375 - 0,425
"E"	0,525 - 0,675
"F"	0,825 - 0,875

	MARMANDE		ROMA	
	"A"	(+)	(0)	(+)
"B"	(+)	(0)	(+)	(0)
"C"	(0)	(+)	(0)	(+)
"D"	(0)	(+)	(+)	(-)
"E"	(0)	(+)	(+)	(+)
"F"	(0)	(+)	(0)	(0)

TABLEAU XIV. - Répartition des substances entre les lots de plantes analysées et évolution avec l'infection.

Les substances "A" et "B", signalées par des pics d'assez forte intensité aux R_f 0,050 et 0,150, sont des constituants normaux des plantules de Tomate : elles existent aussi bien chez les plantules de Marmande que chez celles de Roma, et l'état d'infection latente ne modifie pas leur concentration. Au contraire, la substance "C" n'apparaît que lorsque les plantules sont infectées par le *Fusarium* sans distinction de la résistance ou de la sensibilité des variétés. L'effet le plus spectaculaire de l'infection concerne la substance "E" qui apparaît chez "Marmande" ; déjà présente chez "Roma", elle voit son niveau atteindre l'équivalent de 6-7 microgrammes d'A.I.A., soit $0,12 \cdot 10^{-6}$ rapportée à la masse de tissu de Tomate lyophilisée.

En ce qui concerne les lots de plantules cultivées sur milieu de Knop additionné de chlorure de sodium, le faible développement des histogrammes présentés à la figure 11 pourrait résulter de l'accumulation du sel dans les tissus végétaux. Les ions Cl^- et Na^+ seraient susceptibles d'agir à trois niveaux :

- a) en entravant l'extraction des substances de croissance,
- b) en perturbant leur migration sur les chromatogrammes,
- c) en atténuant leurs effets sur les segments de mésocotyle d'Avoine.

Les histogrammes, nettement appauvris qualitativement et quantitativement, ne manifestent plus que les quatre substances "A", "C", "D" et "E".

Nous n'avons pas eu la possibilité de renouveler cette expérimentation, eu égard au volume prohibitif de la verrerie nécessaire pour la culture des plantules.

La confrontation des résultats des analyses cités dans les paragraphes 1 et 2 met en relief la détection de la substance de croissance "E", localisée sensiblement au R_f 0,6 ; cette substance ou ce groupe de substances n'apparaît, chez les plantules sensibles, que lorsqu'elles sont en état d'infection latente. Chez les plantules de variété Roma, résistante, elle se manifeste à l'état sain, mais le niveau détecté en état d'infection latente est considérablement accru.

VII. - ANALYSE DES FILTRATS DE CULTURE DE L'AGENT PATHOGENE

Les précédentes analyses ont montré que pour deux variétés de Tomate, l'une sensible, l'autre résistante à la fusariose, plusieurs substances de croissance peuvent être détectées et l'une que nous avons désignée par la lettre "E" semble importante puisque sa présence est stimulée par l'état d'infection latente.

L'agent pathogène est-il susceptible, pour sa part, de produire ces substances de croissance que l'on décèle chez les plantules infectées, ou a-t-il une action indirecte sur leur métabolisme auxinique ? L'analyse des filtrats de culture du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* pouvait permettre l'étude de la première proposition, à condition toutefois, de ne pas perdre de vue la différence entre milieu artificiel (culture *in vitro*) et milieu naturel (xylème de la Tomate).

1°- Extraction des filtrats et séparation des divers constituants.

La méthode d'extraction, inspirée de celle de KUO & SCHEFFER pour isoler l'acide fusarique, utilise la propriété de solubilité sélective des substances de croissance dans l'acétate d'éthyle, et la faible solubilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau (5 à 6 %) qui permet la séparation des mélanges filtrat-acétate d'éthyle en deux phases distinctes. La faible miscibilité entre l'eau et l'éther éthylique est également utilisée pour une étape suivante de la séparation.

Les extraits "A" (acétate d'éthyle agissant sur le filtrat acidifié) sont plus riches et beaucoup plus diversifiés que les extraits "B" (éther éthylique sur la phase aqueuse reprise de "A" et alcalinisée). En effet, pour un litre de milieu de culture initial, les extraits secs de "A" ont une masse de 12 à 13 mg, alors que celle de "B" ne dépasse pas 1 mg.

Après évaporation totale du solvant, les extraits se présentent sous forme de cristaux différents et séparés. On en distingue assez aisément au moins deux types :

a) les uns, hyalins, formés de fines aiguilles associées en étoile, sont répartis uniformément sur le fond des boîtes de pyrex ;

b) d'autres, constitués de longues aiguilles jaune vif associées en larges faisceaux divergents aux deux extrêmités, sont plus rares et localisés surtout en bas des parois des boîtes.

Les parois des récipients sont également recouvertes de cristaux du premier type, mais le modèle d'association évolue en fonction de la position du dépôt (photos).

Les extraits "B" sont uniformément constitués de minces aiguilles cristallines, hyalines, isolées.

La séparation des substances en mélange dans ces extraits a été réalisée par chromatographie ascendante sur couche mince de cellulose. La plupart des solvants utilisés couramment n'ont pas permis de différencier les substances en mélange, qui demeurent groupées à l'emplacement du "spot initial".

L'adoption, après un certain nombre de tâtonnements, d'une solution de potasse diluée à 1 % comme phase mobile, s'est révélée efficace pour séparer les constituants des filtrats.

Typiquement, l'examen des chromatogrammes, après séchage, révèle à la lumière ultra-violette, cinq substances, que conventionnellement nous désignerons par les lettres "L", "M", "N", "O", et "P".

Le tableau XV reproduit les caractéristiques de ces substances.

Substance	R _f	Fluorescence en U.V. court 254 m-microns	Fluorescence en U.V. long 366 m-microns
SPOT de départ	0	Auréole double : ligne noirâtre + ligne jaune verdâtre	Auréole rose orange
"L"	27	Jaunâtre clair	Violet clair
"M"	44	2 taches superpo- sées ou légèrement distinctes bleu clair - rose	rose clair
"N"	72	Invisible	Sombre
"O"	75	Ligne quadruple, alternance de rose et de violacé	ligne quadruple idem
"p"	83	Sombre	Invisible
<u>Fond</u>		<u>Violet foncé</u>	<u>Bleu violacé</u>

TABEAU XV. - Caractéristiques des substances séparées par chromatographie des filtrats de culture.

Ces substances se retrouvent sur les chromatogrammes relatifs à la souche 3467 (race 2) et 3468 (race 1). Parfois, une tache bleue fluorescente discrète a pu être révélée aux environs des R_f 0,12 - 0,18. De même, certains autres isollements de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ont produit, outre cette substance, une autre également bleutée (en éclairage ultraviolet) située à un R_f légèrement supérieur à celui de "M".

Au cours des répétitions des analyses, les cotes des R_f sont l'objet d'une certaine fluctuation, à mettre sur le compte de différences de température lors du développement des chromatogrammes.

2°- Influence de la durée de la culture sur les substances isolées.

La production des substances décelées sur les chromatogrammes dépend de la durée d'incubation des cultures du *Fusarium*. Nous avons recherché à connaître les délais nécessaires à l'élaboration de ces divers métabolites, en sacrifiant des cultures d'âge croissant : 2, 4, 6, 8, 10 et 13 jours (Figure 12).

L'analyse chromatographique simultanée des six extraits a mis en évidence la présence des cinq substances "L", "M", "N", "O" et "P", pour lesquelles l'intensité de fluorescence est rapportée dans le Tableau XVI.

Durée d'incubation (en jours)	2	4	6	8	10	13
"Spot initial"	++	++	++	++	++	++
"L"	++	++	++	++	++	++
"M"	++	++	++	++	++	++
"N"	++	++	++	++	++	++
"O"	0	+	+	+	+	+
"P"	0	faible	+	+	+	++

TABLEAU XVI. - Délais de production des divers métabolites isolés des filtrats de culture.

