

***Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*: EFFETS DU MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE, LA SPORULATION ET LA PRODUCTION DE L'ACIDE FUSARIQUE**

MECHTA Narimane, AZOUAOU-AIT KETTOUT Tassadit et RAHMANIA Fatma
Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides, Faculté des Sciences Biologiques Université de Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger, Algérie
E-mail: [mechta.n87@gmail.com/](mailto:mechta.n87@gmail.com)

Résumé.- La maladie du bayoud, ou fusariose du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est causée par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian et Maire) Gordon (F.o.a.). L'acide fusarique (AF) produit par F.o.a. pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse. L'objectif du présent travail est d'étudier l'effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne, la sporulation et la production de l'acide fusarique par ce pathogène. Quatre milieux à savoir: Pomme de terre Dextrose Agar (PDA), Czapeck-Dox Agar (CDA), Czapeck-Glucose Agar (CGA) et Richard's Agar (RA) ont été testés. Les résultats obtenus montrent que F.o.a. se développe mieux sur le milieu CGA; la sporulation, suivie du 2^{ème} au 28^{ème} jour, est favorisée par le milieu PDL. Le taux d'acide fusarique produit par F.o.a. est sensiblement identique 10 jours après son développement sur les milieux testés. Cependant, à partir du 20^{ème} jour de l'expérimentation, le CGL s'avère plus favorable à la synthèse d'AF, alors que le milieu PDL ne stimule la production de cette toxine qu'au 30^{ème} jour.

Mots clés: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, milieu de culture, croissance mycélienne, sporulation, acide fusarique.

***Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*: EFFECTS OF THE CULTURE MEDIUM ON THE MYCELIAL GROWTH, THE SPORULATION AND THE FUSARIC ACID PRODUCTION**

Abstract.- Bayoud disease or fusariose of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is caused by the soil fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian and Maire) Gordon (F.o.a.). Fusaric acid (FA) produced by F.o.a. have been proposed to play an important role during the pathogenic process. So, the objective of the present work is to study the effects of culture media, on the mycelial growth, sporulation and fusaric acid production by this pathogen. Four culture media, namely: Potato Dextrose Agar (PDA), Czapeck-Dox Agar (CDA), Czapeck-Glucose Agar (CGA) and Richard's Agar (RA) were evaluated. The results obtained show that F.o.a. grows better on CGA. Sporulation is more important on PDL medium, and thus, throughout the experimentation (28 days). A Fusaric acid level produced by F.o.a. is substantially identical 10 days after its development in media tested. However at the 20th day of the F.o.a. development, the CGL medium is more favorable to the production of FA, whereas PDL stimulates the production of this toxin from the 30th day.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, culture medium, mycelial growth, sporulation, fusaric acid.

Introduction

La fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (F.o.a.) présente une menace permanente pour de nombreux pays phœnicicoles de l'Afrique du Nord, notamment l'Algérie. Cette maladie sévit dans toutes les palmeraies marocaines et a progressé vers l'est pour atteindre les oasis du Sahara occidental et central Algériens [1,2] entraînant ainsi d'énormes dégâts sur le plan écologique et surtout économique au vu de l'importance des exportations des dattes qui génèrent des apports en devises importants pour l'économie Algérienne [3].

