

ANALYSE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE DIFFERENTES POPULATIONS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, EN LIEN AVEC LES RISQUES EPIDEMIOLOGIQUES

LAALA DJEKIREF⁽¹⁾, MOHAMED BELHAMRA⁽¹⁾, CHRISTIAN CILAS⁽²⁾

⁽¹⁾Département d'Agronomie, Université Mohamed Khider, Biskra.

⁽²⁾CIRAD, UR, bioagresseurs, Montpellier

djekiref22896@gmail.com, segmadz@yahoo.fr, christian.cilas@cirad.fr

RESUME

L'analyse de la structure génétique de différentes populations du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal de la maladie du bayoud sur palmier dattier, a été effectuée par l'application de différentes techniques (test de pathogénicité, compatibilité végétative, marqueurs moléculaires). L'appréciation du niveau d'agressivité des isolats du pathogène a révélé une variabilité notable. Le test de la compatibilité végétative nous a permis de discerner nettement les souches de *F.o.albedinis* des souches saprophytes de *F oxysporum*, et d'assigner les unes et les autres à des groupes de compatibilité végétative (VCG) distincts. L'application, de la RAPD, à un niveau d'initiation, révèle une homogénéité des isolats pathogènes. L'analyse par d'autres techniques de marqueurs moléculaires plus fines permettrait, dans la suite de ce travail, de mieux décrire la variabilité génétique de cette espèce. Des mutants *nit*, équivalents à *are A*, chez *Aspergillus nidulans*, et à son homologue *nit-2*, chez *Neurospora crassa*, seraient identifiés.

MOTS CLES: Palmier dattier - *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* - structure génétique –pathogénicité - compatibilité végétative.

ABSTRACT

The analysis of the genetic structure of different populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, the causative agent of bayoud disease on date palm, was carried out by the application of different techniques (pathogenicity test, vegetative compatibility, molecular markers).The assessment of the level of aggressiveness of the pathogen isolates revealed significant variability. The vegetative compatibility test allowed us to clearly discern the *F.o.albedinis* strains from the *F. oxysporum* saprophytic strains, and assign both to distinct vegetative compatibility groups (VCG).The application of RAPD at an initiation level reveals homogeneity of pathogenic isolates. The analysis by other techniques of finer molecular markers would allow us, in the rest of this work, to better describe the genetic variability of this species. Nit mutants, equivalent to *are A*, in *Aspergillus nidulans*, and its counterpart *nit-2* in *Neurospora crassa*, would be identified.

KEYWORDS: Date palm - *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* - genetic structure – pathogenicity - vegetative compatibility.

1 INTRODUCTION

Le Bayoud est sans contexte la plus grave maladie cryptogamique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) [13]. La lutte génétique, par la sélection de variétés et de clones de palmiers dattier résistants, préconisée pour lutter contre cette fusariose, semble être l'unique voie prescrite par différents chercheurs dans ce domaine [13],[42]. Cependant, ce moyen de lutte présente le risque de provoquer l'émergence, à long ou à moyen terme, de nouveaux pathotypes. Ceci a été démontré pour plusieurs cas de fusarioses (du bananier, du cotonnier, du pois, du melon et de la tomate) [1]. Le volet de cette recherche épidémiologique consiste à déterminer la combinaison des variables responsables de la propagation de la maladie et de

sa gravité **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Pour répondre à cette question il est important de cerner la structure génétique de l'agent causal, à partir d'échantillons issus des populations algériennes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* en provenance de différentes zones géographiques. Les acquis fondamentaux qui seront capitalisés à partir de cette connaissance sont plus que nécessaires ; ils devraient permettre d'évaluer l'étendue de la diversité génétique, mettre en évidence l'existence des morphes physiologiques et d'analyser sa répartition spatiale à l'intérieur des différents écosystèmes oasiens. En outre, l'approche simultanée tenant compte de la relation hôte-pathogène est utile dans le développement d'outils de lutte intégrée et du suivi des effets directs et indirects des changements climatiques.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériel fongique

Les isolats fongiques qui ont constitué le matériel de base de notre travail ont été sélectionnés par nous même sur la base de leur conformité avec la forme sauvage du pathogène. Ces derniers sont illustrés dans le Tableau 1. Le milieu de Komada [30] a été choisi pour isoler les *Fusaria* du sol étant donné sa grande sélectivité vis-à-vis de ce genre. D'autre part, trois isolats saprophytes de *F.oxysporum* ont été sélectionnés en tant que témoins. Les colonies développées ont été déterminées par leurs caractéristiques culturelles macroscopiques et microscopiques.

Tableau 01: Liste des isolats sélectionnés.