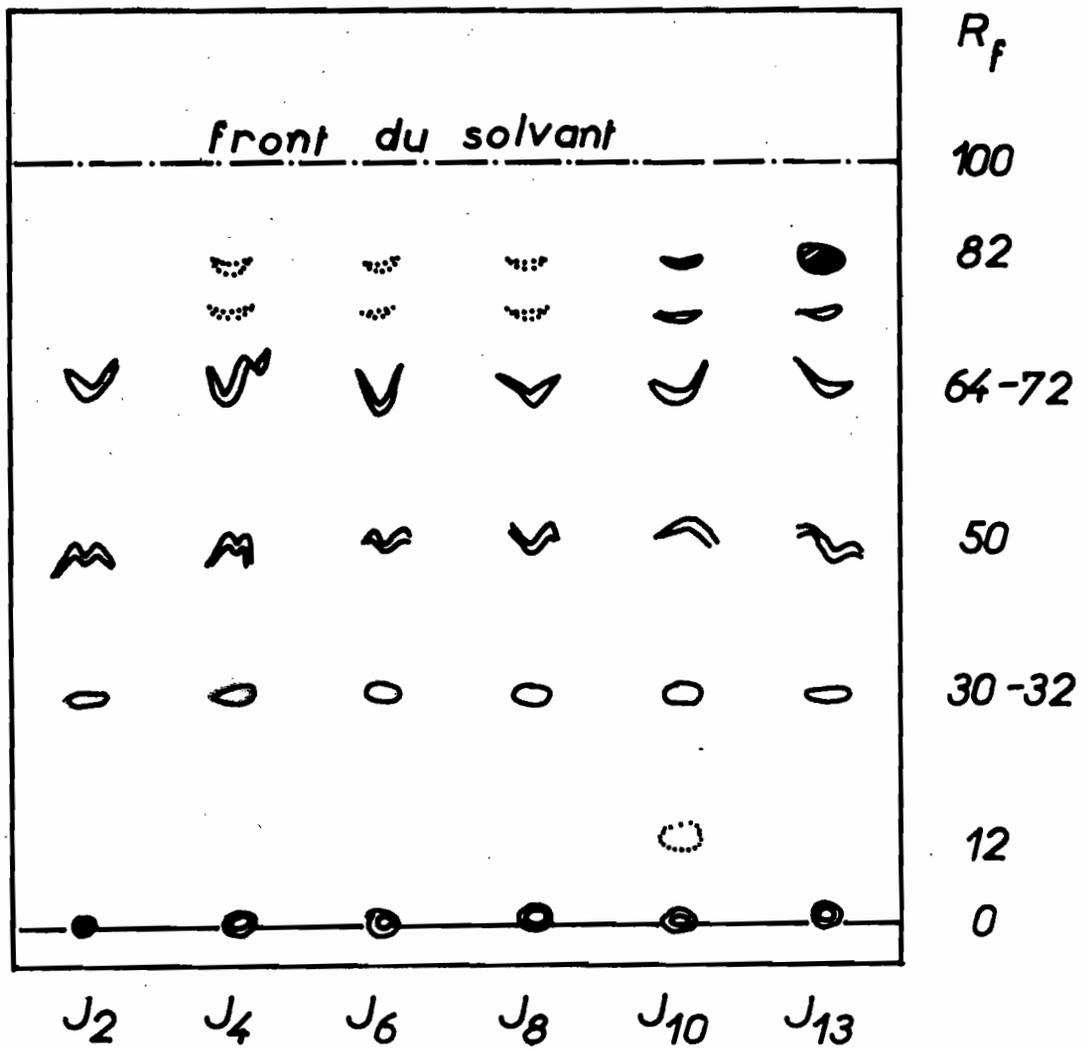


Fig.12 - CHROMATOGRAMME DES FILTRATS DE CULTURE DU FUSARIUM, COUR DES INCUBATIONS DE DUREE PROGRESSIVE : 2, 4, 6, 8, 10 et 13 JOURS

Ainsi, la production de ces cinq métabolites est-elle précoce. Seule celle de "O" et "P" montre un léger retard puisqu'elle demande 4 à 6 jours.

Une tache bleue discrète a été observée au R_f 0,12 sur les chromatogrammes des cultures de 10 jours : la substance qu'elle représente pourrait être un métabolite occasionnel du *Fusarium*. Il est possible que la culture ait subi une variation, cette substance supplémentaire la caractériserait.

La substance "P" est produite progressivement, alors que les autres existent à des niveaux constants au cours de la période où elles sont décelables.

3°- Analyse biochromatographique des extraits.

Les extraits d'une culture de 15 jours de la souche n° 3468 (race 1) sur 1000 ml de milieu ont été soumis successivement à une séparation par chromatographie ascendante sur couche mince puis à la méthode d'analyse biologique "croissance" des racines de plantules de Tomate.

Sur le chromatogramme, les cinq substances L, M, N, O, P, ont été reconnues à l'examen en lumière ultra-violette, leur R_f étant toutefois un peu inférieur à celui obtenu couramment.

Le chromatogramme a été partagé en onze bandes égales allant de la ligne de départ jusqu'au front de développement, et les substances localisées dans chacune de ces bandes ont été reprises par cinq pastilles pour stimuler cinq plantules de Tomate.

Les observations de l'allongement des racines ont été répétées à quatre reprises (les pastilles étant mises en place juste aussitôt après la 2^{ème} mesure) permettant de calculer :

- a) les deux premières, la vitesse initiale d'allongement v_0 ,
- b) la seconde et la troisième, la vitesse d'allongement v_1 des racines après une phase initiale de stimulation par les pastilles,

c) la 3^{ème} et la 4^{ème}, la vitesse d'allongement v_2 des racines après une stimulation prolongée par les pastilles.

Le rapport v_1/v_0 est l'indice relatif d'élongation q_1 . C' est ce paramètre qui mesure l'intensité des actions de stimulation ou d'inhibition des substances appliquées comme stimulus.

Les résultats exprimés par les histogrammes figure 13, sont résumés dans le tableau XVII.

n° bande	$R_f \times 100$	$q_1 \times 100$	$q_2 \times 100$	localisation des substances
0	0- 5	347	237	"L" et "M"
1	5-15	410	320	
2	15-24	355	274	
3	24-34	411	296	
4	34-43	337	235	
5	43-53	367	276	
6	53-62	367	255	
7	62-72	382	295	"N"
8	72-81	216	210	
9	81-91	90	25	"O"
10	91-100	257	224	"P"
Témoin		267	205	
17 millimicrogrammes AIA		129	100	
170 " "	" "	61	25	

TABLEAU XVII. - Valeurs moyennes de l'indice relatif d'élongation pour les différentes bandes du chromatogramme.

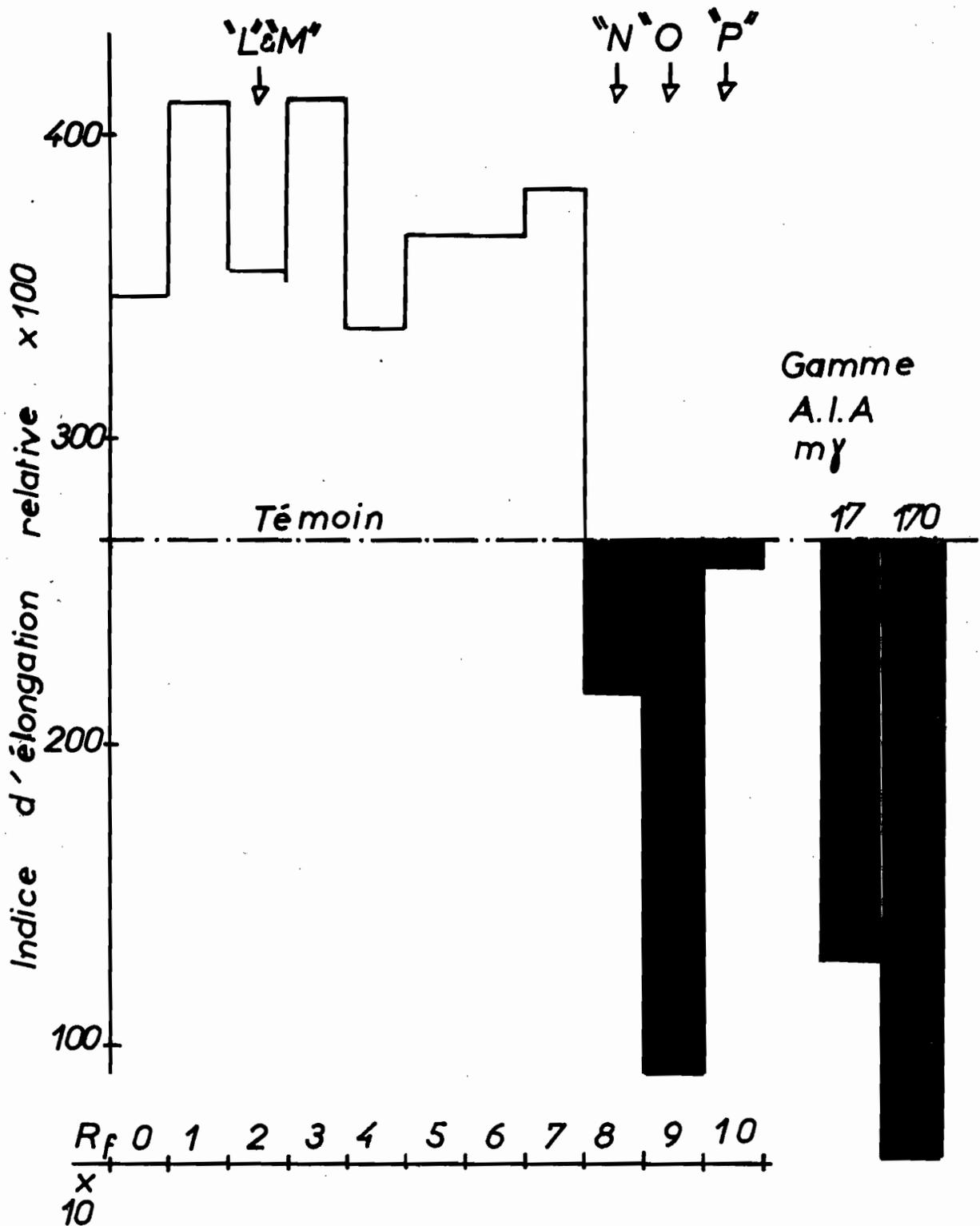


Fig.13_ Histogramme des premières valeurs q_1 de l'indice d'elongation relative pour les dix fragments du chromatogramme [tableau XVII]

Quatre bandes se distinguent très nettement sur les histogrammes et sur le tableau XVII, aussi bien pour q_1 que pour q_2 : ce sont les bandes n° 1, 3, 7 et 9. Cette dernière présente une activité auxinique très forte, de l'ordre de 100 à 170 millimicrogrammes d'acide indol acétique, et correspond à la substance "O". Au contraire, les substances absorbées au niveau des bandes 1, 3 et 7 du chromatogramme, par leur action de stimulation sur la croissance des racines de plantules de Tomate pourraient être des antagonistes d'auxines.

Le tableau XVIII, représentant la rhizogénèse moyenne des plantules de Tomate, cinq jours après leur stimulation par les pastilles, souligne encore les propriétés particulièrement intenses de la bande n° 9 où l'inhibition de la rhizogénèse est fortement accusée.

N° bande	Nombre moyen de racines secondaires	Substance	
0	10	"L" et "M"	
1	8,6		
2	10,8		
3	9,0		
4	10		
5	8,4		
6	9,2		
7	11,2		
8	7,2		"N"
9	2,7		"O"
10	7,2	"P"	
Témoin	7,4		
17 millimicrogrammes	7,2		
170 " "	5,7		

TABEAU XVIII. - Rhizogénèse moyenne des plantules de Tomate stimulées par les extraits des différentes bandes du chromatogramme.

4°- Discussion.

Une seule bande du chromatogramme présente donc des caractères indiscutables de stimulateurs de croissance. La localisation des propriétés auxiniques à la bande n°9 permet de les attribuer à la substance "O" dont la présence à ce niveau a été vérifiée avant le découpage du chromatogramme.

