

50

ROYAUME DU MAROC



# AL AWAMIA

REVUE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE MAROCAINE



*Direction de la Recherche Agronomique*

— RABAT —

Janvier 1974

Pour tous renseignements concernant  
LES CAHIERS DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
et la revue AL AWAMIA  
s'adresser à  
Services d'Édition, d'Impression et de Diffusion  
Institut National de la Recherche Agronomique  
B.P. 415 RABAT R.P.

---

Règlement: par virement au compte courant postal REGIE DE RECETTES  
DES SERVICES EDITION ET DIFFUSION « INRA », RABAT C/C 452 88.

ROYAUME DU MAROC



# AL AWAMIA

REVUE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE MAROCAINE



Direction de la Recherche Agronomique

— RABAT —

Janvier 1974



ETUDE DES  
CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES  
ET BIOLOGIQUES DE CHAMPIGNONS PARASITES  
DU GENRE **VERTICILLIUM**  
LEUR VALEUR TAXONOMIQUE POUR IDENTIFIER  
LES SOUCHES ISOLEES AU MAROC \*

HOURIA LAHLOU

---

\* Diplome d'études supérieures soutenu à Rabat en 1974.  
Al-Awamia, 50, pp. 1-87, janvier, 1974.



## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
PREMIÈRE PARTIE :	
Identification des souches de <i>Verticillium</i> sp. isolées sur tomates au Maroc .....	6
I. - La morphogénèse des thalles des souches marocaines .....	6
A. Les souches utilisées .....	6
B. Le développement des thalles à partir des conidies .....	6
1. Technique d'isolement des spores .....	6
2. Développement du thalle .....	9
C. La morphogénèse des microscérotes .....	11
D. Conclusions .....	13
II. - Données actuelles sur les espèces <i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke et Berthold et <i>Verticillium dahliae</i> Klebahn .....	15
A. Description du genre <i>Verticillium</i> Reinke et Berthold et des espèces <i>V. albo-atrum</i> et <i>V. dahliae</i> .....	15
B. <i>V. albo-atrum</i> et <i>V. dahliae</i> : deux espèces distinctes .....	16
C. <i>V. albo-atrum</i> et <i>V. dahliae</i> : une seule espèce .....	20
1. La variabilité des caractères morphologiques chez les espèces du genre <i>Verticillium</i> et leur valeur taxonomique ....	20
2. Argument d'ordre morphogénétique et génétique en faveur de l'existence d'une seule espèce .....	21
D. Conclusions .....	23
III. - Etude comparative des <i>Verticillium</i> isolés sur tomate au Maroc et de deux souches de référence appartenant aux espèces <i>V. albo-atrum</i> et <i>V. dahliae</i> .....	23
A. Les milieux utilisés .....	24
1. Milieu PSA .....	24
2. Milieu « S » de Messiaen .....	24
3. Milieu « Avoine » .....	24
4. Milieu « M » .....	24
B. Aspects culturels .....	25
1. Comparaison des trois souches sur le milieu PSA .....	25
2. Variations de l'aspect des thalles en fonction du milieu de culture .....	27
3. Conclusions .....	27
C. La vitesse de croissance .....	28
D. La formation des organes de conservation .....	30

E. La taille des conidies .....	32
F. Conclusions .....	37
1. Nature de la souche marocaine .....	37
2. Considérations sur le <i>V. dahliae</i> et le <i>V. albo-atrum</i> ....	37
D. UZIÈME PARTIE :	
Influence du pH et de la nutrition azotée et carbonée sur la croissance et sur la formation des organes de résistance .....	39
I. - Influence du pH sur la croissance et sur la formation des organes de conservation .....	40
A. Technique .....	40
B. Influence du pH sur la croissance des souches marocaines ....	42
1. Croissance en fonction du temps à différents pH .....	42
2. Croissance en fonction du pH .....	43
3. Comparaison des deux souches marocaines .....	43
4. Conclusions .....	43
C. Influence du pH sur la formation des microsclérotés des souches marocaines .....	45
D. Comparaison entre la souche marocaine IF, le <i>V. dahliae</i> et le <i>V. albo-atrum</i> .....	46
E. Conclusions et discussions .....	48
II. - Influence de la nutrition azotée et carbonée sur la croissance et sur la formation des microsclérotés d'une souche marocaine .....	49
A. Croissance radiale et formation des organes de conservation dans un milieu naturel .....	52
1. Influence de la dilution du milieu de base .....	52
2. Influence des variations de la concentration en saccharose et en bouillon de pomme de terre .....	53
3. Recherche des conditions de milieu favorisant la formation d'hyphes enkystées sur les souches à microsclérotés .....	59
4. Discussions et conclusions .....	61
B. Croissance radiale et formation des organes de conservation dans un milieu synthétique .....	64
1. Influence de la dilution du milieu de base .....	64
2. Influence du rapport C/N .....	64
C. Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone .....	71
1. Aspect de la culture .....	71
2. Croissance radiale de la culture .....	73
3. Formation des microsclérotés .....	73
4. Discussions et conclusions .....	74
DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	78
1. Position systématique du <i>Verticillium</i> sp. isolé au Maroc	78
2. Le déterminisme interne de la formation des microsclérotés	79
3. L'influence des facteurs externes sur la formation des microsclérotés .....	81
BIBLIOGRAPHIE .....	82

## RESUME

La culture de la Tomate au Maroc est très handicapée par une maladie vasculaire connue sous le nom de « maladie du fil » causée par deux Champignons parasites appartenant aux genres *Fusarium* et *Verticillium*. Notre étude a porté sur les *Verticillium* isolés des plants de Tomate attaqués par cette maladie.

En culture sur milieu gélosé, le thalle différencie deux types d'organes de propagation et de conservation : des conidies et des microsclérotés. Les conidies rassemblées dans des sphérules apparaissent sur des conidiophores verticillés. Sur milieu PSA et à 25° les microsclérotés, qui mesurent en moyenne 32 x 84  $\mu$ , se forment 6 à 7 jours après l'ensemencement de la spore sur un anneau situé à une distance de 2 à 2,5 mm de l'implant, de 4 à 5 mm du front de croissance. Ces organes se forment par élargissement et cloisonnement d'un ou de plusieurs articles situés sur le parcours d'un filament ou de plusieurs filaments voisins, puis par mélanisation et bourgeonnement de ces articles.

Le développement des thalles est influencé par le pH et la nature du milieu.

La croissance est rapidement stoppée à pH acide (4,6 et 5,2) alors qu'elle se poursuit jusqu'à envahissement complet du récipient de culture à un pH supérieur ; l'optimum se situe aux alentours de pH 5,7. Sur milieu « M » de MALCA et collaborateurs, les microsclérotés ne se forment pas à pH acide (4,6 et 5,2), apparaissent tardivement (deux mois environ) à pH 5,7 et au bout de 6 jours à pH 6,2 et 7,2. La surface pigmentée recouverte de microsclérotés est plus étendue à pH 7,2. Le pH optimum de formation de microsclérotés est donc plus élevé que celui de la croissance.

Indépendamment du pH, le milieu influence l'aspect des cultures et la formation des organes de conservation.

L'aspect des cultures varie selon la concentration des substances nutritives dans le milieu. Des dilutions du bouillon de Pomme de Terre du milieu PSA font apparaître des formes « buissonnantes ». Les variations du rapport saccharose/nitrate-d'ammonium dans le milieu « M » entraînent des changements dans l'aspect et la couleur des cultures avec parfois formation de secteurs ou zonation. L'aspect des cultures varie également en fonction de la nature de la source de carbone. En présence d'un excès de glucose, il y a appa-

rition de la forme levure et de microsclérotés mal individualisés ; cette modification ne se manifeste pas quand la source de carbone est le saccharose (sauf à de très fortes concentrations) ou l'amidon.

Pour un même pH les microsclérotés sont toujours plus abondants sur milieu naturel que sur milieu synthétique. Le nombre de microsclérotés est plus faible quand on dilue simultanément les sources de carbone et d'azote, ou lorsqu'on augmente (100 g par litre) ou qu'on diminue (4 g par litre) la quantité de saccharose utilisée couramment dans nos milieux (20 g par litre). La dilution de la source d'azote se traduit toujours par la formation d'un plus grand nombre de microsclérotés. L'abondance relative de carbone par rapport à l'azote fait apparaître, en plus de microsclérotés, des hyphes enkystées.

Les souches marocaines ont été comparées à deux souches de référence appartenant aux espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum* en ce qui concerne l'aspect des cultures, la vitesse de croissance, la taille des conidies et la nature des organes de conservation (microsclérotés ou hyphes enkystées). Pour les quatre caractères précédents, les souches marocaines sont identiques ou voisines du *V. dahliae*, toujours nettement distinctes du *V. albo-atrum*.

Le pH optimum pour la formation des microsclérotés du *V. dahliae* est plus élevé que celui des souches marocaines. Les hyphes enkystées du *V. albo-atrum* ne se forment pas aux pH étudiés (jusqu'à pH 7,2) sur le milieu synthétique « M », ce qui rejoint les résultats trouvés dans la bibliographie à savoir que le pH optimum de formation des hyphes enkystées est situé entre 8 et 8,6.

Les données bibliographiques sur le *V. dahliae* et le *V. albo-atrum* montrent que le caractère principal qui différencie ces deux espèces est la formation de microsclérotés chez la première, et d'hyphes enkystées chez la seconde. Les résultats d'études morphologiques, génétiques et morphogénétiques sont, selon les auteurs et les souches utilisées, favorables au regroupement des deux *Verticillium* en une seule espèce ou, au contraire, favorables à leur distinction.

En définitive, les données bibliographiques, la comparaison effectuée entre les deux espèces et les souches marocaines et la formation des deux types d'organes de conservation par une souche marocaine et même par le *V. dahliae* (quand le rapport carbone/azote et

élevé) nous amènent à admettre que l'on a affaire à une seule espèce de *Verticillium* en cours de différenciation et dont les individus peuvent théoriquement appartenir à tous les intermédiaires possibles entre individus les plus différents correspondant les uns au type *V. dahliae*, les autres au type *V. albo-atrum*. En conséquence, et en application de la règle d'antériorité, le *Verticillium* marocain doit être nommé *Verticillium albo-atrum* REINKE et BERTHOLD.

On sait, d'après les études bibliographiques que la formation des microsclérotes est induite par un facteur diffusible synthétisé par le thalle et actif à partir d'un seuil de concentration. L'édification des microsclérotes met en œuvre plusieurs processus: élargissement et cloisonnement d'articles mycéliens, puis mélanisation et bourgeonnement des éléments précédents. Les deux derniers phénomènes ont été induits séparément au cours de notre expérimentation: le voisinage d'un thalle de la souche marocaine stimule en effet la mélanisation des hyphes chez le *V. albo-atrum*, et un milieu très concentré en glucose stimule le bourgeonnement (apparition des formes levures). Ces résultats semblent indiquer que ces deux phénomènes sont indépendants et font intervenir des processus physiologiques différents qu'il serait sans doute intéressant d'étudier plus complètement.



## INTRODUCTION

Du fait de sa situation géographique et de son climat, le Maroc est remarquablement situé pour produire des primeurs aux périodes qui correspondent à une forte demande des marchés européens. Les cultures maraîchères tiennent une place importante dans l'économie du pays, tant par les surfaces plantées, plus de 26 000 hectares, que par le volume des exportations, 250 à 300 000 tonnes (O.C.E., 1971). Les superficies consacrées à la tomate occupaient en 1969, environ 15 000 hectares (D.R.A., 1969). Les études de l'O.C.E. (1971) prévoient que la production de tomates doublera en 1976 et qu'elle sera multipliée par trois en 1980.

Or, la culture de la tomate est très handicapée, depuis une dizaine d'années, par une maladie vasculaire connue sous le nom de « maladie du Fil ». MESSIAEN & PÉCAUT (1963) ont écrit à ce sujet : « Ce Fil, manifestement provoqué par un organisme du sol, présente, d'après les cultivateurs avec lesquels nous avons dialogué, une gravité telle qu'il devient, actuellement, impossible de pratiquer la culture de la tomate plus de deux fois sur le même terrain. La solution pratique est, aujourd'hui, la location de terrains neufs pour cette culture ».

Actuellement, cette maladie continue à causer des dégâts importants. Ainsi, nous avons observé en juin 1974 des champs de tomates entièrement attaqués par le « Fil » dans la région de Mohammedia.

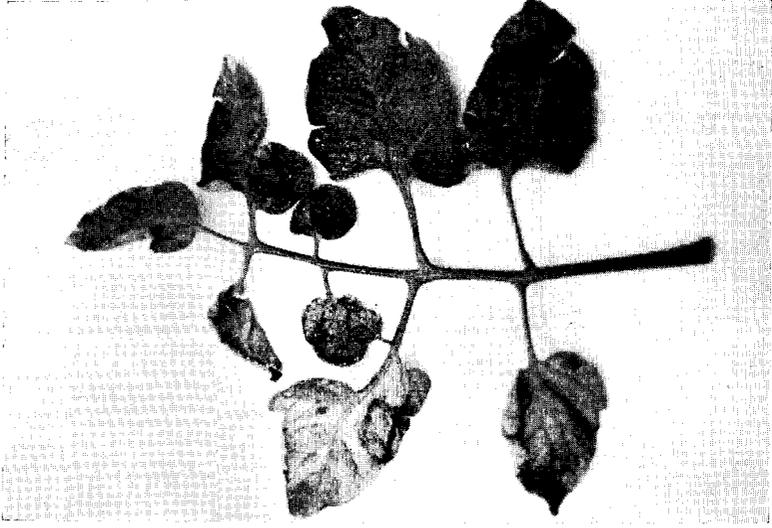
Les symptômes externes de cette maladie sont reconnaissables à un jaunissement qui peut atteindre la totalité de la feuille ou quelques folioles seulement (PL. I A), à un flétrissement de la plante (PL. I B) susceptible de cesser, parfois, grâce à l'irrigation et, enfin, à un dessèchement progressif du feuillage finissant par atteindre la totalité du plant (PL. II A et B). Dans certains cas, un pied attaqué par le « Fil » peut résister et donner des fruits. Les vaisseaux ligneux des tiges et des pétioles de tomates attaquées sont colorés en brun, sans jamais atteindre la couleur noire observée dans les plants parasités par une Bactérie : le *Corynebacterium michiganense*.

Deux champignons imparfaits peuvent être isolés à partir des vaisseaux bruns : un *Fusarium* sp. et un *Verticillium* sp.

Les souches de *Fusarium* isolées sur tomate au Maroc, identifiées par MESSIAEN & PÉCAUT (*loc. cit.*), sont des *Fusarium oxysporum*

**PLANCHE I**

Les symptômes de la maladie du « Fil » de la tomate au Maroc



**A.** Jaunissement unilatéral de la feuille de tomate



**B.** Flétrissement généralisé

PLANCHE II

Dessèchement des plants de tomate attaqués par le « Fil »



A. Pied attaqué par le *Verticillium* sp.



B. Tomate attaquée par le *Fusarium* sp. — Quelques pieds portent à la fois du *Verticillium* sp. et du *Fusarium* sp.

f. sp. *lycopersici*. Elles peuvent être ramenées à deux types morphologiques différents : le type « *bulbigenum* » et le type « *orthoceras* ». Le premier est caractérisé par des macroconidies abondantes et un stroma rose clair, le second par des macroconidies rares et un stroma violet.

Les souches de *Verticillium*, observées par les auteurs précédents produisent à la fois du mycélium aérien et des microsclérotés en quantité appréciable. Elles appartiennent à un type intermédiaire entre le *V. albo-atrum* qui ne différencie pas de microsclérotés et le *V. dahliae* qui en forme. La validité de ces deux espèces est, comme nous le verrons plus tard, contestée par de nombreux auteurs. Aussi il nous a paru intéressant d'étudier la morphologie et le mode de développement des souches de *Verticillium* isolées sur tomate au Maroc et de comparer leurs caractéristiques à celles des espèces précédentes. Ce sera l'objet de la première partie de notre mémoire.

Le *Verticillium* sp. a été également trouvé au Maroc sur Melon, Aubergine, et Pomme de Terre (PINEAU, communication personnelle). GOETHA (1971) l'a isolé, pour la première fois au Maroc, sur des plants de Carthame malades et il pense que cette verticilliose pourrait être causée par les microsclérotés présents dans les sols ayant porté des plantes maraîchères. A l'appui de cette thèse, il convient de souligner que le *Verticillium* n'est pas spécifiquement lié au parasitisme d'un hôte déterminé, mais peut attaquer des végétaux d'espèces, de genres et de familles différents (DUFRENOY, 1927 ; MESSIAEN & LAFON, 1969). Du reste, VIENNOT BOURGIN (1949) précise que le *Verticillium* isolé de la Tomate peut être transmis à des Solanacées telles que la Pomme de Terre et l'Aubergine, ainsi qu'au Concombre, au Muflier, à *Acer* sp., à *Gossypium herbaceum*, au Piment et à l'Orme.

Les microsclérotés, organes de conservation du *Verticillium*, sont donc responsables de la transmission de la maladie d'une culture à une autre. Les méthodes de lutte consistent à éviter leur accumulation dans le sol par l'introduction dans les rotations de cultures de Haricots, de plantes à bulbes ou de Graminées, toutes résistantes à la Verticilliose (MESSIAEN & LAFON, 1969). S'agissant du cas du Maroc, il n'existe, selon MESSIAEN & PÉCAUT (1963), aucun espoir quant à « l'amélioration des rotations », car dans les conditions de sol et de climat au Maroc, la situation devient catastrophique dès la deuxième ou la troisième culture de la Tomate.

Le rôle important que jouent les microsclérotés nous a conduit à déterminer l'influence des conditions externes sur leur formation. La seconde partie de notre mémoire sera donc consacrée à l'étude de l'influence du pH d'une part, de la nutrition azotée et carbonée d'autre part, sur la croissance et sur la formation des organes de conservation du *Verticillium* sp. isolé sur Tomate au Maroc.

PREMIERE PARTIE  
IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *VERTICILLIUM* S.P.  
ISOLEES SUR TOMATE AU MAROC

Pour identifier les souches du *Verticillium* sp. isolées au Maroc, nous étudierons tout d'abord la morphogénèse de leurs thalles et nous déterminerons leurs caractères morphologiques. Avant de comparer nos souches à deux souches de référence appartenant aux espèces *Verticillium albo-atrum* REINKE & BERTHOLD et *Verticillium dahliae* KLEBAHN, nous essaierons de faire le point sur le problème de la validité des deux espèces précédentes.

I. La morphogénèse des thalles des souches marocaines

A — *Les souches utilisées*

Au début de notre travail, nous avons constitué une collection de souches de *Verticillium* en ayant recours à des isolements à partir de tissus malades, prélevés dans des tiges de Tomate provenant de différentes régions du Maroc. Deux cultures du *Verticillium albo-atrum* REINKE & BERTHOLD et du *Verticillium dahliae* KLEBAHN, obtenues du C.B.S. de Baarn \*, ont servi de références pour les déterminations. Les origines des différents isolats sont indiquées dans le tableau I.

Des expériences préliminaires sur l'aspect de la culture, la vitesse de croissance, et la formation des microsclérotés ayant montré que les souches marocaines se comportent de façon homogène, deux d'entre elles seulement ont été utilisées pour réaliser la plupart de nos essais : IV A et I F. Celles-ci proviennent de deux régions du Maroc assez éloignées ; la première du Sud d'Agadir, étage aride et la seconde de Mohammedia, étage semi-aride. Les deux régions ont un climat littoral, un hiver chaud supérieur à 7° et une amplitude extrême de 15° < M-m < 25° \*\*.

\* Centraal bureau for Schimmelcultures Oosterstraat, I-Baarn, Pays-Bas.

\*\* Etages bioclimatiques. Atlas du Maroc, planche n° 6b, la définition des étages bioclimatiques est celle de L. EMBERGER (1930); celle du climat est de J. DEBRACH (1953).

TABLEAU I

Origines et dates d'isolement des souches de *Verticillium* sp.

Souches	Dates d'isolement	Lieu de récolte
I D	4-6-1970	15 km Sud Casablanca, proximité station Dar Bouazza
I E	4-6-1970	15 km Sud Casablanca, proximité station Dar Bouazza
I A	16-6-1970	10 km au Nord de Mohammedia (Mansouriah)
I K	16-6-1970	10 km au Nord de Mohammedia (Mansouriah)
I F	16-6-1970	10 km au Nord de Mohammedia (Mansouriah)
I P	16-6-1970	Entre Casablanca et Mohammedia
III O	24-3-1971	Proximité station Dar Bouazza
III Q	24-3-1971	Proximité station Dar Bouazza
III I	24-3-1971	» » »
IV G	31-3-1971	Sud de Oualidia
IV J	31-3-1971	Nord Oualidia
IV R	31-3-1971	Nord Oualidia
IV A	31-3-1971	Sud Agadir
IV D	31-3-1971	Sud Agadir
<i>Verticillium dahliae</i> KLEBAHN	1966	Centraal bureau for Schimmelculture Baarn
<i>Verticillium albo-atrum</i> REINKE et BERTHOLD	1949	» » » »

La souche du *V. albo-atrum* a été isolée sur *Fragaria*, les autres souches l'ont été sur tomate.

Les souches marocaines ont été isolées par GABRIEL (Faculté des Sciences de Rabat).

## B — Le développement des thalles à partir des conidies

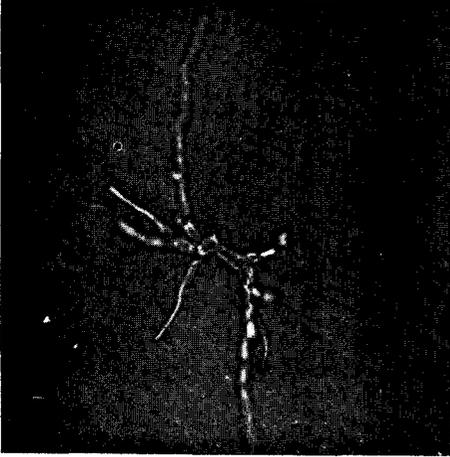
## 1. Technique d'isolement des spores

Une goutte de suspension de spores est étalée sur une boîte de Pétri contenant de l'eau et de la gélose. Quelques jours plus tard, des conidiophores se différencient à la surface du thalle ; ils portent à leur extrémité des groupes de spores enrobées dans du mucilage (sphérules). Mises en suspension dans de l'eau stérile et étalées sur un milieu PSA \*, les spores germent et seront prélevées une à une

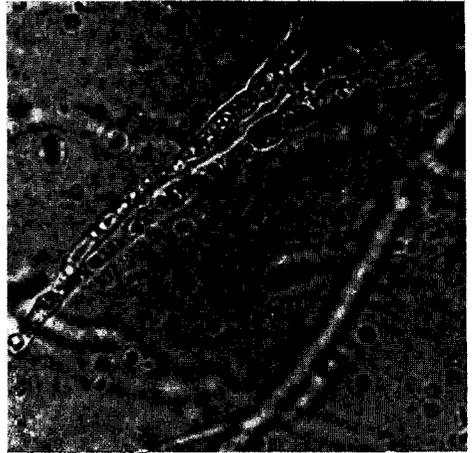
\* Milieu PSA (voir page 24).

PLANCHE III  
La morphogénèse du thalle

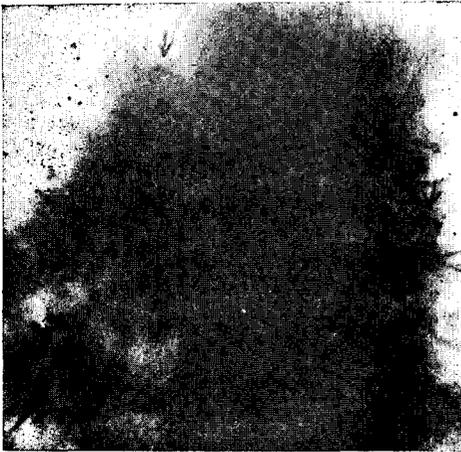
A



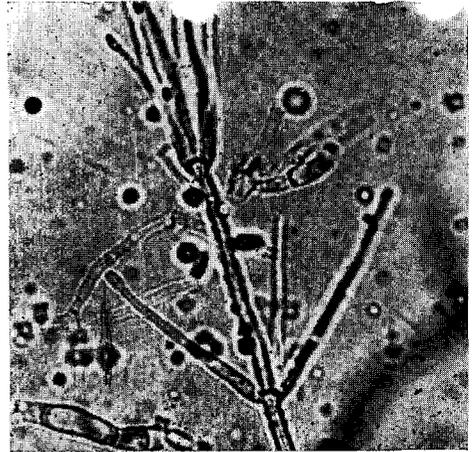
B



C



D



- A. Jeune thalle de 27 h. La spore a germé en émettant plusieurs filaments. G x 500
- B. Anastomose entre filaments provenant de la ramification d'une hyphe. G x 857
- C. Thalle de 70 h. Les sphérules (flèches) apparaissent aux extrémités de conidiophores dressés. G x 200
- D. Conidiophore verticillé. G x 909.

27 heures après, puis repiquées sur de nouvelles boîtes de Pétri contenant du milieu PSA. ROTH & BRANDT (1964), HEALE (1966) et TOLMSOFF (1972) ont constaté que les conidies du *Verticillium* possèdent un seul noyau haploïde ; le matériel de départ des thalles est donc génétiquement pur.