Code	Variété de dattier	Lieu	Identification	
1*	B-03/08	Hartane	Mazer	<i>F.o.a</i>
2*	B-07/08	Fegous	Berbi	<i>F.o.a</i>
3*	B-08/08	Fegous	Berbi	<i>F.o.a</i>
4*	B-12/08	Hartane	Mazer	<i>F.o.a</i>
5*	B-13/08	Fegous	Berbi	<i>F.o.a</i>
6*	B-14/08	Fegous	Mazer	<i>F.o.a</i>
7*	B-00/08	-	Mazer (sol)	<i>F.o.a</i>
8*	G-10/04	Ghars	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
9	G-10/06	Ghars	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
10	G-09/07	Ghars	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
11	G-02/04	Del't	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
12	G-04/04	Del't	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
13	G-27/07	Del't	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
14	G-07/04	Tazerzeit	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
15	G-17/04	Dokkar	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
16	G-15/05	Dokkar	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
17	G-19/07	Dokkar	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
18	G-13/06	Tafezaouine	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
19	G-17/06	Tafezaouine	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
20	G-12/05	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
21	G-17/05	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
22	G-21/07	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
23	G-23/07	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
24	G-34/08	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
25	G-20/06	Tazizaouet	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
26	G-21/05	Deglet Nour	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
27	G-14/08	T'mhamed	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
28*	G-47/90	Bentk'bala	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
29*	G-22/91	Tafezouine	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
30	G-06/92	Dokkar	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
31*	G-13/91	Deglet Nour	Ghardaïa	<i>F.o.a</i>
32*	G-00/08	-	Ghardaïa (sol)	<i>F.o.a</i>
33*	G-01/04	Ghars	Metlili	<i>F.o.a</i>

34	G-64/07	Ghars	Metlili	<i>F.o.a</i>
35	G-25/07	Dokkar	Metlili	<i>F.o.a</i>
36*	G-09/05	Tafezaouine	Metlili	<i>F.o.a</i>
37*	G-02/05	Azerza	Metlili	<i>F.o.a</i>
38	G-24/07	Azerza	Metlili	<i>F.o.a</i>
39*	G-24/05	Ghars	El-atteuf	<i>F.o.a</i>
40	G-77/07	Ghars	El-atteuf	<i>F.o.a</i>
41*	G-03/06	Deglet Nour	El-atteuf	<i>F.o.a</i>
42	G-42/08	Deglet Nour	El-atteuf	<i>F.o.a</i>
43*	G-19/07	T'dala	Dhaya	<i>F.o.a</i>
44*	G-20/04	Tafezaouine	Dhaya	<i>F.o.a</i>
45*	G-04/06	Deglet Nour	Dhaya	<i>F.o.a</i>
46	G-05/06	Deglet Nour	Dhaya	<i>F.o.a</i>
47	G-22/07	Azerza	Dhaya	<i>F.o.a</i>
48*	G-32/06	Babati	Beni -isguen	<i>F.o.a</i>
49*	A-03/11	T'guezza	Mehdia	<i>F.o.a</i>
50	A-05/11	Tillemssou	Mehdia	<i>F.o.a</i>
51	A-06/11	Tillemssou	Mehdia	<i>F.o.a</i>
52*	A-09/11	Ahartane	Mehdia	<i>F.o.a</i>
53*	A-05/04	H'mira	M'raguen	<i>F.o.a</i>
54	A-06/04	H'mira	M'raguen	<i>F.o.a</i>
55*	A-11/11	Tillemssou	Tillilène	<i>F.o.a</i>
56	A-13/11	Tillemssou	Tillilène	<i>F.o.a</i>
57*	A-08/11	T'guezza	Ouled Ali	<i>F.o.a</i>
58*	A-14/11	Inc	Timmy	<i>F.o.a</i>
59	A-15/11	Inc	Timmy	<i>F.o.a</i>
60*	A-02/92	T'guezza	Adrar	<i>F.o.a</i>
61*	A-04/92	chikh m'hamed	Adrar	<i>F.o.a</i>
62*	A-05/92	Timliha	Adrar	<i>F.o.a</i>
63*	A-08/92	Tillemssou	Adrar	<i>F.o.a</i>
64*	A-07/92	degla baidha	Adrar	<i>F.o.a</i>
65*	A-09/92	deguel	Adrar	<i>F.o.a</i>
66	A-26/92	deguel	Adrar	<i>F.o.a</i>
67*	A-00/08	-	Adrar (sol)	<i>F.o.a</i>

2.2 Matériel végétal

Il s'agit de plantules, au stade 2 feuilles, utilisées pour le test de pathogénicité. Elles ont été obtenues par la mise en germination de graines de palmier dattier (espèce hôte) issues d'un croisement contrôlé entre géniteurs sensibles à la maladie du bayoud : un pied femelle (variété "Deglet Nour") et un pied mâle (Dokkar) local.

