

CHOIX D'UN MILIEU FAVORABLE
A L'ISOLEMENT DES FUSARIUM OXYSPORUM
DES SOLS DE PALMERAIES IMPLANTEES
DANS UNE REGION DE SAVANE

J. L. RENARD

Adiopodoumé

Mars 1966

- INTRODUCTION -

Les sols renferment une quantité importante de champignons microscopiques que l'on peut mettre en évidence par les techniques générales d'isolement des champignons du sol. Le milieu à la pomme de terre glucosée permet d'avoir une représentation très correcte de la mycoflore, mais dans certains cas, ce milieu riche, favorisant les Mucorales ou les Pythiacées masquent d'autres genres à croissance plus lente. Pour étudier la présence dans le sol de ces champignons on a recours à des techniques spéciales qui piègent le champignon ou à des milieux sélectifs qui favorisent certains genres. Pour les Fusarium ces milieux permettent le développement des espèces qui produisent des Chlamydospores.

Cet exposé a pour but de comparer l'efficacité de trois milieux sélectifs sur l'isolement des Fusarium présents dans les sols de savane et de palmeraies. L'aspect quantitatif de la mycoflore isolée avec ces milieux sera brièvement indiquée; les populations de Fusarium des sols feront l'objet d'un développement particulier.

I - CARACTERISTIQUES DE LA REGION (1)

Les savanes de Dabou où les sols ont été prélevés se situent à 50 Km à l'Ouest d'Abidjan, au Nord de la lagune Ebrié. Ces savanes ont été l'objet d'un défrichement important pour l'établissement de grandes palmeraies.

Le substrat géologique de cette région est caractérisé par une roche sédimentaire sablo-gréseuse, très meuble du tertiaire supérieur. Les sols sont très sablonneux, pauvres en éléments fins, avec un faible pouvoir de rétention pour l'eau. On note fréquemment des phénomènes de cuirassement sur certaines buttes. Le pH du sol varie de 4,9 à 6,2.

Du point de vue climatique l'année se divise en quatre saisons. Une saison sèche de décembre au début mai, une grande saison des pluies de mai à juillet, une petite saison sèche jusqu'à la fin septembre, puis une petite saison pluvieuse de durée très variable se situant entre septembre et décembre.

.../....

Les savanes sont caractérisées par des formations herbeuses parsemées d'éléments arbustifs disséminés. Quelques îlots forestiers de bas fonds ou de crêtes et quelques palmeraies naturelles interrompent cette uniformité.

Dans cette savane dominent les graminées: Hyparrhenia dissoluta et H. diplandra; Andropogon pseudapricus, Brachiaria jubata, Schizachyrium semiberbe et Panicum fulvum. Les Cypéracées sont représentées par les espèces Bulbostylis aphyllanthoides, B. filamentosa et Cyperus schweinfurthianus. L'ensemble floristique de cette savane comprend également des espèces fréquentes telles que Eriosoma glomeratum et Indigofera paniculata (légumineuses) et Cassia mimosoides (Coesalpinées). Les rôniers (Borassus flabellifer var. aethiopicum) sont également bien représentés.

L'ouverture d'une palmeraie en savane nécessite un nettoyage complet du sol et un nivellement soigneux. Puis, dès le début des pluies on sème les légumineuses de couverture : Pueraria javanica en mélange avec Centrosoma pubescens. La plantation des palmiers s'effectue en général l'année suivante.

II. - MODE OPERATOIRE

1) Prise d'échantillons

Plusieurs séries d'échantillons prélevés tous les 10cm sur une tranche de sol de 80 cm de profondeur ont été réalisées dans les différents sols caractéristiques de la région.

Pour un même essai, huit trous sont creusés à l'aide d'une bêche et les échantillons sont prélevés dans des tubes à essais stériles (25 x 250 mm). Ces tubes sont enfoncés perpendiculairement à la paroi, chacun d'entre-eux correspondant à une seule prise. Les prélèvements sont effectués à partir des horizons profonds de manière à ne pas souiller la paroi par les éboulis résultant des prises successives.

Les tubes sont ensuite regroupés par profondeur et le sol qu'ils renferment est mis à sécher à l'air pendant 3 jours, à l'abri des poussières, en boîtes de Pétri stériles légèrement entr'ouvertes.

2) Préparation des échantillons

Le sol est finement broyé dans un mortier préalablement lavé à l'hypochlorite de sodium, puis flambé trois fois à l'alcool

Chaque fraction correspondant à un même horizon est introduite dans un Bécher stérile. Le poids global du Bécher et de la terre qu'il contient est noté au moment de l'expérience.

3) Milieux utilisés

Trois milieux de composition différente ont été essayés:

a) Milieu ALCOOL-ACIDE CITRIQUE (3)

Solution de KNOP	1 l
Saccharose	10 gr
Extrait de levure	4 gr

Chaque boîte de Pétri (\emptyset 12 cm) reçoit 10cm³ de ce milieu de base stérilisé, puis 0,5 cm³ d'alcool à 95° et 10 cm³ d'une solution d'acide citrique à 1 gr/l. préalablement autoclavée.

b) Milieu ROSE-BENGALE sous atmosphère de GAZ CARBONIQUE (2)

A un milieu Czapeck sans saccharose on ajoute une faible quantité de Rose bengale. Une fois commencées, les boîtes sont introduites dans une atmosphère saturée de gaz carbonique :

Milieu Czapeck :

Sulfate de fer	0,01 g
Nitrate de Sodium	3g
Phosphate bipotassique	1g
Chlorure de Potassium	0,5g
Sulfate de magnésium	0,5g
Gélose	20g
Eau distillée	1000cc
Rose bengale	66mg

c) Milieu P.C.N.B.-Streptomycine (4)

Peptone	15g
Phosphate monopotassique	1g
Sulfate de magnésium	0,5g
Agar en poudre DIFCO	20g
Eau distillée	1000cc

A ce milieu porté à ébullition puis maintenu au bain marie à 50°C sont ajoutés 300 mg de Streptomycine et 2,5g de PCNB à 30% (Pentachloronitrobenzène)

Tous ces milieux contiennent un agent bactériostatique (respectivement l'acide nitrique, le Rose bengale et la Streptomycine) et un agent sélectif différent qui est l'alcool dans le premier cas, le gaz carbonique dans le second et le P.C.N.B. dans le dernier cas.

4) Technique d'ensemencement

Tous ces milieux sont maintenus à 50° C et répartis dans des boîtes de Pétri stériles de 12 cm de diamètre. Alors que le milieu est encore liquide, on y incorpore le sol à l'aide d'un tube de verre stérile. Une petite quantité de sol contenu dans le Becher est prélevée dans la lumière du tube et régulièrement distribuée dans chaque boîte de Pétri. Pour parfaire l'homogénéisation, on imprime à la boîte de Pétri un mouvement rotatif.

Pour chaque horizon quatre boîtes de Pétri sont ainsi préparées. La quantité de sol introduite dans chaque série est donnée par la différence de poids du Becher avant et après l'ensemencement.

III - VARIATION DU NOMBRE DES COLONIES ISOLEES SUR LES BOITES DE PETRI EN FONCTION DE LA PROFONDEUR

1) Nombre total de colonies

A partir des comptages effectués sur les boîtes de Pétri six jours après l'ensemencement pour les méthodes à l'Alcool et au PCNB et 10 jours après pour la méthode au CO₂, le nombre des colonies mycéliennes est rapporté au gramme de terre.

