



Effet d'une souche non pathogène de *Fusarium oxysporum* sur l'expression de la fusariose chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Sékou DIABATE¹, Jean Noël KONAN KOUAME^{2*}, Désire ALLOU² et François HALA N'KLO²

¹Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Laboratoire Central de Biotechnologies, 01 BP 1740 Abidjan 01, Côte D'Ivoire.

²Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Station de Recherche de La Mé, 13 BP 989 Abidjan 13, Côte D'Ivoire.

*Auteur correspondant, E-mail: jnkonan@gmail.com; konan_jeannoel@yahoo.fr
Tel: (+225) 02 25 17 21 / 07 80 79 01

RESUME

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la réaction vis-à-vis de la fusariose de plantules de palmier à huile prémunies auparavant d'une souche non pathogène de *Fusarium oxysporum*. L'évaluation a porté sur des plantules issues d'un croisement tolérant et d'un croisement non tolérant à la fusariose. Les résultats ont montré, qu'après quatre mois d'inoculation de l'agent pathogène, 0% et 2,5% de plants malades ont été observés respectivement chez les plantules issues du croisement tolérant et du croisement non tolérant à la fusariose. Par contre, lorsque les plantules n'ont pas été pré-inoculées avant avec la souche non pathogène de *Fusarium oxysporum*, le pourcentage cumulé de fusariose, après quatre mois d'incubation de l'agent pathogène, a varié entre 7,5% et 12,5% pour le croisement tolérant et de 14,5% à 47,5% pour le croisement non tolérant à la fusariose. Il ressort donc de l'étude que l'inoculation, à un croisement sensible d'une souche non agressive de *Fusarium oxysporum* pouvait lui conférer le pouvoir fongitoxique et améliorer la fongitoxicité chez un croisement tolérant.

© 2013 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Induction, fongitoxicité, agent non agressif, prémunition.

INTRODUCTION

La fusariose vasculaire est la maladie la plus grave du palmier à huile en Afrique tropicale. Elle est provoquée par un champignon d'origine tellurique, *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. En Côte d'Ivoire, la fusariose a occasionné la perte de plusieurs centaines d'hectares de palmeraies dans la zone de savane de Dabou, avant d'apparaître dans les plantations installées sur d'anciennes zones forestières (Franqueville et Diabaté, 1995).

Maladie de l'âge adulte, la fusariose s'exprime en replantation dès la première année de culture pour se stabiliser progressivement à partir de quatre à cinq ans (Allou et al., 2001, 2003). Bien que les composantes de l'environnement et les techniques culturales agissent sur l'expression des symptômes et l'intensité des dégâts (Franqueville et Diabaté, 1995), la recherche de matériel végétal tolérant, assurée par des tests d'inoculation de l'agent pathogène en préépinière, constitue la seule voie qui

permette de lutter contre la maladie (Renard et al., 1980). Après l'inoculation de l'agent pathogène, la tolérance à la fusariose va s'exprimer chez les plantules en préépinière par une accumulation au niveau racinaire de substances phénoliques toxiques pour le pathogène (Diabaté et al., 2009, 2010).

En outre, de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle protecteur d'organismes antagonistes de *Fusarium oxysporum* dans le développement des fusarioses vasculaires (Diabaté et al., 2012). La notion de prémunition ou de protection croisée est alors évoquée par certains auteurs qui y voient les prémisses d'une lutte biologique. Gbongue et al. (2012) ont annoncé que l'action antagoniste entre certaines souches de *Fusarium oxysporum* sp., saprophytes du palmier à huile, et l'agent pathogène *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* (Foe) peut permettre de conférer la prémunition contre la fusariose à des plants sensibles de palmier à huile. Toutefois, l'action de ces souches non pathogènes de *Fusarium oxysporum* dans cette lutte biologique n'a pas encore été suffisamment évoquée. L'action d'un microorganisme antagoniste peut se situer à différents niveaux. Elle peut contribuer à ralentir le développement de l'agent pathogène, stimuler le développement racinaire ou stimuler le développement végétatif de la plante. Ces différents effets vont dépendre entre autres du microorganisme (genre, espèce ou souche) utilisé, du pathogène (genre, espèce et virulence) et du type de matériel végétal.