2.3 Test de pathogénicité

2.3.1 Inoculation.

L'inoculum a été obtenu par culture agitée du matériel fongique étudié. Utilisé sous forme liquide, il a été préparé à partir d'une mise en suspension de spores dans un milieu PDA amendé par 0,08 mg de ZnSO₄ [45]. Le pH est ajusté à 4. Des fioles d'Erlenmeyer, contenant ce milieu nutritif

stérile, sont mises en agitation constante à une température ambiante, pendant 15 jours. Les suspensions sont alors ajustées à 10^6 spores / ml [43]. L'inoculation des plantules a été effectuée au stade deux feuilles. Quatre millilitres de l'inoculum sont déposés, à l'aide d'une pipette stérilisée, au niveau de la racine principale de chaque plantule.

2.3.2 Protocole expérimental

Dans le but de comparer l'agressivité des souches de notre matériel fongique sous sa forme sauvage, un test d'inoculation artificielle a eu lieu. Pour des contraintes techniques et du fait d'un faible effectif de plantules-test, on s'est contenté de choisir 34 isolats du total (marquées par un astérisque dans le tableau 1) de *F. o. albedinis*, de telle sorte que les différentes régions d'échantillonnage soient représentées. Par chacun des isolats étudiés, 40 plantules ont été inoculées. L'expérience a été faite en quatre répétitions. Parallèlement, un témoin de 40 plantules également a été réservé pour l'ensemble des isolats. Les plantules témoins ont reçu de l'eau stérile comme inoculum.

L'évolution de l'attaque des plants infestés artificiellement est suivie régulièrement. Une somme cumulative de mortalité est notée hebdomadairement pour chaque lot de plants. Les résultats obtenus sont traités par l'analyse de variance et la comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls au seuil de 5% effectuée par les logiciels Excel (Microsoft) et XLSTAT (Addinsoft) version 2010.

2.4 Test de la compatibilité végétative

Ce test est basé sur les caractéristiques génétiques des isolats à tester. La réduction du nitrate a été retenue comme marqueur. L'application du test nécessite donc l'obtention de mutants ne réduisant pas le nitrate (notés mutants *nit*); pour ce faire, nous avons procédé selon les étapes successives suivantes [39], [6]:

2.4.1 Sélection de mutants résistants au chlorate

Cela consiste à transférer en masse un fragment d'isolat fongique à partir d'un milieu naturel (PDA) sur un milieu chloraté. A partir de chaque isolat, dix fragments sont prélevés puis repiqués sur milieu KMM [4].

2.4.2 Obtention et désignation de mutants ne réduisant pas le nitrate

Les mutants ne réduisant pas le nitrate, appelés "mutants *nit*" dans le reste du texte, sont obtenus par le transfert, sur milieu minimum (MM), de bouts de secteurs sélectionnés précédemment sur le milieu KMM.

La désignation des mutants *nit* consiste à déterminer la classe à laquelle appartient chacun des mutants *nit* obtenus. Pour ce faire, on s'est basé sur les travaux de Correll *et al.* [4]; Cove [7], [8], [9],[10]; Garrett et Amy [22]; Marzluf [33]; Pateman *et al.* [36] et Tomsett et Garrett [47]. Le type,

ou la classe, des mutants *nit* est déterminé selon le phénotype physiologique obtenu sur chacun des trois milieux de caractérisation précédents. Selon ce système de désignation chaque mutant *nit* a été assigné à une des trois classes phénotypiques suivantes : *nit* 1, *nit* 3 et Nit M.

2.4.3 Confrontations

Du fait que les confrontations suivant le modèle Nit m / *nit* 1 donnent les résultats les plus concluantes, les mutants de type Nit m ont été pris comme testeurs. Un mutant Nit m par isolat a été confronté à un mutant *nit* 1 sélectionnés à partir de chacun des autres isolats étudiés. Les appariements ont été réalisés sur MM.

Notons que chacune des formes d'appariements mutants *nit* ⊗ mutants *nit* testeurs a été réalisée avec deux répétitions.

3 RÉSULTATS

3.1 Test de pathogénicité.

Le test de pathogénicité, appliqué selon le postulat de Koch, a donné les résultats illustrés par la figure 1. Elle représente le taux de mortalité des plantules de palmier dattier suite à l'effet des 34 isolats de *F. o. albedinis* au cours du temps (16 semaines) [43].

Après l'infestation artificielle, les plantules commencent à exprimer les symptômes maladiques dès la deuxième semaine. La mortalité débute à la troisième.

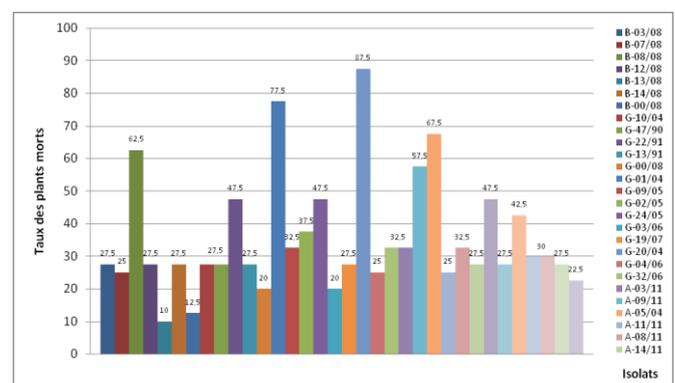


Figure 01: Taux de mortalité des plantules de palmier dattier, provoqué, après 16 semaines, par la pathogénie de 34 isolats de *F. o. albedinis* inoculés artificiellement.