## 2. Développement du thalle

La conidie germe en émettant plusieurs filaments cloisonnés qui se ramifient rapidement (PL. III A). Ils sont rectilignes et hyalins, les uns rampent à la surface du milieu, les autres s'enfoncent dans le substrat et croissent plus rapidement que les précédents. La marge en croissance est donc constituée en majorité par du mycélium intramatriciel. Des anastomoses s'établissent entre filaments voisins et sont visibles dans la marge du thalle (PL. III B) ; ces formations ont déjà été observées par SCHREIBER & GREEN (1966). Les hyphes ont un diamètre moyen de  $2,6 \mu$ . Elles sont plus épaisses au voisinage de la spore ( $5,2 \mu$ ) et à l'emplacement des futurs rameaux ( $3,9 \mu$ ).

Sur le thalle végétatif vont se différencier des conidies et des microsclérotés. Deux jours après l'ensemencement, des houppes blanches sont visibles au niveau de l'implant ; elles sont constituées par des rameaux dressés qui représentent les jeunes conidiophores. Ces filaments se ramifient à leur extrémité en un verticille de phialides au sommet desquelles apparaissent les conidies. Après leur formation, celles-ci restent enrobées dans du mucilage et constituent ce que l'on appelle les sphérules (PL. III C). Deux jours plus tard, soit quatre jours après l'ensemencement de la spore, de nouvelles phialides se forment sur le conidiophore en constituant des verticilles de 2 à 5 unités (PL. III D) ; elles portent chacune une sphérule à leur extrémité. Les conidies mesurent en moyenne  $4,7 \times 2,1 \mu$ .

Six à sept jours après l'ensemencement, un anneau noir de 1 à 1,5 mm de largeur est visible à une distance de 2 à 2,5 mm du semis. Cette pigmentation est due à la présence de microsclérotés mûrs. La partie centrale du thalle, d'abord non pigmentée, se recouvre de microsclérotés par la suite. La marge du thalle reste incolore sur 4 à 5 mm, ce qui correspond à du mycélium âgé au maximum de deux jours. Les mesures de diamètre des cultures et des parties colorées par les microsclérotés (TABL. II) ont montré que leur extension se fait à la même vitesse, environ 4 mm par jour. La largeur de la marge non pigmentée diminue lorsque le front de croissance de la culture arrive au voisinage du bord de la boîte de Pétri. Dans ce cas, la croissance radiale diminue, alors que la vitesse de forma-



tion des microsclérotés ne varie pas. En conséquence, dans une culture âgée, les microsclérotés sont présents sur toute la surface du thalle. Ces organes donnent parfois à la culture un aspect zoné.

La morphogénèse des cultures obtenues à partir d'une conidie, d'une sphérule, d'un microsclérote ou d'un semis de quelques mm de diamètre, se déroule de la même manière. Signalons cependant que les microsclérotés apparaissent plus tôt, 5 jours après l'ensemencement, dans les cultures issues d'une suspension de spores étalée à la surface du substrat. La limitation de la croissance, provoquée par la rencontre de nombreux thalles contigus, semble donc accélérer le processus de formation des microsclérotés.

### C — La morphogénèse des microsclérotés

L'observation microscopique de microsclérotés en formation permet de suivre les différentes étapes de leur morphogénèse.

Dans un premier stade, des articles mycéliens grossissent et se cloisonnent en donnant naissance à des cellules arrondies, associées en chaînes qui accumulent des réserves visibles dans le cytoplasme sous forme de globules lipidiques (PL. IV A) ; leurs parois s'épaississent et noircissent par suite du dépôt de mélanine (PL. IV B et C). Dans un second stade, les grosses cellules ainsi formées bourgeonnent, parfois avant d'être pigmentées, en général après épaississement et mélanisation de leurs parois. Les cellules apparues par bourgeonnement vont, au fur et à mesure de leur formation, s'épaissir et se mélaniser. Ce massif cellulaire va finalement donner naissance à un microsclérote très noir au centre, résultat de l'entassement de cellules pigmentées formées par bourgeonnement, bordé de cellules plus claires en voie de pigmentation (PL. IV D).

Les auteurs ne semblent pas être d'accord sur le déroulement des différentes étapes qui conduisent à la formation des microsclérotés.

D'après BRANDT (1964) et ISAAC (1949), cités par TURIAN (1969), la transformation des hyphes végétatives du *Verticillium* débute par le cloisonnement accru de certains articles mycéliens, l'élargissement des cellules ainsi délimitées, la multiplication cellulaire par bourgeonnement et, enfin, l'épaississement des cadres cellulaires et le dépôt de matières mélaniques dans les parois des cellules formant le cortex du sclérote.

D'après BASU (1961), VIGOUROUX et CASTELLAIN (1969), la formation des microsclérotés commence par l'élargissement et le cloi-

PLANCHE IV

Formation des microsclérotos chez le *Verticillium* sp.

A



B



C



D



- A. Elargissement et cloisonnement des cellules
- B. Bourgeonnement des cellules et épaississement des cellules
- C. Epaississement des parois
- D. Microsclérote mûr.

sonnement d'une partie de l'hyphe, aboutissant à la formation d'une chaîne de cellules de forme rectangulaire dont les parois s'épaississent et s'imprègnent de pigment noir. Ces cellules différencient par bourgeonnement, de nouvelles cellules d'abord hyalines puis à parois épaisses et pigmentées. L'ensemble se transforme progressivement en un microsclérote.

Ainsi, pour les premiers auteurs le bourgeonnement précède l'épaississement et la pigmentation. Pour les seconds, c'est l'inverse qui se produit : les cellules qui bourgeonnent ont déjà des parois épaisses et pigmentées. SCHNATHORST (1965) a remarqué que dans des cultures âgées de 8 semaines les microsclérotés continuent à former de nouvelles cellules. Ceci montre bien que la pigmentation et l'épaississement ne constituent pas l'étape finale, contrairement à la description donnée par ISAAC & BRANDT (*loc. cit.*). Nos propres observations confirment celles de BASU, VIGOUROUX & CASTELLAIN (*loc. cit.*).

#### D — Conclusions

Le développement des thalles à partir de spores provenant de souches de *Verticillium* sp. isolées sur Tomate au Maroc est résumé dans une série de schémas (FIG. 1).

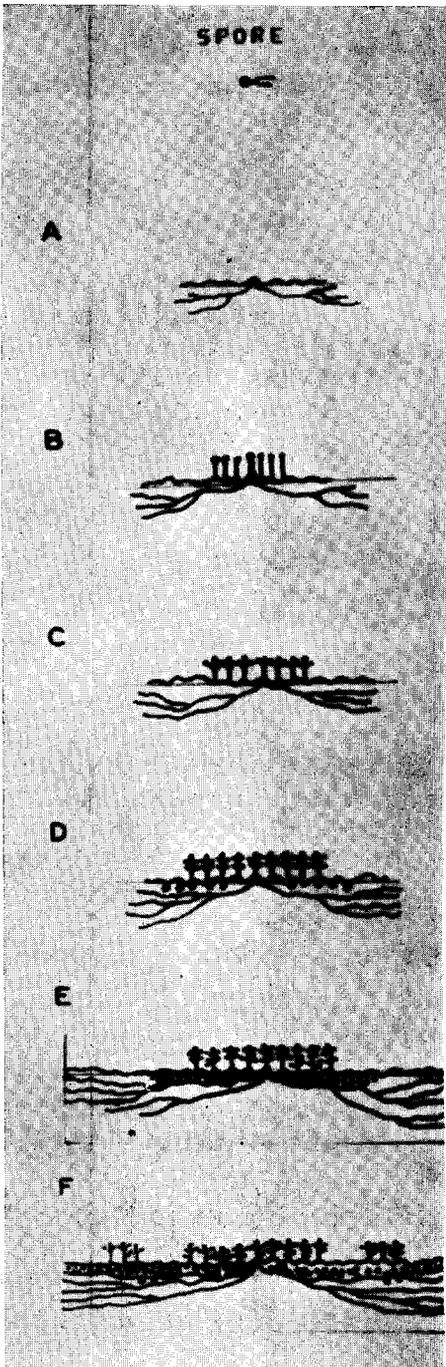
Le spore germe par un ou plusieurs filaments germinatifs (FIG. I, A) et donne naissance rapidement à un thalle de forme circulaire qui s'accroît, en diamètre, de 4 mm par jour en moyenne dans nos conditions expérimentales. Deux types d'éléments reproducteurs vont se différencier sur la culture. Très rapidement, en moins de 48 heures (FIG. I, B) apparaissent au centre des conidiophores dressés, d'abord nus, puis portant des verticilles de phialides (FIG. I, C). Des conidies naissent à leurs extrémités et restent groupées dans les sphères. Ces conidiophores d'abord localisés au niveau de l'implant vont envahir lentement la culture.

Les microsclérotés se différencient plus tard, 6 à 7 jours après l'ensemencement, sur un anneau distant de l'implant de 2 à 2,5 mm et 4 à 5 mm en arrière du front de la culture (FIG. I, D).

Ils finissent par se développer sur la totalité du thalle lorsque celui-ci a complètement envahi le récipient de culture (FIG. I, E et F).

En définitive, les *Verticillium* isolés sur Tomate au Maroc sont proches, par la formation des microsclérotés et le développement de la culture, du *Verticillium* décrit par VIGOUROUX & CASTELLAIN (1969).

FIGURE 1  
Développement du thalle de *Verticillium* sp.



Filament résultant de la germination après 24 h.

Apparition des conidiophores (48 h)

Ramification des conidiophores en verticilles (4 jours)

Apparition des microsclérotés (6 à 7 jours)

Culture près du bord de la boîte de Pétri

Culture âgée: toute la culture est pigmentée et recouverte par endroits de mycelium cotonneux aérien

Ces auteurs ont désigné leur *Verticillium* par *V. dahliae* et considèrent que les microsclérotés permettent de distinguer cette espèce du *V. albo-atrum*. Mais l'espèce *V. dahliae* n'est pas considérée comme valable par tous les auteurs. En particulier, les auteurs américains, cités par MESSIAEN & LAFON (1969), estiment qu'il n'existe qu'une seule espèce valable : *V. albo-atrum*. Il est donc nécessaire de faire une mise au point bibliographique sur les espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum* avant de classer les souches isolées au Maroc dans l'une ou l'autre d'entre elles.

## II. Données actuelles sur les espèces *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold et *Verticillium Dahliae* Klebahn

A — Description du genre *Verticillium* REINKE & BERTHOLD et des espèces *V. albo-atrum* et *V. dahliae*

Le genre *Verticillium* REINKE & BERTHOLD appartient au groupe des Champignons Imparfaites, ordre des Moniliales, famille des Moniliacées. Il est caractérisé par un mycélium d'abord hyalin puis noir et par des hyphes fertiles, dressés, sombre et plus pâles vers le haut, portant des rameaux verticillés, modérément cloisonnés et formant de manière continue à leur extrémité des conidies, ovales ou oblongues, hyalines à noires (SACCARDO, 1886). Les espèces qu'il comprend provoquent chez un très grand nombre de plantes des maladies vasculaires appelées « verticillioses ».

Le *V. albo-atrum* a été isolé en 1879 par REINKE & BERTHOLD à partir de Pommes de Terre malades. Ce champignon différencie des hyphes cloisonnées dont les parois cellulaires s'épaississent et noircissent ; ces formations caractéristiques de l'espèce ont reçu le nom d'hyphes enkystées. Des masses noires de taille et de forme variables peuvent se former quand des hyphes enkystées voisines deviennent contiguës, constituant ainsi « le mycélium résistant », appelé par REINKE & BERTHOLD « Dauermycélium » ou « Sklerotien ». Ces auteurs ont utilisé tantôt le terme de sclérote, tantôt celui de mycélium résistant, pour désigner les structures de conservation du *V. albo-atrum*. Pour eux, le mycélium résistant peut être également appelé « sclérote », même si les cellules ne forment pas les larges masses de tissu caractéristiques des structures désignées généralement sous le nom de sclérotés (RUDOLPH, 1931).

En 1913, KLEBAHN a isolé un champignon, voisin du précédent, sur des Dahlias malades. Cette nouvelle espèce nommée *Verticillium dahliae*, est caractérisée par la formation de microsclérotés, structures

granuleuses issues du bourgeonnement d'articles mycéliens, constitués de cellules de grande taille, à peu près sphériques, à parois épaisses et noires. Il a comparé le *V. dahliae* au *V. albo-atrum* et conclu que la première espèce produit des microsclérotés en grande quantité et jamais d'hyphes enkystées, alors que la seconde ne forme que des hyphes enkystées et jamais de microsclérotés.

Les différences essentielles entre ces deux types de structure apparaissent dans la planche V. Le microsclérote du *V. Dahliae* (FIG. 2 et 3, PL. V) est formé de cellules globuleuses, provenant de l'élargissement et du cloisonnement d'une hyphe puis de son bourgeonnement en divers points. Après épaississement et mélanisation des parois, il se présente sous forme d'un organe granuleux noir mesurant de 80 à 100  $\mu$  (VAN DER MEER, 1925). Les hyphes enkystées du *V. albo-atrum* sont formées à partir de filaments qui s'élargissent et dont les parois s'épaississent et se pigmentent. Le cloisonnement et le bourgeonnement des cellules qui conduisent à l'édification des microsclérotés ne se produisent pas lors de la formation des hyphes enkystées.

REINKE & BERTHOLD (1879), qui ont utilisé le mot « sclérote » pour désigner le « mycélium dormant » du *V. albo-atrum*, n'ont pas précisé si le type qui forme de vrais microsclérotés (comme ceux du *V. dahliae*), était inclus dans l'espèce *V. albo-atrum*. Une confusion persiste toujours en ce qui concerne le type de cellules, auquel REINKE & BERTHOLD se sont référés ; elle est, en grande partie, à l'origine des divergences relatives à la valeur taxonomique des microsclérotés, et à la séparation des espèces *V. albo-atrum* et *V. dahliae* (SCHNATHORST, 1965).

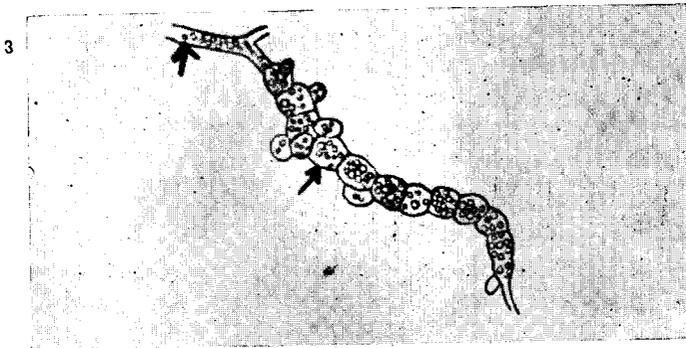
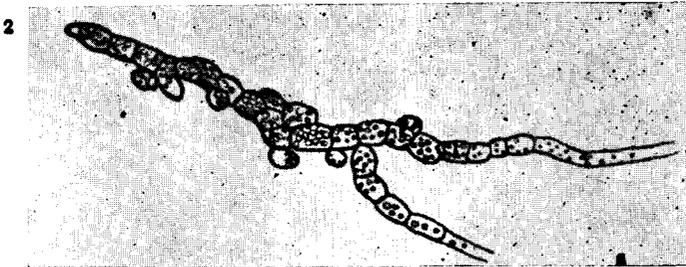
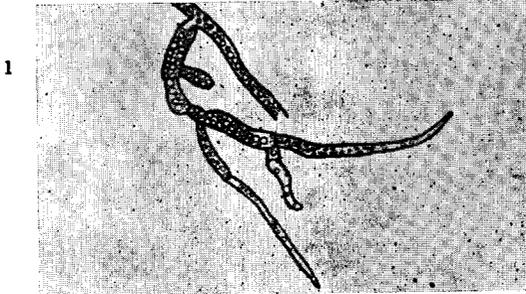
Certains auteurs, dont VAN DER MEER (1925) et ISAAC (1967), se sont alignés sur KLEBAHN qui distingue les deux espèces. D'autres auteurs, comme RUDOLPH (1931), PRESLEY (1941) et VAN DEN ENDE (1958), estiment que les deux *Verticillium* ne constituent qu'une seule espèce qui doit être appelée *V. albo-atrum* REINKE & BERTHOLD, du nom de ceux qui l'ont découverte pour la première fois. Une mise au point bibliographique, destinée à nous éclairer sur les arguments présentés par les partisans de l'existence d'une ou de deux espèces nous paraît donc utile.

#### B — *V. albo-atrum* et *V. dahliae* : Deux espèces distinctes

Parmi les partisans des deux espèces, nombreux sont ceux qui ont utilisé, outre l'aspect morphologique, des critères physiologiques (TABL. III).

PLANCHE V

Différences essentielles entre les hyphes enkystées du *V. albo-atrum*  
et les jeunes microscélotes du *V. dahliae*  
d'après VAN DER MEER (1925)



Les flèches permettent d'observer l'élargissement des hyphes par rapport au filament végétatif.

**TABEAU III**  
**Comparaison des caractères morphologiques et physiologiques**  
**des espèces *V. albo-atrum* et *V. dahliae***

Critères	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	Auteurs
Aspect de la culture sur « Corn-meal » agar	Mycélium aérien forme une couche fine. Organes de résistance apparaissent tôt et recouvrent toute la culture	Mycélium aérien forme une couche épaisse	VAN DER MEER (1925)
Délai nécessaire à la formation des conidiophores sur « Cherry » agar	Nombreux conidiophores après 5 jours de culture	Pas ou peu de conidiophores après 5 jours de culture	VAN DER MEER (1925)
Croissance après 5 jours de culture sur « Cherry » agar	Thalle de surface importante et présence de mycélium aérien	Thalle inexistant ou très petit	VAN DER MEER (1925)
Organes de résistance	Microsclérotos pas d'hyphes enkystées	Hyphes enkystées pas de microsclérotos	LUDBROOK (1932) HEALE et ISAAC (1965) REISS (1969)
	Pas de forme	de passage	
Taille des Conidies	4,7 x 2,31 $\mu$ 3 à 6 x 1 à 3 $\mu$	5,46 x 2,66 $\mu$ 4 à 12 x 2,5 à 5 $\mu$	VAN DER MEER (1925) SMITH (1965)
Effet de la température sur la croissance en culture pure	Croissance optimale à 24° diminue entre 28 et 33° mais n'est pas nulle à cette dernière température	Croissance optimale à 22° diminue très fortement à 28° nulle à 30 et 33°	BEWLEY (1922) LUDBROOK (1932) MESSIAEN et LAFON (1965) MARTINSON et ENGLAND (1967) SKADOW (1969)
Effet de la température sur l'apparition des symptômes	Température optimale d'infection coïncide avec celle de la croissance en culture pure Présence de symptômes à 30°	Pas de symptômes au-delà de 25° & 28°	BEWLEY (1922) ISAAC (1967)
Effet d'un éclairage continu	Permet la formation des microsclérotos	Ne permet pas la formation d'hyphes enkystées	HEALE et ISAAC (1965)
Effet du pH optimal de formation des organes de conservation	5,3 à 7,2	8 à 8,6	HEALE et ISAAC (1965)
Effet de la nature du milieu sur la formation des organes de conservation Faible concentration en C et N	Permet la formation des microsclérotos	Ne permet pas la formation d'hyphes enkystées	HEALE et ISAAC (1965)

La différence essentielle entre les deux espèces réside dans la nature des organes de résistance qu'elles édifient : hyphes enkystées ou microsclérotos. L'absence de forme de passage entre elles montre que ce caractère a une bonne valeur taxonomique.

Les deux espèces, cultivées sur un milieu identique, n'ont pas le même aspect. Les thalles du *V. dahliae* croissent plus rapidement que ceux du *V. albo-atrum*, leurs conidiophores se différencient après un délai plus court et leurs conidies sont moins longues.

La température et l'éclairement n'exercent pas le même effet sur les cultures des deux espèces : la température optimale de croissance est plus forte pour le *V. dahliae* (24°) que pour le *V. albo-atrum* (20°) et cette dernière espèce cesse de croître rapidement lorsque la température augmente (croissance nulle à 30° et 33°).

Par ailleurs, les organes de conservation ne réagissent pas de la même façon aux conditions externes. Les microsclérotos du *V. dahliae* apparaissent à des pH acides ou proches de la neutralité (5,3 à 7,2) alors que les hyphes enkystées se différencient à des pH nettement basiques (8 à 8,6). Les microsclérotos peuvent se former sur un milieu pauvre en carbone et en azote alors que les hyphes enkystées ne peuvent pas le faire.

D'autres auteurs se sont basés sur des critères génétiques et biochimiques pour distinguer les deux espèces.

Chez les *Verticillium* sp., il est facile d'obtenir des hétérocaryons à partir de souches auxotrophes haploïdes (HASTIE, 1964). Ces hétérocaryons très instables donnent naissance à des noyaux diploïdes ou aneuploïdes et à des noyaux haploïdes prototrophes stables obtenus après recombinaison mitotique. Lorsque les hétérocaryons dérivent d'une seule espèce, ils se dissocient en donnant 4 % de noyaux diploïdes, 7 % de noyaux aneuploïdes et 89 % de noyaux haploïdes. Lorsqu'ils sont formés par hybridation entre *V. dahliae* et *V. albo-atrum*, on obtient respectivement les valeurs 73 %, 27 % et 0,2 %. HASTIE (1973) interprète ces faits en disant que les haploïdes formés dans le dernier cas ne sont pas viables, car ayant un génome déséquilibré, ce qui traduit l'absence d'homologie entre les génomes haploïdes du *V. albo-atrum* et du *V. dahliae*. Ce résultat est donc en faveur de l'existence de deux espèces distinctes.

HALL (1969), MILTON et Coll. (1971), PELLETIER et HALL (1971), WHITNEY et al. (in PEGG, 1974) ont séparé les protéines du *V. albo-atrum* et du *V. dahliae* par électrophorèse. Les différences

observées entre les bandes de protéines des deux *Verticillium* sont toujours beaucoup plus importantes que celles observées entre plusieurs isolats au sein d'une même espèce. Pour les auteurs précédents, cela justifie la distinction entre les deux espèces.

C — *V. albo-atrum* et *V. dahliae* : une seule espèce

Les auteurs qui sont pour le regroupement des deux formes en une seule espèce, le *V. albo-atrum*, considèrent les souches ne formant pas de microsclérotés comme des variétés « asclérotiques » de cette espèce. Les différences morphologiques ne constituent pas pour eux des critères taxonomiques valables ; certains s'appuient pour défendre leur thèse sur des critères génétiques ou de développement.

1. La variabilité des caractères morphologiques chez les espèces du genre *Verticillium* et leur valeur taxonomique

La morphologie d'un organisme peut changer en fonction de la nature du milieu, de son pH, de son épaisseur, de l'aération, de la température et de la lumière. Ainsi, le diamètre des filaments, la couleur du mycélium et des conidiophores d'une souche donnée de *Verticillium*, de même que le nombre de verticilles par conidiophore et de ramifications par verticille sont modifiés par la nature chimique du milieu (PRESLEY, 1941).

Le critère taille des conidies a fait aussi l'objet de certaines critiques. C'est ainsi que PELLETIER et AUBE (1970) ont montré que les dimensions des conidies du *V. albo-atrum*, du *V. dahliae* et du *V. nigrescens* varient beaucoup selon les milieux de culture, la température et l'âge des thalles. Des résultats de cette étude, il ressort que le critère taille des conidies ne peut justifier à lui seul la formation de nouvelles espèces.

SCHMOTINA et GORLENKO (1967) ont obtenu, par ailleurs, des changements morphologiques en utilisant différents composés azotés, dont l'urée et la peptone sont les plus actifs. Ils ont remarqué que les composés ammoniacaux entraînent la formation d'oidies à la place du mycélium normal et que les polysaccharides, le glucose et le galactose, jouent un rôle important dans la morphogénèse des microsclérotés.

WILHELM (1948) a précisé, en outre, qu'une différence de température de 3 à 6° C, dans une gamme allant de 10 à 31° C, peut entraîner des changements dans l'aspect de la culture du *V. albo-*

*atrum* et dans ses caractères morphologiques. Ainsi, à de basses températures, 10 à 22° C, et pendant l'hiver, les microsclérotés sont nombreux. En revanche, à des hautes températures, 25 à 31° C, et durant l'été, les thalles sont duveteux et ne présentent guère que des microsclérotés dispersés.

La morphogénèse des microsclérotés peut être influencée, également, par la lumière (BRANDT, 1974 a et KAISER, 1964). *Le bleu* inhibe, en effet, la formation des microsclérotés et augmente la production des conidies. Exposés à la lumière bleue, verte ou blanche, avec une alternance d'obscurité (12 h) et lumière (12 h), certains isolats montrent une zonation des thalles.

Ces quelques indications bibliographiques mettent en évidence la nécessité de travailler dans des conditions identiques lorsqu'on veut comparer deux espèces. RUDOLPH (1931) n'a pas manqué de faire remarquer, à ce propos, que la plupart des différences constatées entre les espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum* sont dues au fait que les auteurs n'ont pas travaillé dans les mêmes conditions.

Il n'en reste pas moins que, même dans des conditions de cultures identiques, les deux espèces présentent un certain nombre de différences dans leur morphologie (VAN DER MEER, 1925). Le problème qui se pose en définitive concerne la valeur taxonomique de ces caractères morphologiques. Certains auteurs ont étudié la question en employant des techniques génétiques et morphogénétiques.