La présente étude a été proposée pour déterminer l'action d'une souche non pathogène de *Fusarium oxysporum* dans l'acquisition de la prémunition contre la fusariose chez des plants sensibles de palmier à huile. L'évolution de la fongitoxicité d'une part, et l'évolution des teneurs phénoliques d'extraits racinaires d'autre part, de croisements tolérants ou sensibles à la fusariose, pré inoculés ou non par la souche non agressive, ont été comparées.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de jeunes plants de palmier à huile. Ces plants, au stade deux feuilles, appartiennent à deux croisements, l'un connu pour sa tolérance (L564D x L498P) et l'autre pour sa sensibilité à la fusariose (L238T x L404D). Pour chaque croisement, 256 plantules ont été utilisées pour conduire l'expérimentation.

Inoculum

L'inoculum est composé de deux souches de champignons dont l'une pathogène (M179) et l'autre non pathogène (R168). La première souche a été isolée de tissus de palmier malade et la seconde de racines de palmier sain. Ces souches de champignons sont conservées en culture monospores.

Site de l'étude

L'étude a été réalisée à la station d'expérimentation et de production Robert Michaux de Dabou du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Côte d'Ivoire. Cette station, située à 35 km à l'Ouest d'Abidjan, est spécialisée dans la sélection de matériel végétal de palmier à huile tolérant à la fusariose.

Dispositif expérimental

Des plantules de palmier à huile âgés de 2 mois ont été disposées en 5 blocs expérimentaux. Chaque bloc expérimental est composé de 64 plantules dont 32 sont issues du même croisement. A l'intérieur de chaque bloc, les plantules d'origines distinctes sont disposées sur des lignes contiguës de 4 plantules. Un traitement spécifique est appliqué à chaque bloc expérimental.

Dans le traitement A ou traitement témoin, les plantules n'ont pas été inoculées avec les inocula des deux souches de *Fusarium oxysporum*. Il s'est agit dans ce traitement de verser simplement à T0 (date de début de l'expérimentation), 20 ml d'eau autour du collet des plantules. Pour ce qui concerne les traitements B et C, les plantules

ont été inoculées à T0, au niveau du système racinaire, avec les inocula respectivement de la souche non agressive (R168) et de la souche agressive (M179) de *Fusarium oxysporum*. Le traitement D, par contre, est composé de plantules pré-inoculées à T0 avec la souche non agressive (R168) de *Fusarium oxysporum*, puis à T0 + 10 jours de la souche agressive (M179). Le traitement E a permis de suivre le comportement des plantules inoculées avec la souche virulente à T0 + 10 jours.

Les tests ont été réalisés sur 4 plantules par croisement à chaque stade de prélèvement. Les prélèvements ont été effectués le 1^{er} jour, le 3^e jour, le 8^e jour, le 15^e jour, le 30^e jour, le 60^e jour, le 90^e jour et le 120^e jour après la date de T0 + 10 jours.

Préparation inoculum et inoculation

➤ Préparation inoculum

Les souches pathogène (M179) et non pathogène (R168) sont conservées en culture monospores. La préparation d'un inoculum a été réalisée selon la procédure décrite par Renard et al. (1972). Une suspension de spores et de mycélium utilisée pour l'inoculation est composée en moyenne de 5.10^6 spores par ml de milieu.

➤ Inoculation

Les collets des plantules de palmier à huile ont été préalablement dégagés pour mettre à nu leurs jeunes racines. L'inoculation a ensuite consisté à verser 20 ml d'eau ou d'inoculum (de souche pathogène ou non) autour des collets.

L'incidence de la fusariose et l'évolution des teneurs phénoliques d'extraits racinaires ont été observées régulièrement aux différents stades de prélèvement.

Extraction d'extraits bruts, dosage des composés phénoliques et Test de fongitoxicité

Extraction des extraits bruts

Les racines ont été découpées finement, pesées et broyées dans de l'azote liquide. Le broyat a été repris dans de l'Ethanol à 70 %

selon la méthode de Diabaté et al. (2009). L'extrait brut a été ensuite conservé au congélateur.

Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux des extraits racinaires a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu à équivalence de poids de tissus frais (Diabaté et al., 2009).

Test de fongitoxicité

Les propriétés fongitoxiques des extraits bruts racinaires à équivalence de phénols totaux ont été appréciées en faisant germer, sur des milieux à base de ces extraits, des spores de *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaedis*. La durée d'incubation a été de quinze heures à la température de 27 °C. L'inhibition de la germination des spores a été exprimée en pourcentage et correspond au rapport : (Nombre de spores germés sur extrait témoin - nombre de spores germés sur extrait test) / nombre de spores germés sur extrait témoin

Analyses statistiques

L'incidence de la fusariose au niveau de chaque croisement a été appréciée à l'aide de calcul du pourcentage cumulé d'apparition de la maladie après 4 mois d'incubation des différentes souches de *Fusarium oxysporum*. Les calculs ont été réalisés sur Excel version 2010.