Les résultats exprimant le taux de mortalité des plantules en fonction du temps présentent l'allure d'une courbe sigmoïde.

Les taux de mortalité des plants inoculés par les différents isolats varient entre 10 et 87,5 %. Ce constat indique l'existence d'un gradient d'agressivité au sein de notre échantillon d'isolats.

Pour mettre en évidence la variabilité du pouvoir pathogène inter-isolat, nous avons procédé à l'analyse de la variance des nombres des plants morts, en tenant compte d'un seul paramètre : le taux de mortalité. Le dispositif est mené en randomisation totale à un seul facteur : l'isolat.

Les différences observées entre les moyennes de mortalité des plants inoculés sont hautement significatives ($F=5,056$). Les résultats obtenus révèlent donc une grande diversité dans le niveau d'agressivité des 34 isolats testés.

A fin de comparer les groupes de moyennes des 34 isolats en fonction du taux de mortalité, une application du test de Newman et Keuls a eu lieu (intervalle de confiance de 95%).

La classification des moyennes par ce test a permis de distinguer quinze groupes homogènes d'isolats (Tab.2). Le groupe A est représenté par l'isolat B-08/08, avec un taux de mortalité de 62,5%.

Tableau 02: Classement des isolats, en fonction des taux de mortalités, par le test de Newman et Keuls

Isolats	B-08/08	G-20/04, G-32/06, G-24/05.	G.22/91, G-01/04	G-02/05, A-7/92, A-8/92.	G-19/07	A-5/92, A-2/92, A-4/92, A-03/11, A-08/11, G.47/90, A-05/04.	A-9/92, G-04/06.
Moyenne	3.618	2.527	2.218	2.018	1.836	1.667	1.482
classe	A	B	B-C	B-C-D	C-D-E	C-D-E-F	C-D-E-F-G

Tableau 02: (suite)

Isolats	G-10/04, A-14/11, A-11/11, G-09/05.	G-00/08	G-03/06, B-12/08.	G.13/91, A-00/08, B-14/08.	B-03/08, A-09/11.	B-07/08	B-13/08	B-00/08
Moyenne	1.415	1.273	1.145	0.994	0.791	0.582	0.473	0.291
classe	D-E-F-G	D-E-F-G-H	E-F-G-H-I	F-G-H-I	G-H-I-J	H-I-J	I-J	J

Il est clair, d'après le regroupement établi, que les isolats B-08/08 et B-00/08 se démarquent bien des autres en se trouvant, par ce test, chacun dans une classe à part. Le premier est parmi les isolats qui ont provoqué un taux plus élevé de mortalité. A l'opposé, le second, avec l'isolat B-13/08 est l'un des deux isolats les moins agressifs.

Du fait que le taux de mortalité le plus élevé a été provoqué par l'isolat G-20/04 (87.5 %), ce dernier peut être considéré comme le plus agressif de notre collection.

A l'exception de deux isolats G-03/06 et B-13/08, les taux de mortalité les plus faibles sont enregistrés par les isolats pris à partir du sol : A-00/08, G-00/08 et B-00/08 ; bien que le taux de mortalité enregistré par l'isolat G-03/06 soit égal à celui noté par G-00/08. Cette observation va dans le sens de ce qui a été rapportés par certains travaux qui signalent que les isolats du sol sont généralement moins agressifs que ceux isolés à partir d'un matériel végétal atteint de la fusariose en question.

3.2 Test de compatibilité végétative

3.2.1 Obtention de mutants *nit*

La quasi totalité des boutures mycéliennes récoltés à partir du milieu chloraté KMM, lorsque transférés sur le milieu

minimum (MM), donnent naissance à des colonies caractérisées par un mycélium hyalin, mince et rasant à expansion radiale, rapide et développée. Ces isolats résistants au chlorate n'ont pas pu se développer normalement sur MM; ils étaient incapables d'assimiler le nitrate comme unique source d'azote. Par conséquent, ils se sont développés sous forme de colonies minces à peine visibles, telles que décrites ci-dessus. Ce sont des mutants qu'on note "mutants *nit*".

Mille trois cent huit (1308) mutants *nit* ont été récupérés à partir de l'ensemble des 64 isolats de *F. o. albedinis* testés. Le taux des mutants *nit* stables obtenus varie d'un isolat à un autre; il est de 3 à 31 par isolat.

3.2.2 Désignation

Le tableau 3 donne le nombre des mutants *nit* par phénotype obtenus à partir de chacune des isolats étudiés. Parmi les 1308 mutants *nit* sélectionnés et restés stables, 34,86 % sont des *nit* 1, 29.89 % sont des *nit* 3 et 34.78 % s'avère des Nit M (Fig.2).

