

TEST DE COMPATIBILITÉ VÉGÉTATIVE DES DIFFÉRENTS ISOLATS DE *FUSARIUM OXYSPORUM F.SP ALBEDINIS*, AGENT CAUSAL DU BAYOUD

HAFIDA KHELAFI ET SAÏD YAKHOU

I.N.R.A.A. Laboratoire de physiologie végétale. C.R.P Mehdi boualem, B.P 37 Baraki 16210 Alger. Algérie.

Résumé : Des fragments de mycélium issus de différents isolats de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a) et cultivés sur milieu P.D.A, ont été transférés sur un milieu minimum à base de chlorate de potassium (MMC) pour la sélection des mutants non réducteurs de nitrate. Trois types de mutants Nit1, Nit3 et Nit M ont été caractérisés sur le milieu minimum (MM) où la seule source d'azote est soit le nitrate, nitrite ou l'hypoxanthine.

La compatibilité végétative se traduit par la formation d'hétérocaryon dans le point de contact de deux mutants complémentaires (Nit1 et/ou Nit3 X NitM).

L'appariement des mutants complémentaires dans toutes les combinaisons possibles a montré que toutes les souches utilisées appartiennent à la même forme spéciale *albedinis*. L'appartenance de ces souches à la forme spéciale *albedinis* montre l'existence d'un seul groupe de compatibilité végétative (VCG1).

Ce test de compatibilité végétative, nous a permis d'identifier rapidement la forme spéciale *albedinis* sans passer par le test d'inoculation artificielle qui s'avère très long.

Mots clés : *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a), palmier dattier, *Phoenix dactylifera*, bayoud, compatibilité végétative, hétérocaryon, mutants.

Abstract : Fragments of mycelium cultured on the P.D.A medium of different isolats of *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a) were transferred on minimal medium containing potassium chlorate (MMC) in order to select the mutants Nitrate nonutilizing.

Three types of mutants (Nit1, Nit3, NitM) were characterized on minimal medium where the only source of nitrogen is the nitrate, nitrite or hypoxanthine.

Vegetative compatibility is expressed by heterocaryosis formation in the contact point between two complementary mutants.

The crossing of the complementary mutants (Nit1 and/or Nit3 X Nit M) in all possible combinations reveals the existence of one vegetative compatibility group (VCG)1. The existence of a unique group shows that all strains used are of the same forma *specialis albedinis*.

This test of vegetative compatibility allows us to identify quickly the forma *specialis* without using artificial inoculation which needs a longer time.

Keys words : *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a), date palm, *Phoenix dactylifera*, bayoud, vegetative compatibility, heterocaryosis, mutants.

INTRODUCTION

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, les zones phoenicoles du sud - ouest algérien ont subi des pertes considérables estimées à 3 millions de palmiers (Djerbi,1982), dues à une maladie vasculaire appelée localement "Bayoud" causée par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a) (Killan, et Maire).

Le contrôle de cette maladie, en Algérie, exige une surveillance permanente pour la détection des foyers primaires. Par conséquent, un diagnostic précoce et rapide s'avère très important. L'observation des symptômes externes et internes in situ doit être complétée par des isolements au laboratoire. Cependant, lorsque les conditions de culture sont défavorables, le champignon présente un polymorphisme très marqué (Sedra,1982). Pour cela, L'identification du F.o.a doit être généralement complétée par le test de pathogénicité. Toutefois, son utilisation pose un certain nombre de problème à savoir: la lenteur du test, l'hétérogénéité génétique du matériel végétal et, enfin, une mortalité assez importante sur les plantules de palmier dattier qui peut être entraînée par des isolats n'appartenant pas à la forme spéciale albedinis (Sedra et Djerbi, 1986; Khelafi et Fergani,1990).

Une approche génétique basée sur la compatibilité végétative, ou encore sur la capacité de former des hétérocaryons, constitue une voie rapide pour l'identification de l'agent causal du Bayoud. En effet, Puhalla (1985), Correll et al (1985), ont pu classer différentes souches de *Fusarium oxysporum* sur la base de leur compatibilité végétative.