## 2. Arguments d'ordre morphogénétique et génétique en faveur de l'existence d'une seule espèce

Certains auteurs, dont RUDOLPH (1931), PEGG (1957) et SKOTLAND (1971), ont observé que les cultures perdent, après plusieurs repiquages, leur capacité de former des organes de conservation : mycélium de résistance ou microsclérotés. Les thalles sont constitués essentiellement par un mycélium blanc cotonneux, très faiblement pigmenté en noir par suite de la présence en faible quantité de microsclérotés ou d'hyphes enkystées. Ces organes de conservation peuvent, d'ailleurs, réapparaître chez certaines souches par suite de l'ensemencement du mycélium hyalin sur PDA (1957).

A partir d'une souche d'origine monosporée du *V. albo-atrum*, PRESLEY (1941) a obtenu des thalles portant plusieurs types de secteurs. Les semis prélevés dans ces secteurs ont donné naissance à

des cultures d'aspect variable, pigmentées en noir ou blanches, avec un mycélium cotonneux abondant ou, au contraire, très rare. Les variations dans la pigmentation des cultures sont dues à la quantité, à la taille et à la nature des organes de conservation (hyphes enkystées ou microsclérotés). Ainsi, à partir de matériel génétiquement pur, peuvent apparaître chez les souches du *V. albo-atrum* des variations auto-entretenuës qui se traduisent par la formation de microsclérotés dans certaines lignées, d'hyphes enkystées dans d'autres.

Les observations faites par VAN DEN ENDE (1958) vont également dans le même sens. En effet, un *Verticillium* qui forme un mycélium de résistance à base d'hyphes enkystées (Dauermycélium) en début de culture peut former des microsclérotés après plusieurs repiquages successifs.

BRANDT (1964 b) a obtenu trois types différents de thalles (« Halo », « BWP » et « Slimy ») à partir de semis mycéliens prélevés dans une culture d'origine monosporée, cultivés dans les conditions suivantes :

- type « Halo » (marge légèrement pigmentée) : grand récipient de culture (boîte de Roux), nombreux thalles en présence.
- type « BWP » (black with white patch : mycélium aérien blanc au centre d'une culture pigmentée) : un seul thalle dans un tube de milieu incliné.
- type « Slimy » (visqueux) : un seul thalle dans un petit récipient de culture.

Ces observations ont conduit l'auteur à considérer que l'aspect des thalles du *V. albo-atrum*, type à microsclérotés, est très variable même lorsque les conditions externes et le substrat sont les mêmes. Selon lui, cette variabilité serait liée à la concentration plus ou moins forte d'une substance diffusible produite par le champignon.

Il est parfaitement clair qu'une souche d'origine monosporée peut donner naissance à des clones formant indifféremment soit des hyphes enkystées, soit des microsclérotés. Des variations morphologiques très nombreuses se manifestent également parmi la descendance. D'après TOIMSOFF (1972), l'obtention des « variants » est plus fréquente quand les cultures filles sont faites à partir de microsclérotés que lorsqu'elles proviennent de conidies. Cet auteur pense, sans en apporter une démonstration rigoureuse, que les variations observées dépendent du fonctionnement des gènes, le génome des individus observés étant toujours le même.

FORDYCE et GREEN (1964) ont apporté des arguments génétiques en faveur du regroupement du *V. albo-atrum* et du *V. dahliae* en une seule espèce. Ces auteurs ont réalisé des hétérocaryons à partir de souches marquées simultanément par une déficience nutritive et par un caractère morphologique, la nature des organes de résistance (hyphes enkystées chez *V. albo-atrum* et microsclérotés chez *V. dahliae*). Ces hétérocaryons instables donnent naissance à des diploïdes prototrophes qui forment (à une exception près sur 100 thalles testés) des microsclérotés. La nature diploïde de ces individus est confirmée par leur dissociation en haploïde dont les caractéristiques ne peuvent résulter que de recombinaisons mitotiques.

Ces expériences montrent en définitive qu'une cellule possédant dans son génome les potentialités « microsclérote » et « hyphe enkystée », ne manifeste que le caractère « microsclérote ». Il y a en quelque sorte une « dominance » du caractère « microsclérote » sur le caractère « hyphe enkystée », qui, en l'absence d'analyse génétique rigoureuse, ne peut être assimilée sans risque à la dominance d'un allèle sur un autre.

#### D — Conclusions

L'étude bibliographique que nous venons de faire n'apporte apparemment pas de grande lumière sur le problème de l'existence d'une ou deux espèces. A propos de chaque critère taxonomique, qu'il soit morphologique, physiologique ou génétique, existent des arguments pour et des arguments contre la séparation en deux espèces. Nous verrons plus tard, à la fin du paragraphe III, comment on peut interpréter ces contradictions apparentes.

Mais auparavant et dans l'espoir d'apporter de nouveaux éléments de réponse, nous allons comparer le *Verticillium* isolé au Maroc aux deux souches de référence appartenant aux espèces *V. albo-atrum* et *V. dahliae*.

#### III. Etude comparative des *Verticillium* isolées sur tomate au Maroc et de 2 souches de référence appartenant aux espèces *V. Albo-Atrum* et *V. dahliae*

Les différences morphologiques qui existent entre le *V. albo-atrum* et le *V. dahliae* sont parfois dues à l'utilisation de milieux de culture différents (RUDOLPH, 1931). Cette constatation faite également par PELLETIER et AUBE (1970) nous a incité à utiliser des milieux identiques lors de la comparaison du *Verticillium* sp. isolé

au Maroc, aux deux autres *Verticillium*, quant à l'aspect de la culture, la vitesse de croissance, la formation des organes de conservation, et enfin, la taille des conidies.

#### A — Les milieux utilisés

Nous avons retenu pour cette étude deux milieux naturels, l'un au bouillon de Pomme de Terre (PSA) et l'autre à base d'avoine. Les autres milieux sont le milieu « S » de MESSIAEN et LAFON (1965) et le milieu « M » de MALCA et collaborateurs (1966).

##### 1. Milieu P S A

Pomme de terre	200 g
Saccharose	20 g
Gélose	20 g
Eau qsp	1 000 ml

Les pommes de terre sont lavées, pelées et coupées, puis mises à cuire dans de l'eau pendant 20 mn. Dans le bouillon filtré et refroidi, on ajoute le saccharose et la gélose, le volume est enfin ramené à 1 000 ml. avec de l'eau distillée.

##### 2. Milieu « S » de MESSIAEN

$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$	1 g
$\text{NO}_3\text{K}$	0,25 g
$\text{SO}_4\text{Mg}$	0,25 g
$\text{PO}_4\text{KH}_2$	0,125 g
$\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	0,125 g
Extrait de Malt	1 g
Acide citrique	0,05 g
Saccharose	5 g
Gélose	25 g
Eau qsp	1 000 ml.

##### 3. Milieu « Avoine »

Flocons d'Avoine	30 g
Agar	15 g
Eau qsp	1 000 ml

##### 4. Milieu « M »

Saccharose	23,72 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2,4 g
$\text{MgSO}_4$	0,5 g

FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	1,45 mg
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,88 mg
MnSO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,44 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,612 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18,146 g
Gélose	20 g
Eau qsp	1 000 ml.

## B — Aspects cultureux

### 1. Comparaison des trois souches sur le milieu PSA

L'examen des photographies de la planche VI montre que la croissance est régulière dans toutes les directions à partir du semis et que les thalles ont tous une forme circulaire régulière. Les différences entre les trois souches apparaissent essentiellement au niveau de la pigmentation et de l'abondance du mycélium aérien dressé.

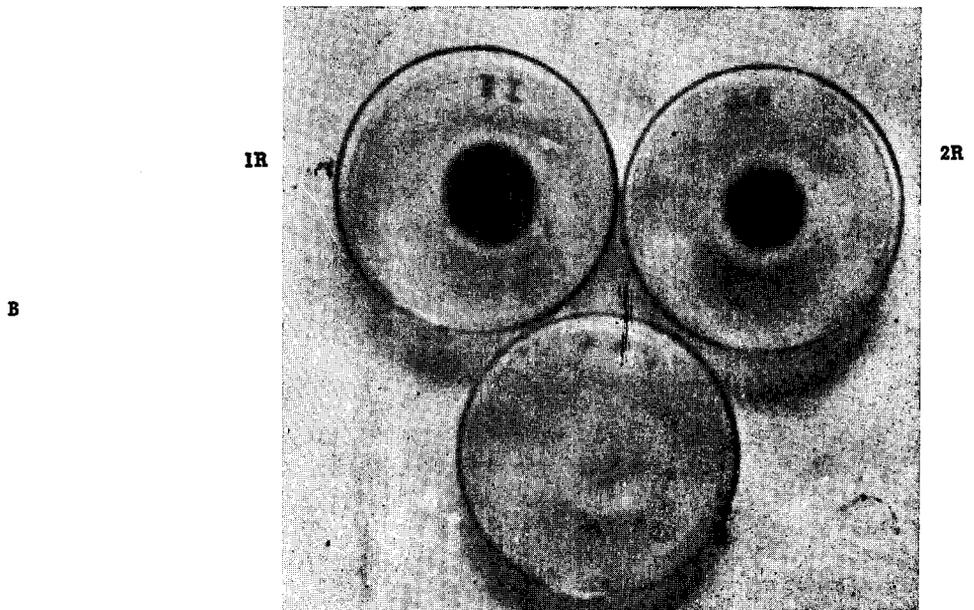
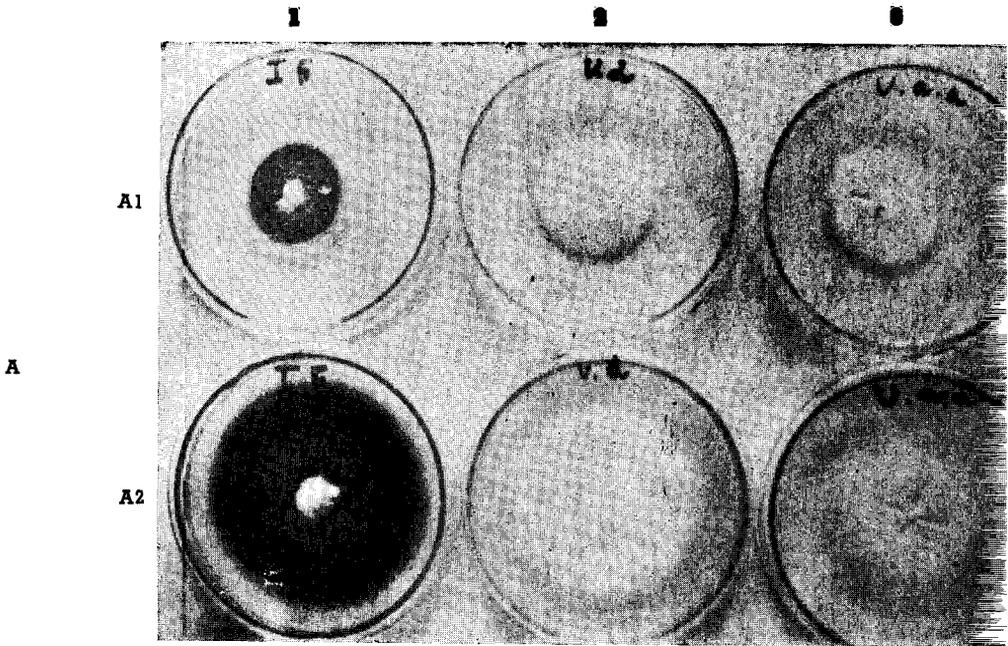
Les cultures de la souche IF ont un système aérien dressé très dispersé sauf au niveau de l'implant où une houppes blanche apparaît au centre du thalle; le mycélium est fortement pigmenté excepté dans la marge en croissance qui se présente sous forme d'un anneau blanc de 4 à 5 mm de large (PL. VI A). Les cultures du *V. dahliae* observées sur le fond des boîtes de Pétri (PL. VI B) ont le même aspect que les précédentes, mais il faut noter que la marge blanche dépourvue de microsclérotés est plus large. La pigmentation noire n'apparaît pas quand on regarde le thalle par-dessus, car la culture est recouverte d'un mycélium aérien duveteux blanc très abondant.

Le *V. albo-atrum* a un mycélium ras non cotonneux plus ou moins plissé au centre (PL. VI A). De petites touffes blanches de mycélium aérien dressé peuvent apparaître, mais en quantité peu importante. Les organes de conservation colorent légèrement la zone centrale des cultures (PL. VI B), mais cette pigmentation n'atteint jamais la couleur noire due aux microsclérotés, observée chez les deux autres souches.

En conclusion, nous pouvons relever que chacun des 3 *Verticillium* montre, en culture pure sur milieu PSA, un aspect qui lui est propre. Toutefois, si nous observons le revers des cultures, nous constatons que la souche IF se rapproche du *V. dahliae* dont la pigmentation est importante. En revanche, le revers des cultures de ces deux souches diffère complètement de celui du *V. albo-atrum* dont la pigmentation est très faible.

PLANCHE VI

Aspect cultural de trois souches de *Verticillium* sur milieu PS



## 2. Variations de l'aspect des thalles en fonction du milieu de culture

Des variations culturelles sont observées sur trois milieux différents.

Sur milieux PSA, « Avoine » et « S », le mycélium de la souche IF devient, respectivement, de plus en plus cotonneux et la surface recouverte de microsclérotés de moins en moins étendue. Pour le *V. dahliae*, le mycélium engendré est toujours cotonneux et touffu, mais la densité des microsclérotés varie beaucoup. Quant au *V. albo-atrum*, il forme plus de mycélium aérien et moins de structures de résistance sur milieu « S » que sur les deux autres.

## 3. Conclusions

Les observations précédentes montrent clairement que la nature du milieu modifie l'aspect des cultures. Néanmoins, le *V. dahliae* garde, quel que soit le substrat, un aspect différent des deux autres souches : son mycélium aérien dressé d'allure cotonneuse est toujours très abondant.

Par ailleurs, les cultures de IF et du *V. dahliae*, observées par-dessous montrent, au moins sur les deux milieux naturels utilisés PSA et Avoine, une pigmentation noire due à la présence de microsclérotés. Ce caractère rapproche IF du *V. dahliae* et sépare ces deux souches du *V. albo-atrum*.

Notons enfin que, chez la souche IF, la densité des microsclérotés est plus forte, et le mycélium aérien moins abondant que chez le *V. dahliae*. Ce rapprochement recoupe une observation de BASU (1961) selon laquelle les cultures qui ont beaucoup de mycélium aérien édifient moins de microsclérotés et réciproquement.

### Légende :

- |   |   |
|---|---|
| 1. Souche IF isolée au Maroc  | 2. <i>V. dahliae</i> ..                     |
| 3. <i>V. albo-atrum</i>   | R. Revers                                   |
| A <sub>1</sub> . Cultures âgées de 10 jours   | A <sub>2</sub> . Cultures âgées de 20 jours |
| B. Revers des cultures âgées de 10 jours (cliché pris lorsque les boîtes de Pétri sont retournées). A remarquer, au revers des cultures, la surface pigmentée et la marge sans microsclérotés de la souche IF et du <i>V. dahliae</i> . |   |

### C — La vitesse de croissance

Pour chacune des trois souches, 12 boîtes de Pétri contenant du milieu PSA sont ensemencées avec des implants de même taille. La croissance est mesurée 6, 12 et 18 jours après le repiquage (TABL. IV).

Les courbes de la figure 2 montrent que le *V. dahliae* croît plus vite que la souche IF et que cette dernière à son tour croît plus rapidement que le *V. albo-atrum*.

Les différences enregistrées entre le *V. dahliae* et la souche IF (test de STUDENT) ne sont significatives pour aucune des trois mesures : en revanche, si l'on excepte la première mesure, les différences sont significatives entre le *V. dahliae* et *V. albo-atrum* d'une part, la souche IF et le *V. albo-atrum* d'autre part.

FIGURE 2

Croissance de la souche IF, du *V. dahliae* et du *V. albo-atrum* sur milieu PSA.

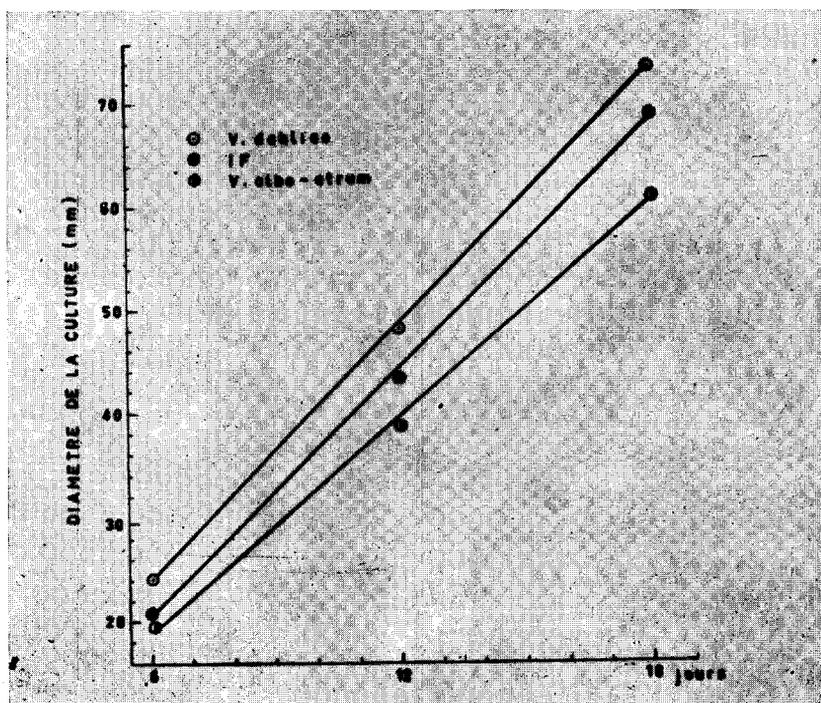


TABLEAU IV

Croissance diamétrale en fonction du temps de la souche I.F. du *V. Dahliae* et du *V. albo-atrum* sur milieu PSA

Souche	6 jours après repiquage		12 jours après repiquage		18 jours après repiquage	
	Diamètre de culture en mm *	Vitesse moyenne en mm par jour (jusqu'au 6 <sup>e</sup> jour)	Diamètre de culture en mm *	Vitesse moyenne en mm par jour (de 6 à 12 jours)	Diamètre de culture en mm *	Vitesse moyenne en mm par jour (de 12 à 18 jours)
IF	20,5 ± 1,1	3,4 ± 0,2	43,2 ± 1,6	3,9 ± 0,1	68,5 ± 2,1	4,2 ± 0,1
<i>V. dahliae</i>	24 ± 3,7	4 ± 0,6	48 ± 3	4 ± 0,2	73,2 ± 4,1	4,2 ± 0,2
<i>V. albo-atrum</i>	20 ± 0,8	3,3 ± 0,1	38,7 ± 0,9	3,1 ± 0,1	61 ± 3,0	3,7 ± 0,2

\* Moyenne de 12 mesures.

Les intervalles de confiance sont calculés, pour le risque 5 %, à l'aide de la table de Student.

Des résultats semblables ont été obtenus sur les milieux Avoine et « S » ; ils concordent avec ceux de VAN DER MEER (1925). En ce qui concerne la croissance, on peut donc conclure que la souche marocaine IF se rapproche du *V. dahliae* et que ces deux isolats croissent plus rapidement que le *V. albo-atrum*.

#### D — La formation des organes de conservation

La formation des microsclérotés chez la souche IF que nous avons déjà décrite au paragraphe I (p. 6) se déroule de la même manière que chez le *V. dahliae*. La seule différence qui existe entre le *V. dahliae* et IF porte sur la rapidité de la formation de ces organes. En effet, ils apparaissent plus tôt (6 à 7 jours après repiquage au lieu de 7 à 9 jours), et en plus grande quantité chez IF que chez le *V. dahliae*.

Le *V. albo-atrum* ne forme jamais de microsclérotés sur les milieux étudiés. Des hyphes cloisonnées, à paroi épaisse et pigmentée, sont observables dans la masse de la culture, après un délai dépassant souvent une dizaine de jours. Ces hyphes, formant le mycélium résistant, sont plus larges que les hyphes normales non enkystées ou en voie de le devenir, et ne bourgeonnent à aucun moment (PL. VII). Les cultures du *V. albo-atrum* se pigmentent plus tardivement que celles des deux autres *Verticillium* et ne prennent jamais la coloration noire sombre due à la présence des microsclérotés.

En ce qui concerne les organes de conservation on doit donc, une fois de plus, rapprocher la souche marocaine IF du *V. dahliae* puisque toutes deux édifient des microsclérotés tandis que le *V. albo-atrum* ne différencie que des hyphes enkystées.

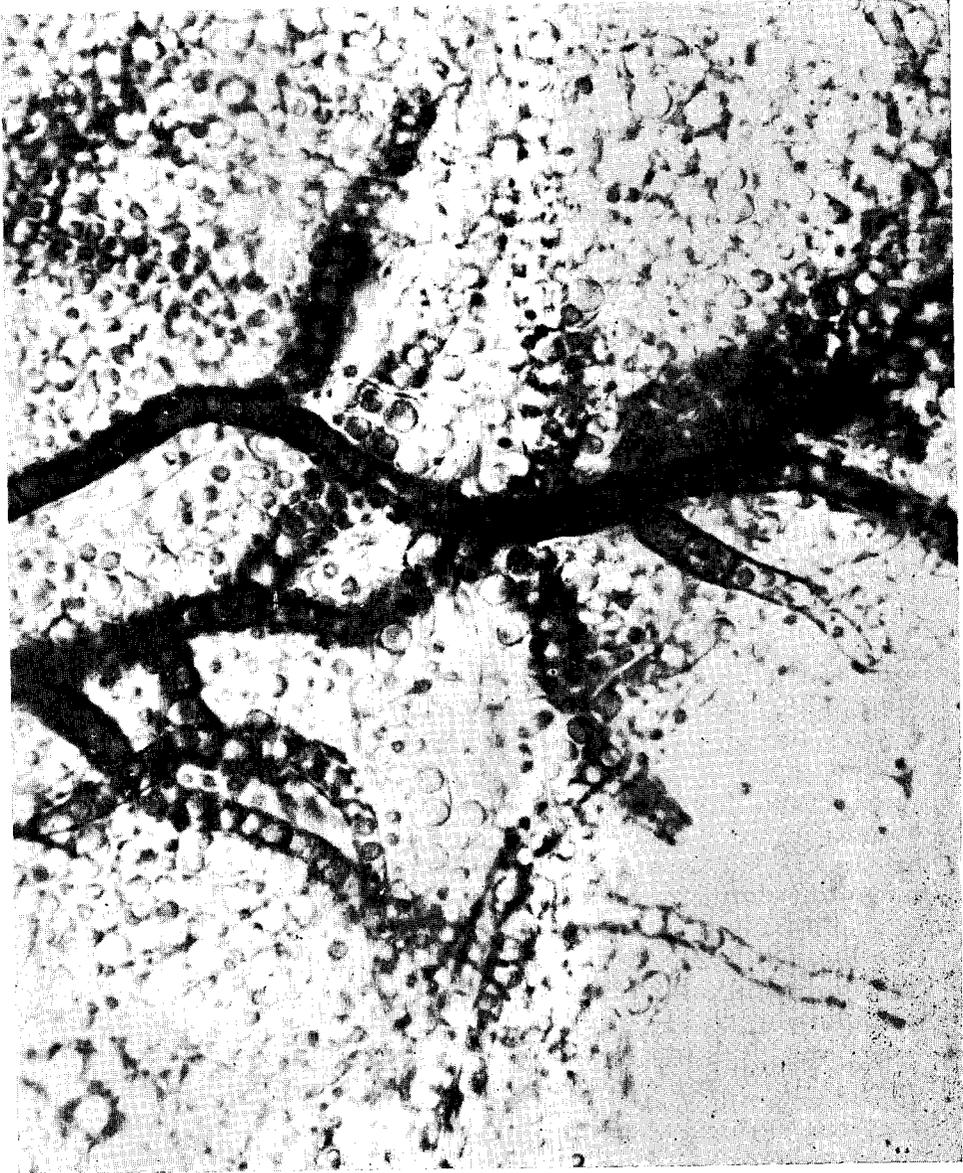
BRANDT et REESE (1964) ont montré, au cours de leurs études sur la morphogénèse chez le *Verticillium* qu'une substance diffusible, synthétisée par le champignon lui-même, est nécessaire à la formation des microsclérotés. L'absence de ces organes chez le *V. albo-atrum* peut être interprétée, entre autres hypothèses, par son incapacité de fabriquer le facteur morphogène diffusible. Autrement dit, le *V. albo-atrum* (souche ascclérotique) confronté avec la souche IF ou le *V. dahliae* (tous deux synthétisant ce facteur) devrait former des microsclérotés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience suivante en utilisant le milieu PSA :

La souche IF et le *V. albo-atrum* d'une part, le *V. albo-atrum* et le *V. dahliae* d'autre part, sont ensemencés simultanément sur une même boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Pour chaque cas, les

PLANCHE VII

Hyphes enkystées du *V. albo-atrum*

(G x 1330)



semis sont soit distants, soit proches l'un de l'autre. Dans le premier cas, ils sont déposés aux deux extrémités d'un diamètre de la boîte de Pétri, donc à une distance de 7 à 8 cm environ. Dans le deuxième cas, ils sont posés côte à côte, au centre de la boîte de Pétri. Des témoins sont constitués par des cultures pures du *V. albo-atrum*, de IF et du *V. dahliae*.