Aucun mutant *nit* 1 n'a pu être obtenu pour trois isolats (G-17/06, G-01/04 et A-13/11). D'autre part aucun mutant Nit M n'a pu être sélectionné pour dix isolats (B-03/08, G-04/04, G-27/07, G-17/05, G-21/07, G-47/90, G-03/06, G-19/07, G-

05/06, A-11/11).

Chez dix isolats de *F. o. albedinis*, certains de leurs mutants de type Nit M, en plus de leur aspect sauvage sur milieu à base de nitrite, ces mutants *nit* ont exprimé un pigment violet plus ou moins abondant. Ces mutants, représentant 5,49 % du nombre total des mutants Nit M obtenus chez toutes les isolats, ont été notés "*nit* Mv".

Pour l'isolat G.06/92, isolé à partir d'un pied "Dokkar", 20% des mutants *nit* sélectionnés n'ont pu être déterminés, conformément au système de désignation adopté, et ont été notés "*nit* n".

Tableau 03: Désignation des mutants *nit* par phénotype.

Isolat	Type de mutant <i>nit</i>					Total
	<i>nit</i> 1	<i>nit</i> 3	Nit M	<i>nit</i> M _v	<i>nit</i> n	
B-03/08	3	3	0	-	-	6
B-07/08	7	7	5	-	-	19
B-08/08	11	3	4	-	-	18
B-12/08	8	11	3	-	-	22
B-13/08	6	5	8	-	-	19
B-14/08	3	9	7	-	-	19
B-00/08	12	7	5	-	-	24
G-10/04	10	10	11	-	-	31
G-10/06	5	9	8	-	-	22
G-09/07	3	10	7	-	-	20
G-02/04	6	6	8	-	-	20
G-04/04	7	7	0	-	-	14
G-27/07	10	8	0	-	-	18
G-07/04	8	7	9	-	-	24
G-17/04	8	12	10	-	-	30
G-15/05	4	4	11	3	-	22
G-19/07	8	6	10	-	-	24
G-13/06	11	7	7	-	-	25
G-17/06	0	4	8	-	-	12
G-12/05	7	8	6	-	-	21
G-17/05	7	10	0	-	-	17
G-21/07	3	0	0	-	-	3
G-23/07	4	9	8	-	-	21
G-34/08	9	7	11	-	-	27
G-20/06	9	7	9	-	-	25
G-21/05	7	9	9	-	-	25
G-14/08	9	9	3	-	-	21
G-47/90	4	8	0	3	-	15
G-22/91	7	7	8	2	-	24
G-06/92	1	3	20	-	6	30
G-13/91	7	0	4	2	-	13
G-00/08	7	3	9	-	-	19
G-01/04	0	3	7	-	-	10
G-64/07	10	4	12	-	-	26

G-25/07	9	3	7	-	-	19
G-09/05	10	3	3	-	-	16
G-02/05	6	7	7	-	-	20
G-24/07	7	7	9	1	-	24
G-24/05	8	4	9	-	-	21
G-77/07	11	0	9	-	-	20
G-03/06	4	6	0	-	-	10
G-42/08	5	5	5	-	-	15
G-19/07	10	5	0	-	-	15
G-20/04	8	0	7	-	-	15
G-04/06	3	0	9	-	-	12
G-05/06	7	8	0	-	-	15
G-22/07	8	3	5	-	-	16
G-32/06	6	6	6	-	-	18
A-03/11	9	5	7	-	-	21
A-05/11	5	9	11	-	-	25
A-06/11	7	5	6	-	-	18
A-09/11	7	9	8	-	-	24
A-05/04	10	0	11	-	-	21
A-06/04	12	0	11	-	-	23
A-11/11	5	0	0	-	-	5
A-13/11	0	11	7	-	-	18
A-08/11	11	8	4	-	-	23
A-14/11	6	8	9	-	-	23
A-15/11	5	0	9	-	-	14
A-02/92	9	6	12	2	-	29
A-04/92	12	5	7	5	-	29
A-05/92	8	0	2	-	-	10
A-08/92	8	4	8	-	-	20
A-07/92	2	17	1	4	-	24
A-09/92	7	14	3	2	-	26
A-26/92	5	4	7	1	-	17
A-00/08	5	7	4	-	-	16
Total	456	391	430	25	6	1308

Ces mutants *nit* ont développé, sur les deux milieux de caractérisation, un mycélium d'aspect rasant et hyalin identique à celui des mutants *nit* récoltés précédemment sur milieu à base de nitrate.

Pour les mutants *nit* issus des isolats de *F. oxysporum* saprophytes, les résultats n'ont pas été portés en détail, mais signalons que les observations relatives à la fréquence d'obtention des différentes classes phénotypiques, *nit* 1, *nit* 3 et Nit M, restent valables.