D'après les valeurs obtenues pour la "gamme" d'acide indol acétique, on peut évaluer la production de cette substance à l'équivalent d'au moins 500 à 800 millimicrogrammes d'A.I.A. pour 1000 ml de milieu de culture au départ (sans tenir compte des pertes de substance au cours des différentes étapes de l'extraction, de la séparation et de la reprise à partir de bandes du chromatogramme).

Il est important de se souvenir que cette substance "O" n'est pas produite rapidement en culture par le *Fusarium*, contrairement aux autres "L", "M" et "N", puisqu'elle ne se manifeste qu'au 4^{ème} jour et ne se détecte bien qu'au 6^{ème}.

Les autres substances, "L", "M", "N" et "P", détectées sur les chromatogrammes par leur fluorescence en lumière ultra-violette, ne se distinguent pas par une activité particulière des bandes correspondantes du chromatogramme analysé. Seules, les deux premières, groupées sur la même bande n° 2, stimulent la rhizogénèse des plantules. Il est possible que tous ces métabolites soient produits en trop faible quantité pour pouvoir agir par eux-mêmes. Leur identification semble devoir être, néanmoins, indispensable pour une meilleure compréhension de l'action parasitaire du *Fusarium*.

VIII. - INTERACTIONS HÔTE-PARASITE

L'analyse de plantules de Tomate a révélé que l'état d'infection latente stimule la production d'une substance douée de propriétés auxiniques (Chapitre VI). D'autre part, parmi les constituants des filtrats de culture de l'agent pathogène se trouve une substance particulièrement active comme stimulateur de croissance (Chapitre VII).

La racine de plantule de Tomate a pu être utilisée pour caractériser la présence et apprécier la concentration de substances de croissance. Cette technique peut être transposée pour étudier *in vivo* les interactions hôte-parasite au niveau des facteurs de croissance : le stimulus inerte (pastille imbibée d'une solution de substance à analyser) est remplacé par un stimulus vivant (spores de *Fusarium* adsorbées sur une pastille stérilisée, agissant sur la racine par les filaments germinatifs et les hyphes).

1°- Action de substances de croissance sur la rhizogénèse et la croissance de la racine.

Nous avons pu constater que l'application de doses modérées d'auxine réduisait la production de racines secondaires (Tableau XIX).

Témoin	9,66
180 millimicrogrammes	7,00
360 millimicrogrammes	5,66
540 millimicrogrammes	3,16

TABLEAU XIX. - Action de doses croissantes de 2,4-D sur la rhizogénèse de plantules de Tomate.

Plantules de variété Roma, traitées le 3^{ème} jour après le semis.

Nombre moyen de racines secondaires dénombrées au 5^{ème} jour.

Lorsque des doses élevées (produisant des réactions tumorales au niveau des apex) sont appliquées, elles déclenchent, au contraire, une accélération temporaire de la rhizogénèse (tableau XX).

Témoin	9,25
5 millimicrogrammes	5,4
50 millimicrogrammes	6,8
500 millimicrogrammes	20,1

TABLEAU XX. - Action de doses élevées d'A.I.A. sur la rhizogénèse de plantules Roma observées au 4^{ème} jour suivant le traitement

Mais, c'est principalement sur la croissance de la racine qu'a été étudiée l'influence des stimulateurs de croissance. L'acide indol acétique a été utilisé comme élément de référence à différentes doses (nous avons pu constater, en effet, que pour une même concentration de la solution l'action est une fonction croissante du volume apporté). L'application de l'acide indol acétique a toujours entraîné une réduction de la croissance de la racine (Tableau XXI).

Dose A.I.A. (en millimicrogrammes)	0	36	90	360	900
v_o moyen	1,68	2,34	2,09	1,91	1,51
v_i moyen	2,97	2,62	1,60	0,82	0,45
q moyen	100	62,7	50,2	24,5	16,9

TABLEAU XXI. - Influence de doses croissantes d'A.I.A. sur l'indice moyen d'élongation relative.

Durée de sélection : 5 h 45 mn

Durée d'observation: 14h

3 plantules par lot ; variété Roma.

Pour des doses modérées, il s'agit d'un ralentissement momentané, la vitesse d'élongation reprenant sa valeur après une courte période. Pour des doses plus importantes, la durée de l'inhibition est prolongée, tandis qu'apparaissent des réactions toxiques (hypertrophie terminale de l'apex).

L'expression de la dose en logarithmes décimaux permet de reconnaître qu'il existe une régression linéaire entre l'indice moyen et la dose d'A.I.A. (Tableau XXII).

$$\begin{aligned}v_1 \text{ estimée} &= 2,17 - 5,64 \log X & r &= - 0,90 \\v_2 \text{ estimée} &= 2,88 - 7,63 \log X & r &= - 0,86 \\v_3 \text{ estimée} &= 3,61 - 9,27 \log X & r &= - 0,88\end{aligned}$$

v_1 observée 15 h après la stimulation
 v_2 observée 21 h après la stimulation
 v_3 observée 44 h après la stimulation

TABLEAU XXII. - Equation de quelques droites de régression de la vitesse moyenne d'élongation sur le logarithme décimal de la dose X (en millimicrogramme) d'A.I.A. et indice de corrélation r.

De telles équations permettent de construire les abaques pour reconnaître dans une expérience donnée les doses équivalentes d'A.I.A. correspondant aux vitesses v_x observées.

2°- Croissance de la racine des plantules après la contamination artificielle.

Au cours de la période de contamination, les racines sont soumises à l'action irritative des spores du *Fusarium*. On peut envisager la décomposition du stimulus en plusieurs étapes :

- a) excrétion de substances par les spores et les filaments germinatifs (action toxique),
 - b) développement superficiel des hyphes en contact avec l'assise pilifère de la racine (action mécanique et toxique),
 - c) pénétration des hyphes dans le cortex en direction du xylème.
- La phase d'infection est commencée : elle se situe environ 36 à 48 h après l'application de la pastille *inoculum*.

Quelques mesures, effectuées au microscope sur plantules en culture sur lame, ont montré qu'au cours de la seconde phase citée ci-dessus, la vitesse d'élongation a subi une régression très nette par rapport aux plantules témoin (non infectées) (Tableau XXIII).

	Avant la contamination (sélection)	Contamination + 7 h	Contamination + 24 h (°)
TEMOIN	3,8 \pm 0,9	5,3 \pm 0,6	1,8 \pm 0,2
<i>Fusarium</i> n° 3468	3,2 \pm 0,0	5,8 \pm 0,3	0,6 \pm 0,01
<i>Fusarium</i> n° 3467	3,2 \pm 0,0	4,2 \pm 0,4	0,4 \pm 0,0

TABLEAU XXIII. - Vitesse de croissance de la racine après contamination par le *Fusarium* (exprimée en microns/mn)
- plantules de variété Roma.

(°) après la 2^{ème} mesure les plantules ont été sectionnées au collet.

3°- Influence de l'infection artificielle sur la rhizogénèse des plantules.

L'état d'infection latente, créé artificiellement chez les plantules de Tomate, entraîne une stimulation de la rhizogénèse. Cette stimulation est sensiblement du même ordre que celle obtenue par excision chirurgicale de l'extrémité de l'apex (Tableau XXIV).

	Sans contamination	Avec contamination
Sans excision	2,25 (1)	4,0 (2)
Avec excision	4,63 (3)	5,35 (4)

TABLEAU XXIV. - Rhizogénèse moyenne de plantules de Tomate Roma infectées artificiellement par une souche de race 2 du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, ou traitées chirurgicalement (excision de l'apex).
Dénombrement effectué 4 jours après le traitement.

La différence (3) (4) n'est pas significative (test "chi 2" sur les médianes) ; celle entre les traitements (2) et (4) est au contraire très significative ("chi 2" = 6,41).

4°- Influence de l'infection artificielle sur la croissance de la racine.

Pour cette recherche, la croissance des racines a été calculée par la mesure des positions successives de l'apex au cours d'une culture temporaire de plantules en boîtes de Petri sur milieu gélosé. Les plantules ont été contaminées par dépôt d'une "pastille-*inoculum*" sur la racine, à 1 cm environ du collet. La position des apex est marquée chaque jour.

La croissance des racines est très sensiblement ralentie lorsque les plantules sont en état d'infection latente (Tableau XXV).

Durée d'incubation (en jours)	2	3	4	5
<u>Plantules inoculées</u>				
souche n° 3468	14	7	3	0,5
souche n° 3467	14	6	2,5	0,5
souche n° 3466	15	7	3	0,5
souche n° 39020	14	6	2	1
souche n° 39040	13	6	3	1
<u>Plantules témoin</u>	20	16	9	4
(Nombre de plantules par lot = 12)				

TABEAU XXV. - Vitesse moyenne de croissance des racines de plantules de Tomate Roma, contaminées par des souches différentes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, exprimée en mm/j. - Evolution avec la durée d'incubation (comptée à partir de la contamination).

Il est manifeste que l'action répressive en relation avec l'infection est d'autant plus intense avec le temps, à moins qu'il n'existe un effet d'interaction avec le ralentissement général de la croissance (observé chez les plantules témoin) dont la cause la plus probable est l'épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs.

Durée d'incubation	2	3	4	5
n° 3468	0,70	0,44	0,33	0,12
n° 3467	0,70	0,37	0,27	0,12
n° 3466	0,75	0,44	0,33	0,12
n° 39020	0,70	0,37	0,22	0,25
n° 39040	0,65	0,37	0,33	0,25
Equivalence en dose A.I.A. d'après l'abaque dose/q moyen	30 à 40	60 à 100	100 à 400	400 à 800

TABLEAU XXVI. - Rapports des vitesses moyennes d'élongation pour les plantules infectées et les plantules témoin d'après XXV).

5°- Discussion. Conclusion.