Cette expérience permet d'observer les résultats suivants (PL. VIII) :

— si les implants sont éloignés, aucune modification n'apparaît dans la formation des organes de conservation et la pigmentation des cultures.

— si les implants sont rapprochés, nous observons des microsclérotés et des hyphes enkystées en mélange dans la zone de contact de IF et du *V. albo-atrum* ; ceci peut s'expliquer de plusieurs manières dont la plus simple est d'admettre un emmêlement des deux thalles.

En confrontation avec IF, le *V. albo-atrum* montre une plus forte pigmentation que lorsqu'il est seul ou en confrontation avec le *V. dahliae*. L'examen microscopique permet d'observer, par ailleurs, une quantité d'hyphes enkystées plus grande que sur le témoin.

Ces observations montrent que s'il y a une substance diffusible, elle est capable d'intervenir au niveau de la mélanisation sur le *V. albo-atrum*, mais elle est incapable d'induire le bourgeonnement des cellules, phénomène nécessaire à la formation de vrais microsclérotés.

#### E — La taille des conidies

Pour chaque *Verticillium*, nous avons mesuré la longueur et la largeur de 150 spores en provenance de plusieurs cultures sur milieu PSA. Les résultats sont exprimés sous forme d'un tableau d'effectifs en fonction de la longueur et de la largeur des spores (TABL. V).

#### Légende :

1. *V. albo-atrum* - 2: IF - 3: I + 2 éloignés - 4: I + 2 rapprochés
5. *V. dahliae* - 6: I + 5 éloignés - 4: I + 5 rapprochés.
- R. Revers des cultures.

Les cultures sont âgées de 20 jours. Les boîtes ont 90 mm de diamètre.

PLANCHE VIII

Cultures mixtes de *V. albo-atrum* et de *Verticillium* à microscélérotés

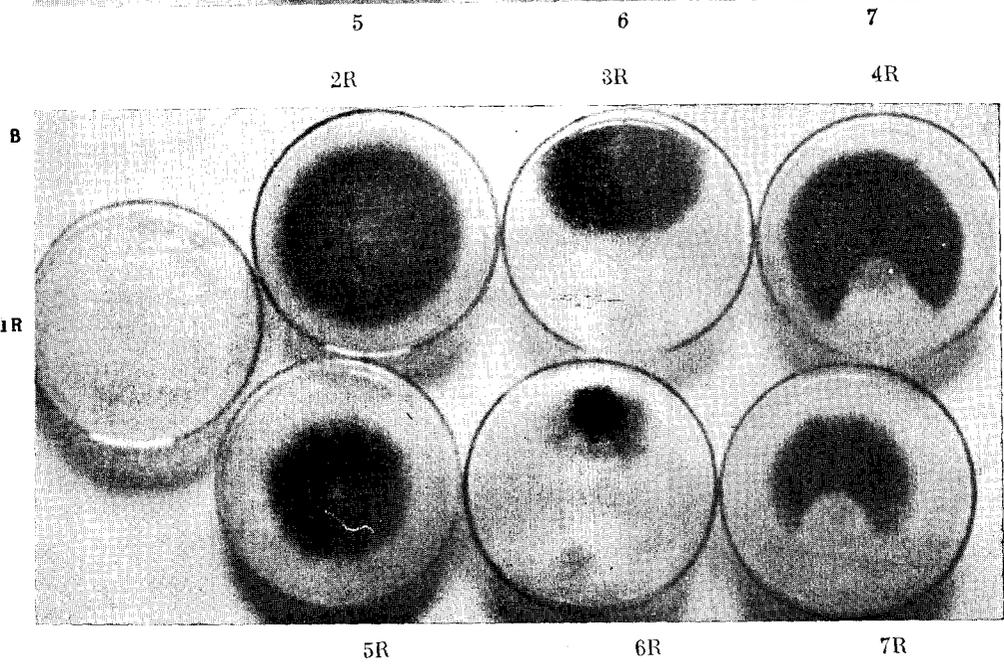
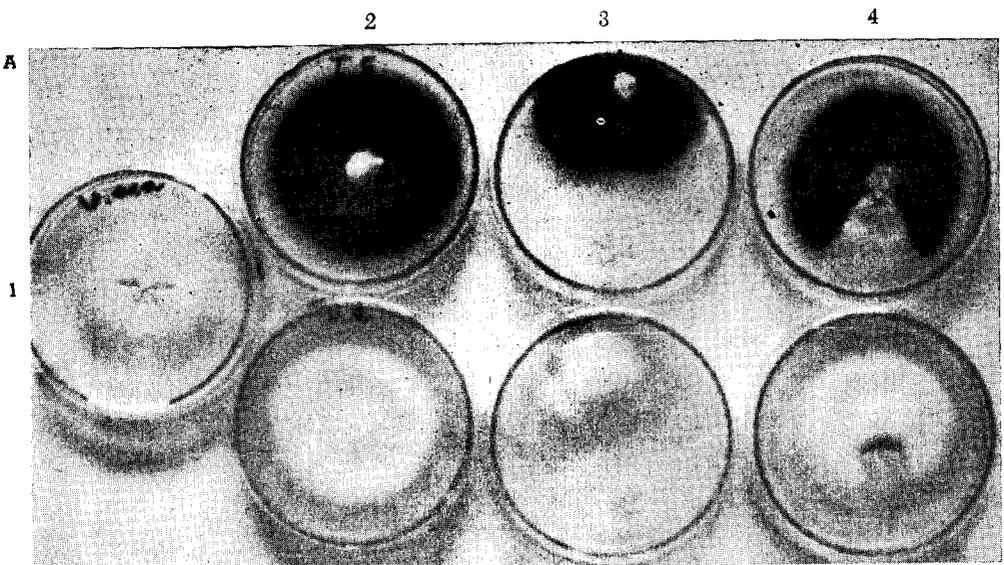


TABLEAU V  
Taille des conidies des 3 souches de *Verticillium* sur milieu PSA

Longueur Largeur	Espèces	Taille en $\mu$							Taille moyenne en $\mu$				
		1,32	1,98	2,64	3,30	3,96	4,62	5,28		5,94	6,60	7,26	7,92
Longueur	IF			2	3	38	60	35	9	3			4,68 $\pm$ 0,04
	<i>V. dahliae</i>			5	5	31	74	30	5	4	1		4,68 $\pm$ 0,05
	<i>V. albo-atrum</i>			2	6	15	42	37	25	13	9	1	5,21 $\pm$ 0,08
Largeur	IF	12	93	39	6								2,11 $\pm$ 0,05
	<i>V. dahliae</i>	32	97	21									1,91 $\pm$ 0,05
	<i>V. albo-atrum</i>	15	58	51	23	3							2,37 $\pm$ 0,05

— Les mesures sont faites avec l'objectif 90 à immersion. Une division du micromètre correspond à 0,66  $\mu$ .

— Les différences entre la longueur des spores du *V. albo-atrum* et celles du *V. dahliae* ou de la souche IF sont significatives, de même qu'entre les largeurs des conidies des trois souches.

Les conidies du *V. albo-atrum* qui mesurent en moyenne  $5,21 \times 2,37 \mu$  sont plus grandes que celles du *V. dahliae* ( $4,68 \times 1,91 \mu$ ) ; ces résultats sont analogues à ceux obtenus par VAN DER MEER (1925) et SMITH (1965). Les conidies de IF, qui mesurent en moyenne  $4,68 \times 2,11 \mu$ , sont de longueur égale à celle du *V. dahliae* et de largeur intermédiaire entre celle des deux espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum*.

En conclusion, si nous prenions la longueur des spores comme critère de distinction systématique, nous serions amenés à classer IF dans l'espèce *V. dahliae*. Nous pourrions également en faire une espèce à part, compte-tenu du fait que sa largeur est différente, d'une façon significative, de celle des deux autres *Verticillium*.

Nous avons signalé précédemment que PELLETIER et AUBE (1970) ont montré que les dimensions des conidies varient en fonction des conditions de milieu. Afin de mettre en évidence l'amplitude de cette variabilité, nous avons procédé à des mesures de longueur et de largeur de conidies provenant de cultures réalisées sur milieu PSA ou milieu « M » dans lesquels nous avons fait varier les proportions de saccharose et bouillon de pomme de terre pour le premier, de saccharose et de nitrate d'ammonium pour le second.

Les résultats obtenus (TABL. VI) indiquent que les spores sont plus longues sur milieu synthétique « M » ( $5,61 \mu$ ) que sur milieu naturel PSA ( $4,67 \mu$ ), mais qu'elles ont la même largeur sur les deux substrats. Quand on change la concentration des substances azotées et carbonnées, la largeur des spores est toujours plus grande en présence de fortes concentrations en saccharose (TABL. VI). La longueur subit aussi des variations, mais proportionnellement moins importantes. Par ailleurs, le rapport C/N, dont les différentes valeurs sont reportées dans le tableau VI, semble influencer les dimensions des spores et notamment la largeur. En effet, celle-ci devient plus importante et passe de  $2,11$  à  $2,70 \mu$  quand le rapport C/N est élevé (59) et diminue de  $2,11$  à  $2,04 \mu$  quand il est bas (2,4).

Ces constatations recourent celles faites par PELLETIER et AUBE (1970) qui ont observé des variations considérables dans la longueur des spores de chaque espèce, quand ils passent d'un milieu à un autre. En plus, ces auteurs ont remarqué que le milieu de culture affecte beaucoup plus la largeur des conidies que leur longueur. Nos résultats montrent en outre que les variations obtenues sont plus importantes sur le milieu naturel PSA que sur le milieu synthétique M.

TABLEAU VI

Influence des concentrations en saccharose et bouillon de pomme de terre (milieu PSA) et du rapport C/N (milieu « M ») sur la taille des conidies de IF

Longueur ou largeur	Milieu PSA		Milieu M		
	Concentrations	Moyenne en $\mu$	Longueur ou largeur	Concentrations et rapport C/N	Moyenne en $\mu$
Longueur	S P	4,67	Longueur	C N (11,8)	5,61
	5 S P	4,81		5 C N (59)	5,28
	$\frac{S}{5}$ P	5,08		$\frac{C N}{5}$ (2,4)	5,14
	P $\frac{S}{5}$	4,81		$\frac{C N}{2}$ (23,9)	5,34
	$\frac{S P}{5}$	4,95		$\frac{C N}{5}$ (11,8)	5,01
Largeur	S P	2,11	Largeur	C N (11,8)	2,11
	5 S,P	2,31		5 C N (59)	2,70
	$\frac{S P}{5}$	2,24		$\frac{C N}{5}$ (2,4)	2,04
	$\frac{S}{5}$ P	2,28		$\frac{C N}{2}$ (23,9)	2,11
	$\frac{SP}{5}$	2,31		$\frac{C N}{5}$ (11,8)	2,11

— Les lettres C et S indiquent le saccharose, N le  $NH_4NO_3$  et P le bouillon de pomme de terre.

— Les chiffres indiquent les concentrations ou dilutions des différentes substances.

En conclusion, nous pouvons donc dire que :

— La souche IF se rapproche plus du *V. dahliae* que du *V. albo-atrum*. Sur milieu PSA, les spores du *V. dahliae* et de la souche IF ont en effet la même longueur.

— Les dimensions des spores varient en fonction des conditions de milieu. Par exemple, la longueur des spores de la souche IF est de  $4,67 \mu$  sur milieu PSA, de  $5,61 \mu$  sur milieu « M » (TABL. VI). Supposons alors que nous comparons les spores de la souche IF cultivée sur milieu M et celles du *V. albo-atrum* cultivé sur milieu PSA : les mesures (TABL. V et VI) de longueur nous amèneront à conclure que les spores de la souche IF sont plus longues que celles du *V. albo-atrum* ( $5,61 \mu$  et  $5,21 \mu$ ) et du *V. dahliae* ( $5,61 \mu$  et  $4,68 \mu$ ). Cette conclusion est différente de celle obtenue lorsque les mesures sont faites sur un même substrat (milieu PSA : *V. albo-atrum*  $5,21 \mu$  - IF et *V. dahliae*  $4,68 \mu$ ). Il ressort de toute évidence que les critères morphologiques, tels que la taille des spores, doivent être définis dans des conditions identiques et que cet impératif doit être respecté si l'on veut que ces caractères aient une valeur taxonomique.

## F — Conclusions

### 1. Nature de la souche marocaine

La comparaison, basée sur l'étude de quatre caractères, que nous venons de faire permet de rapprocher le *Verticillium* sp., isolé sur tomate au Maroc, beaucoup plus du *V. dahliae* que du *V. albo-atrum*. En effet, la souche IF et le *V. dahliae* ont un revers de culture pigmenté en noir, une même vitesse de croissance, des spores de longueur identique, et édifient les mêmes organes de conservation, les microsclérotés. Si donc il existe deux espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum*, le *Verticillium* marocain responsable de la maladie du fil de la tomate est un *V. dahliae* : qu'en est-il alors de la différence entre les deux espèces ?

### 2. Considérations sur le *V. dahliae* et le *V. albo-atrum*

Nous avons déjà signalé à la fin de l'étude bibliographique (paragraphe II) qu'il est difficile de prendre position sur le problème de la validité des deux espèces. Rappelons, en effet, que selon les auteurs, les caractères utilisés ont une bonne valeur taxonomique ou n'en ont aucune.

A notre avis, pour comprendre l'ensemble des résultats obtenus et pour expliquer en même temps les contradictions apparentes, il faut admettre que l'on a affaire à une seule espèce de *Verticillium* en train d'évoluer à l'heure actuelle et dont les individus peuvent théoriquement appartenir à tous les intermédiaires possibles entre les individus les plus différents. Les auteurs ont tous travaillé avec deux souches qui, le hasard aidant, peuvent être ou très proches ou, au contraire, très différentes. Cette explication n'est bien sûr qu'une hypothèse ; elle présente cependant l'avantage de pouvoir être testée expérimentalement en étudiant un échantillon aussi vaste et aussi divers que possible de la population de *Verticillium*.

En attendant que de nouvelles données soient apportées, nous considérerons les *V. dahliae* et *V. albo-atrum* comme une seule espèce que nous dénommerons *Verticillium albo-atrum* REINKE et BERTHOLD pour respecter la règle d'antériorité.

## DEUXIEME PARTIE

**INFLUENCE DU pH ET DE LA NUTRITION AZOTEE  
ET CARBONEE SUR LA CROISSANCE  
ET SUR LA FORMATION DES ORGANES DE RESISTANCE**

Les microsclérotos du *Verticillium* sont formés de deux sortes de cellules (paragraphe I, p. 6), les unes hyalines à paroi mince, les autres à paroi épaisse et mélanisée. Ces dernières sont les plus nombreuses; on leur a attribué divers rôles (SCHNATHORST, 1965) : de protection, de réserve, de résistance. L'étude de l'ultrastructure des microsclérotos (NADAKAVUKAREN, 1962, BROWN et WYLLIE, 1970) a montré que les cellules mélanisées contiennent des lipides, des hydrates de carbone, des mitochondries, des ribosomes et d'autres inclusions; elles possèdent donc tous les organites nécessaires à la germination. Toutefois, il semble que les deux types de cellules (hyalines et mélanisées) jouent un rôle au moment de la germination (ISAAC et MAC GARVIE, 1962).

Dans un sol ne portant pas de plante sensible au parasite, la présence des autres micro-organismes empêche la germination des microsclérotos. Cette fongistase peut persister pendant 14 ans sans que la vitalité des microsclérotos soit altérée (WILHELM, 1955). Lorsqu'une plante sensible est cultivée, des substances libérées par ses racines entraînent des changements dans la rhizosphère et stimulent la germination des microsclérotos (SCHREIBER et GREEN, 1963). Le tube germinatif ou les conidies vont infecter la plante hôte en pénétrant par les blessures de la racine.

Cet aperçu bibliographique montre l'importance des microsclérotos dans le cycle naturel du parasite. Etant donné le mode d'infection des plantes hôtes, il faut s'attendre à des attaques d'autant plus graves que le sol est plus fortement infesté par des microsclérotos. C'est ce que l'on observe quand on fait des cultures de tomate plusieurs fois sur le même terrain : les dégâts de plus en plus importants sont à l'origine de l'abandon des parcelles trop contaminées. MARTINSON (1963), travaillant avec un autre organisme à sclérote, le *Rhizoctonia solani*, a montré par ailleurs que le potentiel d'inoculum fait intervenir, en partie, la quantité d'organes de conservation présents dans le sol. Des expériences effectuées avec le *Verticillium* ont

prouvé que le potentiel d'inoculum diminue avec l'utilisation d'amendements riches en azote (WILHELM, 1951). De même la gravité de la maladie varie avec le pH du sol : elle diminue lorsqu'il est compris entre 4,2 et 4,8, s'accroît au contraire quand il passe de 4,6 à 6,2 (WILHELM, 1950).

Les facteurs précédents peuvent intervenir, entre autres hypothèses, au niveau de la formation des microsclérotés. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'influence du pH et celle de la nutrition carbonée et azotée sur la croissance et sur la formation des organes de conservation des souches de *Verticillium*.

### I. - Influence du pH sur la croissance et sur la formation des organes de conservation

Le pH peut intervenir en même temps sur la croissance des thalles et sur l'édification des microsclérotés. Bien que ces deux aspects aient été étudiés au cours d'une même expérience, nous les exposons séparément pour plus de clarté et nous comparerons les deux effets du pH dans la conclusion du paragraphe. Nous envisagerons également de quelle manière le pH intervient dans la morphogénèse des thalles du *V. dahliae* et du *V. albo-atrum*.

#### A — Technique

Le milieu de base retenu pour étudier l'influence du pH est le milieu « M » utilisé par MALCA et collaborateurs (1966), qui ont montré qu'une concentration en phosphate de 0,190 M donne au milieu un pouvoir tampon convenable, sans pour autant modifier la croissance de façon notable. En conséquence, la gamme de pH utilisée au cours de nos expériences a été obtenue à partir d'un mélange de phosphate mono et bipotassique, tous deux à 0,190 M. Les mesures de pH faites, avant et après autoclavage, montrent que le pH varie très peu au cours de la stérilisation.

Des expériences préliminaires sur le pH ont permis de constater que la croissance est nulle à pH 3,2, qu'elle démarre lentement et s'arrête définitivement au bout de quelques jours à un pH voisin de 4,3. La gamme de pH utilisée a donc comme limite inférieure 4,6 ; la limite supérieure de 7,2 n'a pu être dépassée avec les mélanges tampons employés. En effet, des précipités blancs apparaissent dès que nous dépassons le pH 7,3. Certains auteurs tels que HEALE et ISAAC (1965) ont pu arriver jusqu'à pH 8,6.

Les souches utilisées IV A et IF proviennent de deux régions différentes du Maroc, IV A du Sud d'Agadir et IF de Mansouriah,

FIGURE 4  
 Courbes de croissance de la souche marocaine IF en fonction du temps à différents pH.

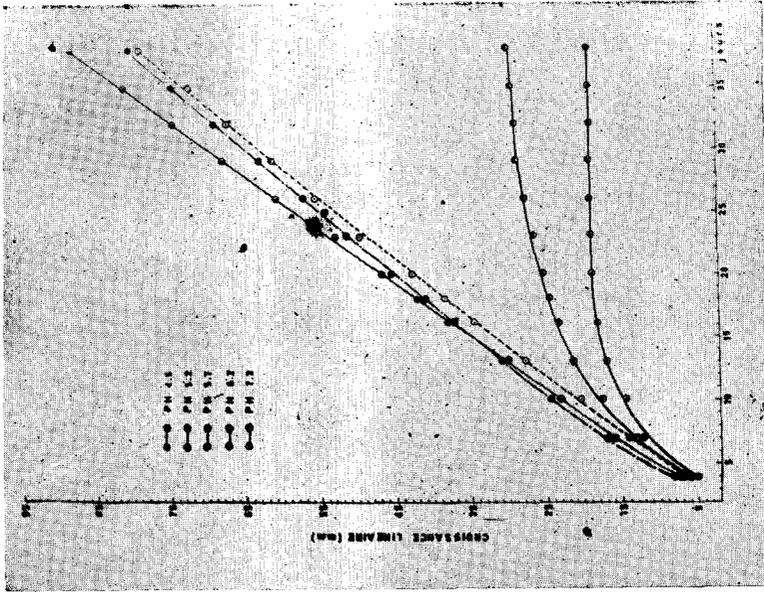
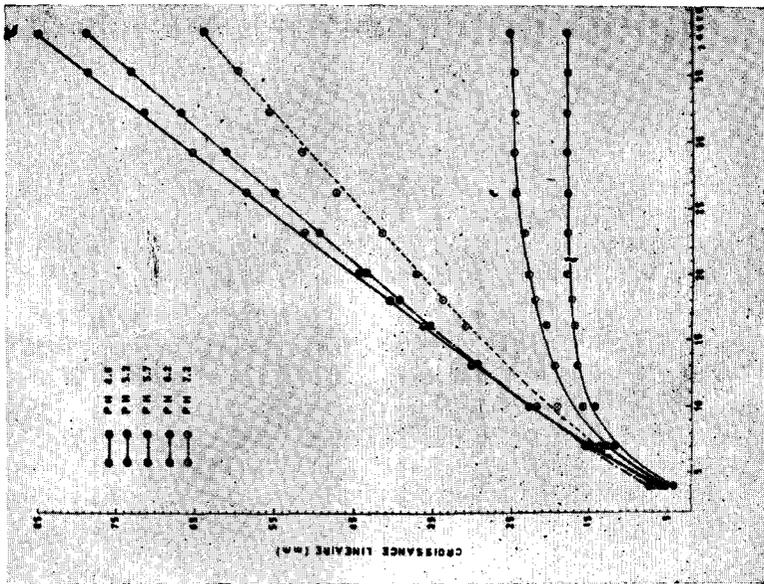


FIGURE 3  
 Courbes de croissance de la souche marocaine IV A en fonction du temps à différents pH.



Pour éviter le brunissement du milieu « M », nous avons stérilisé dans des tubes à part le saccharose et la gélose. Le mélange des contenus des différents tubes, qui constituera 20 ml de milieu « M » est réalisé à chaud, après autoclavage dans des tubes de 22 cm de long. Ces derniers, stérilisés auparavant avec un double bouchon en coton, vont être refroidis à l'horizontale de manière à obtenir une épaisseur constante de substrat (VIGOUREUX et CASTELLAIN, 1969). Le retrait du second bouchon intervient au moment du repiquage. Ces tubes, au nombre de 11 par pH sont, ensuite, ensemencés avec des cylindres de culture de 0,6 mm de diamètre et de 5 mm de haut, pris dans un anneau de microsclérotés situé à 22 mm du semis d'une culture noire sur milieu PSA, âgée de 39 jours.

La température d'incubation, voisine de 25° C, est située dans la zone de croissance optimale du *Verticillium* (MALCA et Coll., 1966 - VIGOUREUX et CASTELLAIN, 1969).

#### B — Influence du pH sur la croissance des souches marocaines

La croissance linéaire est mesurée, d'abord, chaque jour, pendant deux semaines, ensuite, tous les deux jours jusqu'au moment où la culture envahit tout le milieu gélosé.

##### 1. Croissance en fonction du temps à différents pH

Dans les figures 3 et 4, il est possible d'observer, pour chaque souche, deux types de courbes d'allures très différentes. Le premier type apparaît aux pH 4,6 et 5,2 : la croissance démarre rapidement, ralentit et cesse alors qu'une petite partie seulement du milieu est envahie par la culture. Dans le second type, aux pH 5,7 - 6,2 et 7,2, la croissance se poursuit à vitesse variable selon le pH jusqu'à l'envahissement total du milieu gélosé. Les variations précédentes ont été précisées en calculant la vitesse de croissance journalière moyenne en fonction du temps (TABL. VII et VIII). Cette vitesse est maximale vers le 7<sup>e</sup> jour, à tous les pH et pour les deux souches sauf à pH 7,2 pour IV A (maximum atteint vers le 10<sup>e</sup> jour). Au-delà de cette période, elle décroît rapidement à pH 4,6, un peu plus lentement à pH 5,2 et tend progressivement vers zéro. En revanche, aux autres pH, la vitesse diminue légèrement après le 7<sup>e</sup> jour, mais reste relativement constante pendant plusieurs semaines avant de décroître petit à petit lorsque le milieu est presque entièrement envahi par la culture.

## 2. Croissance en fonction du pH

Nous venons de voir que la vitesse de croissance varie avec le temps et peut rester constante, pendant plusieurs semaines au moins, à certains pH. Il est donc nécessaire, pour bien apprécier la croissance en fonction du pH de tenir compte de l'âge de la culture. C'est pourquoi nous avons pris en considération, pour tracer les courbes de croissance en fonction du pH, trois âges différents, 7 jours, 16 jours et 26 jours (fig. 5 et 6).