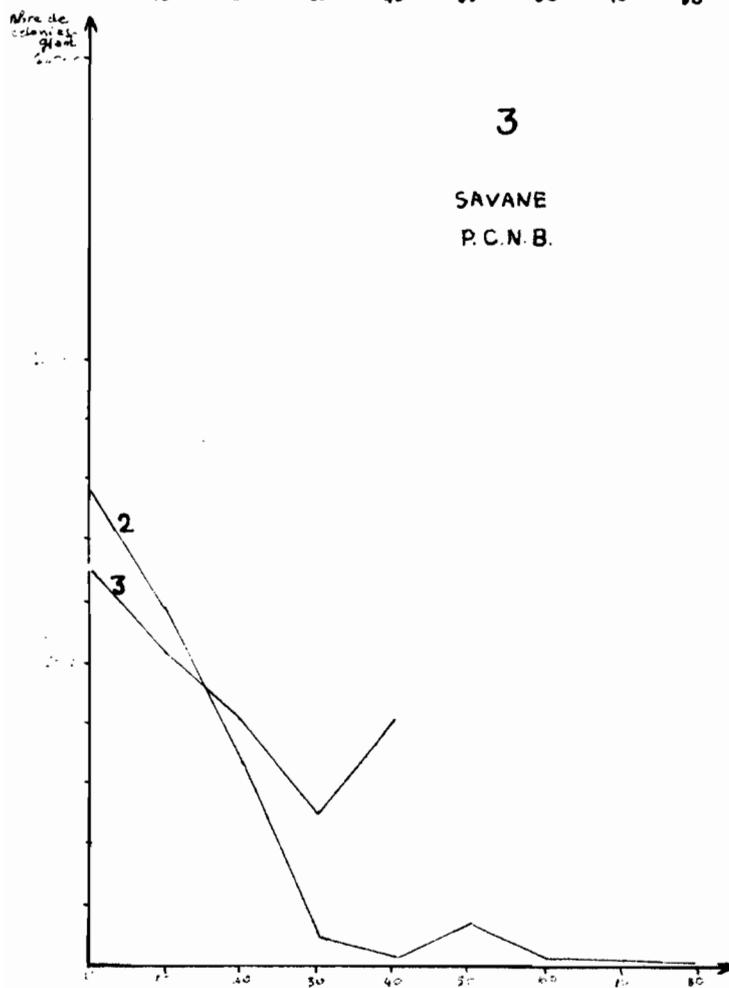
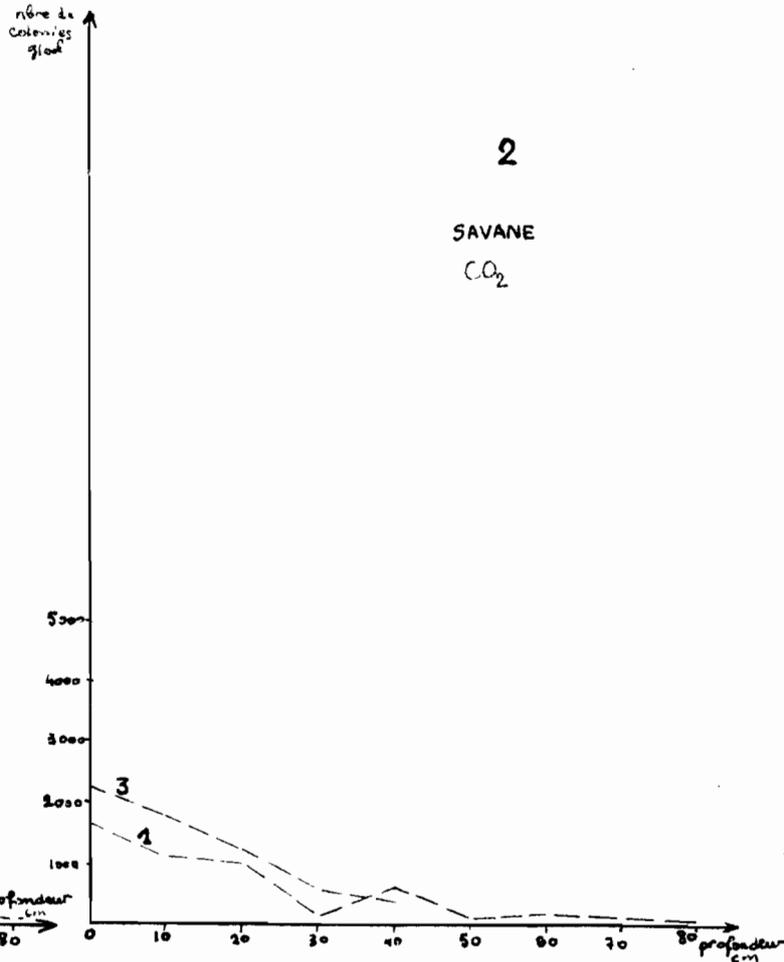
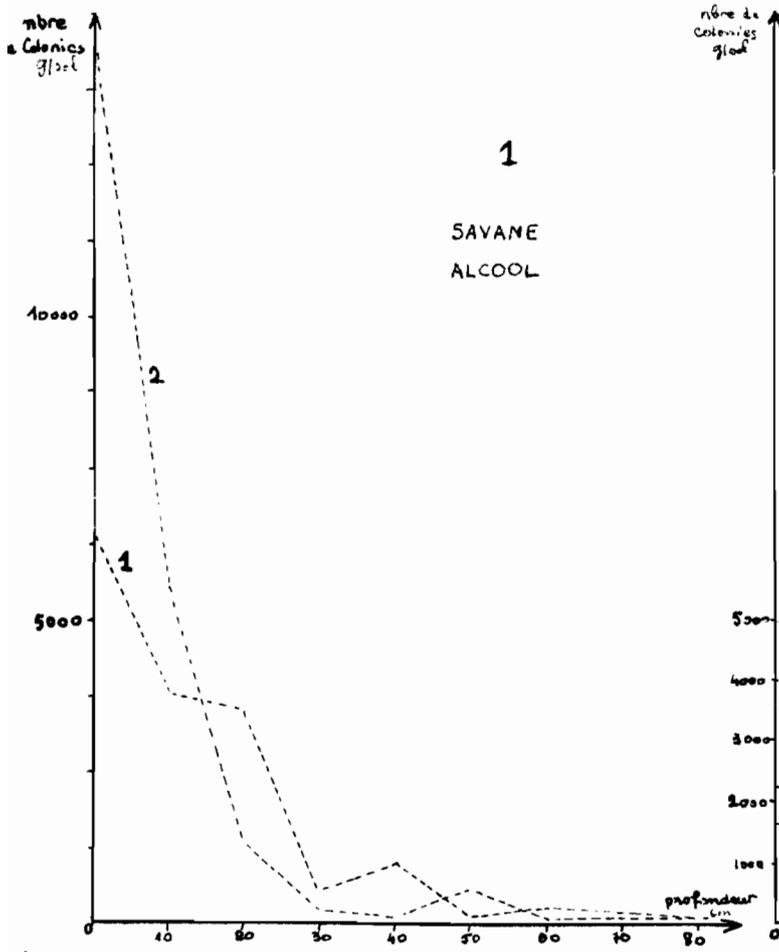
D'une façon générale ce nombre diminue avec la profondeur. En surface il varie considérablement selon la méthode. La technique au CO₂ donne des chiffres ne dépassant jamais 5.000 colonies par gramme de sol; par contre les deux autres méthodes donnent un nombre de colonies atteignant 20.000 par gramme de sol. Pour un même milieu ce chiffre peut varier de 7.000 à 20.000/g/sol (planche III, graphique 1)

D'autre part, des variations identiques, à partir d'un même échantillon de sol, s'observent sur des milieux différents:

Exemples : Planche I , graphiques 1 et 2, courbes 1
graphiques 1 et 3, courbes 2

Planche II, graphique 1 , courbes 1 et 2 et
graphique 2 , courbe 1

Planche III, graphiques 1 et 2, courbes 1
graphiques 1 et 2, courbes 2



REPARTITION DU NOMBRE TOTAL
DES COLONIES MYCELIENNES ISOLEES
EN FONCTION DE LA PROFONDEUR

PLANCHE I

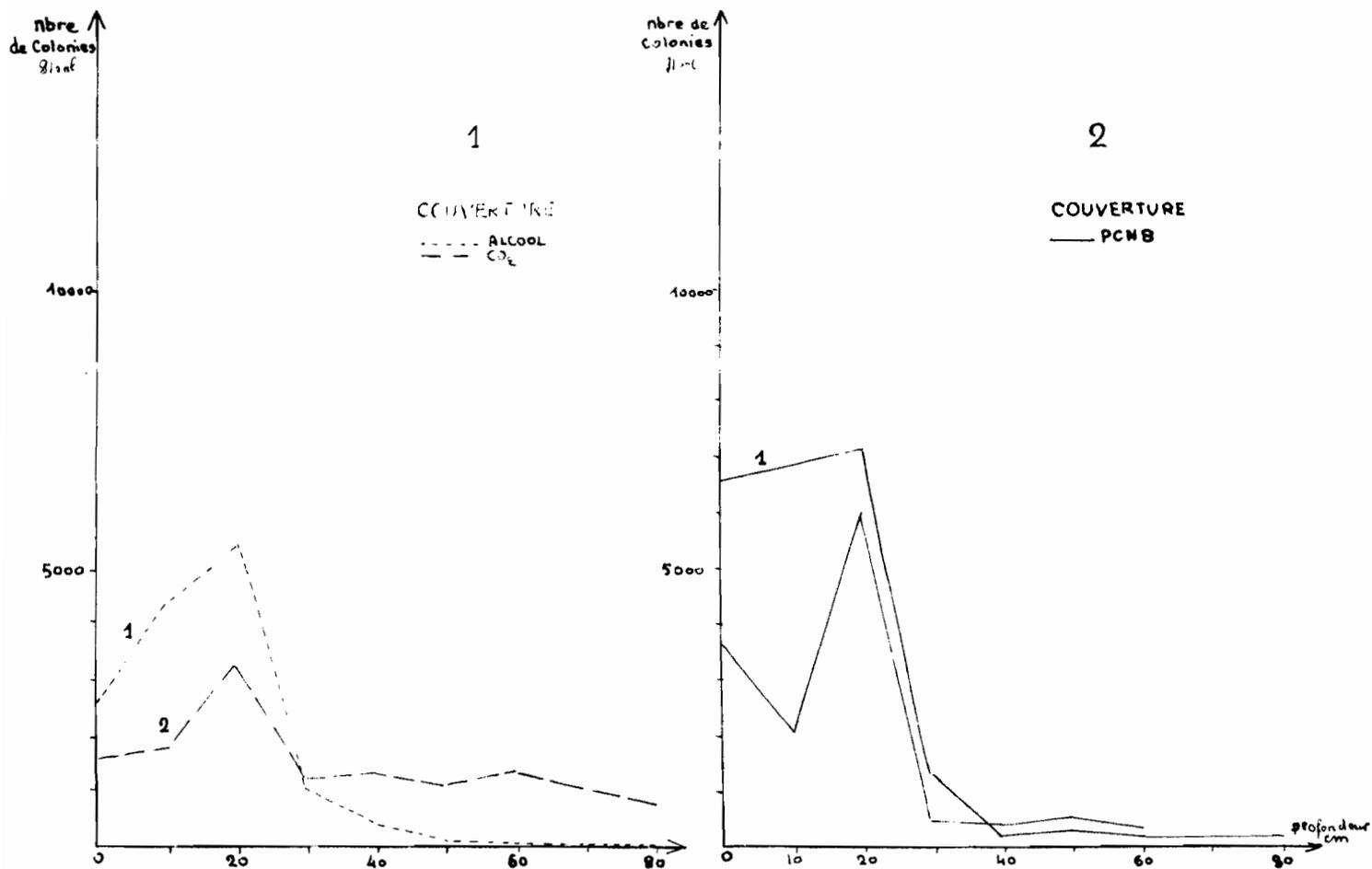
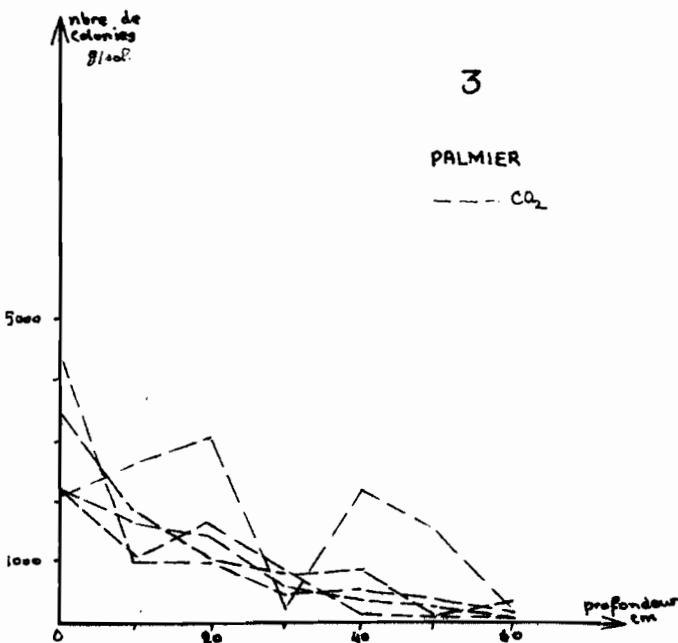
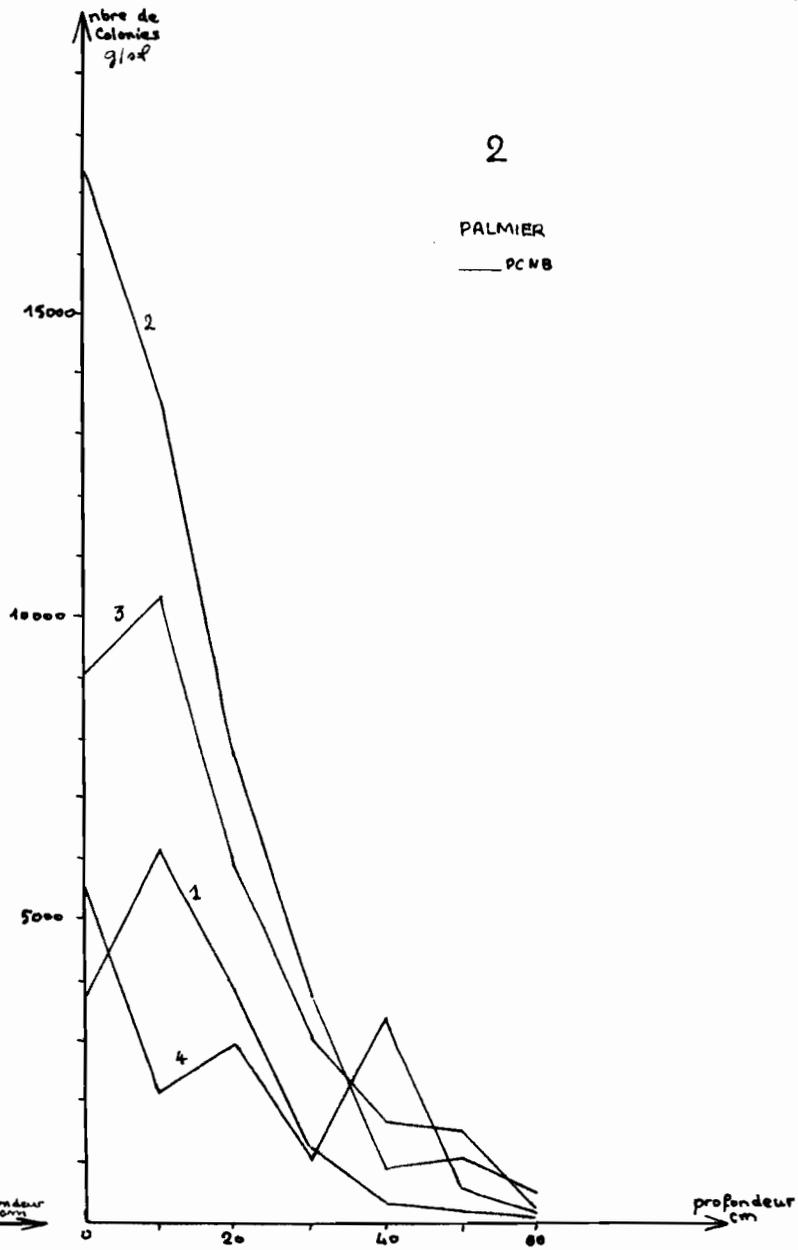
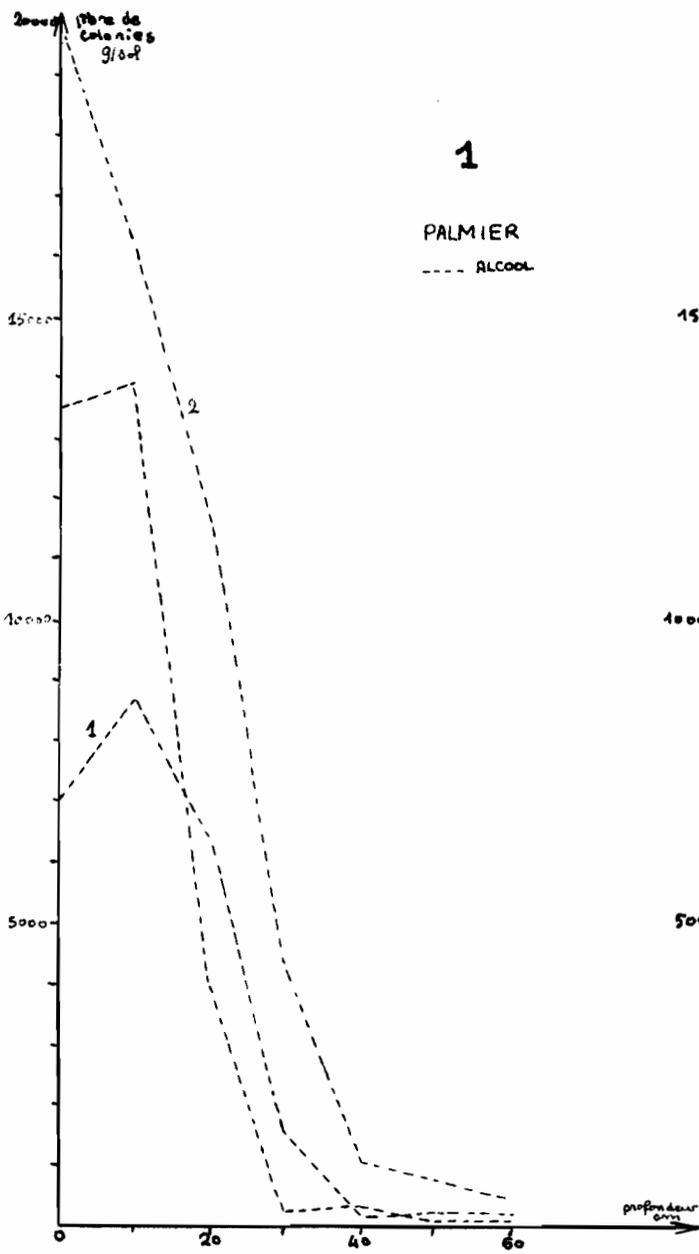


PLANCHE II

REPARTITION DU NOMBRE TOTAL
DES COLONIES MYCELIENNES ISOLEES
EN FONCTION DE LA PROFONDEUR



REPARTITION DU NOMBRE TOTAL
DES COLONIES MYCELIENNES ISOLEES
EN FONCTION DE LA PROFONDEUR

PLANCHE III

Pour les milieux au PCNB et à l'alcool la reproductibilité des résultats indique une sensibilité égale, toute proportion gardée, de ces deux milieux et une homogénéisation valable de l'échantillon de sol considéré.

La mise sous atmosphère de gaz carbonique réduit considérablement la germination des éléments fongiques du sol en surface, si bien que l'allure générale de ces courbes relatives à ce milieu ne présentent pas une chute rapide pour 30 cm.

2) Genres fréquemment isolés

Dans un même sol, cinq cents à six cents colonies sont repiquées séparément en tube.

Trois genres principaux appartenant à la Classe des Ascomycètes apparaissent régulièrement. Deux d'entre eux font partie de l'ordre des Plectascales : ce sont les genres Eurotium (+) (D₁) et Arachniotus (+) (D₃), le troisième appartient à l'ordre des Hypocréales, famille des Nectriacées : Nèocosmospora vasinfecta (D₅)

Suivant le milieu, une certaine sélection s'effectue sur les espèces existant dans les sols, mais il faut noter que toutes ces méthodes éliminent les Mucorales et les Phycomycètes. Le Trichoderma viride apparait sporadiquement dans les boîtes d'isolements sur les milieux au Rose Bengale et au PCNB. Dans le premier cas l'extension rapide de ce champignon nuit à l'isolement du reste des colonies; sur le milieu au PCNB, le Trichoderma se développe très lentement sans gêner l'isolement des autres colonies.

a) Répartition du genre Eurotium

Le champignon forme très rapidement sur les milieux à l'alcool et au PCNB des colonies très rases, rondes, bien délimitées, jaune ocre dans le premier cas, grises à lie de vin dans le second. Par la méthode au gaz carbonique seuls les repiquages permettent de les mettre en évidence.

Le mycélium est très peu abondant et rapidement se forment de petits périthèces sphériques, brun entièrement clos, à paroi formée d'une seule couche de cellules polygonales. Ils contiennent des asques sphériques renfermant huit ascospores sphériques, hyalines parfois échinulées ou présentant une bordure équatoriale proéminente.

(+) Des cultures de D₁ et D₃ ont été envoyées à BAARN pour une détermination précise.

Les courbes des planches IV, V et VI donnent le pourcentage du nombre des colonies d'Eurotium en fonction du nombre total de colonies comptées sur les boîtes de Pétri.

En savane, (planche IV) la répartition de ce champignon est très irrégulière. A 20 cm de profondeur les courbes se regroupent autour du point 30%.

La surface du sol, (0-10 cm) soumise aux intempéries renferme une population d'Eurotium très variable. A 20-30 cm de profondeur les modifications du milieu sont amorties et la population se stabilise, puis elle devient plus importante à 40 cm pour enfin décroître brutalement à 50 cm.

Dans la zone explorée par les racines des palmiers (Planche VI) les courbes obtenues par les méthodes à l'alcool et au PCNB présentent certaines analogies avec celles de la planche V : un maximum très net, puis une chute brutale. La culture du palmier occasionne un déplacement de la zone où ce champignon était prédominant dans la rhizosphère des légumineuses. Ce décalage de 10 cm existe également pour le minimum. L'introduction du palmier se traduit donc par une remontée vers la surface du genre Eurotium.