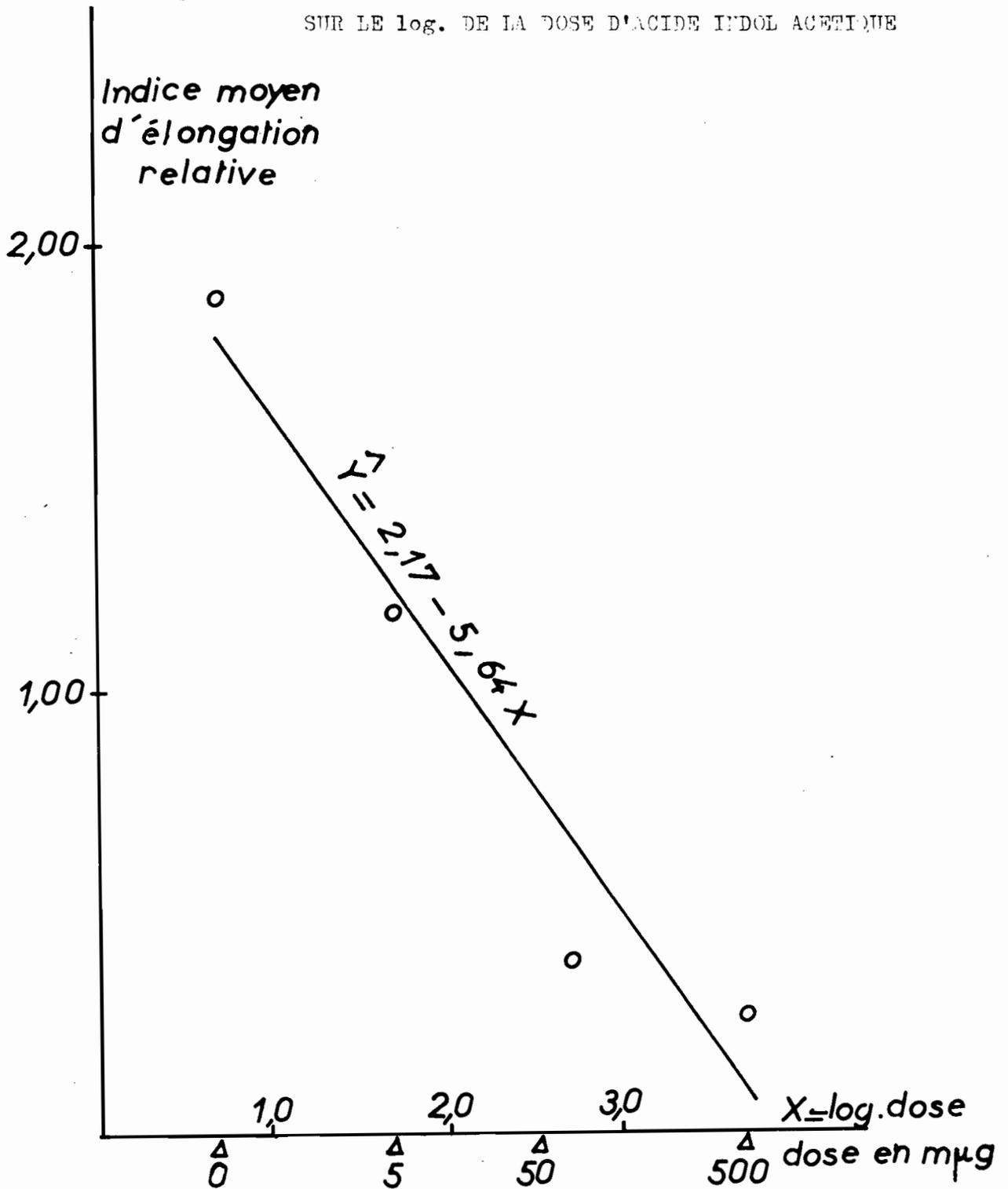
Les quelques résultats expérimentaux cités dans ce chapitre VIII montrent que la rhizogénèse et l'élongation de la racine sont deux fonctions inverses vis-à-vis du facteur "auxines":

- la rhizogénèse augmente avec les doses d'auxine croissantes,
- la croissance de la racine, au contraire, diminue avec des doses croissantes.

L'évolution de ces deux fonctions aussi bien pendant la contamination que pendant la phase d'infection latente, où nous observons simultanément l'augmentation de la rhizogénèse et la répression de la croissance de la racine, montre clairement que la concentration interne des facteurs de croissance augmente avec l'infection.

Le rapport des vitesses moyennes, citées au tableau XXVI, peuvent être assimilées à l'indice q, indice moyen d'élongation relative. D'après l'abaque (figure 14) établi pour un dosage de 5 à 500 millimicrogrammes d'A.I.A., on peut envisager les équivalences citées en bas du tableau XXVI ;

Fig. 14 - REGRESSION DE L'INDICE MOYEN D'ÉLONGATION RELATIVE
SUR LE log. DE LA DOSE D'ACIDE INDOL ACÉTIQUE



autrement dit, l'inhibition d'élongation relevée le 2^{ème} jour pour les plantules infectées par la souche n° 3468 correspond à l'application d'une dose exogène de 30 millimicrogrammes d'A.I.A. sur une racine de plantule de Tomate Roma, celle du 5^{ème} jour à 800 millimicrogrammes.

IX. - DISCUSSION GENERALE

Plutôt que de reprendre point par point les résultats relatés précédemment, nous avons jugé plus fructueux de les situer par rapport aux derniers développements publiés sur le sujet, et enfin, de prévoir quelques orientations souhaitables pour déboucher sur les résultats pratiques pressentis.

Nous évoquerons ainsi :

1) la nouvelle synthèse de BECKMAN, insistant toujours sur la "localisation" du parasite,

2) les hypothèses sur le pouvoir pathogène, la spécificité du champignon parasite et la résistance de l'hôte,

3) enfin, le rôle des auxines et autres substances de croissance, revu à travers les interactions hôte-parasite.

1°- La nouvelle synthèse de BECKMAN.

Interprétant des observations minutieuses de racines de Tomate et de Bananier infectées par le *Fusarium oxysporum*, BECKMAN (1966) construit un schéma faisant intervenir cinq types de substances A, B, C, D et E (Figure 15).

Par la substance "A" non spécifique, le champignon induit le gonflement des constituants des cloisons perforées et des membranes terminales produisant un gel. Sa répartition est limitée à la lumière des vaisseaux et son intervention très rapide : le flux de sève peut être arrêté en 24 heures. Ce gel, de nature pectique, est soumis à une action

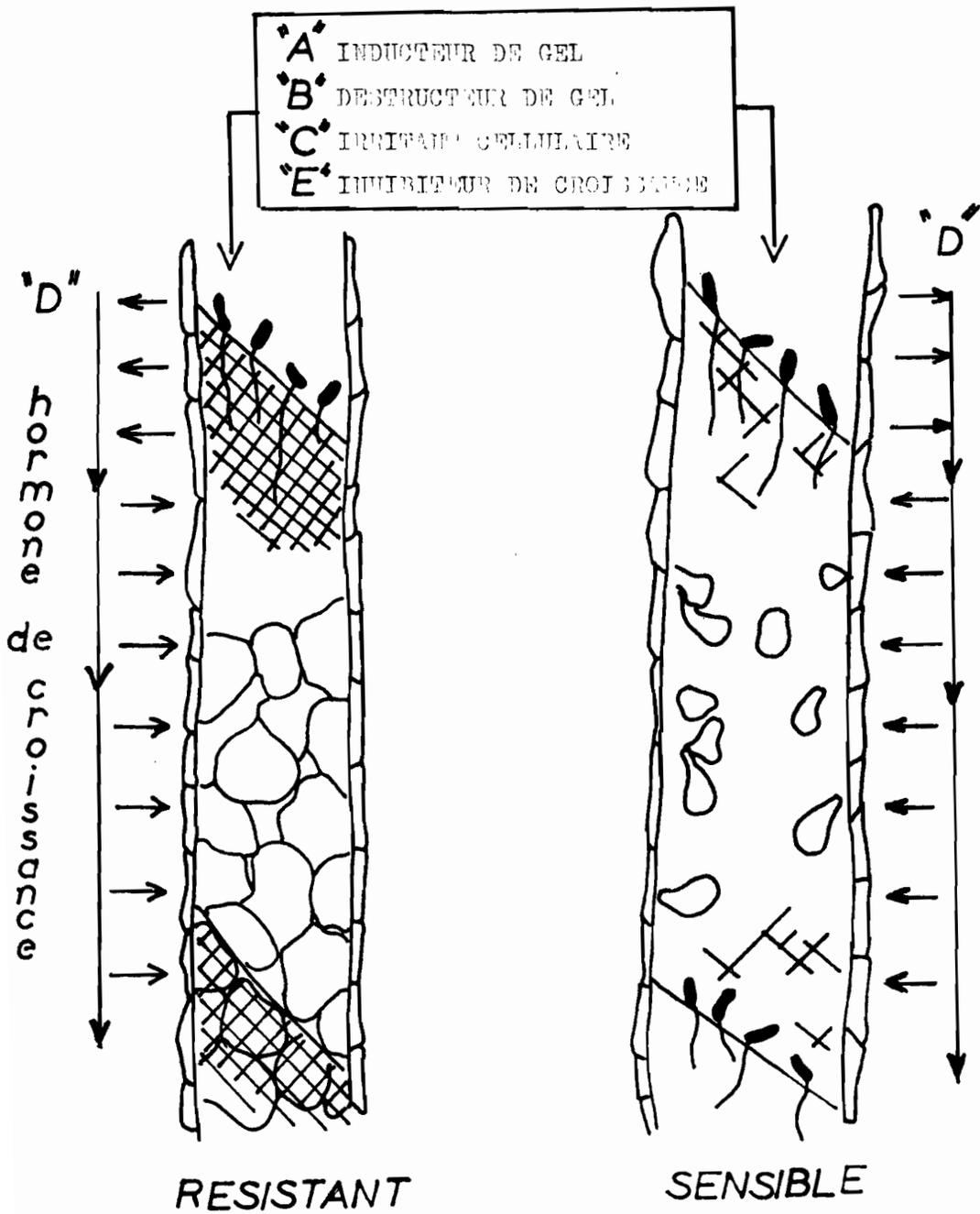


Fig.15 - Interactions hôte-parasite au
 niveau des vaisseaux du bois
 (d'après BECKMAN 1966)

de dégradation par la substance "B" produite par le parasite : ce sont principalement des enzymes pectolytiques. Au voisinage immédiat du site d'infection, les substances "C", d'origine parasitaire, attaquent les cellules du parenchyme vasculaire, qui, en réaction, produisent la substance du type "D". "D" est doué d'un grand pouvoir de diffusion et induit la croissance des cellules et les thylles intravasculaires. Les substances "E" seraient des inhibiteurs de croissance par lesquelles le parasite s'oppose au développement de ces thylles.