Les champignons phytopathogènes adoptent différentes stratégies dans le processus d'infection des plantes, telle que la production de métabolites à faible poids moléculaire appelées «toxines». Le genre *Fusarium* produit de multiples toxines: Enniatins, Beauvericines, Fusaproliferin et autres [4]. Cependant, *Fusarium oxysporum* produit un nombre limité de toxines dont les plus connues est l'acide fusarique et ses dérivés [5]. L'acide fusarique (5-n-butyle-2-pyridine acide carboxylique) fut isolé pour la première fois chez *Fusarium heterosporum* Nees, pathogène du riz [6]. C'est une toxine non spécifique, produite par différentes espèces pathogènes et non pathogènes de *Fusarium*. Elle est toxique pour différentes plantes, champignons et bactéries [7]. De nombreuses études ont prouvé ses effets toxiques sur la plante, telles que l'altération de la perméabilité membranaire [8], la modification du potentiel membranaire, la diminution du taux d'ATP [9], la réduction de l'activité respiratoire [10,11] et l'altération de la croissance cellulaire [12,13]. La production de l'AF par *F. oxysporum in vitro* dépend de la souche et de la composition du milieu de culture [14,15]. *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est connu pour produire de l'acide fusarique [16]; cependant très peu de travaux ont concerné l'effet du milieu de culture sur la croissance de ce champignon et sur la production de cette toxine. Dans le présent travail, une étude *in vitro* a été réalisé afin d'évaluer l'effet de quelques milieux de cultures sur la croissance mycélienne, la sporulation et la synthèse d'acide fusarique par *F.o.a.*

1.- Matériel et méthodes

1.1.- Matériel

1.1.1.- Matériel fongique

Il s'agit d'une souche virulente de *Fusarium oxysporum* f .sp. *albedinis* Killian et Maire (Gordon) *F.o.a.* NRLL 38288, mise à notre disposition par le Laboratoire de Recherche du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (United States Department of Agriculture, USDA) et stocké sur milieu PDA à 4°C.

1.1.2.- Milieux de culture

Quatre milieux de cultures sous forme solide et liquide sont testés. Il s'agit:

- Milieu PDA (Pomme de terre Dextrose Agar) [17], dont la composition est de 250g de pomme de terre, 10g de glucose, 20g d'agar et QSP 1 litre d'eau distillée.
- Milieu Czapeck-Dox Agar (CDA) [18], 3 g Na NO₃, 1 g KH₂ PO₄, 0.5 g KCl, 0.5 g Mg SO₄ 7H₂O, 0.01 g Fe SO₄ 7H₂O, 30 g saccharose, 20g agar, l'ensemble est complété à QSP 1 litre d'eau distillée.
- Milieu Czapeck-Glucose Agar (CGA) constitué du milieu CDA auquel on ajoute 2g d'extrait de levure et 8g de glucose. Ce milieu favorise la production de métabolites fongiques [19].
- Milieu Richard's Agar (RA) [20], contenant 10g KNO₃, 5g K₂HPO₄, 2.5g MgSO₄ 7H₂O, 50g de Saccharose, 20g agar, et QSP 1 litre d'eau distillée.

Les milieux de culture précédemment décrits, sont utilisés aussi sous forme liquide, avec la même composition chimique mais ils sont dépourvus d'Agar. Il s'agit de: Pomme de terre Dextrose liquide (PDL), CzapeckK-Dox liquide (CDL), Czapeck-Glucose liquide (CGL) et Richard's liquide (RL).

1.2.- Méthodes

1.2.1.- Détermination de la croissance mycélienne de *F.o.a.*

L'ensemencement du champignon consiste à prélever à l'aide d'une anse stérile, un morceau de colonie mycélienne purifiée, qu'on dépose dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA. Les boîtes sont mises à incuber dans une étuve, à une température de 28°C et à l'obscurité, pendant 7 jours. Ensuite des disques d'agar de 10mm de diamètre prélevés à la marge de la culture jeune et déposés au centre des boîtes de Pétri stériles, contenant chacun des milieux de culture solides (PDA, CDA, CGA, RA). La croissance diamétrale est notée toutes les 48h pendant 10 jours. Trois répétitions sont réalisées pour chacun des milieux utilisés.

1.2.2.- Estimation du nombre de conidies

Les quatre milieux de culture liquides préparés (PDL, CDL, CGL, RL) sont répartis dans des flacons en raison de 20ml par flacon. Ils sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Deux disques d'Agar de 10mm de diamètre, prélevés à partir de la périphérie d'une culture jeune de *F.o.a* âgée de sept jours, sont introduits dans les flacons contenant les milieux liquides. L'incubation se fait à 28°C et à l'obscurité, pendant 28 jours.

