Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*

Julio Cesar Tello-Marquina, Claude Alabouvette

► To cite this version:

Julio Cesar Tello-Marquina, Claude Alabouvette. Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*. *Agronomie*, 1984, 4 (9), pp.885-890. hal-00884709

HAL Id: hal-00884709

<https://hal.science/hal-00884709>

Submitted on 1 Jan 1984

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*

Julio Cesar TELLO-MARQUINA & Claude ALABOUVETTE (*)

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Departamento de Proteccion Vegetal, Crida 06, Madrid, Espagne

(*) *I.N.R.A., Station de recherches sur la Flore Pathogène dans le Sol, 17, rue Sully, F 21034 Dijon Cedex*

RÉSUMÉ

Afin de produire l'inoculum nécessaire à l'infestation artificielle des sols, les *Fusarium* sont cultivés en milieu nutritif agité puis les propagules ainsi produites sont mélangées avec du talc. Séché puis broyé, cet inoculum peut être conservé au sec pendant plus d'un an. Des observations microscopiques ont montré qu'une population de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ainsi obtenue est constituée de plusieurs types de propagules morphologiquement distinctes. Les microconidies à elles seules constituent plus de 90 p. 100 de cette population. Elles peuvent se conserver sans transformation apparente ou au contraire présenter une paroi épaisse qui traduit une transformation progressive en microchlamydospores (tabl. 1) ; les différentes propagules sont toutes susceptibles de germer lorsqu'elles sont déposées à la surface d'une plaque d'eau gélosée (tabl. 2). Incorporée au sol, cette population de *F. o. f. sp. lycopersici* évolue et la proportion de chlamydospores augmente nettement. Cependant, après un mois d'incubation il est toujours possible d'observer 44 p. 100 de microconidies dans le sol préalablement traité à la vapeur et 25 p. 100 dans le sol non traité (tabl. 3). Lorsque ces sols infestés sont soumis à l'influence d'une racine de tomate ou amendés avec du glucose, les microconidies comme les chlamydospores sont capables de germer en 24 h (tabl. 4). Ces résultats indiquent que, dans certaines conditions, les microconidies de *F. oxysporum* sont capables de persister dans le sol pendant plus d'un mois et de jouer un rôle actif dans les infections.

Mots clés additionnels : *Chlamydospores, conservation, germination.*

SUMMARY

Observations on the survival of microconidia of Fusarium oxysporum in soil.

To produce inoculum of *Fusarium oxysporum* for addition to soils, the fungus was grown in shake-culture for 8 days and the propagules then washed and mixed with talc. After drying and grinding, the talc was stored dry at room temperature until use. Microscopic observations showed that a population of *F. o. f. sp. lycopersici* stored in talc for 1 month consisted of morphologically different propagules, mainly microconidia (table 1). These microconidia remained alive without changing their appearance, or else became thick-walled, indicating a progressive transformation into microchlamydospores. All types of propagules germinated when incubated for 19 h on water agar (table 2). After addition of a typical mixture of propagules of *F. o. f. sp. lycopersici* in talc to soil, the proportion of chlamydospores increased significantly, but even after 1 month, the proportion consisting of microconidia not converted into chlamydospores was estimated at 44 % in steamed soil and 25 % in non-steamed soil (table 3). These microconidia germinated as well as chlamydospores in soils incubated close to a root of tomato or amended with glucose (table 4).

Additional key words : *Chlamydospores, conservation, germination.*

I. INTRODUCTION

Pour réaliser de manière simple et reproductible l'infestation de sols avec une population déterminée de *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans., nous avons mis au point une technique dérivée de celle initialement décrite par LOCKE & COLHOUN (1974). Celle-ci consistait à récolter des macroconidies

à la surface d'une culture sur milieu gélosé et à les mélanger à du talc afin de favoriser leur transformation en chlamydospores. Les souches de *F. oxysporum* les plus couramment utilisées au cours de nos travaux ne produisant qu'une faible proportion de macroconidies sur milieu gélosé, nous cultivons les *Fusarium* en milieu liquide agité. Dans ces conditions de culture, les *F. oxysporum* ne forment pratiquement pas de

macroconidies et l'inoculum conservé dans le talc est essentiellement constitué de microconidies ou de formes qui en dérivent.