L'ampleur et l'évolution de l'effet fongitoxiques des extraits racinaires ont été mises en évidence sur des courbes d'évolution tracées également à l'aide du logiciel Excel 2010.

RESULTATS

Expression de la fusariose

Quel que soit l'origine des semences, la fusariose est apparue lorsque l'inoculum de l'agent pathogène M179 a été apporté aux plantules au début de l'expérimentation (Tableau 1). Chez le croisement tolérant, le taux de plantules atteintes par la maladie a été de 12,5% et 7,5%, selon que l'inoculum a été apporté respectivement au début et 10 jours après le début de l'expérimentation. Chez le

croisement sensible, les pourcentages de plantules atteintes par la fusariose ont été de 47,5% et 14,5% pour les plantules infectées respectivement au début et le 10^e jour de l'expérimentation. L'incidence de la maladie a été 2 à 4 fois plus importante chez le croisement sensible.

A l'opposé, lorsque seul l'inoculum de l'agent non pathogène R168 a été apporté aux plantules, la fusariose n'est pas apparue au bout de quatre mois, quelque soit le type de semence. Mais, si au 10^e jour de l'expérimentation, l'inoculum de l'agent pathogène M179 est apporté en plus, aucune plantule n'a été atteinte de la fusariose chez le croisement tolérant. Chez le croisement sensible, le taux de plantules atteintes de la maladie a été de 2,5% (Tableau 1).

Fongitoxicité des extraits bruts

L'inoculation de la souche pathogène M179 au début de l'expérimentation (T0) a provoqué une augmentation de la fongitoxicité du matériel végétal, que celui-ci soit tolérant ou sensible (Figure 1). En effet, le taux de fongitoxicité est resté globalement supérieur à ceux des plantules non inoculées. Toutefois, le taux de fongitoxicité a régulièrement baissé chez le croisement sensible. Il est passé, d'une valeur d'environ 70% au début de l'expérimentation (T0) à une valeur très proche de celle des plantules sensibles non inoculées au bout de 4 mois (Figure 1a). Pour ce qui concerne le croisement tolérant, le taux de fongitoxicité a diminué jusqu'en dessous de 50% le 90^e jour avant d'augmenter constamment et atteindre une valeur proche de 70% le 120^e jour (Figure 1b). Mais, les extraits bruts obtenus des plantules appartenant au croisement tolérant ont été globalement plus toxiques que ceux obtenus à partir des plantules issues du croisement sensible (Figure 2). Par ailleurs, les résultats ont montré que le taux de fongitoxicité chute rapidement, d'environ 70% à 50% au bout de 3 jours d'expérimentation, avant d'augmenter chez le croisement tolérant et de se stabiliser visiblement chez le croisement sensible.

Lorsque l'inoculum a été la seule souche non agressive R168, les propriétés fongitoxiques du matériel végétal ont également augmenté, que le matériel soit tolérant (Figure 3a) ou sensible (Figure 3b). En effet, au terme des 4 mois, le taux de fongitoxicité est passé d'environ 40% à 80% aussi bien chez le croisement tolérant que chez le croisement sensible.

Les résultats ont montré par ailleurs que les plantules, issues du croisement sensible, inoculées de la souche non pathogène R168 au début de l'expérimentation (T0), produisaient des extraits bruts plus fongitoxiques au bout de 40 jours environ que ceux obtenus à partir de plantules du croisement tolérant inoculées de la souche pathogène M179 (Figure 4). Avant cette date, les 2 croisements se sont comportés de la même manière. Le taux de fongitoxicité a également baissé chez les deux croisements les 3 premiers jours avant d'augmenter.

Lorsque les inocula R168 puis M179 ont été inoculés aux plantules, les propriétés fongitoxiques ont très peu variées d'un type de croisement à un autre (Figure 5).

Evolution des teneurs en composés phénoliques totaux

Lorsque la souche pathogène M179 a été inoculée aux plantules au début de l'expérimentation, la teneur en phénols totaux a augmenté entre trois et huit jours chez les plantules issues du croisement tolérant alors qu'elle est restée à un niveau beaucoup plus faible chez le croisement sensible (Figure 6). Les proportions de composés phénoliques totaux observés ont été beaucoup plus élevées quand l'inoculum de souche non pathogène R168 a été apporté avant la souche virulente M179 chez les plantules issues du croisement tolérant (Figures 7a et 7b).