Le nombre de conidies est déterminé, pour chaque milieu, à l'aide d'une cellule de Malassez au 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 18, 22, 28^{ème} jour d'incubation. Trois répétitions sont réalisées pour chacun des milieux.

1.2.3.- Dosage de la quantité d'acide fusarique produit par *F.o.a.*

Les milieux liquides inoculés par *F. o. a.* sont filtrés à l'aide de papier Whatman n°1. Le surnageant représente le filtrat de culture qui servira pour l'extraction des toxines par la technique préconisée par BAKER *et al* (1981) [21]. Elle se fait à l'acétate d'éthyle (vol/vol); deux phases sont obtenues, une hypophase aqueuse et une épiphase organique (phase éthylée). La phase éthylée est mise dans des flacons stériles portés à évaporation dans l'étuve à 50°C. Le résidu obtenu est récupéré dans 3ml d'éthanol. Il constitue l'extrait de toxines utilisé pour le dosage de l'acide fusarique à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY ($\lambda=270\text{nm}$). Les concentrations sont déterminées à partir d'une courbe étalon d'acide fusarique commercial ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$, Mr 179,22 mp 96-100°C, solubilité 50mg/ml, Pm = 96). Trois répétitions sont réalisées pour chaque milieu.

2.- Résultats et discussion

2.1.- Estimation de la croissance mycélienne

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 1. La croissance du champignon varie en fonction des milieux de culture. Les résultats de l'expérimentation révèlent qu'après 10 jours d'incubation, les milieux CGA et CDA sont plus favorable au développement mycélien de *F. o. a.* La croissance maximale est respectivement de 4.725 ± 0.392 cm et 4.30 ± 0.071 cm, suivi de RA (3.46 ± 0.088 cm) et PDA (2.5 ± 0.62 cm). Ceci indique que le milieu CGA enrichie de glucose assure un meilleur développement du *F. o. a.* Ces résultats confirment ceux de FAROOQ *et al* (2005) [22]. En effet, le milieu Czapeck-dox induit une croissance radiale maximale de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*,

en outre, il s'est avéré que le glucose est la meilleure source de carbone pour une bonne croissance mycélienne.

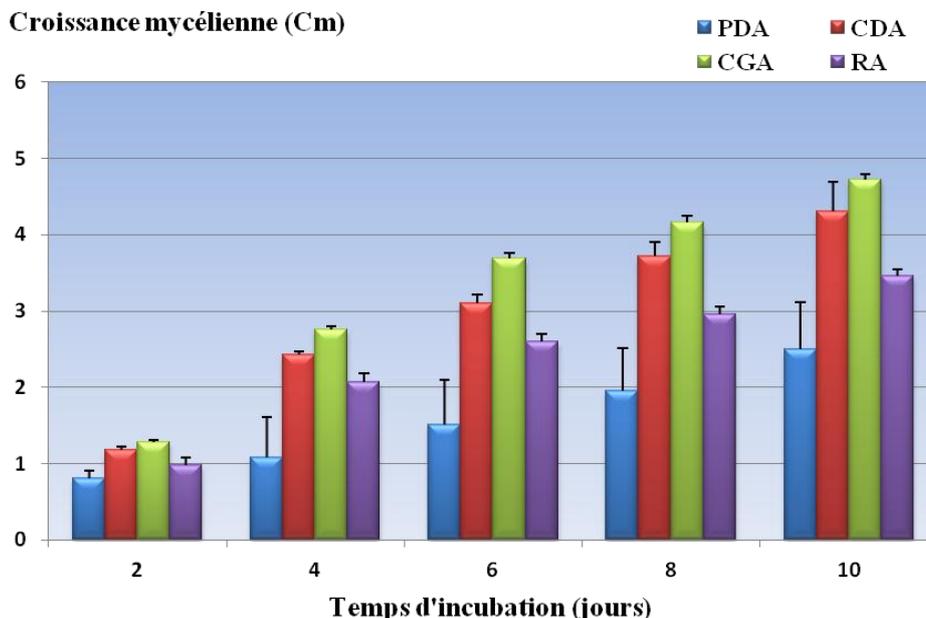


Figure 1.- Effet des différents milieux de culture sur la croissance du *F.o.a.*

Les résultats indiquent que toutes les sources de carbone sont utilisables pour la croissance des champignons. Le champignon peut convertir certaines formes de composés de carbone complexes en forme simple, qui peut être facilement métabolisé [23]. En plus de la source de carbone, d'autres éléments présents dans les milieux tels que l'azote, le phosphore, le soufre, les vitamines, et des ions métalliques, le Fer et le Magnésium, sont nécessaires pour la croissance et le développement des champignons.