Le présent travail a pour objectif d'identifier le F.o.a par le test de compatibilité végétative des différents isolats provenant des palmeraies de la région du touat, d'Adrar et du M'Zab.

II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

II - 1- Souches fongiques :

Les différents isolats de F.o.a ont été obtenus soit à partir des rachis infectés récoltés lors de nos prospections en 1998 dans les palmeraies atteintes dans les régions du Touat et le M'Zab, soit fournis gracieusement par nos collègues A. chikh Aissa et S.Sekouti (I.N.P.V de Ghardaïa). La variété, l'origine ainsi que la nature du substrat à partir duquel l'isolement a été réalisé, sont indiquées dans le tableau I.

Tableau I : Origine et références des souches.

Code	Référence	Cultivar	Palmeraie d'origine	Prélevé le	Cultivar
S 1	CMP 13/89 - GH	Deglet nour	Karkora - Ghardaïa	1989	Isolement à partir
S 2	CMP 87/88 - GH	Deglet nour	Ghardaïa	1988	Milieu de culture
S 3	CMP 48/89 - GH	Sidi M'hamed Belagrib	Chaabet - El atteuf	1989	Milieu de culture Milieu de culture
S 5	03/97 - GH	Timjouhert	Chaabet/Beni Isguen	1997	Rachis
S 6	04/97 - GH	Outakbala	Chaabet / Beni Isguen	1997	Rachis
S 8	3.1.3	Tinnaqor	Zaouet Kounta - Agzmir -Adrar	1997	Rachis
S 9	3.1.3	Messoudia	Zaouiet Kounta - Agzmir -Adrar	1997	Rachis
S 10	3.1.3	Adekli	Zaouiet Kounta - Agzmir Adrar	1997	Rachis
S 12	4 (C)	Deglet nour	Souani - Metlilia	1996	Rachis
S 13	6 (C)	Ghars	Belghanem - Ghardaïa	1996	Rachis
S 14	2 (C)	Deglet nour	Souani - Metlili	1996	Rachis
S 15	7 (C)	Deglet nour	Baba N'chacha - Ghardaïa	1996	Rachis
S 16	3 (c)	Tafazouine	Souani- Metlili - Ghardaïa	1996	Rachis
S 17	5 (B) ^o	Ghars	Belghanem - Ghardaïa	1996	Rachis
S 18	(I)	Tegaza	Zaouet Echikh – Bouda Adrar	1997	Rachis
S 19	(III)	Tilemsou	Beni Illou – Bouda - Adrar	1997	Rachis
S 20	(V)	Ahartane	El Mansour – Bouda -Adrar	1997	Rachis
S 21	(IV)	Tilemsou	Laghmara – Bouda - Adrar	1997	Rachis
S 22	(X)	Tegaza	Zaouiet Echikh – Bouda - Adrar	1997	Rachis

II-2- Sélection des mutants résistants au chlorate :

Pour chaque souche, une dizaine de boutures myceliennes ($\approx 1 \text{ mm}^3$) sont prélevées à partir des cultures fongiques développées sur milieu P.D.A et sont déposées sur un milieu minimum à base de chlorate (MMC). Les cultures sont incubées à la température ambiante et sous lumière continue, pendant 8 à 10 jours.

II- 3- Caractérisation des mutants Nit :

Tous les mutants sont repiqués sur le milieu minimum (MM) où la seule source d'azote est le nitrate. Après 5 jours d'incubation, les mutants présentant un thalle de type rasant sont mis en culture sur un milieu de culture contenant du nitrite ou de l'hypoxanthine.. Les mutants Nit 1, Nit 3 et Nit M sont caractérisés grâce à la morphologie du thalle sur les 3 milieux de culture (Tableau II).

Tableau II : Identification des mutants non utilisateurs de nitrates par leur croissance sur trois sources d'azote (Correll et al 1987).