Dans un article précédent (TELLO-MARQUINA *et al.*, 1980) nous avons indiqué qu'une forte proportion de microconidies de *F. o. f. sp. melonis* conservées dans le talc était encore viable après plusieurs mois de conservation au sec. Ayant confirmé la validité de ce résultat préliminaire pour toutes les souches de *F. oxysporum* pathogènes ou saprophytes utilisées au cours de nos recherches, il devenait nécessaire d'étudier le comportement de ces formes microconidiennes après leur introduction dans le sol. En effet, nous obtenons des résultats satisfaisants en utilisant ce type d'inoculum pour apprécier le niveau de réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires (ALABOUVETTE *et al.*, 1982), alors qu'il est généralement admis que les microconidies de *Fusarium* sont rapidement lysées au contact de la microflore tellurique et qu'elles sont incapables d'assurer l'infestation durable des sols (MESSIAEN *et al.*, 1965).

Dans le présent travail, nous avons donc observé les principales modifications qui affectent un inoculum de *F. o. f. sp. lycopersici* au cours des différentes étapes qui conduisent du milieu de culture au sol infesté.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Préparation de l'inoculum

Une suspension de conidies de *F. o. f. sp. lycopersici*, obtenue par lavage d'une culture sur milieu gélosé, sert à ensemencer des fioles contenant 150 ml de milieu liquide à base de malt à 1 p. 100. Après 8 j d'incubation à une température de 22 °C, le milieu de culture est éliminé par centrifugation, les conidies remises en suspension dans l'eau puis mélangées au talc à raison de 1 ml de suspension pour 2 g de talc. Après séchage dans une étuve ventilée à une température de 20 °C, le talc est broyé, tamisé et conservé au sec à la température du laboratoire. Avant l'emploi, la densité d'inoculum est déterminée par une analyse microbiologique basée sur le principe des suspensions-dilutions. Les talcs obtenus titrent couramment 10^5 à 10^7 propagules/g.

B. Observations microscopiques

L'observation des propagules est réalisée au grossissement 600 du microscope après coloration au bleu d'aniline à 0,01 p. 100 dans le lactophénol. 30 mg de talc ou 100 mg de sol sont mis en suspension dans 100 ml d'eau. Six gouttes de cette suspension sont déposées à la surface d'une même pellicule d'eau gélosée à 1,5 p. 100. Les fragments d'eau gélosée correspondant à l'étalement d'une goutte sont prélevés puis transférés sur une lame porte-objet. On ajoute une goutte de colorant, on recouvre d'une lamelle et on chauffe lentement de manière à obtenir un étalement parfait de l'eau gélosée. Cette même technique est employée pour déterminer le pourcentage de germination des propagules après incubation sur eau gélosée ou dans le sol.

C. Observation des propagules dans le sol soumis à l'influence des racines

Afin d'observer la germination des propagules dans le sol soumis à l'influence d'une racine ou amendé avec du glucose, nous avons adopté le dispositif précédemment décrit (TELLO-MARQUINA *et al.*, 1980). Nous déposons 0,1 g de sol dans un tube de diamètre 5 mm, fermé à la base par une éponge maintenue humide. Une graine prégermée de tomate est placée au sommet du tube. Après incubation, la plantule est arrachée, le sol mis en suspension dans 1 ml d'eau et l'on procède à l'observation comme décrit plus haut.

III. RÉSULTATS

A. Caractérisation de la population de *F. o. f. sp. lycopersici* dans le milieu de culture et dans le talc

Des prélèvements ont été effectués dans le milieu de culture après une semaine d'incubation, avant de procéder au mélange des propagules avec le talc. La population de *F. o. f. sp. lycopersici* est alors presque exclusivement constituée de microconidies, septées ou non (tabl. 1). Après un mois de conservation dans le talc, la structure de la population a faiblement évolué et les microconidies représentent toujours plus de 90 p. 100 des propagules observées (tabl. 1). On note cependant l'apparition de microconidies à paroi épaissie (14 p. 100) ce qui constitue vraisemblablement la 1^{re} étape de la transformation en microchlamydospores. Ces conidies partiellement transformées n'apparaissent pas aussi intensément colorées que les chlamydospores ce qui permet de les distinguer. Cependant, il existe une gradation continue entre microconidies à paroi mince et chlamydospores à double paroi de telle sorte que la distinction n'est pas toujours aisée. Dans la suite de ce travail, nous désignerons sous le terme de chlamydospores toutes les propagules à paroi épaissie, qu'elles soient globuleuses ou qu'elles aient conservé la forme des microconidies. La figure 1 est

TABEAU 1

Pourcentages des différents types de propagules de *F. o. f. sp. lycopersici* observés dans le milieu de culture après 8 j d'incubation et dans le talc, un mois après mélange des propagules produites en culture agitée (densité de la population = 10^7 propagules/g talc).