Par contre, les teneurs en phénols ont très peu varié entre trois et huit jours quand les plantules issues de croisement sensible ou tolérant n'ont pas reçu d'inoculum de souche pathogène M179 (Figures 8a et 8b).

Tableau 1 : Pourcentages cumulés du taux d'infection dû à la fusariose après quatre mois d'incubation.

	Inoculé M179 (To)	Inoculé R 168 (To)	Inoculé R168+M179	Inoculé M179 (To+ 10 jours)
L 564D x L 498P	12.5	0	0	7.5
L404D x L238T	47.5	0	2.5	14.5

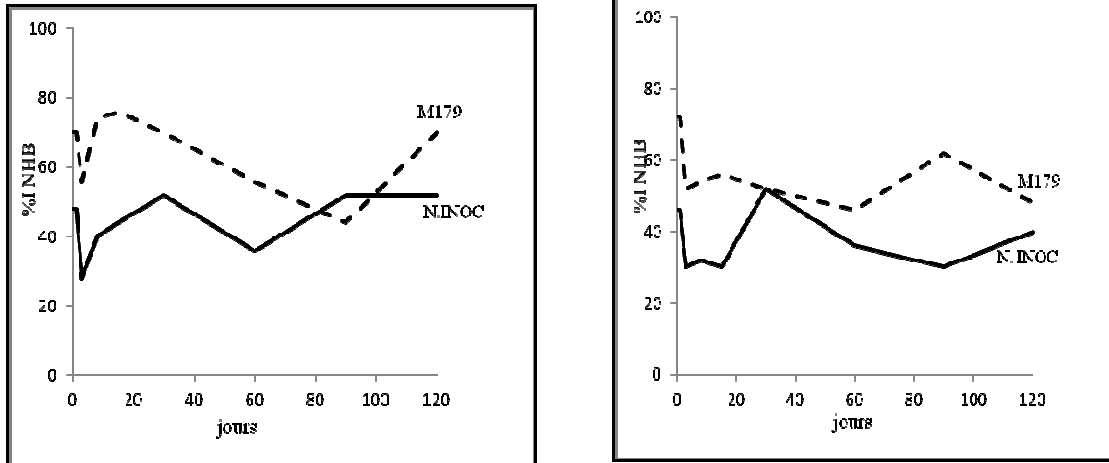


Figure 1 : Evolution de la toxicité *in vitro* du croisement sensible (A) et du croisement tolérant (B) inoculés ou non par M179 au début de l'expérimentation (To).

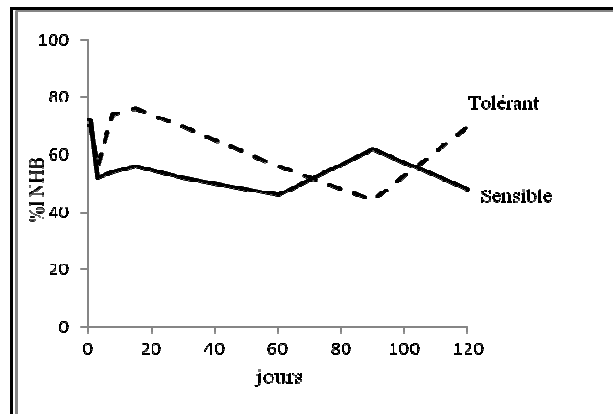


Figure 2 : Evolution de la toxicité *in vitro* de croisements sensible ou tolérant inoculés par l'agent pathogène M179 au début de l'expérimentation (T0).