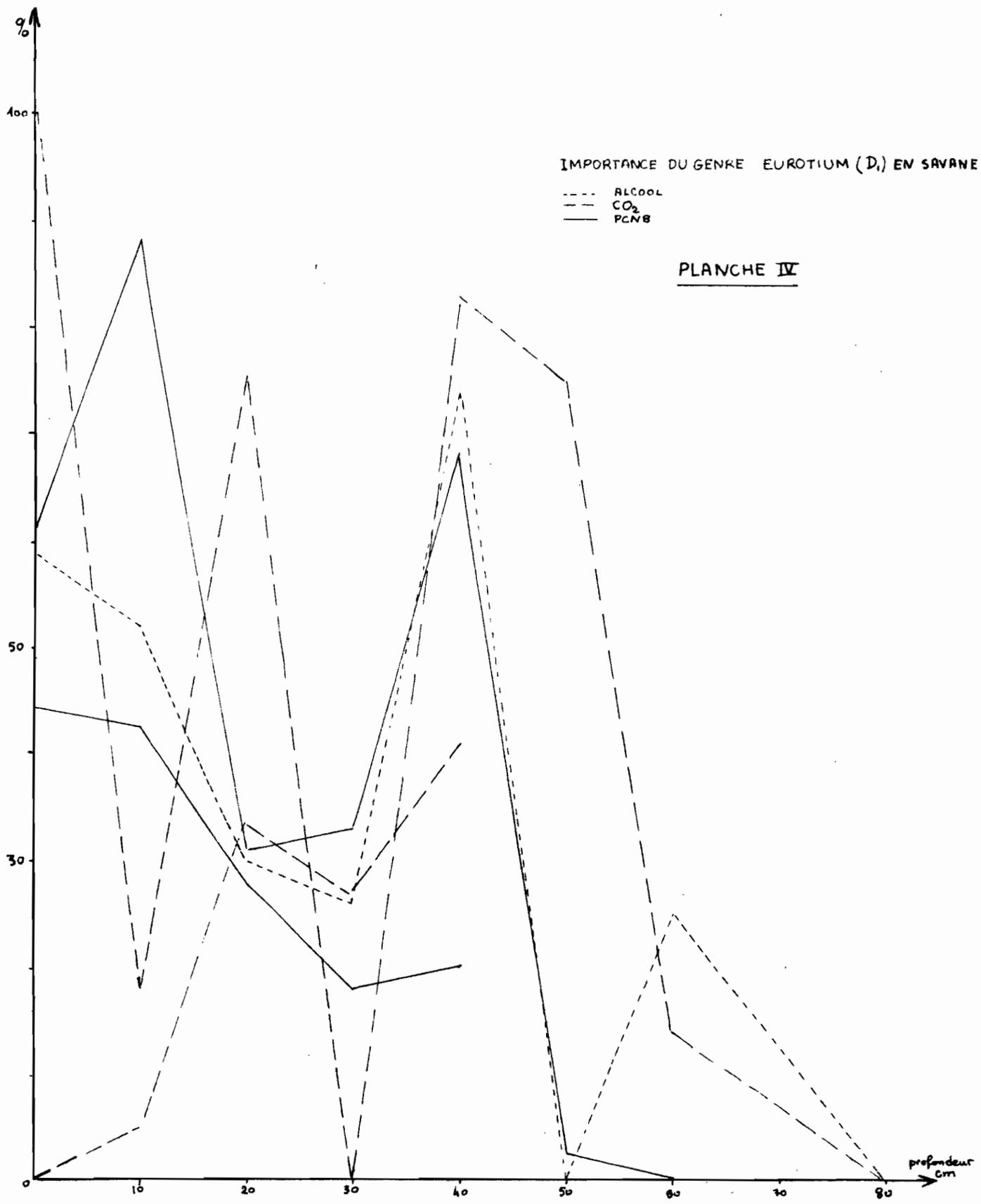
b) Répartition du genre Arachniotus

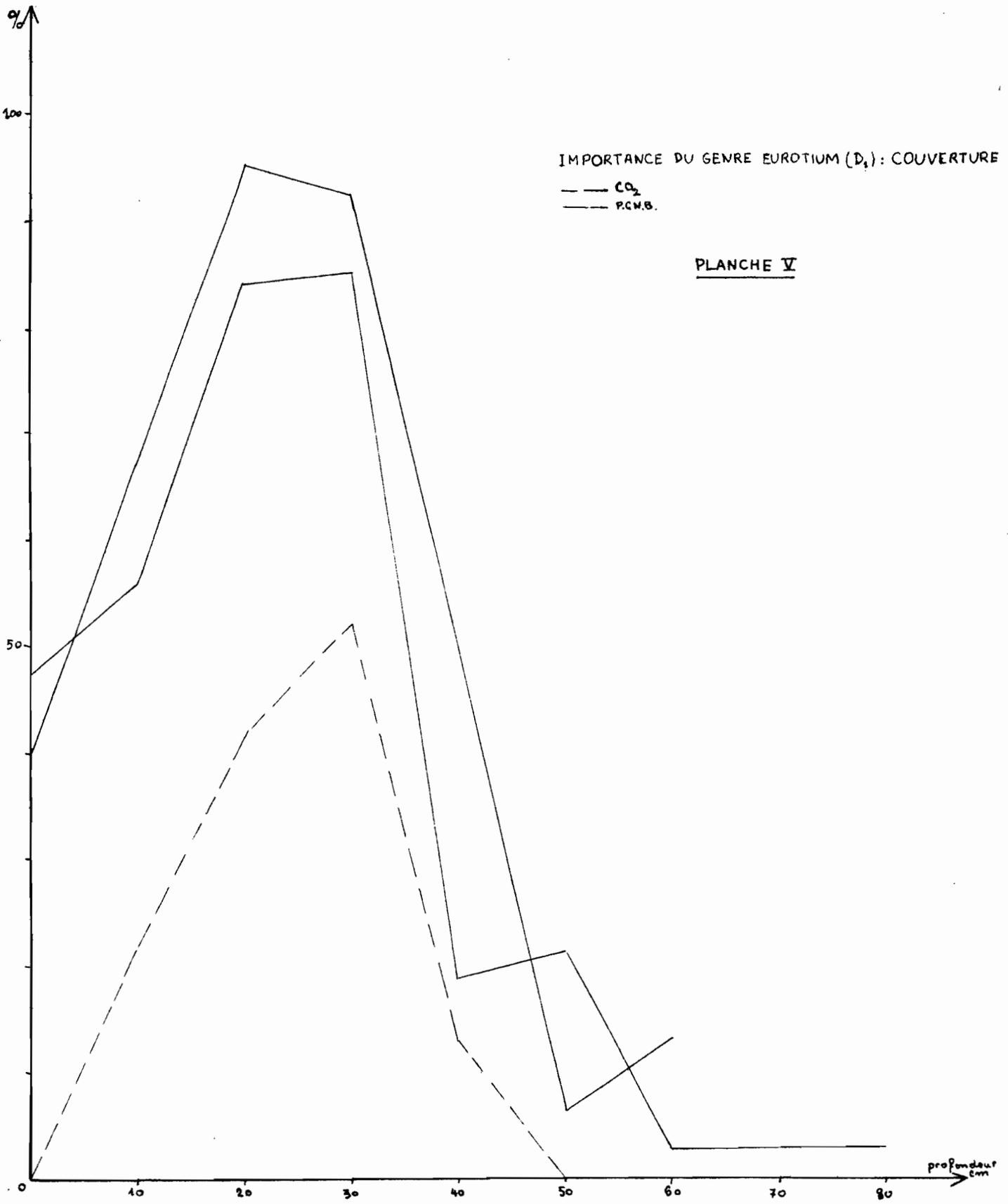
Il est essentiellement localisé dans les sols de savanes et de palmeraies à une profondeur de 30 à 40 cm (Planche VII). Il représente l'essentiel de la mycoflore à cette profondeur où le genre Eurotium est très peu abondant.

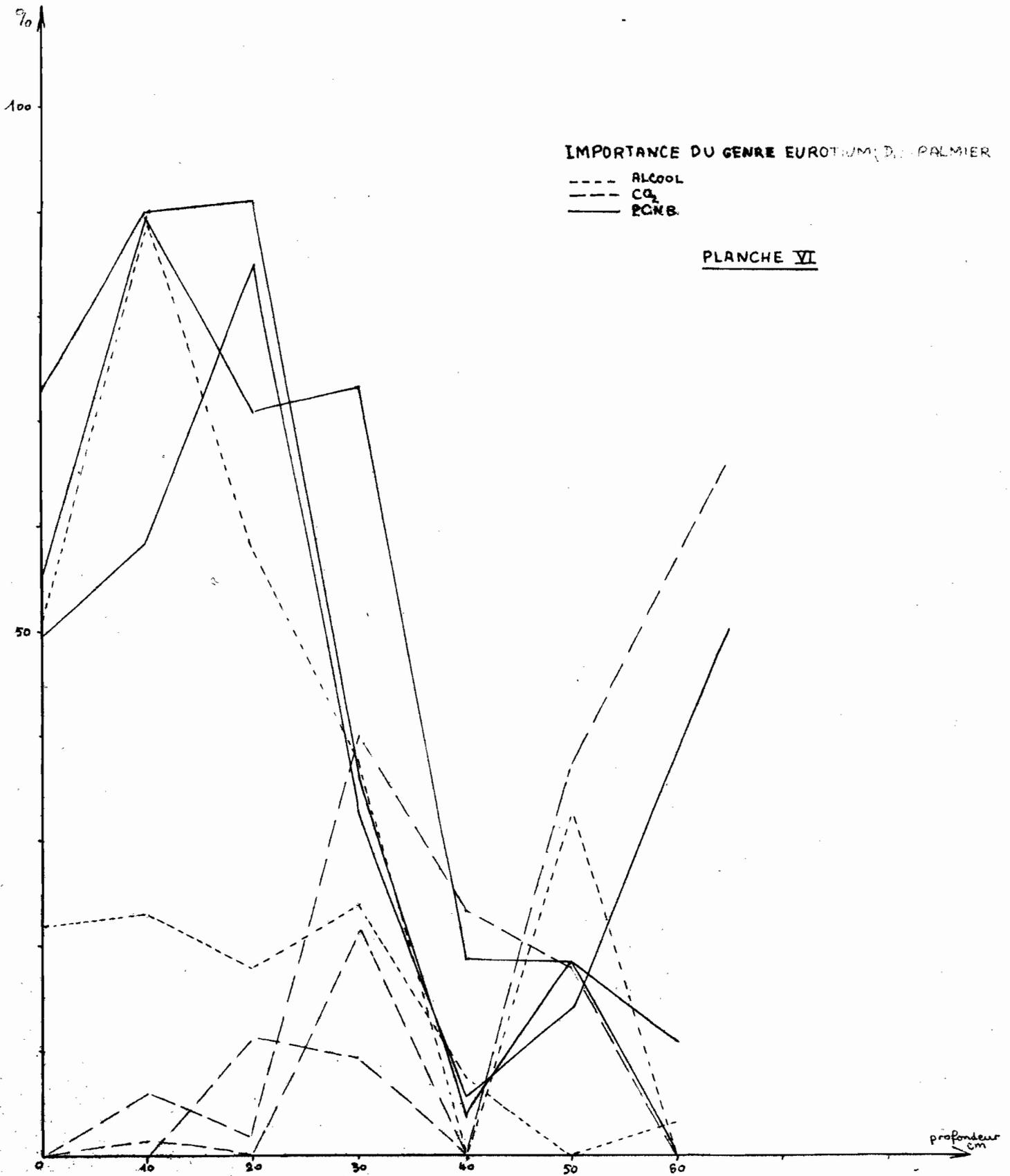
c) Répartition du genre Neocosmospora (Planche VIII)