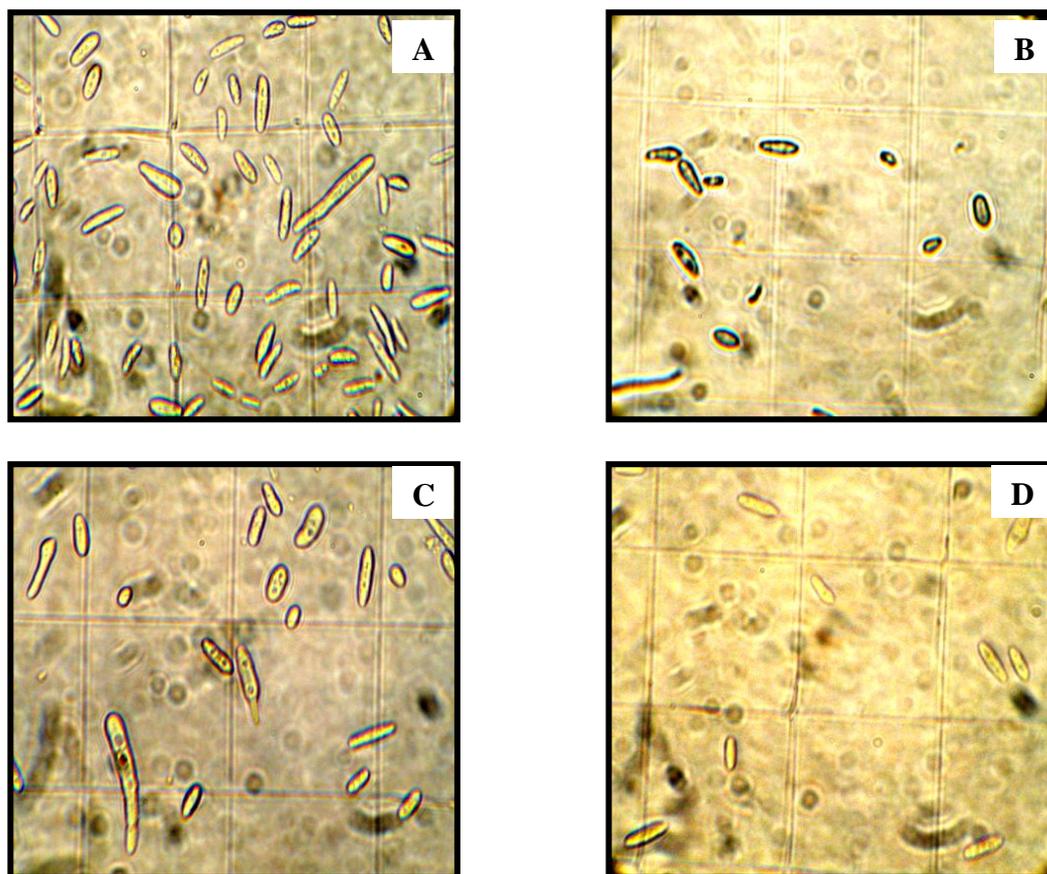
2.2.- Estimation de nombre de conidies

L'ensemble des résultats sont représentés sur le tableau. I et sur la figure 2. Le milieu PDL s'avère plus favorable à la sporulation de *F.o.a.* par rapport aux autres milieux testés. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par KHAN *et al* (2001) qui affirment que le milieu PDL induit la production d'un maximum de spores par *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Ils ont, en outre, constaté que les milieux de culture pourvus d'éléments organiques sont les plus favorables à la sporulation [24].