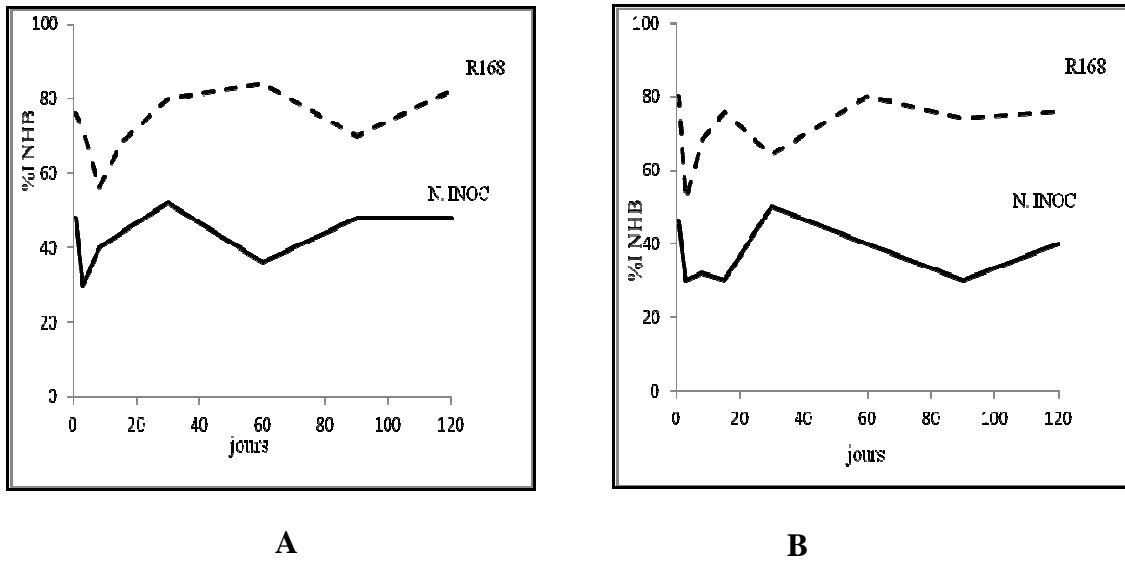


Figure 3 : Evolution de la toxicité *in vitro* du croisement sensible (A) et du croisement tolérant (B) inoculés ou non par la souche non pathogène R168 au début de l'expérimentation (T₀).

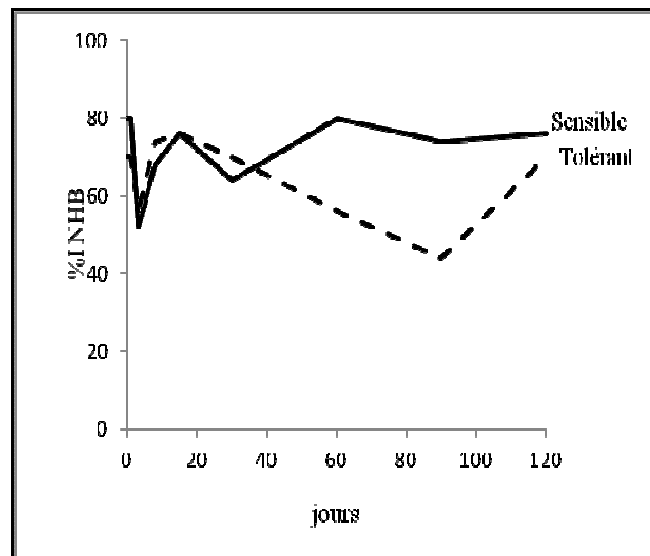


Figure 4 : Evolution de la toxicité *in vitro* du croisement tolérant inoculé par la souche virulente M179 et du croisement sensible inoculé par l'agent non pathogène R168 au début de l'expérimentation (T₀).

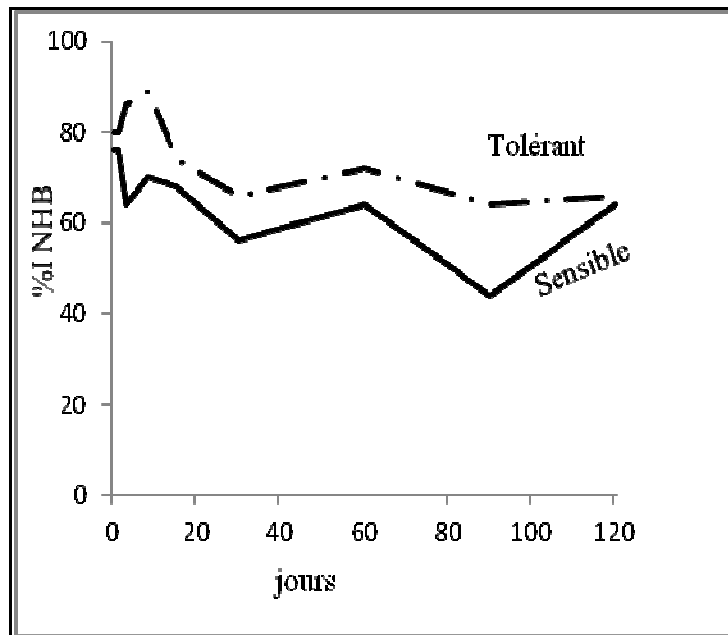


Figure 5 : Evolution de la toxicité *in vitro* de croisement tolérant et sensible inoculés par la souche non pathogène R168 puis la souche pathogène M179.