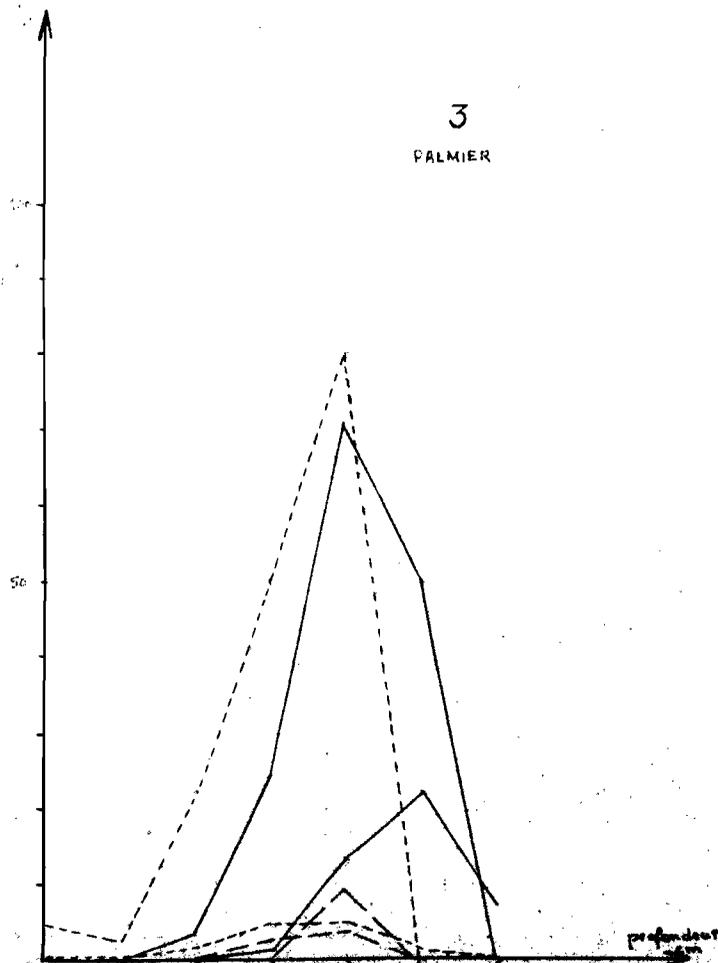
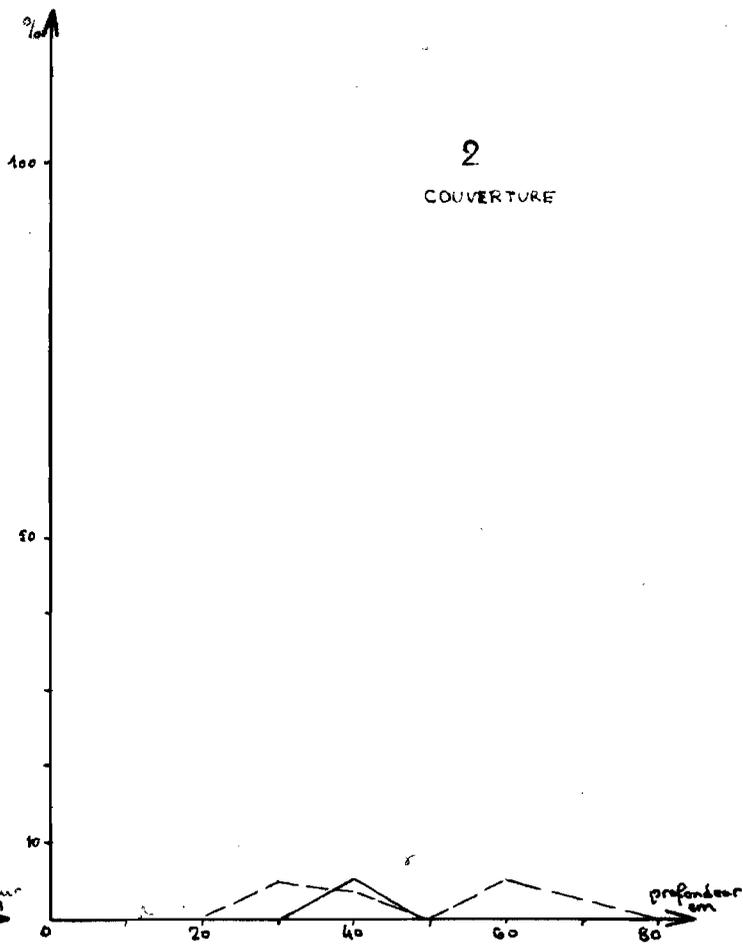
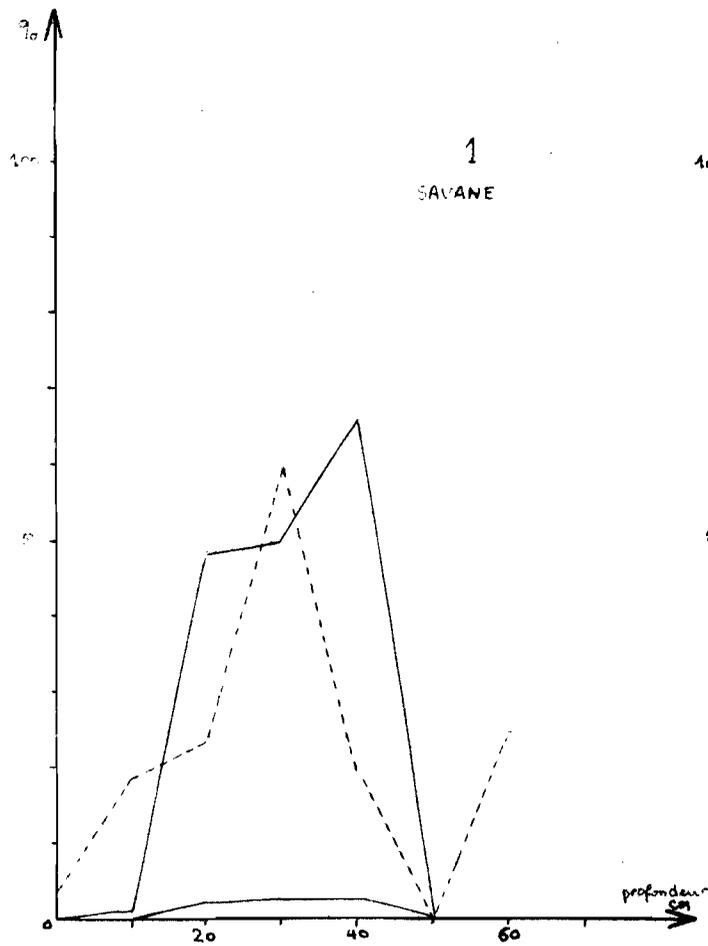
Son importance ne dépasse jamais celle des genres décrits précédemment. Il est peu abondant en surface et ne présente pas de maximum caractéristique. Il est toutefois intéressant de noter qu'à une profondeur de 40 cm dans les sols de palmiers, il n'a jamais été isolé.