La sporulation *in vitro* de *F. o. a.* dépend, elle aussi, du milieu de culture (tab. I). Elle augmente progressivement dans les quatre milieux jusqu'au 16^{ème} jour d'incubation où elle atteint une concentration maximale de $478 \times 10^5 \pm 14.75$, $138.61 \times 10^5 \pm 7.88$, $118.52 \times 10^5 \pm 6.71$ et $112.33 \times 10^5 \pm 3.30$ respectivement dans les milieux PDL, CGL, CDL et RL. A partir de ce temps d'incubation, une diminution progressive de la densité conidienne est notée dans les quatre milieux testés.

Tableau I.- Nombre de conidies dans les quatre milieux de culture

Temps d'incubation (jours)	Milieux de culture liquides			
	PDL	CDL	CGL	RL
	Moyenne \pm Ecart type (nombre de spores / ml $\times 10^5$)			
2	9,36 \pm 0,84	8,56 \pm 3,88	10,37 \pm 2,52	5,55 \pm 1,62
4	82,96 \pm 20.03	29,27 \pm 7.10	61,13 \pm 4.92	38,53 \pm 18.98
6	145,6 \pm 44.54	42,74 \pm 13.14	87,4 \pm 7.81	50,91 \pm 8.31
8	255,18 \pm 46.46	61,66 \pm 9.76	114,3 \pm 26.45	74,7 \pm 7.23
11	417,45 \pm 20.06	77,06 \pm 14.83	118,2 \pm 5.91	93,74 \pm 21.52
13	475,28 \pm 18.68	98,06 \pm 21.35	129,85 \pm 7.48	111,71 \pm 23.32
16	478 \pm 14.75	118,52 \pm 6.71	138,61 \pm 7.88	112,33 \pm 3.30
18	365,43 \pm 5.56	94,06 \pm 7.62	100,66 \pm 1.52	86,2 \pm 3.65
22	228 \pm 25.71	95,66 \pm 29.49	53,48 \pm 3.76	41,4 \pm 16.52
28	180,25 \pm 13.52	117,66 \pm 2.52	53,86 \pm 10.34	41,26 \pm 18.52

**Figure 2.-** Conidies d'une culture de *F.o.a.* NRLL 38288 âgée de 2 jours observées sur cellule de Malassez [Gr 400 \times 3 (A): PDL; (B): CDL; (C): CGL; (D): RL]

2.3.- Dosage de l'acide fusarique

Les résultats de l'expérience sont représentés sur la figure 3. Ils montrent que la concentration d'AF synthétisé par *F. o. a.* est variable selon le milieu de culture et, également, selon le temps d'incubation. Après 10 jours d'incubation, la quantité d'AF produite est sensiblement identique, soit 0.02 mg/ml, sur les quatre milieux de culture. Au 20^{ème} jour, la production d'AF est plus importante sur le milieu CGL et CDL où la concentration est respectivement de 0.31 ± 0.096 mg/ml et 0.263 ± 0.041 mg/ml, comparée aux milieux PDL et RL dont la concentration d'AF produit est sensiblement identique, soit 0.06 mg/ml. Ces résultats concordent avec ceux d'EL FAKHOURI *et al* (1996) et LOFFLER et MOURIS (1992), dont il s'est avéré que le milieu Czapeck-Dox est plus favorable à la synthèse de toxines (AF) par *F. o. a.* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* [25,26].