Pour les cultures âgées de 7 jours, la croissance est maximale à pH 6,2 pour la souche IV A, à pH 5,7 pour la souche IF. Les résultats concernant les thalles âgés de 16 et 26 jours sont homogènes pour les deux souches. La croissance est maximale à pH 5,7. Elle diminue rapidement quand le pH devient plus acide ; elle s'abaisse également, mais plus lentement quand le pH augmente.

Tous ces résultats ont été interprétés statistiquement par le test « t » de STUDENT. Les différences de croissance enregistrées aux pH 4,6 - 5,2 et 5,7 sont significatives quel que soit l'âge du thalle. En revanche, les différences entre les croissances à pH 5,7 et 6,2 ne sont significatives que pour des thalles âgés de plus de 23 jours. Quant à la différence qui existe entre les moyennes correspondant aux pH 6,2 et 7,2 elle est significative pour les cultures de IF âgées de 26 et 38 jours et ne l'est, à aucun moment, pour la souche IV A.

## 3. Comparaison des deux souches marocaines

Le test « t » ne révèle aucune différence significative entre la croissance des deux souches aux pH 4,6 - 5,2 - 5,7 et 6,2 sauf pour les deux derniers pH et seulement quand les thalles sont âgés de plus de 29 jours. Ces résultats apparaissent clairement quand on compare les mesures portées dans les tableaux VII et VIII. A pH 7,2, la croissance de IV A est plus importante que celle de IF et la différence est significative après quelques jours de croissance.

En définitive, cette comparaison permet de conclure que les différences qui existent entre les deux souches marocaines sont peu importantes.

## 4. Conclusions

Des différents résultats obtenus précédemment, nous retiendrons que le pH optimum pour la croissance se situe entre 5,7 et 6,2. A pH acide, la croissance diminue très rapidement, essentiellement

FIGURE 6  
 Courbe de croissance de la souche IF en fonction du pH.

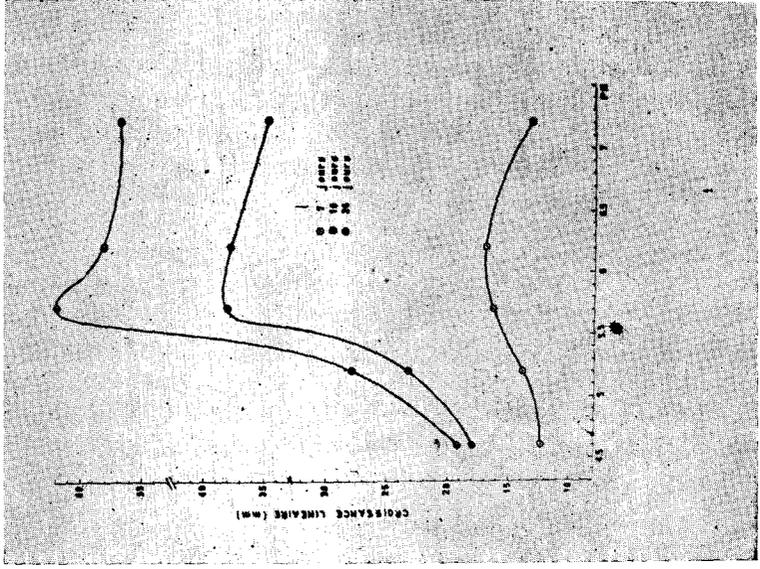


FIGURE 5  
 Courbe de croissance de la souche IV A en fonction du pH.

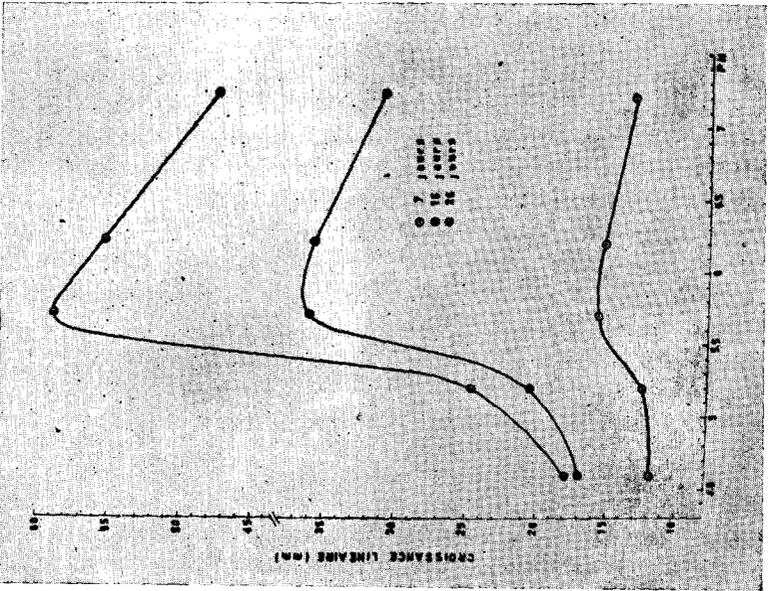


TABLEAU VII

Influence du pH sur la vitesse de croissance de la souche IV A

pH	Age de la culture (jours)							
	4	7	10	16	23	26	29	35
4,6	1,2	2,5	1,6	0,6	0,16	0,06	0,03	0
5,2	1,6	2,5	1,9	0,9	0,6	0,4	0,4	0,1
5,7	1,9	2,9	2,5	2,5	2,6	2,7	2,5	2,4
6,2	2,0	3,0	2,7	2,2	2,3	2,0	2,0	2,0
7,2	1,8	2,0	2,2	2,3	2,3	2,1	2,0	2,0

TABLEAU VIII

Influence du pH sur la vitesse de croissance de la souche IF

pH	Age de la culture (jours)							
	4	7	10	16	23	26	29	35
4,6	1,0	2,6	1,7	0,5	0,1	0	0	0
5,2	1,3	2,5	1,7	0,8	0,5	0,4	0,2	0,01
5,7	1,7	3,0	2,5	2,3	2,6	2,5	2,4	2,0
6,2	1,8	2,6	2,5	2,2	2,3	1,9	2,0	1,9
7,2	1,6	2,1	2,0	2,0	1,8	1,8	1,6	1,4

La vitesse exprimée en mm par jour, est calculée sur les 4 premiers jours, puis entre 4 et 7 jours, entre 7 et 10 jours etc...

parce que le thalle cesse de s'allonger bien avant que le milieu soit entièrement envahi. En revanche, aux pH supérieurs à l'optimum, la vitesse de croissance diminue beaucoup plus lentement et peut se poursuivre indéfiniment, dans les limites de l'expérience.

C — Influence du pH sur la formation des microsclérotés des souches marocaines

La formation des microsclérotés est appréciée par la pigmentation noire qui apparaît à l'œil nu ; la mesure dans le tube de la

longueur de la zone pigmentée donne une idée de la surface de culture portant des microscélérotés.

Chez les deux souches marocaines IV A et IF, la couleur est visible dès le 6<sup>e</sup> jour aux pH 6,2 et 7,2. Les microscélérotés forment un anneau noir circulaire qui entoure une surface sans microscélérotés, au niveau de l'implant. Cette surface se pigmente à son tour, quelques jours plus tard. Ce phénomène est identique à celui décrit précédemment sur le milieu PSA (p. 9). Aux pH 4,6 et 5,2, le thalle ne se pigmente jamais. Le tableau IX montre, en effet, que les cultures âgées de 26 jours n'ont pas différencié de microscélérotés aux pH 4,6 - 5,2 et même à pH 5,7. Néanmoins, à pH 5,7, la souche IF forme, au bout de deux mois environ, et en faible quantité, des microscélérotés mélanisés.

A pH 6,2, la zone pigmentée représente environ 43 % de la surface du thalle chez IF et 36 % chez IV A. A pH 7,2, la zone pigmentée est beaucoup plus étendue : 80 % chez IF et 89 % chez IV A de la surface du thalle.

Des résultats précédents, il ressort que le pH influence fortement la morphogénèse des microscélérotés qui ne se forment pas aux pH acides 4,6 et 5,2. A pH 5,7, ils apparaissent tardivement et toujours en nombre très faible. En revanche, ces organes de conservation se forment bien à pH supérieur à 5,7.

#### D — Comparaison entre la souche marocaine IF, le *V. dahliae* et le *V. albo-atrum*

L'expérimentation qui a permis de faire cette comparaison est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. La valeur limite de pH dans cette expérience est de 6, car aux pH inférieurs et pour la souche IF, nous avons vu qu'il n'y a pas formation de microscélérotés.

De cette expérience, nous pouvons tirer les résultats suivants (tabl. X) :

— la croissance de la souche IF et du *V. albo-atrum* diminue quand le pH augmente de 6 à 7,3. Celle du *V. dahliae* est maximale à pH 6,4. Cependant, le test « t » ne révèle pas de différence significative entre les croissances aux pH 6,4 et 6,9 ; ce qui laisse supposer que le pH optimal de croissance est situé entre 6 et 6,9, plutôt voisin de 6,4 ;

— la souche IF forme des microscélérotés en abondance 6 à 7

TABLEAU IX

Influence du pH sur la croissance et sur la formation des microsclérotés des souches IF et IV A

pH	IF		IV A	
	Longueur de la culture en mm	Longueur de la zone pigmentée en mm	Longueur de la culture en mm	Longueur de la zone pigmentée en mm
4,6	18 ± 1,4	0	19,2 ± 1,2	0
5,2	24,7 ± 1,2	0	27,9 ± 1,6	0
5,7	58,4 ± 0,9	0	61,5 ± 1,3	0
6,2	54,8 ± 1,2	24	57,7 ± 0,7	21
7,2	47 ± 1,6	41	56,1 ± 2,50	50

— Ces mesures sont faites 26 jours après l'ensemencement.

— Les intervalles de confiance sont calculés à l'aide de la table « t » pour un coefficient de sécurité de 95 %.

TABLEAU X

Influence du pH sur la croissance et sur la formation des organes de conservation de la souche marocaine IF, du *V. dahliae* et du *V. albo-atrum* \*

pH	IF		<i>V. dahliae</i>		<i>V. albo-atrum</i> *
	Longueur de la culture en mm	Longueur de la zone pigmentée en mm	Longueur de la culture en mm	Longueur de la zone pigmentée en mm	Longueur de la culture en mm
6	59 ± 5,9	0	52 ± 6,6	0	50,5 ± 1,8
6,4	51,5 ± 3,3	43 très dense	58 ± 0,5	0	40,5 ± 2,3
6,9	49 ± 3,6	41 très dense	56 ± 1,1	0 *	38,5 ± 1,4
7,3	36,5 ± 3,6	28 dense	43,5 ± 5,8	Anneau d'épaisseur de 6 à 8 mm assez dense	33,5 ± 2,5

\* A l'œil nu aucune couleur n'apparaît; on ne peut donc rien dire sur la présence des organes de conservation.

Ces mesures sont faites 25 jours après l'ensemencement.

Les intervalles de confiance sont calculés, à l'aide de la table « t » pour un coefficient de sécurité de 95 %.

jours après ensemencement, à un pH supérieur ou égal à 6,4. Le *V. dahliae* ne forme, et en faible quantité, des microsclérotés qu'au pH 6,9 et pas avant une période de 29 jours. En revanche, à pH 7,3, les microsclérotés apparaissent plus tôt, environ 13 jours après ensemencement. Le *V. albo-atrum* ne forme pas d'organes de conservation aux pH étudiés, ce qui concorde avec les résultats obtenus par HEALE et ISAAC (1965), selon lesquels les hyphes enkystées du *V. albo-atrum* ont un pH optimum de production situé entre 8 et 8,6.

La comparaison entre les trois souches montre qu'aux pH étudiés la croissance du *V. albo-atrum* est toujours inférieure à celle des deux autres. La croissance du *V. dahliae* est également plus importante que celle de IF sauf au pH 6. Ceci nous amène à dire que les deux souches ne répondent pas de la même manière à l'influence du pH, ce qui est vrai aussi quant à la formation des microsclérotés.

#### E — Conclusions et discussions

Cette étude de l'influence du pH sur la croissance et la formation des microsclérotés nous a permis de constater que le pH optimum de formation des microsclérotés diffère de celui de la croissance, ce qui laisse supposer que les métabolites utilisés en vue de la croissance sont synthétisés de façon différente de ceux nécessaires à la formation des organes de conservation. Le même résultat est obtenu chez le *V. dahliae* (TABL. X).

Par ailleurs, la comparaison de la souche IF et des deux souches de référence montre que ces trois *Verticillium* n'ont pas un comportement identique vis-à-vis du pH. Les trois souches n'ont pas le même pH optimum de croissance et n'édifient pas leurs organes de conservation au même rythme aux différents pH étudiés. En effet, le *V. albo-atrum* ne forme point d'hyphes enkystées alors que la souche marocaine présente des organes de conservation, sauf à pH 6. Le *V. dahliae* n'édifie des microsclérotés qu'à un pH alcalin 7,3 dans notre expérience. Mais il faut noter cependant que la quantité de microsclérotés formés sur milieu « M » à pH 7,3 (ceci est vrai aussi sur milieu PSA) est beaucoup plus importante chez IF que chez le *V. dahliae*.

Ce comportement peut être dû au génotype de cette souche ; il peut également se justifier par l'isolement relativement récent de la souche marocaine. Cette constatation rejoint, d'ailleurs, celle notée

par RUDOLPH (1931) et PRESLEY (1941) pour qui une souche de *Verticillium* finit par perdre sa capacité de former des microsclérotos avec le vieillissement qu'implique la fréquence des repiquages.

Au Maroc, le pH du sol où l'on a pu isoler le *Verticillium* sp., type à microsclérotos, est situé, généralement, entre 7,5 et 8 (PINEAU, communication personnelle). Ainsi, tous les sols de la station Dar Bouazza où certaines souches de *Verticillium* sp. ont été isolées, ont des pH alcalins compris entre 7,4 et 7,9 (DRA, fiche technique).

Nous voyons ainsi que les résultats trouvés confirment bien ceux observés dans la nature. Nous avons, en effet, déjà remarqué que la gravité de la maladie diminue quand le pH est compris entre 4,2 et 4,8 et qu'elle s'accroît dès que le pH passe de 4,6 à 6,2. A cet égard, il convient de faire remarquer que dans la région de Larache où le pH du sol est acide (PINEAU, communication personnelle), la tomate est surtout attaquée par le *Fusarium* sp. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le *Verticillium* se développe mal à pH acide, mais aussi par l'absence de microsclérotos dans le sol, due au caractère neuf de ce dernier ou au pH acide qui ne favorise point la formation de ces organes de conservation.

Nous avons vu au paragraphe III que le milieu PSA, dont le pH est de  $6,6 \pm 0,1$ , permet la formation des deux types d'organes de conservation, les microsclérotos chez la souche IF et le *V. dahliae*, et les hyphes enkystées chez le *V. albo-atrum*. Ainsi, à un même pH, le *V. dahliae* forme des microsclérotos sur milieu PSA et n'en différencie pas sur le milieu « M ». Il en va de même pour le *V. albo-atrum* qui montre des hyphes enkystées sur milieu PSA, mais pas sur milieu « M » et cela même à pH 7,3.

Ces différentes remarques nous incitent à penser que le milieu joue un rôle fort important dans la formation des organes de conservation. C'est ce rôle que nous étudierons maintenant.

## II. Influence de la nutrition azotée et carbonée sur la croissance et sur la formation des microsclérotos d'une souche marocaine

Les expériences destinées à déterminer l'influence de la nature et de la concentration de différentes sources azotées et carbonées sur la croissance et la formation des structures de résistance chez le *Verticillium* ont été réalisées, à notre connaissance, sur des milieux synthétiques (BANNEY, 1961 ; GUSEVA et Coll., 1966 ; MALCA et Coll., 1966 ; HEALE et ISAAC, 1965). Nous venons de signaler que les

souches avec lesquelles nous avons travaillé se comportent différemment sur milieu « M » et sur milieu PSA.

Un essai préliminaire a été effectué avec la souche IF sur les milieux PSA, « S » de MESSIAEN et « P » de PRESLEY \* aux pH 6,5 - 7 et 7,5 favorables à la formation des microsclérotés, pour confirmer les observations précédentes. Les résultats (TABL. XI) montrent qu'indépendamment du pH le milieu joue un grand rôle dans la formation des organes de conservation. En effet, quel que soit le pH, la surface recouverte de microsclérotés est toujours plus étendue sur le milieu naturel (PSA) que sur les milieux synthétiques

TABLEAU XI

Influence du pH et de la nature du milieu  
sur la formation des microsclérotés de IF

Milieu	pH initial	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)
PSA	6,5	67	62
	7	70	63
	7,5	66	62
S	6,5	64	16 + anneau de 10 (peu dense) + anneau de 10 (dense)
	7	60	14 + anneau de 10 (peu dense)
	7,5	65	6 + secteurs de densité variable
P	6,5	65	surface allongée de 8/6 (peu dense) + anneau de 4 (peu dense)
	7	61,5	11 peu dense + anneau de 4 (très peu dense)
	7,5	68	très variable de 0 à 10 (très peu dense)

Ces mesures sont faites 18 jours après ensemencement.

Les différents pH sont obtenus par un mélange de phosphate mono et bipotassique à 0,190 m.

\* La composition de ce milieu est la suivante :  $MgSO_4$  : 0,5 g;  $KH_2PO_4$  : 1,5 g;  $NH_4NO_3$  : 0,05 g;  $KNO_3$  : 2 g; Asparagine : 1,5 g; Dextrose (dans nos expériences saccharose) : 20 g; Agar : 20 g; eau distillée : 1 000 ml.

(« S » et « P »). La même conclusion peut être tirée d'un essai mettant en jeu la souche IF, le *V. dahliae* en culture sur milieu PSA, milieu avoine et milieu « S » (TABL. XII).

Par ailleurs, d'autres expériences ont permis de constater que des dilutions du bouillon de pomme de terre et de saccharose entraînent des modifications dans l'aspect, la forme et la croissance du mycélium.

A la suite de ces diverses remarques, il nous a paru utile d'étudier la croissance et la formation des organes de conservation de la souche IF dans un milieu naturel (PSA) et dans un milieu synthétique (milieu M), dans lesquels les quantités de sources d'azote et de carbone varient aussi bien en valeur absolue qu'en valeur relative.

TABLEAU XII

Influence de la nature du milieu sur la formation des organes de résistance des 3 souches IF, *V. dahliae* et *V. albo-atrum*

Souches	Milieux	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)
IF	PSA	71 ± 3,7	63 très dense
	Avoine	68 ± 3,5	59 assez dense
	S	68 ± 3,5	50 assez dense
<i>V. dahliae</i>	PSA	78 ± 4,1	59 assez dense
	Avoine	76 ± 4	54 assez dense
	S	77 ± 4	0
<i>V. albo-atrum</i>	PSA	57 ± 3	anneau de 10 de large à 9 du centre
	Avoine	60 ± 3,3	25 très peu dense
	S	59 ± 3,1	0

Ces mesures sont faites 18 jours après ensemencement.

Les intervalles de confiance sont calculés à l'aide de la table « t » pour un coefficient de sécurité de 95 %.

A — *Croissance radiale et formation des organes de conservation dans un milieu naturel*

Parmi les milieux naturels testés, milieu Avoine, milieu à base de maïs et milieu PSA nous avons retenu le dernier parce qu'il permet la formation de la plus grande quantité de microsclérotés.

1. *Influence de la dilution du milieu de base*

Un même bouillon de pomme de terre contenant du saccharose est dilué 5 fois puis 10 fois ; la quantité de gélose reste proportionnelle à la quantité de milieu. Les implants ont 0,6 mm de diamètre et la température d'incubation est de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ . Cinq répétitions sont réalisées pour chaque dilution. Les diamètres des thalles et de la zone pigmentée recouverte de microsclérotés figurent dans le tableau XIII.

La croissance diamétrale est la même sur les trois milieux. En fait, la densité du mycélium décroît quand la dilution augmente. De plus, sur milieu PSA dilué, la croissance s'arrête sur certaines zones de la marge et continue sur d'autres ; le thalle est alors constitué d'un ensemble de secteurs qui s'étalent côte à côte, formés de filaments très ramifiés d'où le qualificatif de « buissonnante » que nous avons donné à cette forme du thalle.

TABLEAU XIII

**Influence de la dilution du milieu PSA sur la croissance et sur la formation des microsclérotés de la souche IF**

Dilutions	pH initial	Diamètre moyen la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)
PSA	6,7 - 6,8	48,5	35,5 très dense
$\frac{\text{PSA}}{5}$	7,4	49,5	peu appréciable
$\frac{\text{PSA}}{10}$	7,3	47	Microsclérotés dispersés (très peu dense)

Les variations de pH sont dues aux dilutions du milieu PSA.

Les mesures sont faites 13 jours après l'ensemencement,

Les microscélérotés n'apparaissent sur milieu PSA dilué 5 fois que 13 jours après repiquage ; ils reproduisent l'aspect « buissonnant » du thalle (PL. IX, 4). Sur milieu PSA dilué 10 fois, ils sont toujours peu nombreux et restent dispersés dans la culture.

En définitive, la dilution du milieu PSA se traduit dans la morphologie du thalle (« formes buissonnantes » et conduit à la formation d'un nombre réduit de microscélérotés. La variation de pH qui accompagne la dilution (TABL. XIII) ne peut être tenue pour responsable des modifications enregistrées. En effet, il apparaît dans le tableau XI que des variations de même amplitude, sur un substrat identique, ne modifient ni l'aspect des cultures, ni le diamètre des zones recouvertes de microscélérotés. Les effets enregistrés après dilution du milieu de base doivent donc être rapportés à la concentration plus faible en substances nutritives.

## 2. Influence des variations de la concentration en saccharose et en bouillon de pomme de terre

### a. Méthodes d'étude

Dans une première série d'expériences, la quantité de bouillon de pomme de terre (200 g par litre) reste constante tandis que la concentration en saccharose varie :

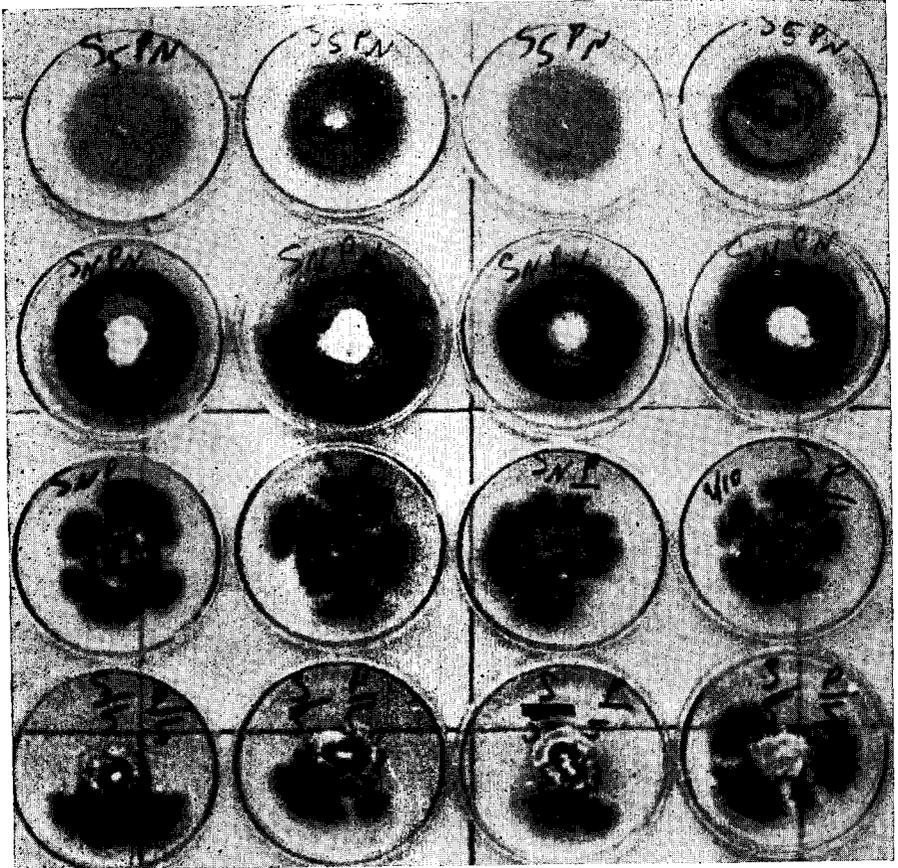
- 20 g de saccharose par litre : S P
- 4 g de saccharose par litre : S/5 - P
- 2 g de saccharose par litre : S/10 - P
- 1 g de saccharose par litre : S/20 - P
- pas de saccharose : S

Au cours d'une seconde série d'essais, la quantité de saccharose reste constante (20 g/l) ; seule la concentration en bouillon de pomme de terre varie :

- Bouillon de pomme de terre dilué 5 fois = P/5 - S
- Bouillon de pomme de terre dilué 10 fois = P/10 - S
- Bouillon de pomme de terre dilué 20 fois = P/20 - S
- Milieu sans bouillon de pomme de terre = S

## PLANCHE IX

Influence des variations du rapport  
Saccharose/bouillon de pomme de terre du milieu PSA sur  
la croissance et sur la formation des microsclérotés de la souche IF



1. Saccharose concentré 5 fois. Bouillon de Pomme de Terre à concentration normale
2. Milieu PSA à concentration normale : témoin.
3. Saccharose à concentration normale, bouillon de Pomme de Terre dilué 5 fois. Le thalle perd sa forme circulaire et il y a apparition des « formes buissonnantes ».
4. Saccharose dilué 5 fois, bouillon de Pomme de terre dilué 5 fois. Apparition des « formes buissonnantes ».