Chacun de ces champignons possède une aire de répartition qui lui est propre, avec des maxima et minima caractéristiques. Dans un même genre ces horizons dépendent de la végétation. A un même niveau mais dans des sols différents, le genre Eurotium a une importance très faible en comparaison de ce qu'elle était en sol de palmiers (Planche IV et VI); la même observation est valable pour Neocosmospora vasinfecta (Planche VIII fig. 1 et 3)





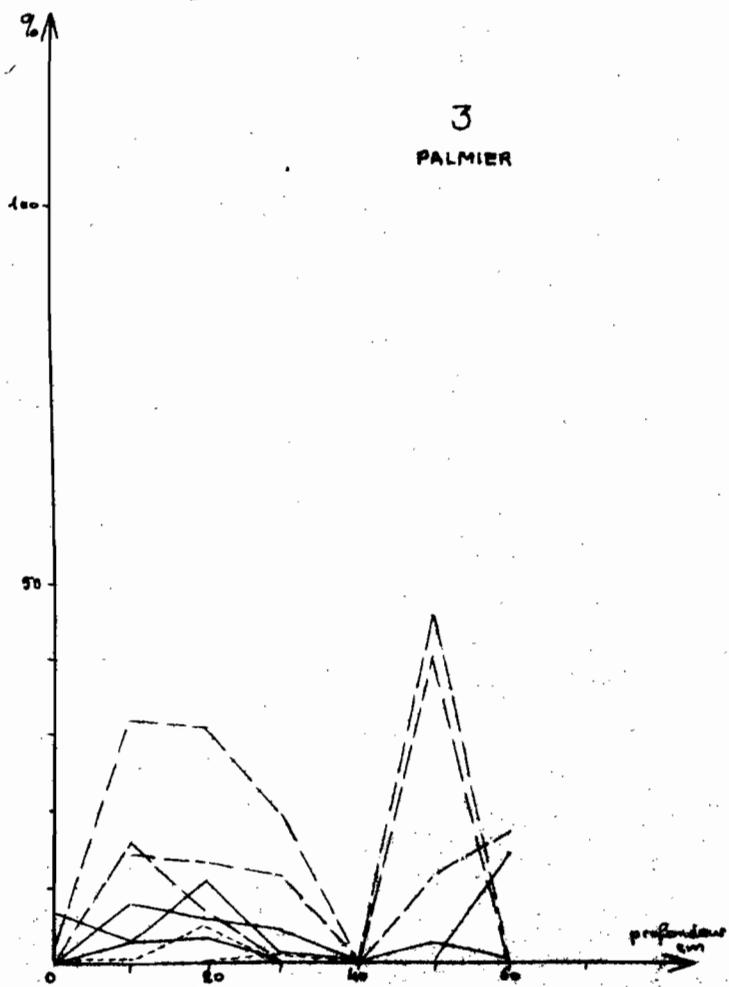
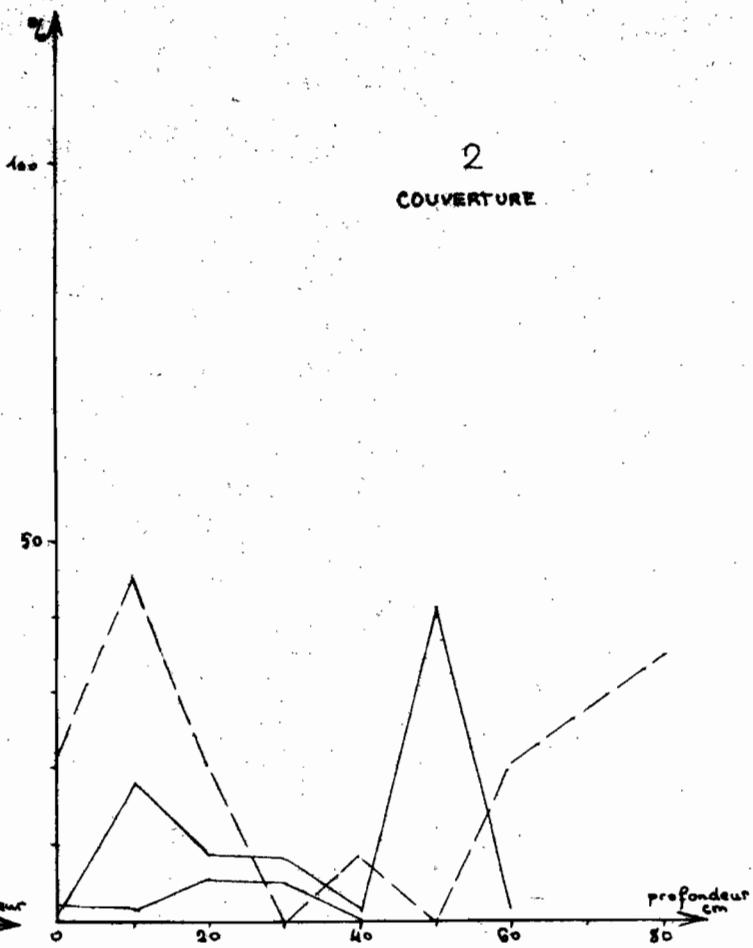
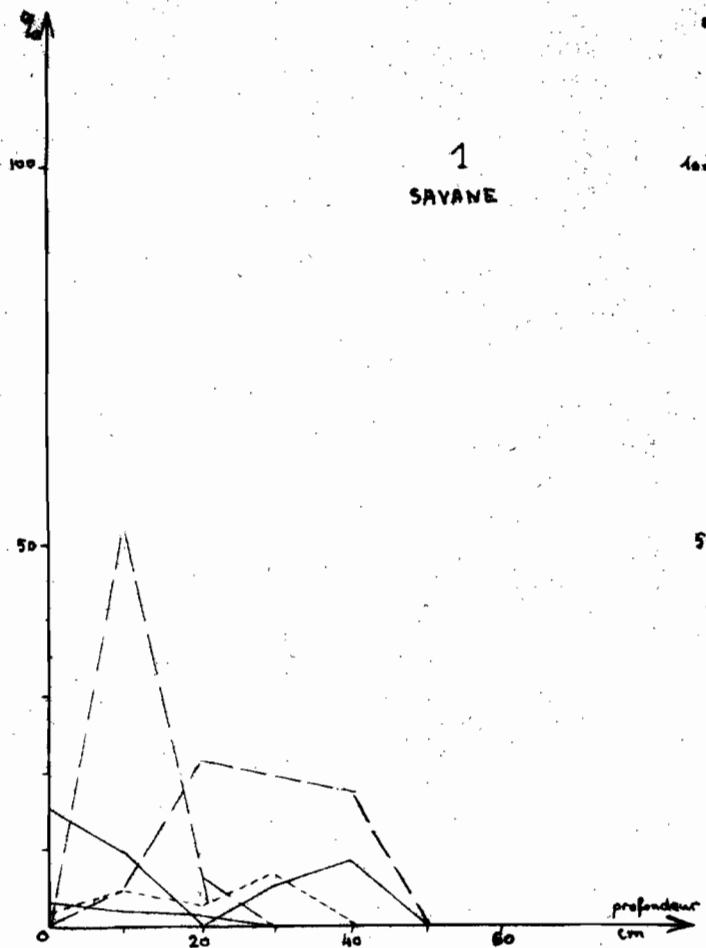




REPARTITION DU GENRE ARACHNIDOTUS (D₃)

PLANCHE VII

----- ALCOOL
 - - - - - CO₂
 _____ P.C.M.B.



REPARTITION DU GENRE NEOCOSMOSPORA (D₃)

PLANCHE VIII

--- ALCOOL
 - - - CO₂
 ——— P.C.N.B.

IV - IMPORTANCE DES FUSARIUM

La quantité de Fusarium dans les sols a été évaluée en ramenant le nombre de germes au gramme de sol.

Le pourcentage des colonies de Fusarium obtenues a été calculé en fonction du nombre total de repiquages effectués dans chaque cas.

1) Répartition en profondeur (Planche IX)

Les Fusarium sont très importants en surface mais décroissent très rapidement à 10 cm de profondeur. A 20cm, leur nombre est très faible, ils disparaissent à 30 cm; une exception toutefois est à noter pour un sol de palmier où deux cultures de F. solani ont été obtenues.