3.2.3 Confrontations

La réaction de complémentation est mise en évidence par le développement d'une croissance dense hétérocaryotique là où les *mycelia* des mutants *nit* complémentaires s'anastomosent (Fig.3).

Les confrontations réalisées entre mutants *nit* 1 et Nit M, nous ont permis de conclure que tous les isolats testés sont auto-compatibles. Pour les treize souches précitées ne possédant pas un *nit* 1 ou un Nit M, les confrontations n'ont pas pu avoir lieu dans ce sens.



Figure 02: Expression de trois phénotypes de mutants *nit*, issus à partir des souches de *F. o. albedinis*, sur trois milieux de caractérisation contenant chacun une des trois différentes sources d'azote



Figure 03: Test de compatibilité végétative entre deux mutants *nit* complémentaires confrontés sur mm et obtenus à partir d'une souche de *f. o. albedinis*

3.2.4 Isolats de *F. oxysporum* saprophytes

Le tableau 4 rapporte le nombre des mutants *nit* par type sélectionnés à partir des isolats de *F. oxysporum* saprophytes.

Souches	<i>nit</i> 1	<i>nit</i> 3	Nit M	Total
sap. ₁	9	0	3	12
sap. ₂	7	2	2	11
sap. ₃	6	4	6	16

Les appariements de ces mutants *nit*, et appartenant à différentes classes phénotypiques, avec les mutants *nit* obtenus à partir des isolats de *F. o. albedinis*, n'ont donné aucune réaction de complémentation, et ceci quel que soit le

type des mutants *nit* issus des isolats pathogènes et saprophytes testées.

Les appariements intra- et inter-types aboutissent à des résultats qualitativement similaires à ceux obtenus avec les isolats pathogènes de *F. o. albedinis*.

3.2.5 Appartenance des isolats testés aux VCGs

Selon les résultats obtenus suite au test de confrontation des divers mutants *nit* obtenus, il ressort que deux groupes seulement de compatibilité végétative "VCGs" peuvent être déterminés. Rappelons que les isolats qui appartiennent au même VCG se complètent toujours alors qu'ils sont végétativement incompatibles avec ceux des autres VCGs.

D'après le système de groupement VCG établi par Puhalla [39], nos isolats peuvent être classés comme suit :

- Les soixante quatre isolats de *F. o. albedinis* dans un seul groupe numéroté VCG 1000.
- Les trois isolats de *F. oxysporum* saprophytes dans un autre groupe numéroté VCG 2092.

4 DISCUSSION

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus par l'application du test de pathogénicité et celui de la compatibilité végétative, comme moyens d'analyse de la variabilité génétique chez le *F. o. albedinis*, nous permet de retenir que :

Le test de pathogénicité nous a permis de mettre en évidence le caractère pathogène des isolats de *F. o. albedinis* étudiées, en y reproduisant les symptômes de la maladie sur des plantules tests issus de croisement contrôlé. La variabilité des taux de mortalité enregistrés, pourrait être liée à la variabilité de l'agressivité de chacune des isolats objet d'étude.

Cet aspect a fait l'objet de nombreuses études [3], [15], [16], [43]. Ainsi, suite aux variations de pathogénicité notées par Bulit *et al.* [3], ces derniers classaient les isolats de *F. oxysporum*, isolées à partir d'un palmier dattier, en trois catégories ; selon l'importance des symptômes qu'elles provoquaient in vitro sur les plantules de l'espèce hôte (*P. dactylifera* L.) :

isolats de *F.o.albedinis* agressives (à pouvoir pathogène élevé) ;

isolats de *F.o.albedinis* peu agressives (à pouvoir pathogène faible) ;

isolats de *F.o.albedinis* non agressives (à pouvoir pathogène "nul" ; n'appartenant plus donc à la forme spéciale *albedinis*).

Chez *F. oxysporum*, il existe plusieurs isolats dont la pathogénicité n'a pas été prouvée. De telles isolats ont été désignées comme saprophytes [48], formes spéciales avirulentes [11] ou encore isolats non pathogènes [35], [40].

Signalons que l'influence d'un ensemble de facteurs sur la

variabilité notée ne peut être négligée. Il s'agit du choix de la forme et de la dose de l'inoculum, du mode d'apport de ce dernier, des conditions de conduites du test. Dans les conditions naturelles d'autres facteurs sont à prendre en considération. En effet, l'efficacité contaminatrice d'un inoculum dépend de la variation de la température, de l'architecture du peuplement et de sa conduite [37] ; du pH [21], [49] et de la nature du sol [12].