Les cultures sont âgées de 26 jours.

Les boutures ont 0,6 mm de diamètre ; la température d'incubation est de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ . Cinq répétitions sont réalisées pour chaque condition. Les boîtes de Pétri utilisées ont un diamètre de 90 mm et contiennent 30 ml de milieu.

Les mesures de pH des différents milieux avant stérilisation permettent de constater (TABL. XIV) que la dilution du bouillon de pomme de terre fait augmenter le pH du milieu (6,6 pour le témoin à 7,4 pour le milieu S - P/20). Ces variations du pH devront être prises en considération lors de l'interprétation des résultats. Notons cependant qu'elles restent compatibles avec une formation normale des microsclérotés (TABL. XI). La dilution du saccharose n'entraîne pas de modification de pH.

Les mesures de croissance diamétrale sont effectuées après 19 jours de culture (TABL. XIV). Elles ne donnent qu'une idée de la croissance pondérale du thalle, car elles ne tiennent pas compte de la quantité de mycélium aérien. Ce dernier est, par exemple, beaucoup plus abondant sur milieu PSA (témoin) que sur bouillon de pomme de terre sans saccharose (milieu P).

La quantité de microsclérotés est estimée après 25 jours de culture par la moyenne de 8 à 12 comptages faits à partir de boîtes différentes (TABL. XIV). Chacun de ces comptages donne le nombre de microsclérotés contenus dans un cylindre de culture de 0,6 mm de diamètre et de 5 mm de haut. Ces microsclérotés étant situés en majorité près de la surface du substrat, cette mesure est toujours ramenée au nombre de microsclérotés par  $\text{mm}^2$ , en la multipliant par 3.5. La précision de cette mesure n'est pas très grande, car des microsclérotés très proches l'un de l'autre risquent d'être comptés comme une seule unité ; d'autre part, des microsclérotés jeunes en cours de formation sont pris en considération lors du comptage. Ces estimations n'ont donc qu'une valeur relative et ne doivent être utilisées que pour effectuer des comparaisons entre deux séries de cultures.

## b. Résultats

Le tableau XIV et la planche XI illustrent les résultats obtenus.

Sur le milieu témoin (SP), la croissance radiale est relativement faible et le mycélium aérien abondant (PL. X A), la surface recouverte de microsclérotés est fortement pigmentée, la densité des microsclérotés est élevée.

TABLEAU XIV

Influence des variations de la concentration en saccharose et en bouillon de pomme de terre du milieu PSA sur la croissance et sur la formation des microsclérotés de la souche IF

Concentrations		pH initial	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)	Nombre de microsclérotés par mm <sup>2</sup>
Témoin	SP	6,6	55	50 très dense	689 ± 46
	S P — 5	6,6 - 6,7	61	56 dense + anneau de 4 à 12 mm du centre (très dense)	574 ± 56
Variation de la concentration en saccharose	S P — 10	6,6 - 6,7	71	64 assez dense (très peu dense au centre)	311 ± 2,4
	S P — 20	6,7	67	61,5 assez dense (très peu dense au centre)	278 ± 2
Variation de la dilution du bouillon de pomme de terre	P	6,5 - 6,4	64,5	57 peu dense (très peu dense au centre)	73 ± 26
	P S — 5	7,1 - 7,2	39 *	38 Microsclérotés « en buisson » + anneau discontinu	507 ± 31
Variation de la dilution du bouillon de pomme de terre	P S — 10	7,3 - 7,4	70,5	56 peu dense	84 ± 23
	P S — 20	7,4	77	Microsclérotés dispersés (très peu dense)	52 ± 12
	S	7,1 - 7,2	67	Microsclérotés dispersés (très peu dense)	31 ± 12

S : Saccharose

P : Bouillon de pomme de terre

Les mesures des diamètres de la culture et des zones pigmentées sont faites 19 jours après l'ensemencement.

Le comptage des microsclérotés est fait 25 jours après l'ensemencement.

\* Il s'agit dans ce cas du diamètre du thalle circulaire. En fait, de la marge de ce thalle partent des « buissons » de culture de taille différente.

Quand la concentration en saccharose diminue, la quantité de bouillon de pomme de terre restant constante, on observe une croissance radiale plus forte que sur le témoin, en même temps qu'un mycélium aérien de plus en plus clairsemé. La surface recouverte de microsclérotés est également plus étendue, mais ceux-ci sont très dispersés comme le montrent les mesures de densité du tableau XIV. Dans les mêmes conditions, on constate que les microsclérotés sont de moins en moins abondants au voisinage de l'implant. Les microsclérotés peuvent encore se former, mais en petit nombre seulement, en l'absence de saccharose. Dans ce cas, la source de carbone est vraisemblablement l'amidon du bouillon de pomme de terre.

Quand le bouillon de pomme de terre est dilué, la quantité de saccharose restant constante, le thalle n'est plus circulaire, mais prend la forme « buissonnante ». Les secteurs buissonnants croissent plus vite que le reste du thalle ; comme ils apparaissent de plus en plus tôt quand le bouillon de pomme de terre est de plus en plus dilué, la croissance diamétrale est de plus en plus forte (TABL. XIV). Le mycélium aérien est en même temps de moins en moins abondant (PL. X B) ; il est donc vraisemblable que la croissance pondérale diminue quand le bouillon de pomme de terre est dilué. Le nombre de microsclérotés par mm<sup>2</sup> décroît dans les mêmes conditions. Les microsclérotés sont encore formés, mais en petit nombre, en l'absence de bouillon de pomme de terre.

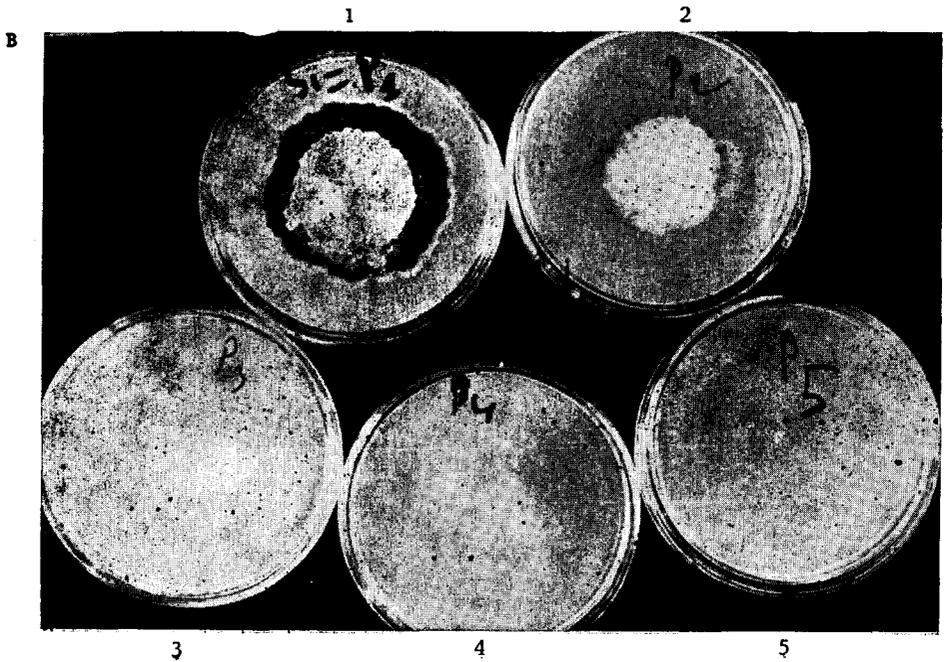
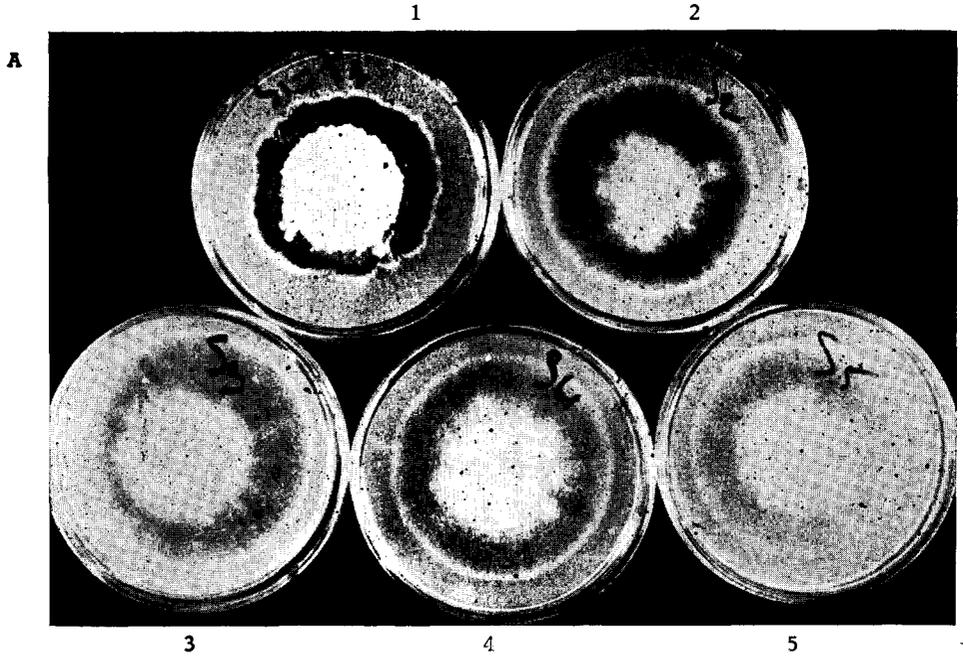
L'observation microscopique des cultures permet de constater, par ailleurs, la présence d'hyphes à paroi épaisse et pigmentée, lorsque le bouillon de pomme de terre est dilué 5 fois. Ces hyphes rappellent, par leur forme, les hyphes enkystées du *V. albo-atrum* (Pl. XI, A) ; elles sont assez longues et peuvent apparaître loin des microsclérotés.

Deux facteurs peuvent intervenir dans l'apparition de ces structures anormales au sein d'une culture ne formant habituellement que des microsclérotés : le rapport saccharose/bouillon de pomme de terre ou la quantité de bouillon de pomme de terre contenue dans le milieu.

Une expérience complémentaire est donc nécessaire pour déterminer laquelle des deux explications est valable.

PLANCHE X

Influence des variations de la concentration en saccharose  
ou en bouillon de pomme de terre du milieu PSA sur la croissance  
de la souche IF et sur la densité des microsclérotés



3. Recherche des conditions de milieu favorisant la formation d'hyphes enkystées sur les souches à microsclérotés

Pour déterminer ces conditions, nous avons procédé aux combinaisons ci-après :

— Bouillon de pomme de terre et saccharose dilués, simultanément 5 fois : P/5 - S/5.

— Bouillon de pomme de terre dilué 5 fois, la concentration du saccharose restant constante S - P/5. Cette combinaison, qui permet d'observer les « hyphes enkystées » chez IF, joue le rôle de témoin.

— Saccharose concentré 5 fois, le bouillon de pomme de terre maintenu constant : 5 S P.

— Milieu PSA normal.

Pour chacun de ces cas, 5 répétitions sont prévues.

L'examen microscopique des cultures montre qu'une abondance relative de saccharose par rapport au bouillon de pomme de terre (5 S P et S - P/5) entraîne la formation d'hyphes à paroi épaisse et pigmentée (PL. XI, A et B). Le milieu S/5 - P/5 permet également l'apparition des hyphes à paroi épaisse et pigmentée, mais en quantité moins importante que sur S - P/5 ou même 5 S P.

---

*Légende :*

- A. Influence des dilutions du saccharose.
- B. Influence des dilutions du bouillon de Pomme de Terre.
- 1. Témoin - 2. Dilution 5 fois - 3. Dilution 10 fois - 4. Dilution 20 fois
- 5. Absence de la substance à tester.

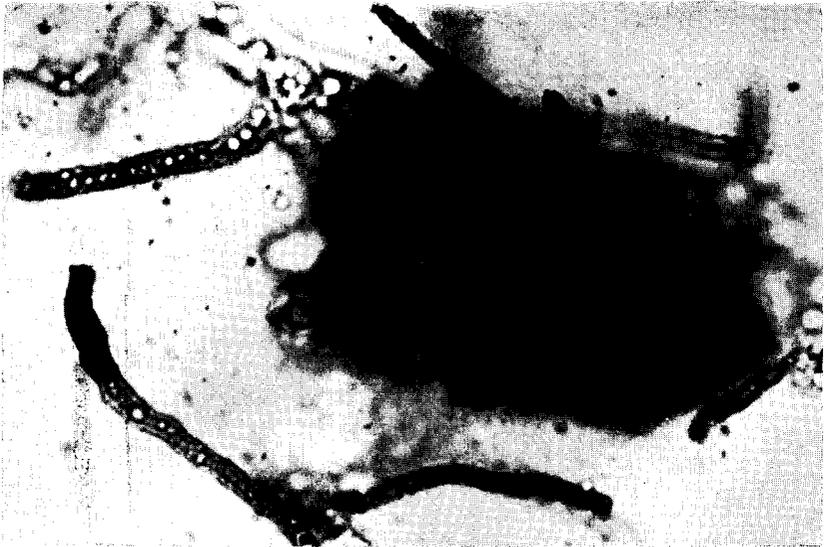
Les cultures sont âgées de 22 jours.

PLANCHE XI

Formation des hyphes enkystés chez la souche IF  
sur milieu PSA modifié



A



B

A. Saccharose constant, bouillon de Pomme de Terre dilué 5 fois. G x 500  
B. Bouillon de Pomme de Terre constant, saccharose concentré 5 fois. G x 1 000.

Il semble donc que les quantités relatives de carbone et d'azote, plus précisément l'abondance du premier par rapport au second, jouent le rôle principal dans l'apparition des hyphes enkystées au sein de cultures qui ne différencient normalement que des microsclérotos. Ces expériences ont été réalisées avec la souche marocaine IF. On peut se demander quelles seront les réactions des deux espèces de *Verticillium* reçues de Baarn dans les mêmes conditions de milieu.

Le *V. dahliae*, espèce à microsclérotos uniquement, forme des hyphes à paroi épaisse et mélanisée (PL. XII, B) sur le milieu S - P/5, mais en quantité beaucoup moins importante que la souche marocaine. Le *V. albo-atrum*, espèce à hyphes enkystées, différencie, en faible quantité, ces organes de conservation sur le substrat S - P/5 (PL. XII, A). Mais, lorsque la croissance se trouve limitée par les bords de la boîte de Pétri, les hyphes enkystées deviennent très abondantes; la marge de la culture paraît alors plus colorée que le reste du thalle. Ceci pourrait s'expliquer, comme pour les microsclérotos, par l'existence d'une substance qui induirait la formation d'hyphes enkystées, dont l'action serait proportionnelle à sa concentration dans le milieu. La barrière constituée par le bord de la boîte de Pétri arrêterait la diffusion de la substance et provoquerait son accumulation dans le substrat.

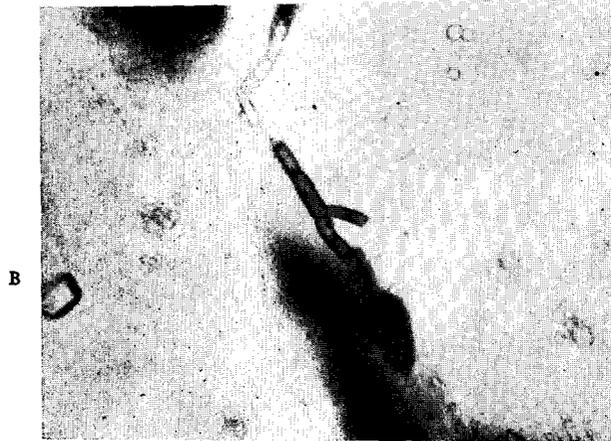
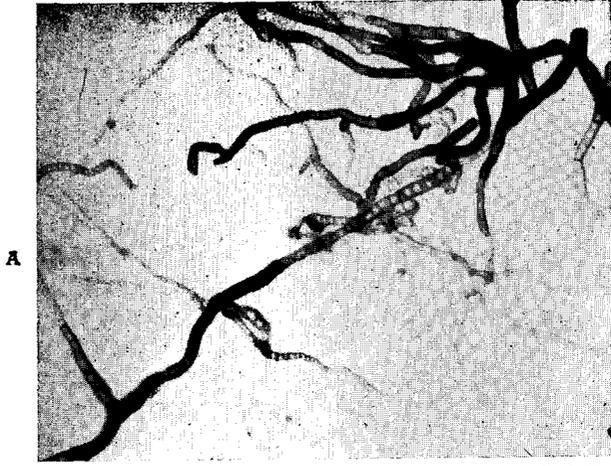
#### 4. Discussions et conclusions

Quand on ajoute du saccharose en quantités croissantes à un milieu contenant uniquement du bouillon de pomme de terre, on constate que les microsclérotos se différencient en nombre de plus en plus grand. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, cet effet s'inverse: il est, en effet, bien visible dans la planche IX (comparer les clichés des figures 1 et 2) que sur le milieu 5 S P (100 g/l de saccharose), la quantité de microsclérotos formés est moins importante que sur le milieu témoin S P.

Quand on dilue le bouillon de pomme de terre, on observe des modifications au niveau de la croissance du thalle (formes « buissonnantes » et une diminution du nombre de microsclérotos formés. Les augmentations de pH qui accompagnent la dilution (6,6 à 7,4) ne sont pas susceptibles d'expliquer à elles seules les effets observés. En effet, quand, dans le milieu PSA, le pH passe de 6,5 à 7,5 (TABL. XI) on n'observe pas de modifications dans la croissance du thalle et dans la surface pigmentée de ce thalle.

PLANCHE XII

Formation d'hyphes enkystées chez les trois *Verticillium*  
sur milieu PSA modifié : Bouillon de pomme de terre  
dilué 5 fois



Les effets du rapport saccharose/bouillon de pomme de terre sont difficiles à apprécier dans ces expériences. On observe une diminution comparable du nombre de microsclérotés quand, à partir du milieu de base (SP), on dilue soit le saccharose (S/5 - P) soit le bouillon de pomme de terre (S - P/5), soit les deux simultanément (S/5 - P/5). Il semble que les quantités absolues de sources nutritives soient plus importantes que leurs valeurs relatives. En revanche, c'est à un excès de saccharose par rapport au bouillon de pomme de terre qu'il faut attribuer l'apparition des hyphes enkystées dans les cultures de la souche IF qui, normalement, ne différencie que des microsclérotés.

Ce phénomène est important si l'on se rappelle que la nature des organes de conservation est un des caractères essentiels de la distinction entre les espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum*. De courtes chaînes de mycélium noir, associées à des microsclérotés, ont été signalées par HEALE et ISAAC (1965). Pour eux, ce mycélium résistant n'est pas le même que celui du *V. albo-atrum*. Nous avons également observé ces courtes chaînes de mycélium ; elles sont très petites et étroitement liées aux microsclérotés, donc différentes des hyphes enkystées typiques. Par « hyphes enkystées », nous entendons, ici, des hyphes longues et mélanisées susceptibles de se former loin des microsclérotés, et c'est bien ce type d'organes que nous avons observé dans les cultures de la souche IF placées dans les milieux S - P/5 ou 5 S P.

Les résultats précédents sont intéressants, mais restent imprécis étant donné le grand nombre de substances présentes dans le bouillon de pomme de terre. Il nous a donc paru nécessaire de reprendre les mêmes expériences avec un milieu entièrement synthétique.

- 
- A. Hyphes enkystées du *V. albo-atrum* sur PSA modifié. G x 500
  - B. Formation d'hyphes enkystées chez le *V. dahliae*. G x 400
  - C. Formation d'hyphes enkystées en plus des microsclérotés caractéristiques chez la souche IF. G x 500.

## B — Croissance radiale et formation des organes de conservation dans un milieu synthétique

Le milieu synthétique retenu est le milieu « M ». La concentration en carbone est de 10 g par litre ce qui correspond à 23,72 g de saccharose par litre. Celle de l'azote, issu de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , est de 0,84 g par litre, soit 2,4 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  par litre. Le rapport C/N est donc égal à 11,8.

### 1. Influence de la dilution du milieu de base

Le saccharose et le  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sont dilués 5 fois, puis 10 fois, les autres composants restant proportionnels à la quantité de milieu. Le pH  $6,3 \pm 0,1$  est favorable à la formation des microscélérotés de IF.

D'après les résultats consignés dans le tableau XV, on peut conclure que la croissance est la même sur les trois milieux et que la dilution simultanée des sources de carbone et d'azote conduit à une diminution du nombre de microscélérotés formés. En effet, bien que la surface pigmentée soit plus étendue sur milieu pauvre que sur milieu riche, les microscélérotés sont, dans le premier cas, très dispersés.

### 2. Influence du rapport C/N

#### a. Méthodes d'étude

Les concentrations en saccharose et en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sont modifiées de façon à obtenir des rapports C/N variant de 2,4 à 59 (TABL. XVI). Tous les autres composants du milieu restent constants. Le pH des différents milieux, voisin de 6,4, est favorable à la formation des microscélérotés de IF. Les boutures ont un diamètre de 0,6 mm et la température d'incubation est de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ . Pour chaque condition, 6 répétitions sont réalisées. Les mesures sont effectuées de la même manière que dans l'expérience précédente.

#### b. Résultats

Les mesures de croissance et de surface pigmentée ainsi que le nombre de microscélérotés par  $\text{mm}^2$  sont faites 24 jours après ensemencement et sont portées dans le tableau XVII.

TABLEAU XV

Influence des concentrations en saccharose et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  du milieu « M » sur la croissance et la formation des microsclérotés de la souche IF

Dilutions de C et de N	pH initial	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)
C N	$7,3 \pm 0,1$	22	2 à 3 (peu dense)
$\frac{C}{5}$	$7,3 \pm 0,1$	23	10 (très variable microsc'érotés dispersés (peu dense)
$\frac{C}{10}$	$7,3 \pm 0,1$	20	9,5 Microsclérotés dispersés (peu dense)

Dans cette expérience, le rapport C/N est le même dans les trois conditions (= 11,8).

Ces mesures sont faites 13 jours après l'ensemencement.

TABLEAU XVI

Les concentrations en saccharose et en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dans le milieu « M »

Rapport	Saccharose	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Symboles
59	x 5	x 1	5 C N
		1	C N
24	x 1	x $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
12	x 1	x 1	C N
	1	1	C N
12	x $\frac{1}{5}$	x $\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$ $\frac{1}{5}$
	1		C N
2,4	x $\frac{1}{5}$	x 1	$\frac{1}{5}$

Les résultats obtenus sont les suivants :

— La croissance radiale est pratiquement la même dans toutes les conditions.

— L'aspect des cultures (Pl. XIII B) change lorsque le rapport C/N varie. Le mycélium peut être plus ou moins plissé et sa couleur varie du rose sur 5 C/N au gris sur C/5 - N et au noir sur C/N. Il y a également apparition de secteurs et de zonations. Toutefois, la marge du thalle reste circulaire dans toutes les conditions.

— Le nombre de microsclérotés varie avec le changement de la concentration en carbone, la quantité de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  étant constante. En effet, le maximum est obtenu avec la concentration normale en C (CN) et l'augmentation ou la diminution de cette dernière fait baisser de beaucoup la quantité de microsclérotés (5 C N et C/5 - N lignes 1, 3 et 5 du tableau XVII).

— Pour une même quantité de carbone, le nombre de microsclérotés augmente lorsqu'on diminue la concentration en azote (C/5 - N/5 et C/5 lignes 4 et 5 du tableau XVII, C N et N/2 lignes 2 et 3 du tableau XVII). Une alimentation déficitaire en azote incite donc le *Verticillium* à former des organes de conservation.

— Par ailleurs, l'observation microscopique des différentes cultures permet de constater la présence, en plus de microsclérotés normaux, d'hyphes à paroi épaisse et pigmentée sur 5 C N et C - N/2 (Pl. XIV, A et B). Il y a en plus sur 5 C N apparition de microsclérotés mal individualisés qui forment des masses de cellules brunes.

### c. Conclusions et discussions

Si l'on compare les résultats des expériences que nous venons de réaliser successivement sur milieu PSA et sur milieu « M », plusieurs conclusions identiques peuvent en être tirées.

On constate tout d'abord que la dilution simultanée des deux principaux constituants des substrats saccharose et bouillon de pomme de terre dans l'un, saccharose et  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  dans l'autre, entraîne une diminution du nombre de microsclérotés formés.

Des variations simultanées ou des modifications portant sur l'un seulement des constituants, saccharose et bouillon de pomme de terre dans l'un, saccharose et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dans l'autre, se traduisent

TABLEAU XVII

Influence du rapport  $\frac{C}{N}$  du milieu synthétique « M » sur la croissance et la formation des microsclérotés chez IF

Rapport $\frac{C}{N}$	pH initial	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)	Nombre de microsclérotés par mm <sup>2</sup>
1 $\frac{5 C N}{(59)}$	6,3 - 6,4	73	Surface irrégulière de quelques mm de large (peu dense)	220 ± 121*
2 $\frac{C N}{2} (24)$	6,3 - 6,4	74,5	64 dense	1 708 ± 179
3 $\frac{C N}{(12)}$	6,4	78,5	66 dense	1 333 ± 128
4 $\frac{C N}{5 \cdot 5} (12)$	6,3 - 6,4	81	71 assez dense	749 ± 98
5 $\frac{C N}{5} (2,4)$	6,3 - 6,4	78	68 assez dense	497 ± 44

\* Les microsclérotés perdent leur individualité et forment des masses brunâtres, ce qui rend difficile leur comptage.  
Ces mesures sont faites 24 jours après ensemencement.