Percentages of different types of propagules of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* observed in a liquid culture medium after incubation for 8 days, and in talc 1 month after addition of the propagules produced in liquid culture (population density = 10^7 C.F.U./g talc).

Différents types de propagules	Dans le milieu de culture	Dans le talc un mois après infestation
Microconidies	82	78, paroi normale 71 paroi épaissie 7
Microconidies septées	15	16, paroi normale 9 paroi épaissie 7
Chlamydospores	1	6, globuleuses 2 microchlamydospores 4
Fragments mycéliens	2

Figure 1
Différents types de propagules de *F. o. f. sp. lycopersici* observées dans le talc : 1 - microconidies typiques à paroi mince, 2 - microconidies allongées ou septées à paroi mince, 3 - microconidie présentant un épaississement de la paroi, 4 - microchlamydospore à double paroi, 5-6 chlamydospores globuleuses de tailles différentes, 7 - germination d'une microconidie, 8 - germination d'une microconidie septée à paroi épaissie, 9 - germination de microconidies à paroi épaissie, 10 - germination d'une chlamydospore globuleuse.

Different types of propagules of *F. o. f. sp. lycopersici* observed in talc : 1 - thin-walled microconidia, 2 - septate microconidia, 3 - thick-walled microconidia, 4 - double-walled microchlamydospore, 5-6 chlamydospores, 7 - germinated thin-walled microconidia, 8 - germinated thick-walled microconidia, 9 - germinated thick-walled microconidia, 10 - germinated chlamydospore.

une illustration des différents types de propagules observés. Signalons enfin que la proportion de chlamydospores augmente avec la durée de conservation dans du talc. Ainsi, pour cette même souche de *F. o. f. sp. lycopersici*, nous avons observé 22 p. 100 de chlamydospores après 6 mois de conservation au sec.

Le tableau 2 indique le pourcentage de propagules présentant un tube germinatif après 19 h d'incubation à 25 °C à la surface d'une plaque d'eau gélosée. Dans ces conditions, le taux de germination moyen est de 58 p. 100 et les microconidies paraissent germer plus abondamment que les chlamydospores. Ainsi, en conditions aseptiques, les microconidies de *F. o. f. sp. lycopersici* conservées dans le talc sont capables de donner naissance à un thalle. Nous avons par ailleurs vérifié qu'il en est de même pour 6 souches différentes de *F. oxysporum* cultivées et conservées dans les mêmes conditions. Il est ainsi démontré que l'inocu-

TABLEAU 2

Pourcentages de germination des propagules de *F. o. f. sp. lycopersici* conservées dans le talc pendant 1 mois puis incubées pendant 19 h à la surface d'une plaque d'eau gélosée.

Percentages of germinated propagules of *F. oxysporum f. sp. lycopersici* stored in talc for 1 month and then incubated on water-agar for 19 h.

	Taux de germination pour 100 propagules observées	Pourcentages de germination pour chaque type de propagules
Microconidies	49	63
Microconidies septées	7	44
Chlamydospores	2	33
Total	58	

lum couramment utilisé pour l'infestation des sols dans nos essais est essentiellement constitué de microconidies ou de formes à paroi épaissie qui en dérivent.

B. Caractérisation de la population de *F. o. f. sp. lycopersici* présente dans les sols, un mois après l'infestation artificielle.

L'inoculum de *F. o. f. sp. lycopersici* précédemment décrit a été utilisé pour infester un sol à la concentration théorique de 10^5 propagules/g de sol. L'inoculum a été introduit, d'une part, dans le sol naturel et, d'autre part, dans le sol préalablement traité à la vapeur (100°C , 30 mn) de manière à éliminer la plus grande partie de la microflore. Les sols ont été incubés humides, à la température du laboratoire et à un potentiel hydrique voisin de -1 bar. Les observations microscopiques ont été réalisées après 1 mois d'incubation (tabl. 3). Dans le sol traité à la vapeur on observe alors 47 p. 100 de microconidies à paroi mince et 53 p. 100 de chlamydospores. La population de microconidies est donc toujours abondante bien que la proportion de chlamydospores soit nettement plus importante que dans le talc d'origine. Dans le sol non traité, les observations sont plus difficiles à réaliser et à interpréter. Cependant, alors que le sol non infesté ne présente que 6 p. 100 de formes microconidiennes, le sol infesté en révèle 27 p. 100. Ce résultat indique donc que toutes les microconidies introduites n'ont pas été lysées au contact de la microflore tellurique.

TABLEAU 3

Pourcentages des différents types de propagules observés un mois après infestation des sols avec un inoculum de F. o. f. sp. lycopersici conservé dans le talc (densité d'inoculum = 10^5 propagules/g sol).