La production des gels de même que celle des thylles est précédée par un assouplissement (ou "plastification") des membranes (BECKMAN 1969) conditionné par une alternance cyclique de pH très acides (3,5), nocturnes, et de pH moins acides (5,5), diurnes, et par la compétition entre les pectines et les acides carboxyliques (ou CO_2). Cette compétition aboutit à rompre un certain nombre de "ponts" Calcium interpolymériques. Cette modification prédispose donc la membrane à l'action de polygalacturonases ou des auxines. La stimulation de l'intensité respiratoire dans les premiers jours de l'infection augmente considérablement le niveau du CO_2 et des acides carboxyliques du cycle de Krebs (BECKMAN 1967), ceci pendant la nuit, et localement aux sites d'accumulation des spores. Il s'en suit une augmentation du potentiel hydrogène. Au contraire, durant le jour, grâce au courant de sève induit par la transpiration, ces "poches" acides sont lavées et le pH prend des valeurs plus élevées.

L'identité de la substance "A" ayant été ramenée à ce mécanisme biochimique, les premières substances actives mises en jeu par le champignon sont les enzymes pectolytiques. La principale, la polygalacturonase, a son activité maximum aux pH acides (3,5 selon KERTESZ 1950, 5 selon PATIL & DIMOND 1968). Elle dégrade la pectine et les polypectates de sodium jusqu'au stade monomère (ac. galacturonique). PATIL & DIMOND (1968) ont pu montrer récemment que les sucres inhibent la formation de cet enzyme (glucose, acide galacturonique, sorbitol, 2 deoxy-D-glucose) : l'application de solutions de glucose ou même de galactose (BIEHN & DIMOND, 1971) sur la section des tiges de Tomate infectées réduit les symptômes. De même, des concentrations croissantes en calcium inhibent-elles l'activité de la poly-

galacturonase (CORDEN 1965). Il est possible que les milieux de culture additionnés de chlorure de sodium favorisent l'accumulation du sodium dans la tige jouant alors un rôle analogue à celui du calcium vis-à-vis de l'enzyme.

En ce qui concerne les substances du type "C", qui sont à l'origine des réactions "irritatives" des cellules du parenchyme vasculaire, ce sont principalement des toxines. Nous avons vu que l'origine de la lycomarasmine est attribuée par la plupart des auteurs à des phénomènes de sénescence du *Fusarium* en culture. L'acide fusarique, quant à lui, a été extrait des plantes infectées, il est bien caractérisé par son R_f sur les chromatogrammes et il reproduit des symptômes typiques sur feuilles et boutures de Tomate. Au contraire de la lycomarasmine, DAVIS (1967) l'obtient rapidement : 3 microgrammes par gramme de poids frais de thalle de *Fusarium* au 6^{ème} jour de culture.

Pourtant, même chez le *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, où l'acide fusarique est détecté le plus couramment et où il constituerait d'ailleurs le fondement de la spécificité de la forme spéciale *niveum* (les autres formes spéciales étant incapables de le synthétiser sur tissu de pastèque), on ne trouve pas de corrélation entre le pouvoir pathogène et l'aptitude à produire cet acide fusarique.

La pectine, les polypectates, la carboxyméthylcellulose, ne sont pas utilisables pour la synthèse de la toxine. Le glucose à 2 % permet l'obtention de quantités élevées *in vitro*, mais la sève n'en contient pas plus de 0,01 %, ce qui permet à peine la production de traces. Selon DAVIS (1970) le parenchyme ligneux constituerait alors la principale source de carbone.

Au sujet des régulateurs de croissance, BECKMAN (1970) a confirmé les résultats de MACE et col. (1966) : les thylles observés à l'intérieur des vaisseaux des plantes sont associés à la réaction vis-à-vis de l'infection et ont bien pour origine une stimulation par une hormone de croissance produite par la plante-hôte.

L'analyse des plantules de Tomate nous a montré, en général, que la concentration en stimulateurs de croissance augmente avec l'infection (Tableau XIII). De même, l'étude dynamique de la rhizogénèse des plantules infectées nous avait-elle conduit à la même conclusion (Tableaux XXIV et XXVI).

En ce qui concerne la teneur en auxines des Tomates infectées, GENTILE (1967) a signalé que la concentration des racines en tryptophane augmente légèrement puis s'abaisse en-dessous de celle des plantes non inoculées. Chez les plantules de Tomate infectées par le *Verticillium alboatrum*, PEGG (1959) avait trouvé une augmentation de près de 200 % de la concentration en acide indol acétique.

Parallèlement, MATTA et col. (1969) ont constaté l'augmentation rapide de la concentration en phénols totaux chez la Tomate après l'infection par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

A propos de la substance "E", par laquelle le champignon parasite s'opposerait à la formation des thylls, BECKMAN (1966) estime qu'elle pourrait être un antagoniste d'auxine ou même une auxine ayant des propriétés inhibitrices du fait d'une concentration élevée. La substance "O", que nous avons séparée des filtrats de culture du *Fusarium oxysporum* (Tableau XV) pourrait jouer ce rôle.

2°- Pouvoir pathogène, spécificité et résistance.

Pour EGLI (1969) qui a réussi à obtenir une production régulière d'acide fusarique, pour différentes cultures de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* grâce à un approvisionnement judicieux de zinc et de fer, il apparaît que le pouvoir pathogène serait lié à la capacité de synthèse de cette toxine.

Selon MATTA et col. (1969), l'augmentation de la concentration des phénols totaux chez la Tomate infectée artificiellement, permet de distinguer la forme spéciale *lycopersici* des autres.

En effet, pour une variété sensible infectée par une forme correspondante (Bonny Best x *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 1), l'augmentation est régulière mais lente (150 % d'augmentation sur le témoin au 18^{ème} jour) alors que pour une combinaison non susceptible (Bonny Best x *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*) elle est rapide au début (270-300 % au 3^{ème} jour) et décroît ensuite (25 % au 5^{ème} jour) pour revenir au même niveau que chez le témoin. L'agent pathogène spécifique serait donc capable de supprimer ou de moduler les réponses typiques des combinaisons incompatibles.

Selon MUSSEL (1970), la résistance d'une variété à l'infection pourrait tenir à la capacité de l'hôte à régler l'activité de la polygalacturonase du parasite ; l'enzyme extraite de plantes résistantes est, en effet, beaucoup plus faible que celle obtenue de plantes sensibles.

Chez certaines plantes qui sont naturellement résistantes à l'infection, le taux de phénols est beaucoup plus élevé que chez celles qui sont sensibles (cas de la pomme de terre avec l'acide chlorogénique) (PATIL et col. 1966). Le traitement pré-infectieux des cotonniers par des phénols appropriés (catéchol) a pu améliorer leur résistance (RAJ & MAHADEVAN 1970).

On estime que l'accumulation des phénols après l'infection est plus importante pour les plantes résistantes (BATESON 1970). Une certaine modulation de la résistance pourrait être réalisée par un effet contrariant des acides aminés vis-à-vis de l'inhibition des phénols sur les enzymes (PATIL & DIMOND 1967).

Il est intéressant de rappeler l'observation de DEESE & STAHPMAN (1962) concernant l'augmentation de la teneur des Tomates en sucres réducteurs après l'infection par le *Fusarium*, phénomène qui serait lié à la multiplication cellulaire du parenchyme ligneux. URITANI (1963), bien plus, formait l'hypothèse de la transformation de ces sucres en phénols.

MESSIAEN (1969) rapporte que la teneur en sucres totaux de plusieurs variétés de Tomate permet de les classer dans le même ordre que celui de leur degré de résistance à l'infection par le *Fusarium* (Marmande, Saint-Pierre, Eclairéur).

MOLOT (1969), étudiant les composés phénoliques du Maïs rappelle qu'ils se trouvent rarement à l'état libre mais le plus souvent combinés aux glucides par des liaisons ether-oxyde - C - O - C - ou ester - CO - O - C - sous laquelle ils sont résistants à l'oxydation et peu toxiques. La rupture des combinaisons peut se faire par une β -glucosidase, une hydrolyse acide attaquant la liaison ether-oxyde ou une hydrolyse alcaline attaquant la liaison ester. En conclusion d'une série d'analyses, ce chercheur suggère que le rapport H/B est en rapport direct avec la résistance au *Fusarium roseum* (H est la quantité totale des phénols hydrolysables et B celle des phénols libres). Au début de l'infection, le parasite affronte uniquement les phénols libres "B" ; après la pénétration, sous l'effet de sa β -glucosidase, la somme "H+B" devient toxique si la réserve de phénols hydrolysables est importante.

3°- Interactions hôte-parasite.

L'action des régulateurs de croissance sur la croissance de la racine et la rhizogénèse des plantules de Tomate ne représente pas un effet spécifique. A cet égard, rappelons les résultats de l'enrichissement du milieu de culture en chlorure de sodium, stimulation de l'élongation et inhibition de la rhizogénèse (Tableaux IX et X).

Pour les plantules de Tomate, l'application d'auxines réduit la croissance des racines (GUILLOT 1967, ABERG 1957), le taux des auxines endogènes étant supra-optimum. Les gibberellines par inhibition du catabolisme auxinique peuvent avoir le même effet (GASPAR et col. 1966).

En ce qui concerne la rhizogénèse, NANDA et col. citent l'effet répresseur de l'acide gibberellique. De même, la kinétine inhibe la rhizogénèse (SKOOG & MILLER 1957, PAULET 1965, TORREY 1962). Certains composés phénoliques présents dans l'apex de la racine sont également doués d'un pouvoir inhibiteur de la rhizogénèse (GEISSBUHLER 1953, LIBBERT 1956, TORREY 1956). Plusieurs composants ont été séparés (TORREY 1959) pour le complexe dit "beta" de BENNET-CLARK & col. (1952), dont certains sont des inhibiteurs de l'allongement des racines (coumarine en particulier).