TABLEAU XVIII

Les quantités de glucides ajoutées au milieu « M »

Quantité de carbone/litre	Nature du glucide		
	Glucose	Saccharose	Amidon
10 g	25	23,8	22,7
30 g	75	71,4	68,2
40 g	100	95,2	90,9
50 g	125	119,0	113,7

Les quantités de glucide ajoutées sont en g/l.

presque toujours dans la croissance et la morphologie des cultures, selon des modalités différentes dans l'un et l'autre des milieux. Sur milieu PSA, c'est l'apparition des formes « buissonnantes » ; sur milieu « M », il y a des changements dans l'aspect et la couleur des cultures avec parfois formations de secteurs ou de zonations. Ces résultats confirment ceux de JOHNSON (1950) qui montrent que la nature et la concentration de la source d'azote dans le milieu entraînent des changements dans l'aspect de la culture.

Quand on fait varier la quantité de saccharose dans le milieu PSA ou dans le milieu « M », le nombre de microsclérotés formés dépend de l'abondance du sucre ; il décroît au-dessus d'un optimum qui se situe dans nos expériences entre 20 et 100 g/l de saccharose. Ces conclusions sont semblables à celles obtenues par TOWNSEND (1957), WHEELER et SHARAN (1965) avec des champignons à sclérotés autres que des *Verticillium* ; pour ces auteurs, « la quantité de sucre détermine le nombre et la taille des sclérotés formés ».

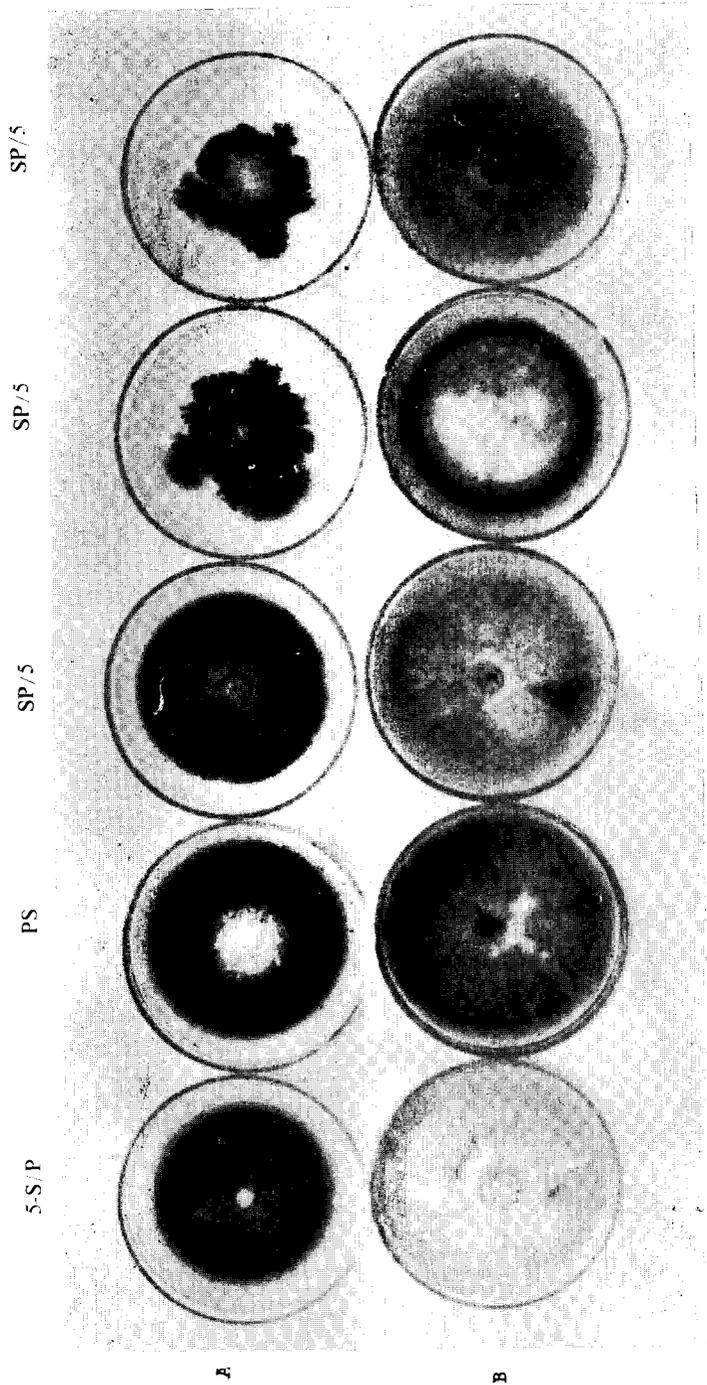
Enfin, sur les deux milieux PSA et M, l'abondance relative de saccharose par rapport au bouillon de pomme de terre ou au  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  produit les mêmes effets, l'apparition d'hyphes enkystées sur les souches qui normalement ne différencient que des microsclérotés. Nous avons déjà insisté, et nous y reviendrons dans la conclusion générale, sur l'importance de ce résultat au point de vue systématique.

L'utilisation d'un milieu synthétique a permis d'apporter quelques précisions supplémentaires à propos de l'effet des constituants chimiques du substrat sur la morphogénèse des microsclérotés. Nous avons vu en effet que la dilution de la source d'azote se traduit toujours, dans nos conditions expérimentales, par la formation d'un plus grand nombre de microsclérotés. Cet effet est inverse de celui obtenu avec la source carbonée. Une constatation du même ordre avait été faite précédemment par ISAAC (1957). Par ailleurs, ces résultats de laboratoire concordent parfaitement avec les observations de WILHELM (1950) qui a montré que l'inoculum de *Verticillium* présent dans le sol diminue quand l'amendement en azote augmente.

Il est enfin intéressant de rappeler les constatations que nous avons faites au début de ce chapitre à savoir que le milieu PSA (naturel) est plus favorable à la formation des microsclérotés que les milieux synthétiques « S » de MESSIAEN et « P » de PRESLEY (TABL. XI et XII) étudiés. Cette action favorable du milieu PSA peut, entre autres hypothèses, s'expliquer soit par le rapport C/N du milieu

PLANCHE XIII

Influence des concentrations en bouillon de pomme de terre, saccharose et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur la densité des microclérotes et l'aspect des cultures

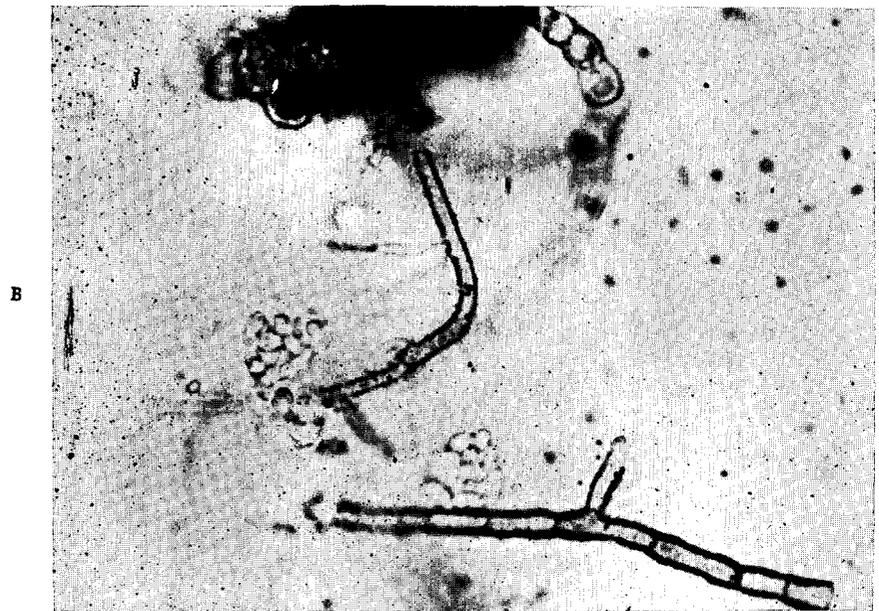
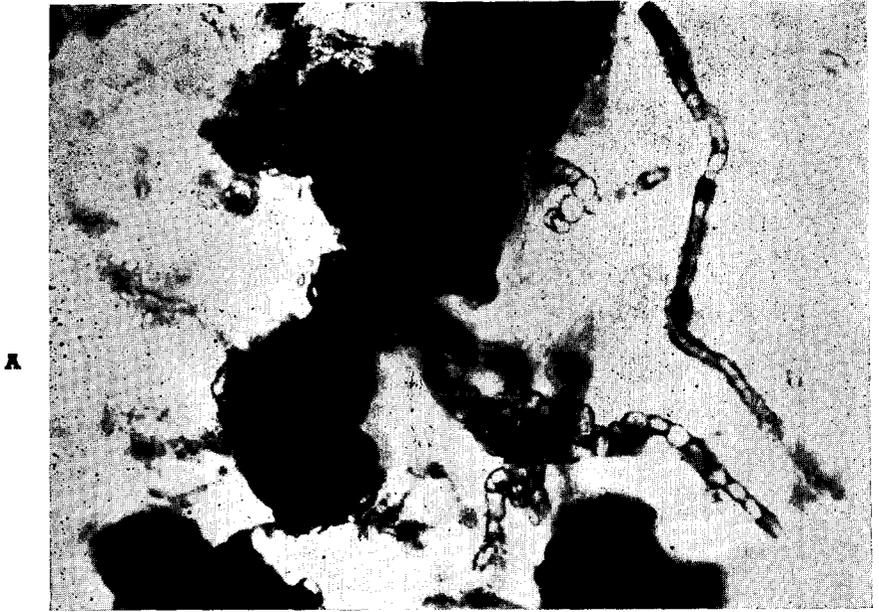


A. Influence des concentrations en bouillon de Pomme de Terre (P) et Saccharose (S) dans le milieu PSA. — Cultures âgées de 21 jours.

B. Influence des concentrations en Saccharose (C) et en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (N) dans le milieu M. — Cultures âgées de 28 jours.

PLANCHE XIV

Formation d'hyphes enkystées chez la souche IF  
quand le rapport C/N du milieu « M » est modifié



A. Microclérotés et hyphes enkystées sur CN/2 (G x 430)  
B. Microclérotés et hyphes enkystées sur 5 CN (G x 430).

(le milieu PSA est certainement assez pauvre en azote), soit par la présence d'amidon (venant de la pomme de terre) dans ce milieu. Il est donc nécessaire d'étudier l'influence de la nature de la source de carbone et de sa concentration sur la formation des microsclérotés.

### C — Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone

Le glucose, le saccharose et l'amidon sont utilisés comme sources de carbone, dans le milieu « M », à des concentrations de plus en plus élevées (TABL. XVIII). L'azote, apporté par le nitrate d'ammonium, garde toujours la même concentration (0,84 g d'azote par litre soit 2,4 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  par litre). Les différents milieux, à pH 6,5, sont coulés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 30 ml par boîte. Pour chaque concentration, 7 répétitions sont faites.

Les mesures de croissance et de surface pigmentée ainsi que les résultats des comptages de microsclérotés, comptages effectués 23 jours après repiquage, figurent dans le tableau XIX.

Des modifications apparaissent au niveau de l'aspect de la culture, de la croissance et de la formation des microsclérotés.

#### 1. L'aspect de la culture

Il diffère avec la nature et la concentration du sucre (PL. XV).

— Sur glucose, le mycélium se plisse quand la concentration augmente ; la couleur noire disparaît progressivement et ne reste plus uniforme. A la concentration 5 C le mycélium est peu pigmenté et présente un aspect humide.

— Sur saccharose, le mycélium aérien, cotonneux, devient plus important au fur et à mesure que la concentration augmente. Aux concentrations élevées, 4 C et 5 C, une couleur brune apparaît sur le revers des cultures.

— Sur amidon, la couleur noire reste toujours importante. Les houppes de mycélium aérien cotonneux sont plus nombreuses quand la concentration augmente.

Dans tous les cas, la forme de la culture est circulaire.

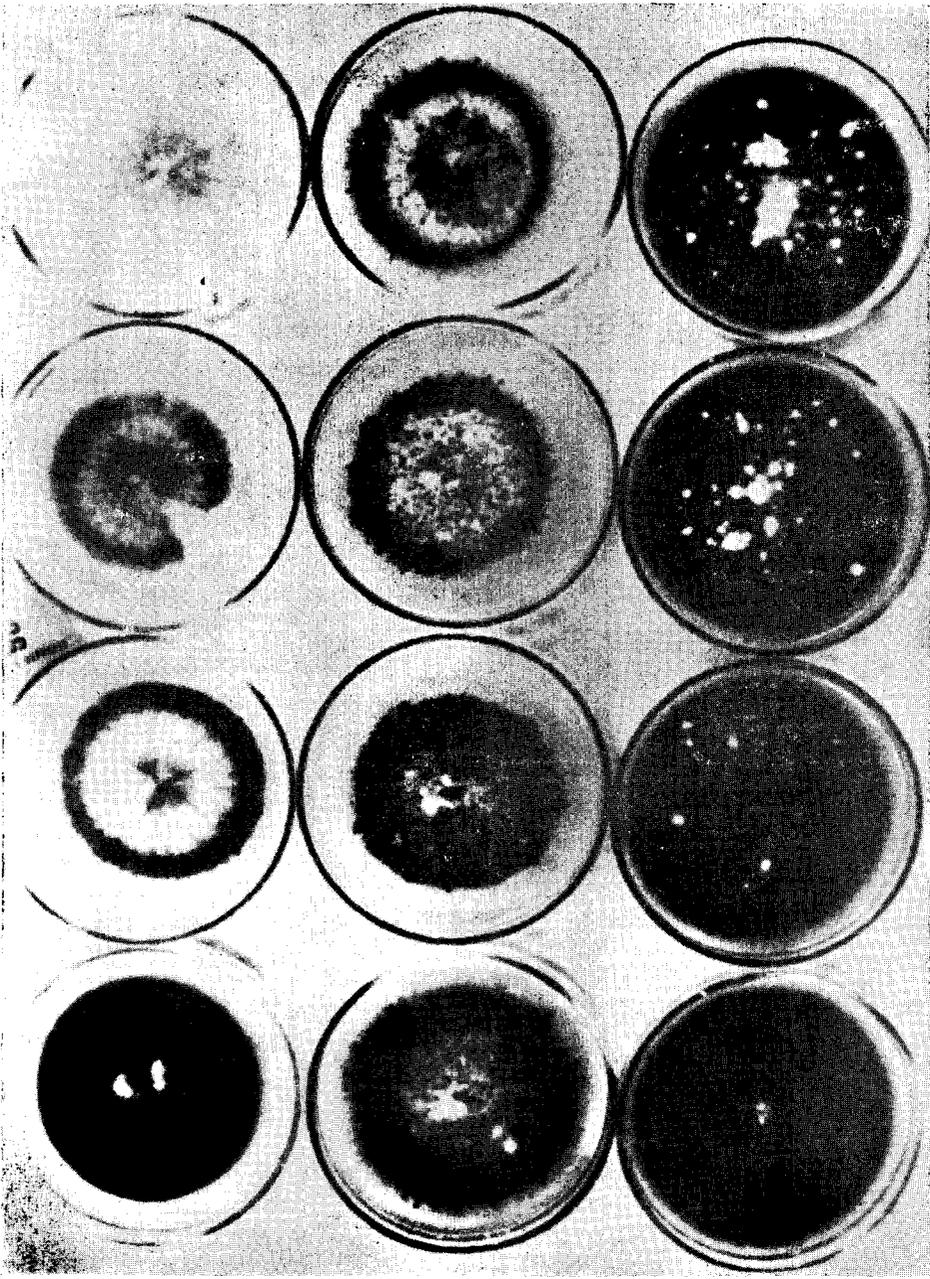
PLANCHE XV

Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone sur  
la croissance et la formation des microsclérotos chez la souche IF

5C

4C

3C



A  
Glucose

B  
Saccharose

C  
Amidon

## 2. La croissance radiale de la culture

Elle décroît, lentement, avec l'augmentation de la concentration en glucose et en amidon et reste relativement constante lorsque le saccharose est de plus en plus concentré.

L'ensemble des résultats montre que la croissance radiale varie selon la nature de la source de C. Lorsque la concentration en C est de 10 g/l (C), la croissance sur amidon est significativement plus forte que sur saccharose et glucose. Sur ces deux derniers sucres, la différence de croissance n'est pas significative. Lorsque la concentration en C est de 50 g/l (5 C), les résultats sont différents : sur saccharose et sur amidon, la croissance est statistiquement identique ; elle est significativement plus forte que sur glucose.

## 3. Formation des microsclérotés

Le délai nécessaire à l'apparition des microsclérotés apprécié à l'œil nu par la pigmentation des cultures varie avec la nature du milieu. Il est de 5 jours sur amidon et de 6 à 7 jours sur glucose et saccharose. Par ailleurs, les microsclérotés se forment directement au niveau de l'implant lorsque le carbone provient de l'amidon, et plus loin du semis quand il est issu du saccharose ou du glucose.

Pour la même concentration normale en carbone (rapport C N = 11,8), ils sont beaucoup plus nombreux sur amidon que sur glucose, et plus abondants sur saccharose que sur amidon.

Quand les quantités de sucre augmentent, on assiste à des phénomènes différents selon la nature de ce sucre.

Sur amidon, les microsclérotés sont abondants même quand la concentration est très forte (5 C : TABL. XIX) et ils conservent toujours leur morphologie typique.

En revanche, la quantité de microsclérotés diminue rapidement quand le saccharose ou le glucose sont plus concentrés (TABL. XIX). Aux concentrations les plus fortes (5 C pour le saccharose, 5 C et 3 C pour le glucose), les microsclérotés sont mal individualisés ; ils ne forment plus que des masses de cellules brunes arrondies (PL. XVI, A et B), répartis non plus uniformément à la surface de la culture, mais constituant des « boules » au niveau de l'implant et un anneau plus coloré vers la marge de la culture (PL. XV).

Par ailleurs, l'examen microscopique de ces thalles montre que des articles mycéliens plus ou moins longs sont séparés les uns des autres et bourgeonnent à la manière de levures (PL. XVI C). Les fortes concentrations en glucose et en saccharose font donc apparaître un nouveau mode de croissance que l'on peut qualifier de « levuriforme ».

#### 4. Discussions et conclusions

Il ressort de cette expérience que pour une même quantité de carbone fournie au substrat, la nature du sucre peut influencer la croissance radiale et l'apparition des microsclérotés.

La croissance est, en effet, plus importante sur amidon que sur glucose, de même qu'elle s'avère, dès que la concentration en carbone augmente, plus grande sur saccharose que sur glucose. TOWNSEND (1957) a obtenu des résultats semblables avec un autre organisme à sclérotés, le *Rhizoctonia solani* : la croissance est plus importante sur le saccharose que sur le glucose et ce, lorsque les sucres sont très concentrés.

Cette croissance moins forte sur glucose concentré peut, entre autres hypothèses, s'expliquer par le fait que ce sucre est rapidement utilisé puisqu'il n'a pas besoin d'être dégradé pour entrer dans les chaînes métaboliques. En revanche, lorsqu'il s'agit du saccharose et de l'amidon, ils doivent être d'abord hydrolysés sous forme de glucose ; cette hydrolyse se ferait progressivement au fur et à mesure des besoins du thalle et permettrait ainsi une utilisation plus efficace de la source carbonée.

Par ailleurs, cette diminution de croissance radiale semble être compensée par l'apparition d'une nouvelle forme de croissance que nous avons qualifiée de « levuriforme ». La nature et la concentration du sucre influencent donc le type de croissance. Une observation comparable peut être faite chez certains espèces de levures du genre *Candida* (TURIN, 1969). Chez ces organismes, la source de carbone permet le maintien de la forme levure, sur hexose (glucose) : substrat facilement oxydable qui entraîne la formation de groupements thiols, ou la filamentation sur polysaccharides tels que glycogène, amidon soluble ou dextrine (NICKERSON et MANKOWSKI, 1953 ; NICKERSON, 1954). Les recherches de NICKERSON et FALCONE (1956) ont abouti à la découverte d'un processus spécifique de réduction des pont-S-S- en groupes sulfhydryles protéiniques comme condition de la multiplication par bourgeonnement.

TABLEAU XIX

Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone sur la croissance et sur la formation des microsclérotés chez IF

Rapport	C — N	Diamètre moyen de la culture (mm)	Diamètre moyen de la zone pigmentée (mm)	Nombre de microsclérotés par mm <sup>2</sup>
<b>Glucose</b>				
C				
—				
N	(11,8)	73 ± 6	63 dense	870 ± 64
3 C				
—				
N	(35,4)	70 ± 1,6	60 peu dense	*
4 C				
—				
N	(47,2)	66 ± 1,1	40 très peu dense	*
5 C				
—				
N	(59)	65 ± 7,7	46 très peu dense	*
<b>Saccharose</b>				
C				
—				
N	(11,8)	77 ± 2,2	61 dense	1 820 ± 58
3 C				
—				
N	(35,4)	76,5 ± 2,3	62 assez dense	1 032 ± 172
4 C				
—				
N	(47,2)	75,5 ± 3,1	58 peu dense	700 ± 50
5 C				
—				
N	(59)	74,5 ± 3,7	58 très peu dense	
<b>Amidon</b>				
C				
—				
N	(11,8)	87 ± 2,2	77 dense	1 204 ± 70
3 C				
—				
N	(35,4)	85 ± 1,5	75,5 assez dense	982 ± 57
4 C				
—				
N	(47,2)	77 ± 1,8 (± 4)	73 assez dense	1 070 ± 74
5 C				
—				
N	(59)	76 ± 1,2 (± 4)	72 assez dense	982 ± 64

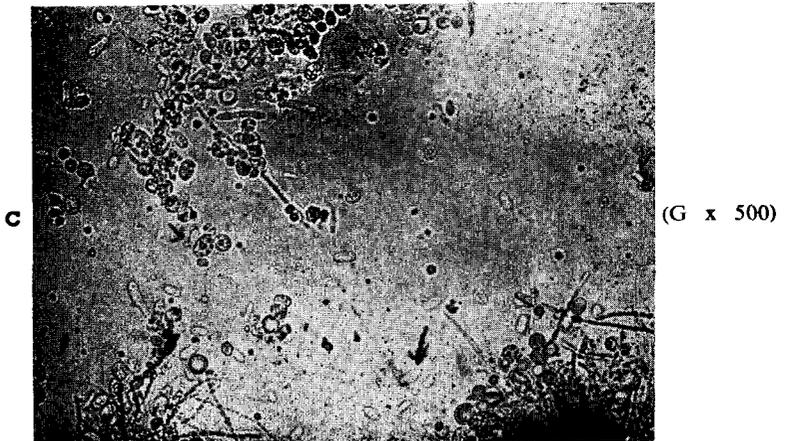
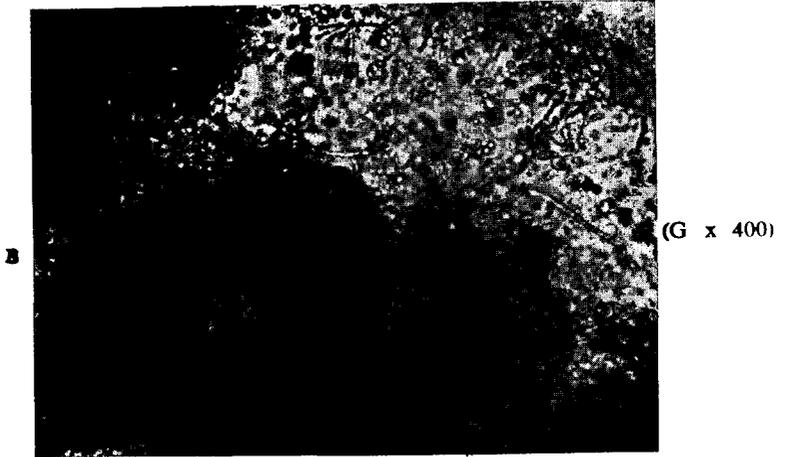
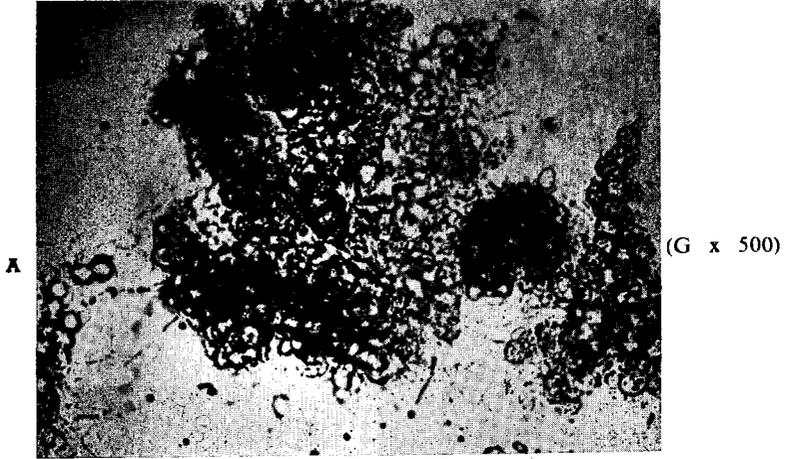
\* Les microsclérotés perdent leur individualité et forment des masses brunâtres, ce qui rend difficile leur comptage.