L'hétérogénéité génétique, quoique relative, du matériel végétal utilisé aurait un effet primordial. L'impact de l'interaction hôte-pathogène serait déterminant dans ce cas. En effet, à cause de l'hétérogénéité génétique signalée, chaque plant pourrait réagir à l'agression du pathogène différemment aux autres. Ceci engendre une durée d'incubation fluctuante et donc un sort différent pour chaque plant. De ce fait, la variation du taux de mortalité enregistrée, ne nous permet pas de conclure hâtivement qu'elle est due à une variation d'agressivité des isolats testés. L'utilisation de vitro-plants pour pallier ce handicap est envisageable dans la suite de notre travail.

D'autre part, aucune relation n'a été noté entre l'agressivité et le génotype du palmier dattier à partir des quels l'isolement a été effectué. Un constat semblable est fait concernant l'agressivité et la zone géographique des isolats étudiés. En effet, les relevés des coordonnées de positionnement de ces zones par GPS, nous nous ont pas permis de lier l'agressivité à l'altitude, tel a été le cas selon d'autres travaux [34].

D'une façon générale, nos résultats concordent avec ceux de plusieurs travaux et montrent la faiblesse du test de pathogénicité, notamment vis-à-vis à la durée nécessaire pour son application, sur les plantules de palmier dattier. Par ce test, bien qu'on note une différence nette d'agressivité inter isolats, exprimé par la fluctuation des taux de mortalité des plantules inoculées, ces résultats restent inconcluants quant à l'existence de races au niveau de la forme spéciale *albedinis*. A ce niveau, divers facteurs dont dépend le test de pathogénicité le rendrait trompeur dans le cas du palmier dattier.

Pour le test de la compatibilité végétative, on note que la variation enregistrée du taux des mutants *nit* sélectionnés, indique que ces derniers résistent différemment à la toxicité du chlorate. D'autre part, cette variation de fréquence d'une classe phénotypique à une autre, révèle que les gènes concernés diffèrent sensiblement par leur aptitude à la mutation. En effet, les mutants *nit* 1 sont les plus fréquemment sélectionnés. Ces derniers sont suivis par les mutants *nit* 3 puis par les mutants Nit M.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus sur *Fusarium* spp. [4], [28], [29], [32]; sur *Aspergillus nidulans* [8] et sur *Verticillium dahliae* [25], [44]. Cependant, Tomsett et Garrett [47] ont noté un taux moindre des mutants *nit* 3 chez *Neurospora crassa*.

On peut croire que ces différences d'aptitude à la mutation entre les gènes pourraient être dues à leur taille physique. Beaucoup de gènes peuvent contenir des séquences qui sont considérées comme des "endroits névralgiques" ou encore

"des points chauds" les rendant plus susceptibles à la mutation. Par ailleurs, la variation en proportions des classes phénotypiques observée, pourrait être en rapport avec une sensibilité différente des gènes cibles aux agents sélecteurs employés. S'il est démontré que la fréquence des différentes classes phénotypiques des mutants *nit*, peut varier à la fois avec l'agent sélecteur et la source d'azote incorporée dans le milieu de sélection utilisé [28], l'influence de la spécificité du matériel fongique étudié ne peut être omis. D'ailleurs, l'obtention de certains phénotypes n'est pas évidente pour toutes les isolats (cas des *nit* 3 et des Nit M).

Les résultats des confrontations réalisées montrent que l'appariement des mutants *nit* peut occasionner une variété de types d'interactions compte tenant de leur vigueur et de leur vitesse. En effet, ces dernières peuvent être caractérisées de fortes ou de faibles réactions. Celles-ci sont considérées fortes lorsque la croissance est abondante et faibles quand il n'y a qu'une croissance mince et diffuse. D'autre part, ces complémentations peuvent être rapides ou lentes. Certaines réactions de complémentation sont très faibles et souvent lentes. Ces dernières se présentent sous forme de quelques taches. Ce niveau de réaction est produit lors des confrontations des mutants *nit* 1 ou *nit* 3 avec les mutants Nit M. De telles observations ont été rapportées par d'autres chercheurs [5], [19], [44].

En comparant ces deux faits, on peut suggérer que dans les faibles réactions, le taux de fusion des hyphes doit être inférieur à celui des isolats à fortes réactions. Ainsi, si la fréquence des réactions faibles dépasse significativement celle des réactions fortes, la faculté d'anastomose est probablement basse chez l'isolat considéré.

D'autre part, on peut considérer que les faibles hétérocaryons formés pourraient être attribués à une hétérocaryose "transitoire". En effet, d'autres travaux considèrent que dans de telles situations, les isolats sont végétativement incompatibles, mais le taux auquel la réaction de neutralisation cytoplasmique produit des cellules anastomosées n'est pas assez rapide pour arrêter la synthèse d'une nitratre réductase fonctionnelle. Comme conséquence, les hétérocaryons qui sont formés sont assez stables pour que cette nitratre réductase fonctionnelle soit synthétisée, mais cette durée n'est pas assez longue pour la production de larges quantités d'enzymes exigées pour produire une croissance prototrophe importante [25].