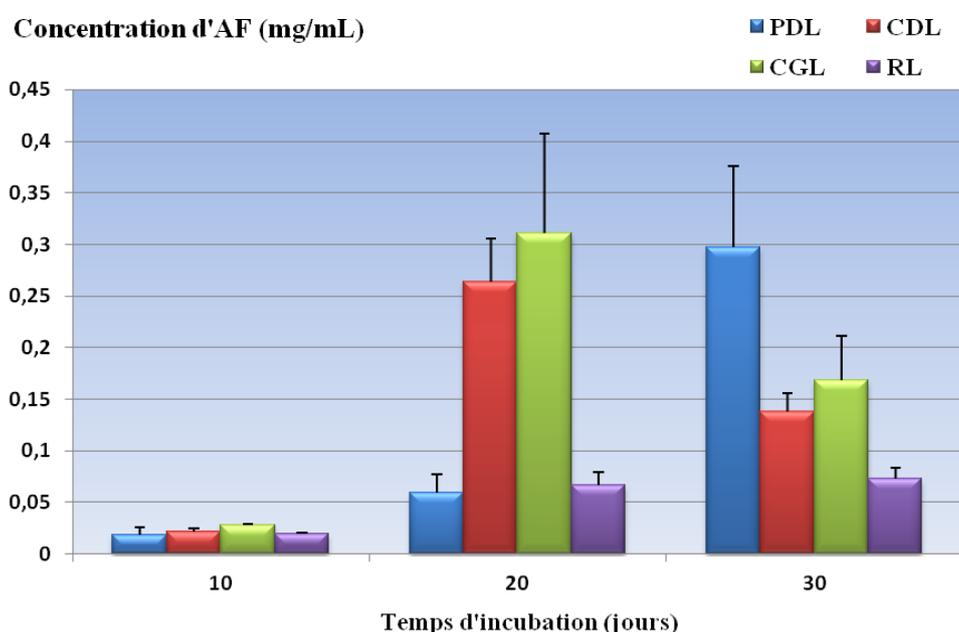


Figure 3.- Effets des différents milieux de culture sur la synthèse d'AF

La concentration d'acide fusarique au 30^{ème} jour d'incubation, sur milieu PDL, est de 0.296 ± 0.079 mg/ml; cependant les concentrations sont de 0.168 ± 0.042 mg/ml et de 0.137 ± 0.018 mg/ml respectivement sur les milieux CGL et CDL. Il paraît donc qu'à ce temps d'incubation, c'est le milieu PDL qui s'avère le plus favorable à la synthèse de l'acide fusarique. Ces résultats confirment ce qui a été trouvé par de DUARTE et ARCHER (2003) [27]. Ils signalent que le milieu pomme de terre sucrose liquide (PSL) favorise la production de l'acide fusarique, dont le maximum est atteint au 25^{ème} jour d'incubation.

Conclusion

La composition du milieu de culture est un facteur important pour la croissance mycélienne, la sporulation et la production des toxines par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Les résultats obtenus indiquent que ce pathogène est capable de se développer, sporuler et de synthétiser l'AF aussi bien sur des milieux complexes que sur des milieux

synthétiques, mais à des degrés variables. Le milieu PDL s'avère plus favorable à la sporulation, alors que le milieu CGL et CGA s'avèrent favorables à la croissance mycélienne et à la production d'AF. Ces résultats indiquent également que la croissance mycélienne et la sporulation, qui sont deux moyens de développement du champignon, n'ont pas les mêmes exigences nutritionnelles.

Ces travaux pourraient trouver des applications, dans la mise au point de milieu de culture favorable au développement de *F. o. a.* et à la production de l'acide fusarique, pour mieux comprendre son action et son éventuelle transformation dans la plante hôte. Ils pourraient également présenter un intérêt pour l'élaboration de substrats répressifs envers la fusariose vasculaire du palmier dattier.