Percentages of different types of propagules observed in soils 1 month after infestation with an inoculum of F. oxysporum f. sp. lycopersici previously stored in talc (inoculum density = 10^5 C.F.U./g soil).

	Nombre de propagules observées	Pourcentages des différents types de propagules	
		microconidies	chlamydospores
Sol traité à la vapeur et infesté	232	47	53
Sol non traité et infesté	200	27	73
Sol non traité, non infesté	49	6	94

Néanmoins, ces observations ne permettent pas de savoir si ces conidies sont encore capables de donner naissance à un thalle. C'est pourquoi nous avons tenté d'induire leur germination soit en cultivant une plantule de tomate, soit en amendant le sol avec du glucose à la dose de 1 mg/g de sol (tabl. 4). Après 24 h d'incubation, le taux de germination observé est faible, même dans le sol préalablement traité à la chaleur. Cependant les microconidies présentant un tube germinatif sont plus nombreuses que les chlamydospores et cela même dans le sol traité à la vapeur. Les

TABLEAU 4

Pourcentages de propagules de F. o. f. sp. lycopersici germées après 24 h d'incubation dans les sols 1) en présence d'une racine de tomate (rhizosphère) 2), amendés avec du glucose (1 mg/sol).

Percentage of germinated propagules of F. oxysporum f. sp. lycopersici incubated for 24 h in soil 1) close to a root of tomato (rhizosphere) and 2) amended with glucose (1 mg/g soil).

	Nombre de propagules observées	Pourcentages de propagules germées	
		microconidies	chlamydospores
Sol traité vapeur			
rhizosphère	280	17	10
glucose	261	26	8
Sol non traité			
rhizosphère	298	7	7
glucose	303	14	11

observations réalisées après 19 et 48 h d'incubation fournissent des résultats similaires. Il faut donc admettre qu'une fraction non négligeable de la population de *Fusarium* est constituée de microconidies toujours capables de germer, un mois après leur introduction dans le sol. Dans nos conditions expérimentales, l'apport de glucose à 1 mg/g de sol est plus efficace pour induire la germination de ces propagules que la présence d'une jeune racine d'une plantule de tomate.

Nous n'avons cependant aucune certitude quant à l'origine de ces microconidies. Il est vraisemblable qu'elles proviennent de l'inoculum initial ; mais il n'est pas exclu qu'elles se soient formées dans le sol lui-même à la suite d'un développement saprophytique et d'une sporulation de *F. o. f. sp. lycopersici* après son introduction dans le sol. Nous avons en effet pu observer la formation de phialides et de conidies à partir des tubes germinatifs issus des chlamydospores (fig. 2). Ce phénomène semble assez exceptionnel et n'a été observé qu'à la suite de l'amendement des sols avec le glucose. Dans ce cas, 3 p. 100 des tubes germinatifs observés dans le sol traité à la chaleur, et 1 p. 100 dans le sol non traité présentaient des phialides. Ainsi, il semble exister une possibilité de formation de microconidies dans le sol lui-même, en présence d'une source nutritive importante.

IV. DISCUSSION

Les observations réalisées au cours de ce travail confirment les résultats acquis antérieurement avec une souche de *F. o. f. sp. melonis* et indiquent nettement que les microconidies constituent la plus grande partie de la population de *F. oxysporum* produite dans les conditions décrites ci-dessus. Ces microconidies peuvent survivre dans le talc sans subir de transformation apparente, mais certaines d'entre elles acquièrent une paroi épaissie et se transforment en microchlamydospores. Toutes les images intermédiaires entre microconidies à paroi mince et microchlamydospores à double paroi et à contenu cytoplasmique intensément coloré ont pu être observées. L'emploi de

Figure 2
Phialide et conidie de F. o. f. sp. lycopersici observées dans le sol amendé avec le glucose après 24 h d'incubation.

Phialide and conidium of F. o. f. sp. lycopersici produced in soil amended with glucose.