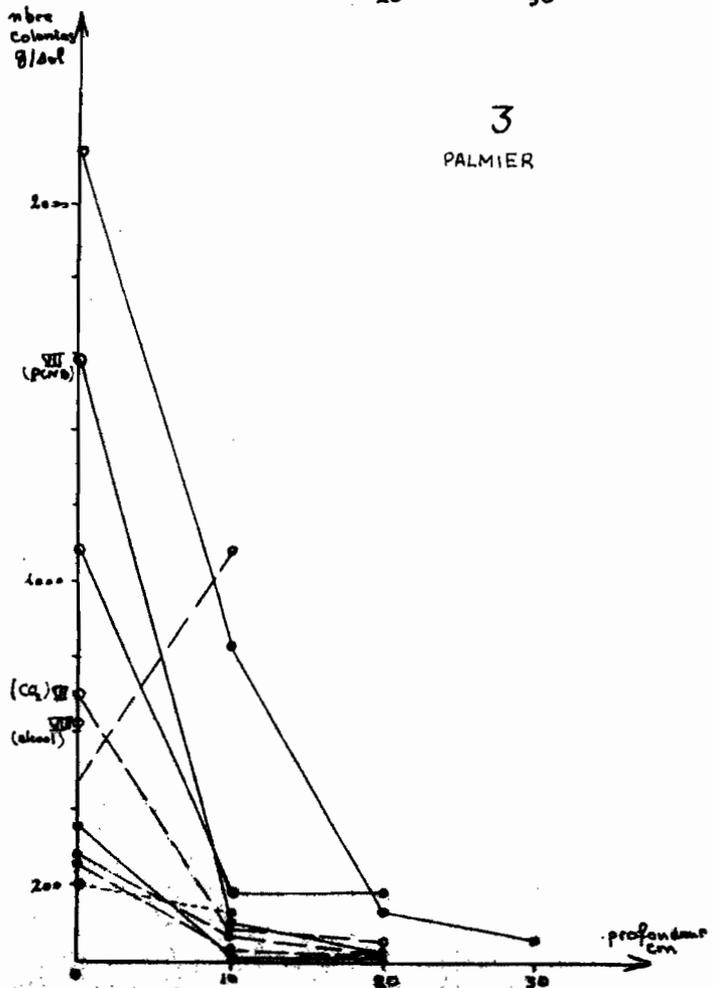
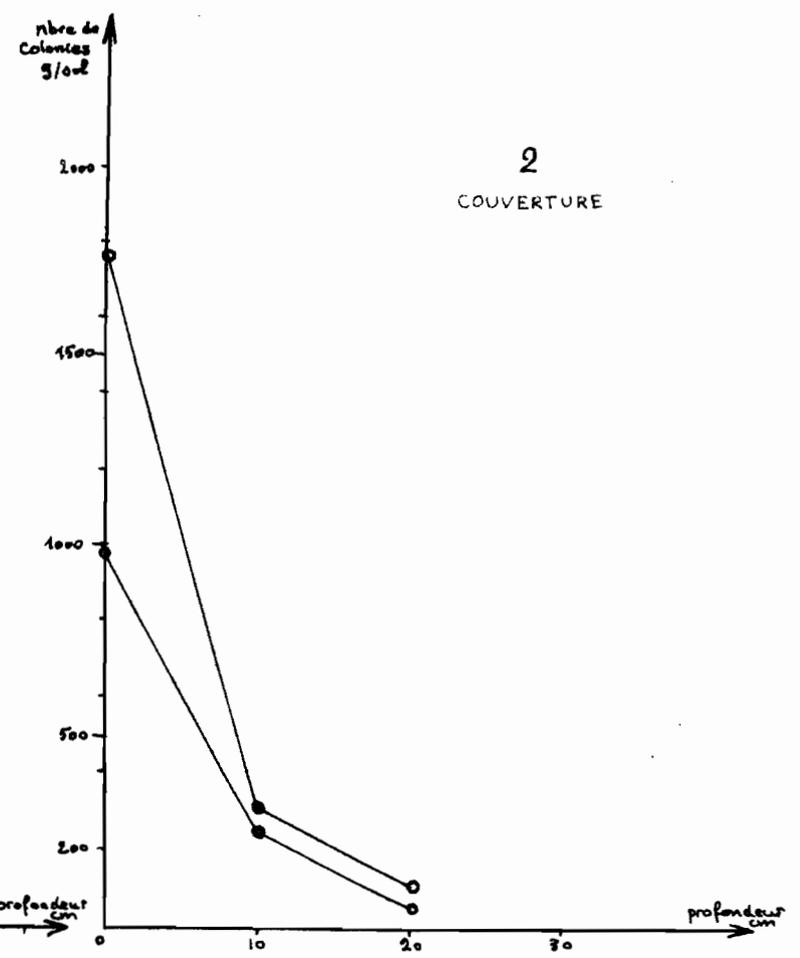
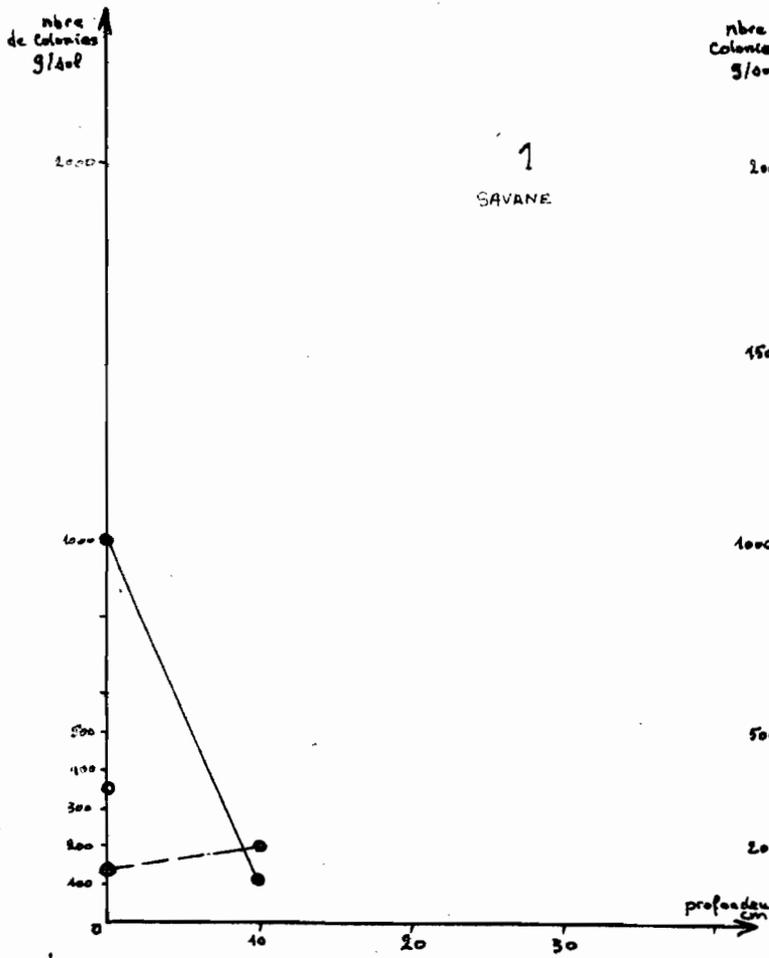
Les méthodes au CO₂ et au PCNB décèlent régulièrement les Fusarium jusqu'à 20 cm de profondeur, voire même jusqu'à 30 cm dans le cas du PCNB, par contre celle utilisant l'alcool est beaucoup moins sensible.

Le nombre des colonies de Fusarium par gramme de sol a été évalué par extrapolation du nombre obtenu à partir de trois ou quatre boîtes de Pétri ne contenant qu'une quantité de terre de l'ordre de 40 à 120 mg. Le poids de sol séché à l'air est toujours supérieur au poids du sol réellement sec si bien que les valeurs trouvées sont inférieures à celles que l'on obtiendrait avec des échantillons complètement deshydratés. Il est évidemment impossible, en microbiologie du sol de faire subir un tel traitement aux échantillons et nous avons adopté la méthode classique de séchage à l'air décrite par plusieurs auteurs.

2) Importance du genre Fusarium

Les méthodes mises en oeuvre pour détecter les Fusarium sont d'autant plus sensibles qu'elle permettent d'obtenir un pourcentage élevé de souches pures dans les isolements.

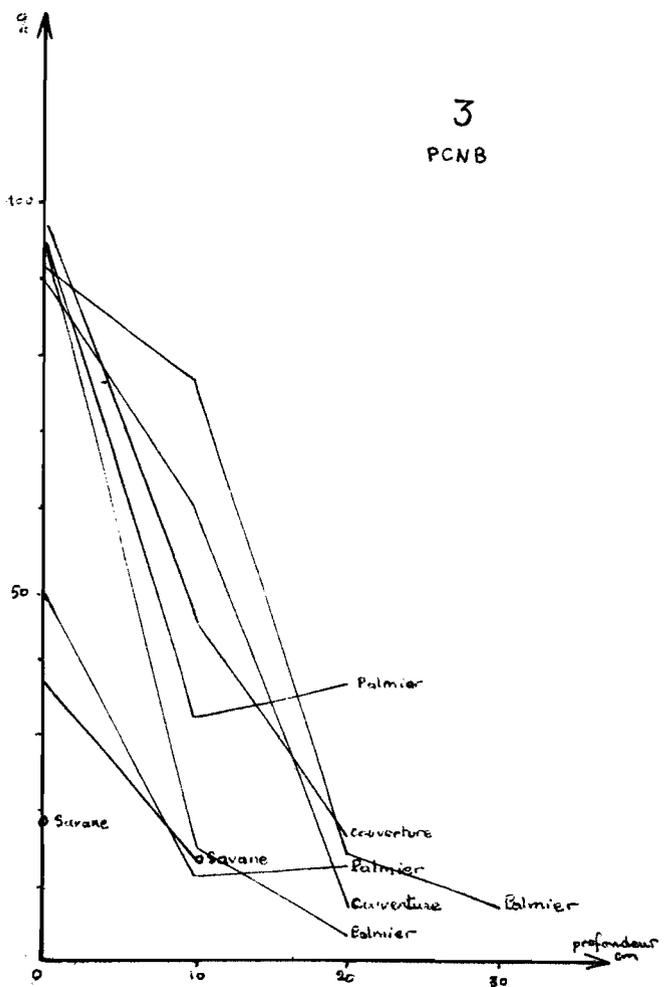
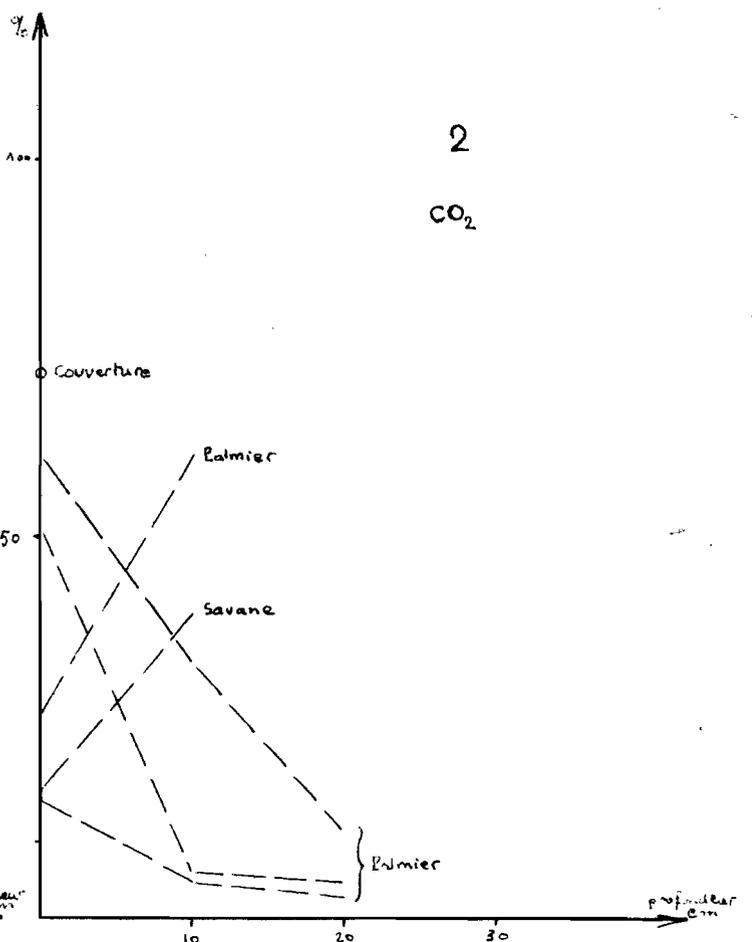
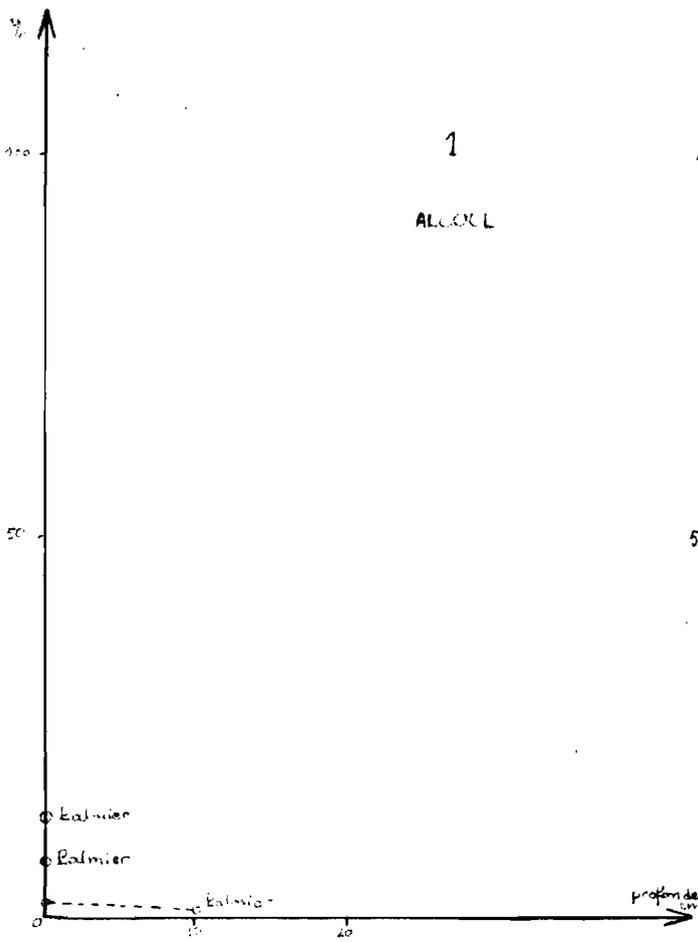
Cette caractéristique peut s'exprimer par la valeur du rapport $\frac{\text{Fusarium total obtenu}}{\text{Nombre de tubes isolés}} \times 100$; (plus cette valeur est voisine de 100, plus le nombre de souches de Fusarium isolées est proche du nombre des isolements pratiqués). Les chiffres les plus élevés sont obtenus par la méthode au PCNB; la technique au gaz carbonique vient en deuxième position, celle à l'alcool donne des valeurs beaucoup plus faibles (Planche X). Le même classement reste