Références bibliographiques

- [1].- Djerbi M., Sedra My H. et El Idrissi-Ammari A.; 198.- Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. Annale de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunis; 58: 1-8.
- [2].- Brac de la Perriere R. A. et Benkhalifa A.; 1991.- Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse; 2: 119-128.
- [3].- INPV., 2014.- Le palmier dattier: Un patrimoine à réserver. Bulletin d'informations phytosanitaires n° 34, INPV, Alger, 4p.
- [4].- Moretti A., Mulé G., Ritieni A. et Logrieco A., 2007.- Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. International Journal Food Microbiology, 118: 158–163.
- [5].- Nelson P. E., Tousson T. A. et Cook R. K. J., 1981.- "*Fusarium*". Diseases, Biology and Taxonomy. Penn. Star. Univ Press, 457p.
- [6].- Yabuta T., Kambe K. et Hayashi T., 2008.- Biochemistry of the bakanae-fungus, I. Fusaric acid, a new product of the bakanae-fungus (1934). In Wu H.S., X.M. Yin, D.Y. Liu *et al.*,.Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. Plant Soil; 308: 255-266.
- [7].- Bacon C. W., Porter J. K., Norred W. P et Leslie J. F., 2010.- Production of fusaric acid by *Fusarium* species (1996) In Parmar P., Vishal P Oza., Subramanian R.B., Indian Journal of Science and Technology: 411-416.
- [8].- Gäumann E., 1958.- The mechanism of fusaric acid injury. Phytopathology; 48: 670-686.
- [9].- D'alton A. et Etherton B., 1984.- Effects of Fusaric Acid on Tomato Root Hair Membrane Potentials and ATP Levels. Plant Physiology, 74: 39-42.
- [10].- Paquin R. et Waygood E. R., 1957.- The effect of Fusarium toxins on the enzymatic activity of tomato hypocotyl mitochondria. Canadian Journal of Botany; 35: 207-218.

- [11].- Kuo M. S. et Scheffer R. P., 1964. Evaluation of fusaric acid as a factor in the development of *Fusarium* wilts. *Phytopathology*; 54: 1041-1044.
- [12].- Matysiak B., Samyn G., 1996.- Growth of young *Aechmea fasciata* seedlings on a medium supplemented with fusaric acid. *Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent*; 61: 333-336.
- [13].- Dinis S. P. S. S. et Oliveira R. C., 2009.- Effects of fusaric acid on *Zea mays* L seedlings. *Phyton*; 78: 155-160.
- [14].- Venter S. et Steyn P., 1998.- Correlation between fusaric acid production and virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* that causes potato dry rot in South Africa. *Potato Res*; 41: 289-298.
- [15].- Notz R., Maurhofer M., Dubach H., Haas D. et Defago G., 2002.- Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas xuorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*; 68: 2229-2235.
- [16].- Surico G. et Graniti A., 1977.- Produzione di tossine da *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*; 16: 30-33.
- [17].- Rapilly F., 1968.- Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*, 19: 102(HS).
- [18].- Thom C, Raper K. B., 1945.- *Manual of the Aspergilli*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 373p.
- [19].- Puel O., Tadriss S., Delaforge M., Oswald I. P., Lebrihi A., 2007.- The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6- methylsalicylic acid synthase and isoeopoxydon dehydrogenase genes. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 131-139.
- [20].- Richards G. S., 1951.- Factors influencing sporulation by *Septoria nodorum*. *Phytopathology*; 41: 571-578.
- [21].- Baker R. A., Tarum J. H. et Nemic S., 1981.- Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight-disease Citrus. *Phytopathology*; 71: 951-954.
- [22].- Farooq S., Iqbal SH. M. et Abdul Rauf CH., 2005.- Physiological Studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *International journal of agriculture and biology*, 275-277.
- [23].- Bais B. S., Singh S. B. et Singh D. V., 1970.- Effect of different carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Curvularia pallescens*. *Indian Phytopathology*; 23: 511-517.
- [24].- Khan I. A. K., Alam S. S. et Jabbar A., 2001.- Standarization of Medium for the production of maximum phytotoxic activity by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Pakistan journal of Biological Sciences; 4(11): 374-1376.

- [25].- El Fakhouri R., Lotfi F., Sedra M. H. et Lazrek HB., 2001.- Production et caractérisation chimique des toxines sécrétées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Al awamia*; 93: 81-92.
- [26].- Loffler H. J. M. et Mouris J. R., 2007.- Fusaric acid: phytotoxicity and in vitro production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*, the causal agent of basal rot *In Strange R.N.*; *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. Natural Product Reports*; 24: 127-144.
- [27].- Duarte M. L. R. et Archer S. A., 2003.- In vitro toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira* ; 28: 229-235.