Désignation du mutant	Croissance sur les différentes sources d'azote		
	Nitrate	Nitrite	Hypoxanthine
Nit 1	-	+	+
Nit 3	-	-	+
Nit M	-	+	-

+ : *Mycelium épais aérien et dense (type sauvage)* - : *Mycelium rasant très lâche*

II- 4- Confrontation des mutants :

Dans toutes les combinaisons possibles, les mutants Nit M des différents isolats ont été confrontés à un mutant Nit 1et/ ou Nit 3 des autres isolats sur le milieu MM (Puhalla, 1985, Correll and al, 1987). Après incubation de 10 à 20 jours, l'observation dans la zone de rencontre des deux thalles permet de constater la compatibilité ou l'incompatibilité des mutants ainsi confrontés. La compatibilité végétative se traduit par la formation d'hétérocaryon, c'est à dire un mycelium dense et aérien de type sauvage, au point de rencontre des 2 mutants.

colonies minces, rasantes et à croissance restreinte au niveau du mycélium périphérique qui se traduit par des secteurs résistants au chlorate (fig1-b).

III- 2- Obtention des mutants :

Les mutants, résistants au chlorate, obtenus sont incapables d'utiliser les nitrates comme source d'azote et présentent par conséquent un mycelium fin, rasant, transparent et à croissance rapide (fig 1-c).

Trois types de mutants ont été obtenus à savoir le Nit1, Nit3 et le NitM. Les résultats de la caractérisation des mutants montrent que 14.82 % d'entre eux sont des Nit1, 26.22 % sont des Nit3 et 38.76 % sont des NitM. Les trois types de mutants ont pu être caractériser pour 15 isolats sur les 18 utilisés. Aucun mutant nit 1 et/ou nit 3 n'a pu être obtenu pour les souches S12, S13 et S18.

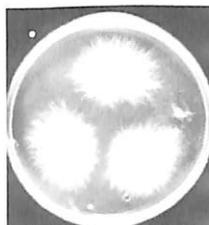
III- RÉSULTATS ET DISCUSSION

III- 1- Isolement des mutants Nit :

Le repiquage des souches de F.o.a sur un milieu minimum (MMC) a donné lieu à des



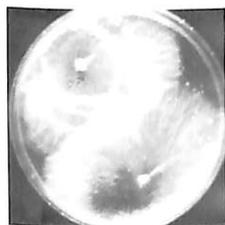
a : Type sauvage de F.o.a obtenu entre par culture monospor



b : colonies sur KPS avec des secteurs bien développés au centre et mince à la périphérie



c : Mutant non réducteurs de nitrate sur milieu MM



d : Formation d'hétérocaryon entre mutant Nit 1 et Nit 3



e : Confrontation d'un mutant nit 1 et un mutant nit 3, Absence d'hétérocaryon (incompatibilité)

Tableau III : Type et nombre de mutants caractérisés.

Isolat	Nit 1	Nit 3	Nit M	mutant résistant
S1	1	2	2	10
S2	0	3	4	11
S3	0	1	4	7
S5	0	2	2	6
S6	0	2	1	6
S8	0	1	1	5
S9	2	0	2	7
S10	0	1	2	5
S12	0	0	0	0
S13	0	0	0	0
S14	2	3	2	9
S15	2	2	2	10
S16	2	0	1	5
S17	0	2	1	6
S18	0	0	2	0
S19	1	1	2	6
S20	2	1	2	7
S21	0	2	2	6
S22	1	0	4	8

III- 3- Test de compatibilité végétative :

L'appariement dans toutes les combinaisons, possibles entre les Nit M et les Nit1 et/ou Nit3 des 15 isolats ont été réalisés.

Les résultats obtenus montrent que tous les mutants Nit1 et/ou Nit 3 confrontés avec le Nit M des 15 clones F.o.a ont donné des réactions positives se traduisant par la formation d'hétérocaryon (fig 1-d).

Au contraire, deux mutants sont végétativement incompatibles lorsqu'il n'y a pas d'appariement entre eux, à savoir l'absence du mycélium hétérocaryotique de type sauvage. Les différents mutants Nit 1 et Nit 3 sont incompatibles entre eux; il en est de même pour le mutant Nit M (fig 1-e).

Dans cette étude, un seul groupe de compatibilité végétative (VCG) a été déterminé.