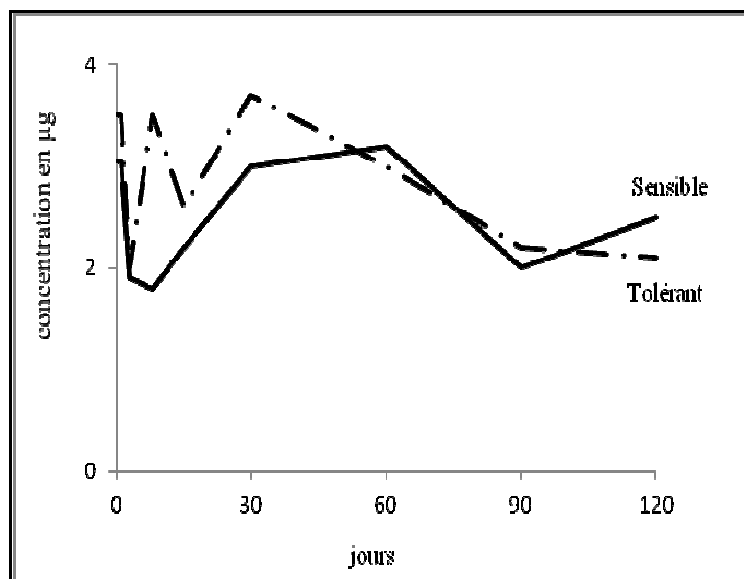


Figure 6 : Evolution des composés phénoliques totaux chez le croisement sensible et le croisement tolérant à la fusariose après inoculation de la souche pathogène M179.

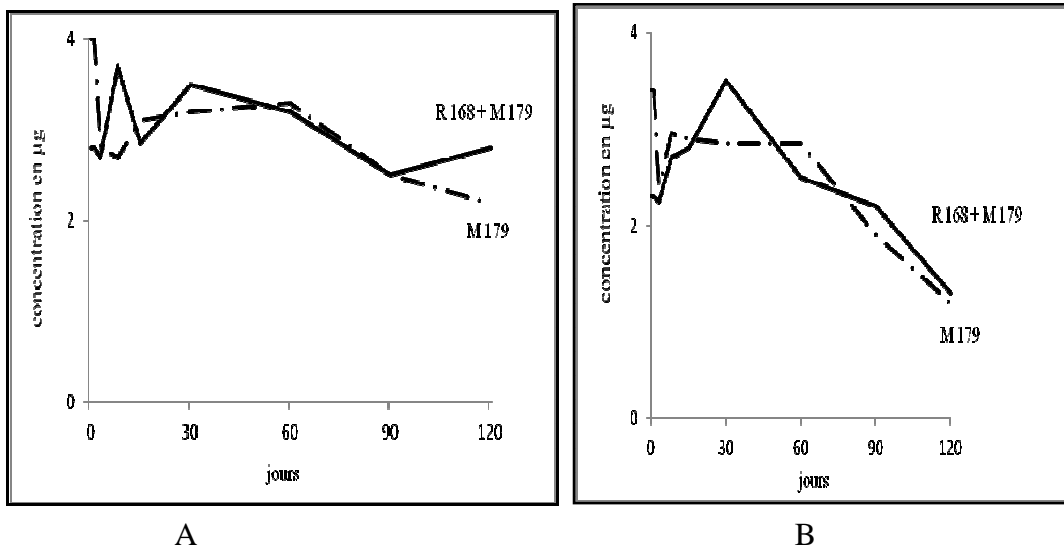


Figure 7 : Evolution des composés phénoliques totaux après inoculation de la souche non pathogène R168 et de la souche pathogène M179 ou après inoculation de la seule souche pathogène M179 chez les plantules issues du croisement tolérant (A) ou sensible (B) à la fusariose.