Cependant, les substances endogènes n'agissent pas isolément mais bien intégrées les unes par rapport aux autres. GAUTHERET (1969) souligne, en effet, que la rhizogénèse n'est pas sous la dépendance du seul facteur auxine, mais d'un ensemble harmonieusement équilibré : sels minéraux, sucres, auxines, température, lumière.

Les résultats concernant la rhizogénèse et la croissance de la racine chez les plantules de Tomate infectées par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* confirment ceux du chapitre VI (analyse des plantules infectées lyophilisées). Mais ces derniers sont, à certains égards, plus riches puisque l'analyse des substances est réalisée après leur séparation et non globalement : les effets complexes inhibiteurs ne masquent plus les effets stimulants simples.

Chez les plantes résistantes, nous avons ainsi pu constater que l'infection provoque une forte augmentation des stimulants de croissance, alors que cette augmentation est plus modérée chez les plantes sensibles. Nous pouvons former les hypothèses suivantes :

A.- Plantes résistantes. Forte augmentation des auxines.

- 1° augmentation de la production des auxines ou de substances analogues avec blocage du système répresseur (A.I.A. oxydase).
Aux substances normalement produites par les cotyledons et l'axe hypocotylé, peuvent s'ajouter celles provenant des cellules du parenchyme vasculaire (substance "D" de BECKMAN).
- 2° destruction du système répresseur. L'obstruction des vaisseaux entre le site de production (l'apex) et le site d'activité de ces répresseurs (zone médiane de la racine) par les gels et les thylles peuvent empêcher toute action de leur part.
- 3° production d'auxines ou de stimulateurs équivalents par le *Fusarium* ; la mise en évidence de la substance "O" justifie cette hypothèse.

B.- Plantes sensibles. Augmentation modérée des auxines.

- 1° il y a augmentation de la production des auxines, probablement par addition de celles provenant du parenchyme vasculaire, mais le système répresseur n'est pas bloqué et intervient pour réduire cet excès.
- 2° inhibition partielle du système répresseur. L'obstruction partielle des vaisseaux laisse une certaine activité au complexe inhibiteur.
- 3° il y a production d'auxines par le *Fusarium* (substance "O"), mais elles sont inactivées ou détruites par la plante hôte.

La présence chez les plantules sensibles d'un complexe inhibiteur des substances de croissance produites par le *Fusarium* se vérifiera facilement en appliquant la substance "O" à des plantules de Tomate de variété Roma et de variété Marmande (méthode des plantules en culture sur lame). Si "Marmande" possède cet inhibiteur la réaction d'allongement sera faible. Nous avons vu, au contraire, que chez "Roma", la réaction d'inhibition est très marquée (Tableau XVII).

4°- Perspectives.

Nous pouvons envisager, dans le cas où cette expérimentation confirmerait l'hypothèse, de constituer un "test" de sensibilité variétale à l'infection par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, en utilisant comme substance irritative la substance "O", ce qui représente une amélioration très notable par rapport au recours à l'agent pathogène lui-même.

Quant au problème des races à l'intérieur de la forme spéciale *lycopersici*, les résultats recueillis ne permettent pas de la résoudre puisque les mêmes substances ont été trouvées sur les chromatogrammes des filtrats des souches de l'une et de l'autre race ; il est possible que la différence du pouvoir pathogène réside dans des différences de concentrations.

Après cette revue des résultats obtenus et des dernières acquisitions sur la fusariose de la Tomate, il est évident que bien des points demeurent à élucider, si certaines interprétations ne sont plus remises en question. En effet, KEYWORTH (1969), à l'issue d'expérimentations de greffage, concluait que le principe actif des filtrats de culture du *Fusarium* n'est, ni un enzyme, ni une protéine, ni un polysaccharide, et encore moins l'acide fusarique. Ainsi, se renforce notre opinion de l'utilité d'une recherche menée entre équipes de phytopathologistes et de physiologistes, avec la mise en oeuvre de techniques complémentaires, audacieuses et rigoureuses, pour mener à bien cette étude complexe des fusarioses.

5°- Conclusion.

Le bilan de cette recherche ne résoud certes pas le problème de la fusariose de la Tomate, mais les résultats acquis représentent une étape importante sur la voie de la connaissance des mécanismes mis en cause. Les éléments suivants méritent d'être soulignés :

- 1) L'apport de chlorure de sodium au milieu de culture permet aux plantules de se maintenir plus longtemps en état d'infection latente, et la durée de cet état est en relation directe avec la résistance à l'infection.
- 2) L'infection par le *Fusarium* provoque une augmentation progressive des concentrations en stimulateurs de croissance chez les plantules.
- 3) Parmi les métabolites produits *in vitro* par le *Fusarium*, l'un a été caractérisé pour ses propriétés de stimulateur de croissance.
- 4) Les réactions précoces des plantules à l'infection montrent un effet auxinique marqué au niveau de la rhizogénèse et de la croissance de la racine, mais cet effet n'est statistiquement pas différent entre les plantules résistantes et sensibles.

5) La méthode d'analyse biologique des substances de croissance par les plantules de Tomate en culture sur lame, méthode rapide et peu exigeante en matériel, devrait pouvoir être généralisée pour des préoccupations analogues (DECLERT 1972). En soi, la mise au point de cette méthode représente un grand intérêt.

RESUME.

Après leur contamination artificielle par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, les plantules de Tomate demeurent sans symptômes pendant un laps de temps dont la durée est en relation avec la résistance ou la sensibilité de la variété. Ce "délai moyen de survie" est allongé lorsque les plantules sont cultivées sur milieu synthétique additionné de chlorure de sodium à 5 g/l., ce qui constitue un indice de la diminution de la sensibilité à l'infection.

L'analyse des régulateurs de croissance présents dans les plantules a révélé que l'infection stimule la production d'une substance stimulatrice de l'élongation des mésocotyles d'Avoine. Par ailleurs, les filtrats de culture de l'agent pathogène, analysés par une méthode biochromatographique nouvelle, se sont révélés particulièrement riches en un autre stimulant de croissance (inhibiteur de l'élongation de la racine des plantules de Tomate). La confrontation directe de la plante-hôte et de son parasite a mis en évidence un aspect dynamique de l'évolution des régulateurs de croissance au cours de l'infection latente, traduite par ses répercussions sur la rhizogénèse et la croissance de la racine primaire des plantules.

Ces éléments sont discutés à la lumière des récentes acquisitions concernant, d'une part, la résistance ou la sensibilité à l'infection et d'autre part, le pouvoir pathogène ou l'inocuité du champignon parasite. L'utilisation des "métabolites" de l'agent pathogène est proposé pour confirmer une corrélation entre résistance et capacité d'inhibition des auxines d'origine parasitaire.

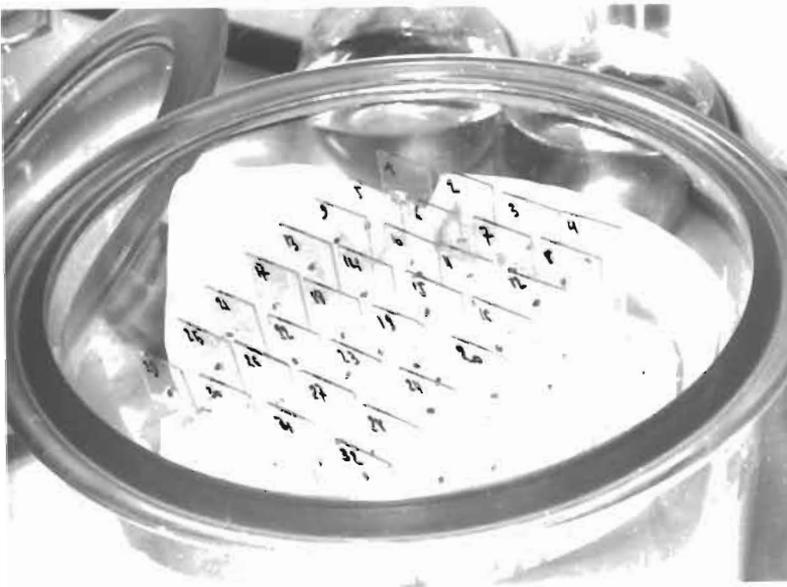
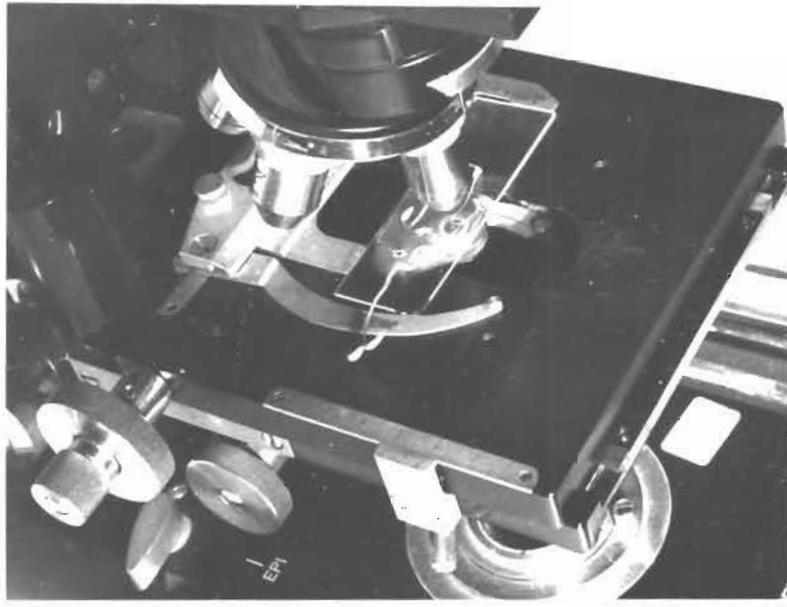
LEGENDE DES PHOTOS