REPARTITION DU GENRE FUSARIUM

PLANCHE IX

- Alcool
- · - · - CO₂
- PCMB



IMPORTANCE DU GENRE FUSARIUM

PLANCHE IX

valable lorsque l'on considère séparément les populations de F. oxysporum et de F. solani (Tableau I)

L'action sélective du milieu au PCNB qui se traduit par un pourcentage élevé, s'exerce à deux niveaux :

- a) la composition du milieu favorise l'apparition de deux types de colonies nettement individualisées, les unes blanches ou légèrement rosées, généralement cotonneuses, et les autres grisâtres en surface, lilas à la face inférieure avec une croissance très lente, correspondant aux colonies D₁.
- b) les isolements portant uniquement sur les colonies du premier type permettent ainsi d'éviter de repiquer des colonies qui ne font pas partie des Fusarium.

Tout en présentant des caractéristiques culturelles analogues (à la couleur près des colonies D₁) le milieu à l'alcool est beaucoup moins favorable, il ne permet pas une extériorisation massive des propagules de Fusarium. Sur le milieu au Rose-Bengale, aucune sélection n'a pu être opérée au moment des isolements et il faut nécessairement repiquer toutes les colonies mycéliennes apparaissant dans les boîtes de Pétri.

3) Répartition de F. oxysporum et F. solani (voir tableau I)

Les Fusarium solani existent en très faible quantité dans les sols de savane. F₁ et F₄ (F. oxysporum ?) représentent par contre en surface la fraction essentielle des populations de Fusarium.

Dans la rhizosphère des légumineuses l'importance des F. solani décroît en fonction de la profondeur.

Dans les sols de palmiers, en surface, les F. oxysporum et F. solani sont présents. Ce caractère reste valable aux horizons inférieurs pour le groupe solani; par contre pour le groupe oxysporum cette répartition est beaucoup plus irrégulière.

Les F. oxysporum apparaissent donc essentiellement localisés régulièrement en surface dans tous les sols; les F. solani ont une répartition plus étendue et plus homogène en profondeur.

4) Comparaison des trois milieux :

Le choix du milieu dépend d'une part de sa sélectivité vis-à-vis des F. oxysporum et d'autre part du rendement qu'il fournit dans l'isolement de cette espèce.

		F. OXYSPORUM (%)			F. SOLANI (%)				
SOL	METHODE	PROFONDEUR			PROFONDEUR				
		0	10	20	0	10	20	30	
SAVANE	CO ₂	F ₁	7,7	32,5		1,9			
		F ₄	7,7	7,5					
	PCNB	F ₁	10,3			4,1			
		F ₄							
	PCNB	F ₁	12,7						
		F ₄	17,7	13,3					
COUVERTURE	CO ₂	F ₁				72			
		F ₄							
	PCNB	F ₁				89,5	60	7,4	
		F ₄							
	PCNB	F ₁				92,5	36,5	10,3	
		F ₄	4,5	7,7	5,1				
PALMIER	ALCOOL		6,1			1,8	1,1		
			9,5			2,3			
						4			
	CO ₂		25,5	5,9	4,7	15,2	4,7	3	
			4,3			25,5			
			5	27,6		18	33,4	11,8	
						22	33,4		
	PCNB		30,6	7,1	4,2	18	3,6	8,3	
			41,5		3,6	54	13,8		
			7,5			19	31,8	36,4	
			62,5	27,6	3,6	29,8	47	19,7	6,9

TABLEAU I

Le milieu à l'alcool est peu sélectif et le pourcentage de cultures pures obtenu est faible.

Les deux autres techniques décèlent la présence de F. oxysporum à des profondeurs égales, mais le pourcentage de souches pures obtenues avec le PCNB, en surface, est plus élevé qu'avec le gaz carbonique. La présélection des colonies sur le milieu au PCNB, au moment du repiquage, favorise considérablement l'isolement des souches de Fusarium.

Ces deux critères justifient le choix de la méthode au PCNB dans la suite des isolements.

Compte tenu de la répartition des Fusarium en fonction de la profondeur nous avons également limité les prélèvements de sol à la zone 0-30 cm.

V - EVOLUTION DES POPULATIONS DE FUSARIUM DANS LES SOLS

A la lumière des résultats précédents, deux points importants se dégagent de ces expériences :

- a) l'existence constante d'une mycoflore à base d'Ascomycètes dans les sols cultivés ou non cultivés
- b) une succession d'espèces de Fusarium
 - Les sols de savane renferment une proportion non négligeable de Fusarium du type F₁ et F₄; permettent le développement de F. roseum, mais contiennent très peu de F. solani.
 - La rhizosphère des légumineuses favorise la pullulation des Fusarium solani, mais inhibe ou supprime les Fusarium roseum et les Fusarium du type F₁ et F₄.
 - La culture du palmier réduit l'importance de F. solani mais permet le développement de F. oxysporum. Ce type cultural sauvage est particulier à ces sols.

L'introduction d'une culture de Pueraria en mélange avec le Centrosema provoque une multiplication intense de F. solani à partir d'une population très faible existant en savane. Les souches sauvages isolées dans les deux cas sont identiques.

L'apparition brutale dans les palmeraies de F. oxysporum d'un type cultural sauvage nouveau est plus difficile à expliquer. Cependant plusieurs hypothèses peuvent être formulées.

- Etat potentiel

- . Ce type sauvage existerait dans tous les sols mais en si faible quantité dans les sols de savane et de Pueraria que les techniques mises en oeuvre ne parviendraient pas à la déceler. De l'état potentiel dans ces sols, il se concrétiserait dans la rhizosphère du palmier en prenant un développement considérable.

- Transformation

- . Les types culturaux sauvages F₁ et F₄ (F. oxysporum ?) évolueraient sous l'influence des conditions de culture, qui restent à préciser, vers le type sauvage nouveau obtenu dans la zone explorée par des racines du palmier.

- Origine extérieure

L'introduction d'une nouvelle souche de Fusarium oxysporum est également possible à partir des sols de préépinière.

L'hypothèse d'une origine extérieure (par les graines par exemple) nécessairement limitée dans le temps et l'espace, est peu compatible avec la répartition générale de ce type cultural sauvage de F. oxysporum.

Ainsi, les modalités d'apparition du type "oxysporum" dans la rhizosphère des palmiers âgés apporterait une information de grande valeur sur l'évolution des populations de Fusarium dans les sols de cette région. Dans les F. solani l'existence d'un seul type sauvage simplifie le problème. Avant de pouvoir vérifier l'une de ces hypothèses, il apparaît clairement que les F. solani se développent en présence des racines de Pueraria et de Centrosema alors que l'espèce F. oxysporum caractérise la rhizosphère des palmiers. Les Fusarium roseum par contre sont liés aux sols recouverts de graminées. Toutes ces espèces sont localisées dans les vingt premiers centimètres du sol avec une abondance maximum, en surface pour F. oxysporum, en surface ou à 10 cm pour F. solani.

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1 - ADJANOHOOUN (E.J.) - Etude phytosociologique des savanes de Basse Côte d'Ivoire (savanes lagunaires) Vegetatio Acta Geobotanica, 1962, vol. XI, fasc. 1-2, p. 1-38
- 2 - BOUHOUT (D) et BILLOTTE (J.M) - Recherche sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. Choix d'un milieu nutritif pour l'isolement sélectif de Fusarium solani et Fusarium oxysporum - Ann. Epiphyties 1964 - 15 (1) 45-56
- 3 - MESSIAEN (C.M) H. VENDRAN et C. FAUVEL - Analyse parasitaire des sols cultivés. Détection de Fusarium oxysporum f. sp. melonis. Ann. Inst. Pasteur 1961 - Tome 101, p. 21-27
- 4 - NASH (S.M) et SYNDER (W.C)- Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. Phytopathology, 1962, 52, 567-572.