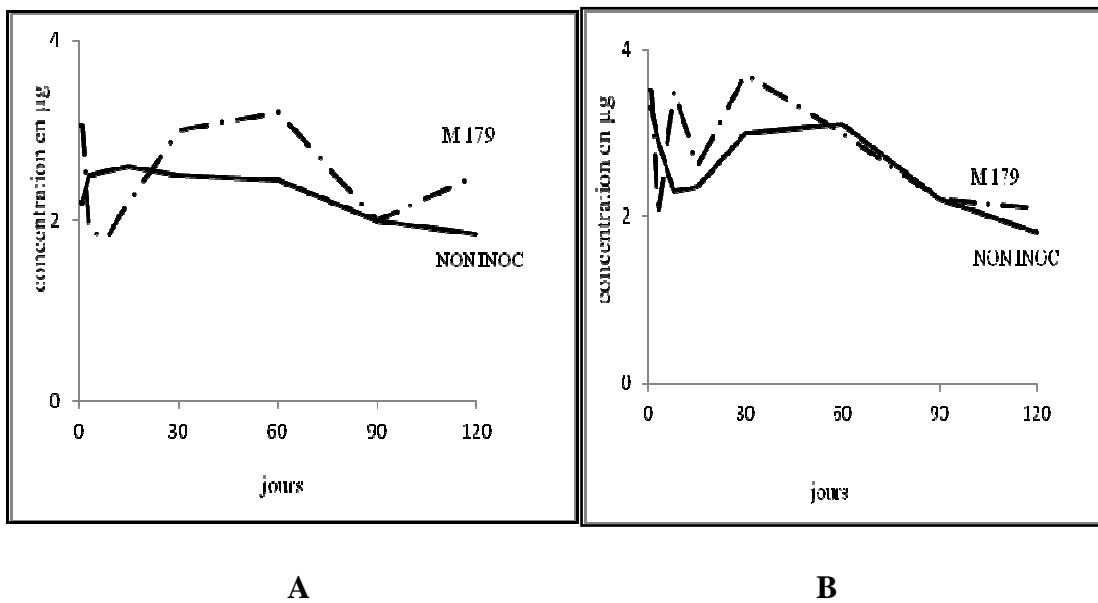


Figure 8 : Evolution des composés phénoliques totaux après inoculation ou non de la souche pathogène M179 chez le croisement sensible (A) et le croisement tolérant (B) à la fusariose.

DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette note confirment que la protection croisée du palmier à huile à l'égard de la fusariose vasculaire peut être obtenue par la pré-inoculation de souches saprophytes de *Fusarium oxysporum* suivie de celle du pathogène. Cette protection réduit significativement les dégâts provoqués par la seule inoculation du pathogène. Diabaté et al. (2012) et Gbongue et al. (2012) ont montré par ailleurs que la préinoculation de l'agent pathogène de la fusariose du gombo (*Fusarium oxysporum* f.sp *hibiscus*) au palmier avant celle de *Fusarium oxysporum* f.sp *elaeidis* réduisait significativement les dégâts provoqués par la seule inoculation du pathogène. Cette protection croisée a été constatée aussi chez le melon où la résistance a pu être induite chez les variétés sensibles au *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* par le phénomène de prémunition quand on les inocule d'abord avec une autre souche ou une forme spéciale ne les attaquant pas (Mas et Molot, 1977). Il a été de même pour la tomate qui a pu être protégée en serre contre la fusariose grâce à cette méthode de lutte biologique (Couteaudier et al., 1985). Un rôle prémunissant de R168 sans confrontation ultérieure de celui-ci avec l'agent pathogène a été observé; bien que cet effet soit moindre que dans le cas de la confrontation. Ceci signifie que la protection apportée par la souche non pathogène R168 repose au moins en partie sur sa capacité à déclencher les mécanismes de défense des plantules puisque la compétition est exclue par la non confrontation des souches. Notre étude a aussi montré à travers les synthèses en composés phénoliques totaux et leur fongitoxicité sur les spores du pathogène que le phénomène de protection croisée était régi par l'élicitation de ces composés. Leur toxicité agissait favorablement à l'inhibition de la germination des spores du pathogène dès les premiers jours de l'infection. Des travaux antérieurs ont montré que ces composés phénoliques appartenaient au groupe des flavonoïdes. Ils

sont synthétisés dès les premiers jours qui suivent l'infection et pouvaient durer dans le temps (Diabaté et al., 2009, 2010). D'autres travaux ont montré le rôle des composés phénoliques dans la résistance de certaines plantes cultivées aux agents pathogènes. En effet, l'inoculation d'une souche de *Pseudomonas* 7 jours avant celle de *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi* permet d'induire la résistance de l'œillet à la fusariose par augmentation des synthèses en phytoalexines (Kroon et al., 1991). C'est aussi le cas de la fusariose de la pastèque provoquée par *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum*, dont le développement peut être sensiblement retardé ou réduit par la pré inoculation d'autres formes spécialisées. Il est donc possible d'envisager un système dans lequel l'installation des souches avirulentes va constituer un préalable nécessaire au phénomène de protection croisée rendu possible par la compétition entre *Fusarium*, compétition éventuellement relayée par l'élicitation des mécanismes de défense de l'hôte.