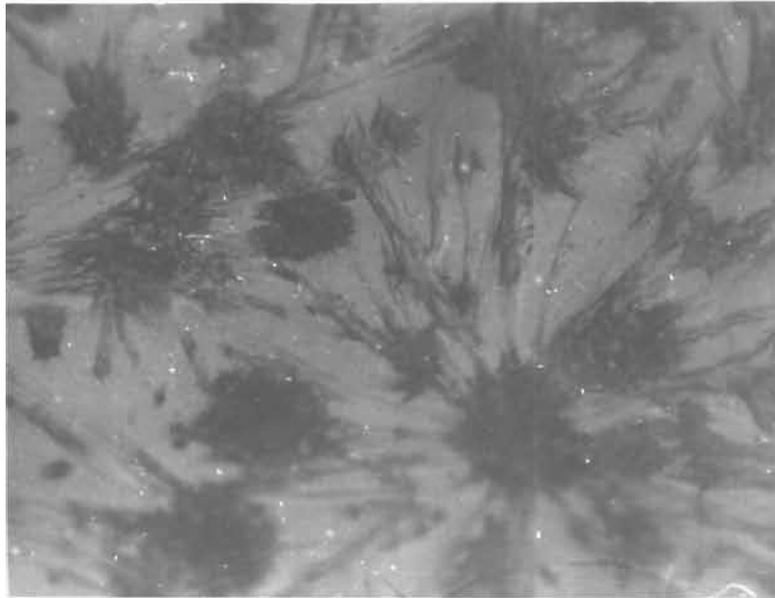
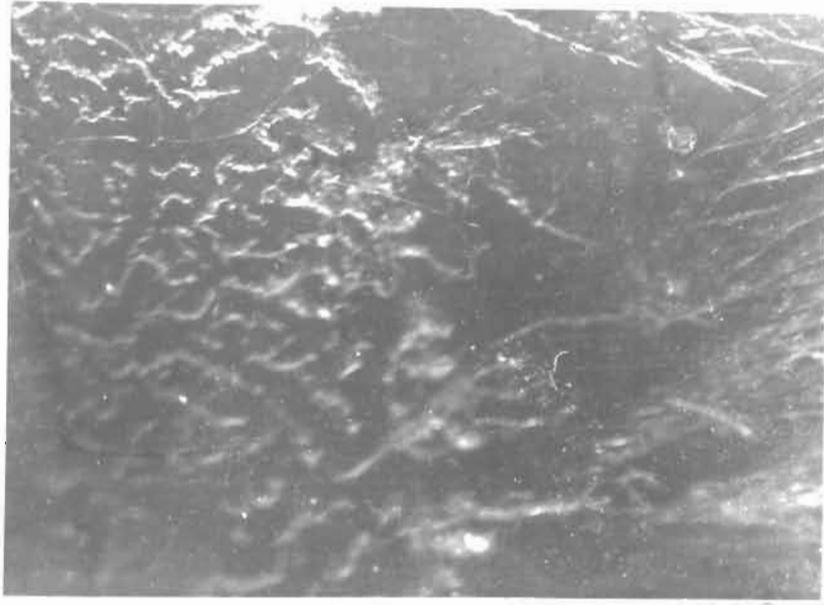
-.-

- N° 1. - Plantules de Tomate en culture stérile.
- N° 2. - Culture de plantules de Tomate sur lame.
a. Dispositif pour le montage - prélèvement du prisme de milieu gélosé - pastille stimulus.
- N° 3. - b. Repérage des coordonnées de l'apex racinaire.
- N° 4. - c. Incubation des plantules.
- N° 5. - Extraction des métabolites du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
a. Extrait sec cristallisé (paroi du cristalliseur).
- N° 6. - b. idem (fond du cristalliseur).

-.-







BIBLIOGRAPHIE

- ABERG (B.), 1957. - Auxin relations in roots. Ann. Rev. Plant. Physiol., 8, p. 153-180.
- BACHMANN (E.), 1956. - Der einfluss von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopathol. Z., 27, p. 255-288.
- BATESON (W.E.), BIRD (L.S.), TOLMSOFF (W.J.), et CARTER (C.M.), 1970. - Accumulation of gossypol and gossypol-like pigments associated with defruit cotton plants. Phytopathology, 60, p. 913-914.
- BECKMAN (C.H.), MACE (M.E.), HALMOS (S.) et McGAHAN (M.W.), 1961. - Physical barriers associated with resistance in *Fusarium* wilt of bananas. Phytopathology, 51, p. 507-515.
- BECKMAN (C.H.) et HALMOS (S.), 1962. - Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root invading fungi. Phytopathology, 52, p. 893-897.
- BECKMAN (C.H.), 1964. - Host response to vascular infection. Ann. Rev. of Phytopathology, 2, p. 231-252.
- BECKMAN (C.H.), BRUN (W.A.) et BUDDENHAGEN (I.W.), 1962. - Water relations in banana plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 52, p. 1144-1149.
- BECKMAN (C.H.), 1966. - Cell irritability and localization of vascular infections in plants. Phytopathology, 56, p. 821-825.

- BECKMAN (C.H.), 1967. - Respiratory response of radish varieties resistant and susceptible to vascular infection by *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans*. Phytopathology, 57, p. 699-702.
- BECKMAN (C.H.), 1969, a. - The mechanics of gel formation by swelling of simulated plant cell wall membranes and perforation plates of banana root vessels. Phytopathology, 59, p. 837-843.
- BECKMAN (C.H.), 1969, b. - Plasticizing of walls and gel induction in Banana root vessels infected with *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 59, p. 1477-1483.
- BECKMAN (C.H.) et MUELLER (W.C.), 1970. - Distribution of phenols in specialized cells of Banana roots. Phytopathology, 60, p. 79-82.
- BENNET-CLARK (T.A.), TAMBIAH (M.S.) et KEFFORD (N.P.), 1952. - Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature, 169, p. 452.
- BIEHN (W.L.), KUC (J.) et WILLIAMS (E.B.), 1968. - Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. Phytopathology, 58, p. 1255-1260.
- BIEHN (W.L.) et DIMOND (A.E.), 1971. - Effect of galactose on polygalacturonase production and pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathology, 61, p. 242-243.
- CAMEFORT (H.) et PANIEL (J.), 1962. - Morphologie et anatomie des végétaux vasculaires. G. Doin et Cie éditeur, Paris.
- CHAMBERS (H.) et CORDEN (M.E.), 1963. - Semeiography of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology, 53, p. 1006-1010.

- CIRULLI (M.) et ALEXANDER (L.J.), 1966. - A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. Phytopathology, 56, p. 1301-1305.
- CORDEN (M.E.), 1965. - Influence of calcium nutrition on *Fusarium* wilt of tomato and polygalacturonase activity. Phytopathology, 55, p. 222-224.
- DAVET (P.), 1967. - Les maladies des solanées maraîchères en Tunisie. Ann. INRAT, 40, 3, p. 24-27.
- DAVIS (D.), 1963. - Investigations on physiology of selective pathogenicity in *Fusarium oxysporum* in test tube culture. Phytopathologie, 53, p. 133-139.
- DAVIS (D.) et DIMOND (A.E.), 1953. - Inducing disease resistance with plant growth regulators. Phytopathology, 43, p. 137-140.
- DAVIS (D.), WAGGONER (P.E.) et DIMOND (A.E.), 1953. - Conjugated phenols in the *Fusarium* wilt syndrome. Nature, 172, p. 959-961.
- DAVIS (D.) et DIMOND (A.E.), 1954. - The source and role of phenols in *Fusarium* wilt symptoms. Phytopathology, 44, p. 485-486.
- DAVIS (D.), 1967. - Fusaric acid in selctive pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 57, p. 808.
- DAVIS (D.), 1970. - Carbohydrate specificity for fusaric acid synthesis. Phytopathologie, 60, p. 111-113.
- DECLERT (C.), 1970. - La fusariose de la Tomate. Influence du chlorure de sodium sur la sensibilité des plantules à l'infection par le *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder et Hans. Cah. ORSTOM, Ser. Biol., 12, 97-106.

- DECLERT (C.), 1972. - Action répressive de l'acide indol acétique sur l'élongation de la racine chez la plantule de Tomate. Publication en préparation.
- DEESE (D.C.) et STAHPAN (M.A.), 1962. - Pectic enzymes in *Fusarium* infected susceptible and resistant Tomato plant. Phytopathology, 52, p. 255-260.
- DERBYSHIRE (D.), 1956. - The relation between mineral nutrition of the tomato plant and infection by *Verticillium albo-atrum*. Th. Univ. of London.
- DIMOND (A.E.) et WAGGONER (P.E.), 1953, a. Role of chelation in causing and inhibiting the toxicity of lycopersin. Phytopathology, 43, p. 281-284.
- DIMOND (A.E.) et WAGGONER (P.E.), 1953, b. - The water economy of *Fusarium* wilted tomato plants. Phytopathology, 43, p. 619-623.
- DIMOND (A.E.) et WAGGONER (P.E.), 1953, c. - The physiology of lycopersin production by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathologie, 43, p. 195-199.
- DIMOND (A.E.), 1955. - Pathogenesis in the wilt diseases. Ann. Rev. Plant. Physiol., 6, p. 329-350.
- DIMOND (A.E.) et EDGINGTON (L.V.), 1960. - Mechanics of water transport in healthy and *Fusarium* wilted tomato plants. Phytopathology, 50, p. 634.
- EGLI (T.A.), 1969. - Studies on the influence of heavy metals on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and the progress of Tomato wilt. Phytopath. Z., 66, p. 223-252.

- GASPAR (Th.) et BOUILENNE-WALRAND (M.), 1966. - L'activité auxines-oxydasique régulatrice de la croissance après traitement à l'acide gibberellique. Cong. Intern. Liège 1965. Les Phytohormones et l'organogénèse. Univ. Liège 1966, p. 411-420.
- GAUMANN (E.) et JAAG (O.), 1947. - Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 57, p. 3-34 ; p. 132-148 ; p. 227-241.
- GAUMANN (E.), NAEF-ROTH (S.) et KOBEL (H.), 1952. - Über Fusarinsäure ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopathol. Z., 20, p. 1-38.
- GAUMANN (E.), NAEF-ROTH (S.) et MESCHER (G.), 1950. - Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopathol. Z., 16, p. 257-288.
- GAUMANN (E.), STOLL (C.) et KERN (H.), 1953. - Über Vasinfuscarin ein drittes Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopathol. Z., 20, p. 345-347.
- GAUMANN (E.), 1958. - The mechanism of fusaric acid injury. Phytopathology, 48, 670-686.
- GAUTHERET (R.J.), 1969. - Investigations on the root formation in tissues of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*. Amer. J. Bot., 56, p. 702-717.
- GEISSBUHLER (H.), 1953. - Untersuchungen über korrelative und hormonale Steuerung der Seitenwurzelbildung. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 63, p. 27-89.
- GENTILE (I.A.), 1967. - Ulteriori ricerche sulla iperauxinia nella tracheofusariosi del Pomodora : variazioni del contenuto in triptofano libero. Phytopath. Mediterranea, 6, p. 168-170.