Ces mesures sont faites 23 jours après ensemencement.

Les chiffres entre parenthèses indiquent l'erreur faite sur le diamètre de la culture, compte-tenu du fait que la marge de la culture se confond avec le milieu.

## PLANCHE XVI

Influence des concentrations en glucose et saccharose  
dans le milieu « M » sur la formation des microsclérotés



Or, nos résultats semblent en accord avec les observations faites sur *Candida*. Nous avons obtenu, en effet, une croissance « levuriforme » sur glucose assez concentré, sur saccharose concentré et une forme normale sur polysaccharide plus concentré. Pouvons-nous dire, après ces quelques précisions bibliographiques, que l'utilisation par le *Verticillium* du glucose entraîne la formation des groupements thiols qui stimuleraient le bourgeonnement observé aux fortes concentrations du glucose et du saccharose ? Il y aurait là toute une étude métabolique à entreprendre pour vérifier si les processus qui interviennent chez les *Verticillium* sont les mêmes que ceux qui interviennent chez *Candida*.

Par ailleurs, les fortes concentrations en glucose (3 C) et en saccharose (5 C), semblent freiner la formation de microsclérotés typiques. Ce freinage peut être interprété, et ceci n'est qu'une hypothèse, par la présence de groupements thiols, qui tout en stimulant le bourgeonnement inhiberait la formation des microsclérotés. Cette hypothèse dépend avant tout de la vérification de celle émise précédemment ; elle est, toutefois, vérifiée chez d'autres organismes à sclérotés comme le *Corticium rolfsii* (GOUJON, 1971 ; CHET et HENIS, 1966). Ces auteurs ont constaté que les inhibiteurs des enzymes de type R-SH sont capables de provoquer l'apparition précoce des sclérotés ; ils ont conclu que l'initiation de ces organes devait être interdite par des composés porteurs du radical sulfhydryle.

Par ailleurs, TREVETHICK, JANET et COOKE (1971), CHET et HENIS (1972) ont montré, en effet, que la cystéine inhibe la formation des sclérotés chez le *Sclerotium rolfsii*.

---

**Légende :**

- A. Microsclérotés mal individualisés sur 5 CN (Saccharose concentré 5 fois).  
Il y a une masse de cellules brunes arrondies à la place de microsclérotés (G x 462)
- B. Microscérotés mal individualisés sur glucose concentré 5 fois et apparition de la forme levure. Les flèches indiquent le bourgeonnement des cellules, ceci rappelle la forme levure (G x 430).
- C. Bourgeonnement des cellules sur glucose concentré 4 fois (G x 500).

## DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

L'étude expérimentale de la morphogénèse des thalles et des microsclérotés des souches de *Verticillium* sp. isolées au Maroc que nous venons de faire a permis de préciser certaines caractéristiques biologiques de ces souches et de les comparer à celles de deux souches de référence : le *V. dahliae* et le *V. albo-atrum*. Les résultats obtenus au fur et à mesure de l'expérimentation ont été exposés et discutés à la fin de chacun des paragraphes. Dans cette conclusion générale, il nous paraît donc inutile de rappeler l'ensemble des résultats ; cette revue a d'ailleurs fait l'objet d'un résumé placé en tête de ce mémoire. Nous nous bornerons plus simplement à reprendre certains grands problèmes qui n'ont été que partiellement évoqués au cours des différents paragraphes et que nous pouvons reconsidérer maintenant et discuter plus complètement à la lumière de l'ensemble des résultats ou d'études bibliographiques auxquelles nous n'avons pas encore fait référence.

### 1. Position systématique du *Verticillium* sp. isolé au Maroc

Les caractères morphologiques et de croissance (aspect de culture, vitesse de croissance, taille des conidies et structure des organes de conservation) rapprochent les souches du *Verticillium* sp. isolées au Maroc beaucoup plus du *V. dahliae* que du *V. albo-atrum*.

La discussion des données bibliographiques exposées au chapitre II et la conclusion du chapitre III nous ont amené à rassembler dans une même espèce *V. albo-atrum*, les isolats décrits précédemment sous les noms de *V. albo-atrum* et de *V. dahliae*. En conséquence, les souches isolées au Maroc appartiennent à l'espèce *V. albo-atrum* ; notons que, dans la plupart des milieux de culture utilisés au cours de nos expériences, ces isolats forment des microsclérotés. Cette dénomination est encore justifiée par le fait que sur certains substrats (abondance relative de saccharose par rapport au bouillon de pomme de terre dans le milieu PSA ou excès de carbone par rapport à l'azote dans le milieu « M »), la souche IF et même le *V. dahliae* édifie, en plus des microsclérotés typiques, des « hyphes enkystées ».

Jusqu'à maintenant, les auteurs ont réussi, par clonage d'une culture d'origine monosporee à partir de spores ou de microsclérotés, à obtenir des thalles qui forment soit des microsclérotés, soit des

hyphes enkystées, mais jamais les deux types d'organes de conservation simultanément. Ce comportement de la souche marocaine et du *V. dahliae* en provenance de BAARN est un nouvel argument qui plaide en faveur de l'existence d'une seule espèce.

## 2. Le déterminisme interne de la formation des microsclérotés

Le *V. albo-atrum* (type à microsclérotés) synthétise un facteur morphogénétique diffusible, ou DMF, qui induit la formation des microsclérotés (BRANDT et REESE, 1964). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de ce facteur en observant le développement des thalles dans différentes conditions. Quand le thalle est seul dans une boîte de Pétri, la croissance s'arrête au contact du bord de la boîte, mais la pigmentation continue à envahir la culture. Quand il y a plusieurs thalles, les effets du facteur dépendent de la distance entre les thalles et de la distance au bord de la boîte. Lorsqu'on empêche l'accumulation de ce facteur, par le transfert journalier de disques de cellophane portant des thalles de *Verticillium*, le nombre de microsclérotés édifié diminue très fortement.

Par ailleurs, des disques pris dans la zone pigmentée de cultures âgées de trois semaines, mis au contact d'une culture âgée d'une semaine, inhibent la croissance et stimulent la mélanisation et la production de microsclérotés.

L'effet de ce facteur dépend de sa propre concentration. Aux faibles concentrations, il stimule la mélanisation et la formation des microsclérotés. Aux fortes concentrations, il peut, en revanche, inhiber ces deux phénomènes de même qu'il interdit la germination des spores.

L'existence d'un facteur morphogène qui induit l'agrégation a été démontré chez d'autres champignons comme le *Corticium rolfsii* (SACCH.) CURZI (GOUJON, 1971) et le *Leptoporus lignosus* (KL.) ex. Pat (BOISSON, 1973). C'est de la quantité disponible de ce facteur que dépend le nombre de sclérotés formés chez le *C. rolfsii*; dans cette espèce, les premiers initiums ne peuvent apparaître que lorsque la concentration en facteur diffusible atteint une valeur seuil (GOUJON, *loc. cit.*).

Il convient de noter dans ce même ordre d'idées que l'amidon réduit la durée du délai qui précède l'apparition des microsclérotés.

Une telle constatation pourrait se justifier par l'importance de la synthèse du facteur morphogène en présence d'amidon. Ce n'est là, évidemment, qu'une hypothèse qui reste à vérifier.

Les premiers résultats de BRANDT et REESE (1964) montrent que le DMF n'est ni une protéine, ni un polysaccharide, ni un lipide ; c'est une molécule organique que l'on pourrait peut-être rapprocher d'un phénol. Le DMF est actif de pH 4 à pH 10, non volatil, dialysable et soluble dans l'eau, mais insoluble dans l'éther, l'éthanol et le dichlorure de méthylène ; il est inactif en présence d'acétone.

L'action de ce facteur, qui peut être constitué par une seule ou plusieurs substances, n'est peut-être pas directe (BRANDT et REESE, *loc. cit.*). Il est possible que l'inhibition de la croissance qu'il entraîne soit à l'origine de la mélanisation et du développement des microsclérotos. Autrement dit, le bourgeonnement et la mélanisation indispensables à la formation des microsclérotos résulteraient de l'inhibition de la croissance. Nous retrouvons une partie de ces résultats dans nos propres expériences : sur un milieu très concentré en glucose (5 C N, voir p. 66), on observe un ralentissement de la croissance radiale en même temps qu'un bourgeonnement accru (apparition des thalles levuriformes). La corrélation croissance-bourgeonnement est évidente dans ces résultats.

Cependant, la mélanisation ne se déroule pas à la même vitesse que le bourgeonnement, ce qui se traduit par la formation de masses de cellules arrondies, peu pigmentées. Il nous paraît intéressant de rapprocher ce résultat de celui obtenu quand on confronte, dans une même boîte de Pétri, deux thalles, l'un de *V. albo-atrum*, l'autre de la souche IF (type *V. dahliae*). Le voisinage du thalle de la souche IF, productrice de microsclérotos, se traduit, dans le thalle du *V. albo-atrum*, par la différenciation d'un nombre d'hyphes enkystées beaucoup plus grand que dans le témoin (*V. albo-atrum* cultivé seul dans une boîte de Pétri). Dans ce cas, les modifications morphologiques observées sont dues à une intensification de la mélanisation, sans induction du bourgeonnement.

Au cours de nos expériences, il a donc été possible de modifier séparément le bourgeonnement et la mélanisation. Ces deux phénomènes sont nécessaires à la formation de microsclérotos alors que seul le second intervient dans la différenciation des hyphes enkystés. Il est possible, nos expériences l'indiquent, que ces deux phénomènes soient indépendants et fassent intervenir des processus physiologiques différents. Cette hypothèse reste à prouver, mais nous paraît inté-

ressante pour aborder, sous un angle nouveau, le déterminisme de la formation des microsclérotés.

### 3. L'influence des facteurs externes sur la formation des microsclérotés

La formation des microsclérotés est également conditionnée par des facteurs externes tels que la température, la lumière, le pH et la nutrition.

Ainsi des températures basses (10 à 22°) favorisent la formation des microsclérotés, alors que celles qui sont comprises entre 25 et 31° C l'inhibent (WILHELM, 1948 ; HEALE et ISAAC, 1965).

Le facteur lumière a retenu l'attention de certains auteurs tels que BRANDT (1963, 1964 b, 1967), KAISER (1964), et BRANDT et REESE (1964). Ceux-ci ont été conduits à soutenir, de par leurs recherches, que les microsclérotés et la mélanisation se développent à l'obscurité et sont inhibés par les proches UV (3 250 à 4 000 Å°) dont le pic d'émission est à 3 650 Å°. Ces proches UV, qui ont un effet négatif sur la formation des microsclérotés, supprimeraient, selon BRANDT et REESE (*loc. cit.*), la synthèse du facteur DMF. Ils peuvent provoquer l'inhibition de toutes les étapes de développement des microsclérotés, ou seulement de ses derniers stades.

Le pH a fait également l'objet de recherches de la part de HEALE et ISAAC (1965) pour qui le pH optimum de production des microsclérotés reste assez bas (5,3 à 7,2). Les souches marocaines, quant à elles, édifient des microsclérotés à un pH égal ou supérieur à 6,2. Cependant, les microsclérotés apparaissent, mais seulement après deux mois environ, à pH 5,7. Ce retard pourrait s'expliquer par l'action quantitative du facteur morphogène. Autrement dit, la synthèse de ce facteur est tellement faible au pH 5,7 qu'il faudrait environ deux mois pour atteindre la concentration nécessaire à la formation de microsclérotés mélanisés. Ces résultats concordent avec ce qui se passe dans la nature où on n'observe pas de verticilliose dans les sols à pH acide.

Les microsclérotés subissent également l'influence de la nutrition. Ainsi, une diminution relative de l'azote par rapport au carbone fait apparaître un plus grand nombre de microsclérotés. La même constatation peut être faite dans la nature ; l'utilisation d'amendements riches en azote diminue, en effet, le potentiel d'inoculum (WILHELM, 1951).



## BIBLIOGRAPHIE

- BASU, P.K. — 1961. *Verticillium* disease of strawberries. — Can. J. Bot., **39**, pp. 165-196.
- BEWLEY, W.H. — 1962. "Sleepy disease" of the tomato. — Ann. appl. Biol., **9**, pp. 116-134.
- BOISSON, C. — 1973. De la basidiospore au rhizomorphe, déterminisme de l'agrégation chez le Basidiomycète *Leptoporus lignosus* (KL.) Heim ex. Pat. — Thèse Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- BRANDT, W.H. — 1963. Effects of near ultraviolet radiation on growth of *Verticillium* in liquid culture. — Am. J. Bot., **50**, p. 625 (Abstr.).
- 1964a. Morphogenesis in *Verticillium*: Effects of light and UV radiations on microsclerotia and melanin. — Can. J. Bot., **42**, pp. 1017-1023.
- 1964 b. Morphogenesis in *Verticillium*: a self-induced, non hereditary variation in colony form. — Am. J. Bot., **51**, pp. 820-821.
- 1967. Influence of near UV light on hyphal elongation in *Verticillium*. — Mycologia, **59**, pp. 736-739.
- BRANDT, W.H. & J. REESE — 1964. Morphogenesis in *Verticillium*: a self-produced diffusible morphogenetic factor. — Am. J. Bot., **51**, pp. 922-927.
- BROWN, M.F. & T.D. WYLLIE — 1970. Ultrastructure of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. — Phytopathology, **60**, pp. 538-542.
- CHET, I. & Y. HENIS — 1966. The morphonegetic effect of sulphur-containing amino-acids, glutathione and iodacetic acid on *Sclerotium rolfsii* SACC. — J. Gen. Microbiol., **45**, pp. 541-546.
- 1973. The response of two types of *Sclerotium rolfsii* to factors affecting sclerotium formation. — J. Gen. Microbiol., **73**, pp. 483-484.

- D.R.A. — 1969. Tomate - Plante maraîchère, 1. Fiche technique.
- DUFRENOY, J. & M.L. — 1927. Hadromycoses. — Ann. des épiphyties, **13**, pp. 195-212.
- FORDYCE, C. (jr.) & R.J. GREEN (jr.) — 1964. Mechanism of variation in *Verticillium albo-atrum*. — Phytopathology, **54**, pp. 795-798.
- GOETHALS, M. — 1971. Une trachéomycose du carthame au Maroc. — Al-Awamia, **39**, p. 39, Rabat.
- GOUJON, M. 1971. Etude physiologique de la sclérogénèse chez le *Corticium rolfsii* (SACC.) CURZI. — Thèse Faculté des Sciences d'Orsay.
- GUSEVA, N.N., V.I. POPOV & M.P. TKACHENKO \* — 1966. Influence of various sources of nitrogen and carbohydrate nutrition on the growth of *Verticillium dahliae* (Résumé dans RAM, **47**, 34). — Vilt Khlopchal., Tashkent « Fan », pp. 104-108 (Abs. in Referat. Zh. Biol., 1967, (9 V), 176, 1967).
- HALL, R. — 1969. *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* distinguished by acrylamide gel-electrophoresis of proteins. — Can. J. Bot., **47**, pp. 2110-2111.
- HASTIE, A.C. — 1973. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. — Trans. Br. mycol. Soc., **60**, pp. 511-523.
- HEALE, J.B. — 1966. Heterokaryon synthesis and morphogenesis in *Verticillium*. — J. gen. Microbiol., **45**, pp. 419-427.
- HEALE, J.B. & I. ISAAC — 1965. Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. — Trans. Br. mycol. soc., **48**, pp. 39-50.
- ISAAC, I. — 1949. A comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*. — Trans. Br. mycol. Soc., **32**, pp. 137-158.
- 1957. The effects of nitrogen supply upon the *Verticillium* Wilt of *Antirrhinum*. — Ann. appl. Biol., **45**, pp. 512-515.
- 1967. Speciation in *Verticillium*. — Ann. Rev. Phytopath., **5**, pp. 201-222.
- ISAAC, I. & O. MAC GARVIE — 1962. Germination of resting bodies in *Verticillium* species. — Nature, **195**, pp. 826-927.

- JOHNSON, R.L. \* — 1950. The *in vitro* effect of varying forms and concentrations of nitrogen on the morphology of *Verticillium albo-atrum* REINKE et BERTHOLD. — Proceeding of the Indiana Academy of Science, **60**, pp. 78-79.
- KAISER, W.J. — 1964. Effects of light on growth and sporulation of the *Verticillium* wilt fungus. — *Phytopathology*, **54**, pp. 765-770.
- KLEBAHN, H. — 1913. Beitrage zur Kenntnis der Fungi Imperfecti. I. Eine *Verticillium* - Krankheit aut Dahlien. — *Mykol. Zentbl.*, **3**, pp. 49-66.
- LUDBROOK, W.H. — 1932. Pathogenicity and environal studies on *Verticillium Hadromycosis*. — *Phytopathology*, **23**, pp. 117-154.
- MALCA, I., D.C. ERWIN, W. MOJE & B. JONES — 1966. Effect of pH and carbon and nitrogen sources on the growth of *Verticillium albo-atrum*. — *Phytopathology*, **56**, pp. 401-406.
- MARTINSON, L.A. — 1963. Inoculum potential relationships of *Rhizoctonia solani* mesured with soil microbiological sampling tubes. — *Phytopathology*, **53**, pp. 634-638.
- MARTINSON, L.A. & L. ENGLAND — 1967. Use of growth rates at high temperature to confirm identification of *V. albo-atrum* and *V. dahliae*. — *Phytopathology*, **57**, p. 821.
- MESSIAEN, C.M. & R. LAFON — 1965. Les maladies des plantes maraichères. — I.N.R.A., vol. II, pp. 295-317, France.
- 1969. Maladies des plantes maraichères. — Institut National de la Recherche Agronomique.
- MESSIAEN, C.M. & P. PECAUT — 1963. Etude sur la maladie du « Fil » de la tomate. — Rapport dactylographié, Mission de Coopération Technique du 1<sup>er</sup> au 6 avril 1963.
- MILTON, J.M., W.G. ROGERS & I. ISAAC — 1971. Application of acrylamide gel electrophoresis of soluble fungal proteins to taxonomy of *Verticillium* species. — *Trans. Br. mycol. Soc.*, **56**, pp. 61-65.
- NADAKAVUKAREN, M.J. — 1962. Ultra structure of *Verticillium albo-atrum* microsclerotia. — *Phytopathology*, **52**, p. 745 (Abstr.).

- NICKERSON, W.J. & Z. MANKOWSKI — 1953. Role of nutrition in the maintenance of the yeast-shape in *Candida*. — *Am. J. Bot.*, **40**, pp. 584-592.
- NICKERSON, W.J. — 1954. An enzymatic locus participating in cellular division of a yeast. — *J. Gen. Physiol.*, **37**, pp. 483-494.
- NICKERSON, W.J. & G. FACONE — 1956. Identification of protein disulfide reductase as a cellular enzyme in yeast. — *Science*, **124**, pp. 722-723.
- O.C.E. — 1971. Bilan 1965-71, perspectives 1980, Maroc.
- PEGG, G.F. — 1957. A hyaline variant of *Verticillium albo-atrum* pathogenic to tomato plants. — *Phytopathology*, **47**, pp. 57-58.
- 1974. *Verticillium diseases*. — *Rev. Pl. Path.*, **53**, pp. 157-182.
- PELLETIER, G. & C. AUBE — 1970. Conidial size and contents in *Verticillium* as affected by environmental factors. — *Can. J. Microbiol.*, **16**, pp. 231-236.
- PELLETIER, G. & R. HALL — 1971. Chemotaxonomic interpretation of changes in protein composition of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* during germination and sporulation (*Rev. Pl. Path.*, 1972, **51**, (6), 2186 j) — *Phytoprotection*, **52**, (3), pp. 131-142.
- PRESLEY, J. — 1941. Saltants from a monosporic culture of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, **31**, pp. 1137-1139.
- RANNEY, C.D. — 1961. Effects of nitrogen source and rate on the development of *Verticillium* wilt of cotton. — *Phytopathology*, **52**, p. 38.
- REINKE, J. & G. BERTHOLD — 1879. Die Zersetzung der kartoffel durch Pilze. Untersuch. — *Bot. Lab. Univ. Göttingen*, pp. 67-96, Berlin, Verl. van Wiegandt, Hempel & Pavey.
- REISS, J. — 1969. On the problem of the systematic distinction between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Z. Pflanzk.* — *Pfl. Path. Pflschutz*, **75**, (8), pp. 480-484.
- ROTH, J.N. & W.H. BRANDT — 1964. Nuclei in spores and mycelium of *Verticillium*. — *Phytopathology*, **54**, p. 363.

- RUDOLPH, B.A. — 1931. *Verticillium* hadromycosis. — *Hilgardia*, **5**, pp. 201-351.
- SACCARDO — 1886. *Sylloge Fungorum*, **IV**, p. 150.
- SCHMOTINA, G.E. & M.V. GORLENKO \* — 1967. Morphological variability of the causal agent of *Verticillium*, wilt under different nutritional conditions (résumé dans RAM, **47**, 53). — *Biol. Nauki*, **10**, (8), pp. 109-118 (Dept. Lower Pl., Univ. Moscow).
- SCHNATHORST, W.C. — 1965. Origin of new growth in dormant microsclerotial masses of *Verticillium albo-atrum*. — *Mycologia*, **57**, pp. 343-351.
- SCHREIBER, L.R. & jr. GREEN Jr. — 1963. Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. — *Phytopathology*, **53**, pp. 260-264.
- 1966. Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. — *Phytopathology*, **56**, pp. 110-111.
- SKADOW, K. \* — 1969. A contribution to *Verticillium* taxonomy (résumé dans RAM, **49**, 964). — *Arch. Pflschutz*, **5**, (3), pp. 155-166.
- SKOTLAND C.B. — 1971. Pathogenic and non pathogenic *Verticillium* species from south central Washington. — *Phytopathology*, **61**, 435 (Abstr.).
- SMITH, H.C. — 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus*. — *New Zeland J. Agr. Res.*, **8**, pp. 450-478. Cité par Mohamed El Mahjoub, 1971 dans thèse de 3<sup>e</sup> cycle.
- TOLMSSOFF, W.F. — 1972. Diploidization and heritable gene repression depression as major sources for variability in morphology, metabolism, and pathogenicity of *Verticillium* species. — *Phytopathology*, **62**, 4 (Abstr.).
- TOWSEND, B.B. — 1957. Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain Fungi. — *Ann. Bot.*, **21**, pp. 153-166.
- TREVETHICK, J. & R.C. COOKE — 1971. Effects of some metabolic inhibitors and sulphur-containing amino acids on sclerotium

- formation in *Sclerotium rolfsii*, *S. delphinii* and *Sclerotinia sclerotium*. — Trans. Br. Mycol. Soc., **57**, (2), pp. 340-342.
- TURIAN, G. — 1969. Différenciation fongique. — Collection Monographies de Physiologie Végétale, Ed. Masson, Paris.
- VAN DEN ENDE, G. \* — 1958. Investigations of the plant parasite *Verticillium albo-atrum* (résumé dans RAM, 1959, pp. 312-313). — Acta Botanica Neerlandica, **VII**, pp. 665-740. Analyse bibliographique dans Revue de Mycologie, **24**, 78.
- VAN DER MEER, J.H.H. — 1925. *Verticillium* wilt of herbaceous and woody plants. — Med. Landbouwhoogesch (Wageningen), **28**, pp. 1-82.
- VIENNOT-BOURGIN, G. — 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées., Ed. Masson, Paris.
- VIGOUROUX, A. & C. CASTELLAN — 1969. La Verticilliose de l'Abricotier. — Ann. de phytopathologie, **3**.
- WHEELER, B.E.J. & N. SHARAN — 1965. The production sclerotia by *Sclerotium rolfsii*. — Trans. Br. mycol. Soc., **48**, pp. 292-301.
- WILHEIM, S. — 1948. The effect of temperature on the taxonomic characters of *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold. — Phytopathology, **38**, p. 919.
- 1950. *Verticillium* wilt in acid soils. — Phytopathology, **40**, pp. 776-777.
- 1951. Effect of various soil amendments on the inoculum potential of the *Verticillium wilt fungus*. — Phytopathology, **41**, pp. 684-690.
- 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. — Phytopathology, **45**, pp. 180-181.

---

\* Pour ces articles, nous n'avons pu consulter que le résumé dans la RAM.

Achévé d'imprimer sur les presses des  
EDITIONS MAROCAINES ET INTERNATIONALES  
11, Avenue de Rabat  
TANGER



المملكة المغربية

50



# العواصم

مجلة مغربية للبحث الزراعي



إدارة البحث الزراعي

- الرباط -

يناير 1974

فيما يخص جميع المعلومات حول : انجازات البحث  
الزراعي وكذا مجلة العوامية، اكتبوا الى :  
قسم الطبع والنشر والتوزيع  
المعهد الوطني للبحث الزراعي  
صندوق البريد 415 الرباط البريد المركزي

---

الاذن من الحساب الجاري بالبريد تحت عنوان «مصلحة الموارد لقسم الطبع والنشر والتوزيع بالمعهد الوطني  
للبحث الزراعي بالرباط» الحساب الجاري رقم 452 88