Conclusion

La fusariose du palmier à huile, provoquée par l'inoculation artificielle de *Fusarium oxysporum* f.sp *elaeidis* au stade pré-pépinière peut être limitée par l'apport préalable d'une souche non pathogène. Ces souches ont un effet antagoniste qui repose essentiellement sur leur installation préalable. Cependant, un effet systémique de l'induction de résistance reposant sur la synthèse de composés phénoliques toxiques pour l'agent pathogène est décelable. L'évolution des propriétés fongitoxiques montre l'existence de deux réponses à l'inoculation. La première réponse se manifeste un jour après l'inoculation du champignon et est indépendante du degré de tolérance du croisement. Elle peut être interprétée comme une réaction à la blessure des racines provoquée par le dégagement du collet. La deuxième réponse qui se manifeste plus tardivement, entre trois et huit jours après

l'inoculation, est au contraire liée à la tolérance de l'hôte et reflète l'efficacité des mécanismes de défense des plantules. On note particulièrement, que La pré inoculation de la souche non pathogène de *Fusarium oxysporum* à un croisement sensible permet de réduire les dommages engendrés par l'inoculation du parasite en augmentant les propriétés fongitoxiques de ce croisement jusqu'à les amener au niveau de celles d'un croisement tolérant. A l'échelle d'une plantation, ou d'une palmeraie, ces résultats suggèrent qu'il est utile de favoriser le développement de souches non pathogènes à travers les plantes de couverture ou des cultures associées.

REFERENCES

- Allou K, Ake S, Ahoussou N, Ballo k, Diabaté S. 2001. Effet de la jachère sur l'expression de la fusariose vasculaire du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq). *Agron. Afr.*, **13**(1): 21-33.
- Allou K, Ahoussou, Ake S, Diabaté S, Franqueville H (de). 2003. Comportement de clones de palmier à huile au champ en zones de haute densité de *Fusarium oxysporum* f. sp *elaeidis* en Côte d'Ivoire. *Agron. Afr.*, **15**(1): 29-38.
- Couteaudier Y, Letard M, Alabouvette C, Louvet J. 1985. Lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la tomate. Résultats en serre de production. *Agronomie*, **5**(2): 151-156.
- Diabaté S, Franqueville H de, Adon B, Coulibaly OA, Ake S. 2009. The role of phenolic compounds in the determination of wilt disease tolerance of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Afr. J. Biotechnol.*, **8**(21): 5679-5690.
- Diabaté S, Aké S, Kouamé KR, Coulibaly OA, N'guessan WP. 2010. Phenolic diversity in the defence reaction of the oil palm against vascular wilt disease. *Agric. Biol. J. N. Am.*, **1**(3): 407-415.
- Diabaté S, Gbongue LR, Dick E, Bomisso EL, Franqueville H de. 2012. Etude comparée de l'action de souches non pathogènes de *Fusarium oxysporum* dans l'induction des réactions immunitaires du palmier à huile contre la fusariose. *European Journal of Scientific Research*, **73**(2): 193-201.
- Franqueville H (de), Diabaté S. 1995. La fusariose du palmier à huile en Afrique de l'Ouest. *Plantation, Recherche, Développement*, **2**: 5-10.
- Gbongue LR, Diabaté S, Bomisso EL, Dick E, Franqueville H, Koné D. 2012. Etude de la confrontation des souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* dans l'acquisition de la résistance contre la fusariose du palmier à huile. *Journal of Animal and Plant Sciences*, **15**(2): 2171-2183.
- Kroon BAM, Scheffer RJ, Elgersma DM. 1991. Induced resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt invoked by *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi*. *Neth. J. Pl. Path.*, **97**: 401-408.
- Mas P, Molot P. 1977. Influence de la concentration de l'inoculum en microconidies sur la prémunition du melon contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Ann. Phytopathol.*, **9**(1): 71-75.
- Renard JL, Gascon JP, Bachy A. 1972. Recherches sur la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux*, **35**(8-9): 387-393.
- Renard JL, Noiret JM, Meunier J. 1980. Sources et gammes de résistance à la fusariose chez le palmier à huile, *Elaeis guineensis* et *Elaeis melanococca*. *Oléagineux*, **35**(8-9): 387-393.