la microscopie électronique serait nécessaire pour préciser l'évolution de la paroi. Cependant, nous adoptons ici la définition de SCHIPPERS & VAN ECK (1981) qui, après une revue exhaustive de la littérature, proposent de désigner sous le terme de chlamydospore toute propagule à paroi épaissie, quelle que soit son origine et dont la fonction essentielle est la conservation dans le sol. La formation de chlamydospores à partir de microconidies de *F. oxysporum* a déjà été signalée par plusieurs auteurs (SEQUEIRA, 1962 ; MESSIAEN *et al.*, 1965 ; SCHIPPERS & VOETBERG, 1969). Malgré ces observations, la plupart des auteurs considèrent que les microconidies de *F. oxysporum*, très sensibles à la lyse, disparaissent rapidement lorsqu'elles sont introduites dans un sol. C'est pourquoi l'objectif principal de ce travail était d'étudier le comportement des microconidies après l'infestation artificielle des sols. Les résultats acquis montrent qu'il est toujours possible d'observer une proportion non négligeable (25 p. 100 dans le sol naturel) de microconidies à paroi mince un mois après l'infestation des sols. Ces conidies sont viables et capables de donner naissance à un thalle lorsqu'un apport nutritif est réalisé. Cependant, le fait que la proportion de chlamydospores soit beaucoup plus élevée dans le sol que dans le talc d'origine indique que les microconidies sont plus sensibles à la lyse que les propagules à paroi épaissie. Ces observations microscopiques concordent avec les études de dynamique de populations réalisées grâce aux techniques d'analyse microbiologique. Nous avons ainsi montré qu'un inoculum de *F. o. f. sp. melonis* conservé dans le talc s'installe dans le sol à un niveau environ 10 fois plus faible que celui auquel il a été introduit (ALABOUVETTE *et al.*, 1984). Cette diminution de la densité de la population traduit vraisemblablement la lyse des propagules les plus fragiles lorsqu'elles sont confrontées à une microflore tellurique complexe.

Ces résultats méritent d'être discutés par rapport aux travaux relatifs à la réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires. C'est en effet dans le but d'infester les sols dans des conditions standard parfaitement reproductibles que nous avons développé cette méthode de production de l'inoculum (ALABOUVETTE *et al.*, 1982). Or il apparaît que cet inoculum est constitué de plusieurs types de propagules morphologiquement distincts dont le comportement écologique est vraisemblablement différent. Cette hétérogénéité de l'inoculum et les variations qualitatives des inoculums différents affectent sans doute la précision et la reproductibilité des mesures du niveau de réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires. Il convient donc de mieux définir les conditions de culture afin d'obtenir un inoculum constitué d'un seul type de propagules ayant, si possible, un comportement écologique analogue à celui des chlamydospores existant dans les sols.

D'autre part, l'observation dans des conditions particulières de la formation de phialides et de conidies à partir des tubes germinatifs issus des chlamydospores conduit à s'interroger sur le rôle éventuel des conidies dans le cycle biologique des *F. oxysporum* agents de trachéomycoses. Il est possible que certains substrats organiques particulièrement riches en éléments nutritifs permettent le développement saprophytique et la sporulation des *F. oxysporum* dans les sols, en absence de la plante-hôte. Cette hypothèse doit être envisagée dans le cas de substrats particuliers tels que la tourbe enrichie qui sert de support aux cultures horticoles et dont nous avons démontré la grande réceptivité aux fusarioses vasculaires (COUTEAUDIER & ALABOUVETTE, 1981).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alabouvette C., Couteaudier Y., Louvet J.**, 1982. Comparaison de la réceptivité de différents sols et substrats de culture aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, **2** (1), 1-6.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., Louvet J.**, 1984. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. IX. Dynamique des populations de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* dans un sol résistant et dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, **4** (8), 729-733.
- Couteaudier Y., Alabouvette C.**, 1981. Fusarium wilt diseases in soilless cultures. *Acta Hortic.*, Substrates in Horticulture, **126**, 153-157.
- Locke T., Colhoun J.**, 1974. Contributions to a method of testing oil palm seedlings for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* Toovey. *Phytopathol. Z.*, **79**, 77-92.
- Messiaen C. M., Mas P., Beyries A., Vendran H.**, 1965. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. IV. Lyse mycélienne et forme de conservation dans le sol chez les *Fusarium*. *Ann. Epiphyties*, **16** (2), 107-128.
- Schippers B., Van Eck W. H.**, 1981. Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*. In « *Fusarium, Diseases, Biology and Taxonomy* ». P. E. NELSON, T. A. TOUSSOUN and R. J. COOK, State Univ. Press, 250-260.
- Schippers B., Voetberg J. S.**, 1969. Germination of chlamydospores of *Fusarium* f. sp. *lini* race 1 in the rhizosphere and penetration of the pathogen into roots of a susceptible and a resistant pea cultivar. *Neth. J. Plant Pathol.*, **75**, 241-258.
- Sequeira L.**, 1962. Influence of organic amendments on survival of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* in the soil. *Phytopathology*, **52**, 976-982.
- Tello-Marquina J. C., Alabouvette C., Louvet J.**, 1980. Aptitude à la conservation des microconidies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Ann. Phytopathol.*, **12** (3), 227-233.