- GORDON (S.A.) et PALEG (L.G.), 1961. - Formation of auxin from tryptophane through action of polyphenols. Plant. Physiol., 36, p. 838-845.
- GOTHOSKAR (S.S.), SCHEFFER (P.), STAHRMAN (M.A.) et WALKER (J.C.), 1955. - Further studies on the nature of *Fusarium* resistance in tomato. Phytopathology, 45, p. 303-307.
- GOTTLIEB (D.), 1944. - The mechanism of wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. Phytopathology, 34, p. 41-59.
- GRUEN (H.E.), 1959. - Auxins and fungi. Ann. Rev. Plant. Physiol. 10, p. 405-440.
- GUILLOT (A.), 1967. - Recherches sur la rhizogénèse de la jeune plante étiolée de Tomate. Thèse Fac. Sci. Paris. Chastrusse et Cie, Brive, 1968, 215 p.
- HELLER (R.), 1968. - Manuel de Statistique Biologique. Gauthier-Villars, Paris, 298 p.
- KALYANASUNDARAM (R.) et VENKATARAM (C.S.), 1956. - Production and systematic translocation of fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants. J. Indian. Bot. Soc., 35, p. 7-10.
- KAMAL (M.) et WOOD (R.K.S.), 1956. - Pectic enzymes secreted by *Verticillium dahliae* and their role in the development of the wilt disease of cotton. Ann. Appl. Biol., 44, p. 322-340.
- KERN (H.), 1952. - Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. Phytopath. Ztschr., 19, p. 351-382.
- KERN (H.) et KLUEPFEL (D.), 1956. - Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* *in vivo*. Experientia, 12, p. 181-182.

- KERTESZ (Z.I.) et McCOLLOCH (R.J.), 1950. - Enzymes acting on pectic substances. in *Advances in carbohydrate chemistry*. Academic Press. 5, p. 79-102.
- KEYWORTH (W.G.), 1969. - Role of toxins in *Fusarium* diseases. Phytochem., 8, p. 4-5.
- KUO (M.S.) et SCHEFFER (R.P.), 1964. - Evaluation of fusaric acid as a factor in development of *Fusarium* wilt. Phytopathology, 54, p. 1041-1044.
- LIBBERT (E.), 1956. - Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzerbildung. II. Die korrelative Beeinflussung der Adventivwurzerbildung durch andere organe, insbesondere durch die Wurzel. Planta, 48, p. 157-189.
- LISON (L.), 1968. - Statistique appliquée à la Biologie Expérimentale. Gauthier-Villars ed. Paris, 346 p.
- MACE (M.E.), 1965. - Isolation and identification of 3-indol acetic from *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Phytopathology, 55, p. 240-241.
- MACE (M.E.) et SOLIT (E.), 1966. - Interactions of 3 indole acetic acid and 3 hydroxytyramine in *Fusarium* wilt of banana. Phytopathology, 56, p. 245-248.
- MAHADEVAN (A.) et REDDY (M.K.), 1968. - Effect of phenolic compounds on cellulase. Indian Phytopath., 20, p. 265-267.
- EL MAHJOUB (M.), 1969. - La fusariose de la Tomate : influence du chlorure de sodium sur la production de toxines par le *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. D.E.A. Physiologie Végétale, Fac. Sci. Tunis.

- MATTA (A.) et GENTILE (I.), 1965. - Sul meccanismo di accumulo dell' acido b-indolil-acetico in piante di pomodoro infette do *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopath. Mediterr., 4, p. 129-137.
- MATTA (A.), GENTILE (I.) et GIAI (I.), 1969. - Accumulation of phenols in tomato plants infected by different forms of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 59, p. 512-513.
- MESSIAEN (C.M.) et MAS (P.), 1969. - Recherches sur les fusarioses. IV. 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. Phytopathologie, 1, p. 401-426.
- MOLOT (P.), 1969, a. - Recherches sur la résistance du Maïs à l'Helminthosporiose et aux fusarioses. II. Facteurs de résistance. Ann. Phytopathologie, 1, 353-366.
- MOLOT (P.), 1969, b. - Recherches sur la résistance du Maïs à l'Helminthosporiose et aux fusarioses. III. Mode d'action des composés phénoliques. Ann. Phytopathologie, 1, p. 367-384.
- MOREAU (M.), 1956 a. - Recherches sur les maladies de dépérissement causées par les champignons. Thèse Fac. Sci. Paris 346 p.
- MOREAU (M.), 1957. - Le dépérissement des Oeillets. Encyclopédie Mycologique, Lechevalier édit., Paris, 30, 309 p.
- MOREAU (M.), 1964. - Fongicides endothérapeutiques à activité morphogène pour induire chez les plantes une résistance aux maladies vasculaires. Phytopath. Z., 50, p. 143-158.
- MUSSELL (H.W.) et GREEN Jr (R.J.), 1970. - Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomytic fungi. Phytopathology, 60, 192-195.

- NAEF-ROTH (S.) et REUSSER (P.), 1954. - Über die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von Tomaten-Blattgewebe. Phytopathol. Z., 22, 281-287.
- NANDA (K.K.), PUROHIT (A.N.) et KRISHNA MEHROTRA, 1968. - Effect of sucrose, auxins and gibberellic acid on rooting of stem segments of *Populus nigra* under varying light conditions. Plant. and Cell Physiol., 9, p. 735-743.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1955. - The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. Beitr. Biol. Pfl., 31, 387-408.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1956. - Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new sensitive straight growth test for auxins. Plant. Physiol. 31, p. 94-111.
- PAGE (O.T.), 1959. - Fusaric acid in banana plants infected with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Phytopathology, 49, p. 230.
- PAQUIN (R.) et WAYGOOD (E.R.), 1957. - The effects of *Fusarium* toxins on the enzymatic activity of tomato hypocotyl mitochondria. Canad. J. Botany, 35, p. 207-218.
- PATIL (S.S.), ZUCKER (M.) et DIMOND (A.E.), 1966. - Biosynthesis of chlorogenic acid in potato root resistant and susceptible to *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 56, 971-974.
- PATIL (S.S.) et DIMOND (A.E.), 1967, a. - Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxydation products of polyphenols. Phytopathology, 57, p. 492-496.
- PATIL (S.S.) et DIMOND (A.E.), 1967, b. - Effects of sugars and sugars alcohols on production of polygalacturonase by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathology, 57, p. 825.

- PATIL (S.S.) et DIMOND (A.E.), 1967, c. - Induction and repression of polygalacturonase synthesis in *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 57, p. 825.
- PATIL (S.S.) et DIMOND (A.E.), 1968, a. - Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* by sugars and its effects on symptom reduction in infected tomato plants. Phytopathology, 58, p. 676-682.
- PAULET (P.), 1965. - Etude de la néoformation *in vitro* de bourgeons végétatifs et floraux. Thèse Fac. Sci. Paris, 103 p.
- PAULET (P.) et LIORET (C.), 1966. - La formation des bourgeons chez *Nicotiana* : sensibilité aux composés phénoliques externes ; insensibilité aux composés phénoliques internes. in "Les phytohormones et l'organogénèse". Congrès International Univ. Liège 3 - 5 juin 1965, 38, p. 341-349.
- PEGG (G.F.) et SELMAN (I.W.), 1959. - An analysis of the growth response of young tomato plants to infection by *Verticillium albo-atrum*. II. The production of growth substances. Ann. Appl. Biol., 47, p. 222-231.
- PLATTNER (P.A.) et CLAUSON-KAAS (N.), 1945. - Uber lycomarasmin, den Welkstoff aus *Fusarium lycopersici* Sacc. Experientia, 1, p. 195-196.
- RABIN (R.S) et KLEIN (R.M.), 1957; - Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indole acetic acid oxydase. Arch. Biochem. Biophys., 70, p. 11-15.
- RAJ (S.A.) et MAHADEVAN (A.), 1970. - Induction of wilt resistance in cotton by phenolic compounds. Indian. Phytopath., 23, p. 89-94.
- SANWAL (B.D.) et WAYGOOD (E.R.), 1961. - The effect of fusaric acid on the oxidative phosphorylation of plant mitochondria. Experientia, 17 p. 174.

- SCHEFFER (R.P.) et WALKER (J.C.), 1953. - The physiology of *Fusarium* wilt of Tomato. Phytopathology, 43, p. 116-125.
- SCHEFFER (R.P.) et WALKER (J.C.), 1954. - Distribution and nature of *Fusarium* resistance in tomato plant. Phytopathology, 44, p. 94-101.
- SKOOG (G.F.) et MILLER (C.O.), 1957. - Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. The biological action of growth substances, Symposium XI, Soc. Exp. Biol., Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 118.
- SMITH (E.F.), 1899. - Wilt disease of cotton, watermelon and cowpea (*Vigna sinensis*). US Dept. Agr. Div. Vegetable Physiol. and Pathology Bull., 17.
- TORREY (J.G.), 1956. - Chemical factors limiting lateral root formation in isolated pea roots. Physiol. Plant. 9, p. 370-388.
- TORREY (J.G.), 1959. - A chemical inhibitor of auxin-induced lateral root initiation in roots of *Pisum*. Physiol. Plant., 12, p. 873-887.
- TORREY (J.G.), 1962. - Auxin and purin interactions in lateral root initiation in isolated pea root segments. Physiol. Plant., 15, p. 177-185.
- URITANI (I.), 1963. - The biochemical basis of disease resistance induced by infection. in Prospectives of biochemical plant pathology, Connecticut Agr. Exp. Sta. Bull., S. Rich ed., 663, p. 4-14.
- YABUTA (T.), KAMBE (K.) et HAYASHI (T.), 1934. - Biochemistry of the bakanae fungus fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 10, p. 1059-1068.