Tableau II : Identification des mutants non utilisateurs de nitrates par leur croissance sur trois sources d'azote (Correll et al 1987).

	S1	S2	S3	S6	S8	S9	S10	S14	S15	S16	S17	S19	S20	S21	S22
S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : mutants compatibles : Formation d'hétérocaryon

Tous les mutants représentant les 15 des 16 isolats provenant des palmiers infectés sont compatibles entre eux et appartiennent à un seul groupe de compatibilité végétative (VCG1). Les isolats étudiés appartiennent donc à la forme spéciale albedinis.

Il existe une corrélation entre la forme spéciale et le groupe de compatibilité végétative, ceci confirme l'hypothèse de Correll et al (1985), Puhalla (1985), et Correll et al. (1985), qui ont pu classer différentes souches de *Fusarium oxysporum* sur la base de leur compatibilité végétative. Ils ont aussi déterminé plusieurs groupes de compatibilité végétative qui leur ont permis d'établir une corrélation entre les groupes de compatibilité végétative et la forme spéciale.

Dans un travail précédent (Khelafi et Fergani, 1990), nous avons pu classer les souches pathogènes et saprophytes de *Fusarium oxysporum* selon 3 groupes de compatibilité végétative; un groupe comportant toutes les souches de F.o.a, un deuxième groupe rassemblant toutes les souches de F.o f.sp canariensis et un troisième groupe comportant des souches saprophytes.

Ouiten (1996), utilisant des marqueurs génétiques (compatibilité végétative) et moléculaires (RFLP de l'ADN mitochondrial) pour l'analyse de la diversité génétique des isolats de F.o.a à partir des palmeraies d'Algérie, n'a pas détecté de polymorphisme parmi les isolats testés. En revanche, l'utilisation d'outils d'analyse plus précis RADP et finge print a

conduit à la mise en évidence d'une diversité génétique au sein de la population. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus montre que la variation génétique est très faible.

IV - CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenu montrent une grande homogénéité au sein de notre collection de F.o.a provenant des palmeraies du Touat et du M'zab. Toutes nos souches sont compatibles entre elles et appartiennent à la forme albedinis, agent causal du bayoud. Cette approche génétique basée sur la compatibilité végétative, ou encore sur la capacité de former des hétérocaryons, peut constituer un outil rapide de diagnostic de l'agent causal de la fusariose du palmier dattier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **CORRELL, J.C, PUHALLA, J.E AND SCHNEIDER, R.W., (1987)** : Identification on *Fusarium oxysporum* f.sp *apii* on the basis of colony size virulence and vegetative compatibility . *Phytopathology*. 76: 396 - 400.
- **CORRELL, J.C, KLITICH, C.J.R AND LESLIE, J.F., (1987)** : Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathology*. 77: 11640 - 1646.
- **DJERBI, M., (1982)** : Le bayoud en Algérie, problèmes et solutions. F.A.O/ Régional project for palm and date research center in the near East and North Africa. Baghdad, Iraq, 45p.
- **KHELAFI H ET FERGANI H., (1990)** : Classification de quelques souches pathogènes et saprophytes de *Fusarium oxysporum* (SCHL) EMEND SNYDER et HANSEN par compatibilité végétative. Mémoire d'ingénieur agronome . INA. El Harrach Alger: 88 p.
- **QUINTEN, M., (1996)** : Diversité et structure génétique des populations Algériennes de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal de la fusariose vasculaire (bayoud) du palmier dattier. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II. 170 pp.
- **PUHALLA, J.E. , (1985)** : Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63 : 179 - 183.
- **SEDRA, M.H., (1982)** : Mise au point d'une technique d'inoculation pour l'évaluation de la résistance des plantules issues des croisements dirigés. Rapport d'activité , Centre Rég. Rech. Agr. Marrakech, Maroc. 150 pp.
- **SEDRA, M.H ET DJERBI, M; (1986)** : Comparative study of morphological characteristics and pathogenicity of two *Fusarium oxysporum* causing respectively the vascular wilt disease of date palm and canary island palm. Second symposium. Date palm recar, center N°4. Univ. Fusal King.