Rappelons que la non formation d'hétérocaryons, dans le cas des isolats qui sont végétativement incompatibles, pourrait résulter des différences alléliques au niveau d'un ou de plusieurs *loci* contrôlant la compatibilité végétative.

Si l'on considère chez *Ophiostoma ulmi* que les différences d'intensité des réactions entre deux isolats reflètent des différences alléliques au niveau des *loci* gouvernant la compatibilité végétative [2], on peut penser, par analogie chez *F. oxysporum*, que de faibles réactions seraient dues à un degré d'homologie génétique plus faible. Pour certains auteurs, ceci reste incertain et n'explique pas le fait que l'intensité des réactions, notamment les plus faibles, soit dans plusieurs cas fonction de combinaisons particulières

des mutants *nit* utilisés. Dans leur étude Gordon et Okamoto [23] notent qu'au cours d'une série d'appariements toutes les réactions négatives ont été associées à un seul mutant *nit m*. Les auteurs considèrent que ce dernier pourrait avoir une (ou des) mutation(s) qui ne peut (peuvent) pas compléter.

Par ailleurs, l'un des facteurs réduisant le nombre des VCGs serait l'utilisation des faibles réactions des appariements aussi comme base de regroupement des isolats. C'est peut être de ce fait que certains auteurs ne prennent en considération dans leurs délimitations des VCGs que les réactions fortes. Ainsi, un isolat ne sera attribué à un VCG donné que si cet isolat réagit fortement avec au moins un autre isolat de ce groupe. Il est à croire que les fortes réactions confieraient aux VCGs une bonne stabilité.

Concernant l'appariement des isolats saprophytes, les résultats des travaux abordant ce point ont montré, sans exception, qu'aucun isolat saprophyte n'a produit d'hétérocaryons lorsque confronté sur le milieu MM avec n'importe quelle autre isolat pathogène.

Nos résultats avec la forme spéciale *albedinis* concordent parfaitement avec ceux de ces travaux et montrent que les isolats pathogènes de *F. o. albedinis* et les isolats saprophytes testées de cette espèce sont végétativement incompatibles.

Il est prouvé que les isolats pathogènes et saprophytes chez *F. oxysporum* ne peuvent pas être distingués morphologiquement [17]. Si les premiers peuvent être différenciés en formes spécialisées et races physiologiques par le test de pathogénicité sur des cultivars hôtes appropriés ; objectif non atteint dans notre cas, les seconds par contre ne peuvent l'être que telles qu'elles. De ce fait, et à cause de l'incapacité de différencier ces isolats d'une population donnée, ces dernières ont été, pour la plupart des auteurs, considérées comme une seule entité écologique.

La mise en évidence de deux groupes de compatibilité végétative (VCG 1000 et VCG 2092), l'un renfermant les isolats pathogènes (*F. o. albedinis*) et l'autre contenant les isolats saprophytes (*F. oxysporum*), va de pair avec ces conceptions. Le fait que tous les isolats saprophytes appartiennent à un seul VCG coïncide en principe avec les résultats de Katan et Katan [27] et Katan *et al.* [26], mais d'autres travaux répartissent cette population saprophyte dans plus d'un VCG. Ceci concorde avec l'hypothèse de Correll *et al.* [6] et confirme que la population saprophyte de *F. oxysporum* pourrait contenir de nombreuses sous-populations génétiquement isolées et qui sont largement répondues [17]. Dans notre travail ça n'a pas été le cas ; en raison peut être du nombre réduit des isolats saprophytes de *F. oxysporum* testées.

Il est à signaler qu'au cours de notre application au test de compatibilité végétative, d'autres types de mutants *nit* (notés *nit n* et *nit Mv*) seraient identifiés également. Des indices nous laissent penser que les mutants "notés *nit n*" sont les équivalents du *are A*, identifié chez *Aspergillus nidulans*, et son homologue *nit-2*, identifié chez *Neurospora crassa*. Ces derniers sont des gènes régulateurs

majeurs d'azote chez les deux mycètes cités [8], [22], [47], [33], [4], [28]. La littérature consultée indique que ce mutant (ou gène) n'a pas été isolé chez *Fusarium*. D'autre part, les mutants "notés *nit Mv*" pourraient représenter un des cinq mutants *nit* formant la classe phénotypique des Nit M soit un *nit 2*, *nit 4*, *nit 5*, *nit 6* ou *nit 7* ; gènes contrôlant la production d'un cofacteur à molybdène nécessaire à l'activité de la nitrate réductase et de la purine déshydrogénase.

Ce genre de mutants peut servir comme "réactifs" dans des études biochimiques et enzymologiques contribuant ainsi à mieux connaître la génétique du champignon et donc le comportement de ce dernier vis-à-vis des mécanismes régissant la compatibilité végétative. Les détails et arguments feront l'objet d'un autre papier.

En général, il semble qu'à partir de ces constats, les tests appliqués ne renseignent pas trop sur la structure des populations de *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* étudiées provenant de différentes zones géographiques, comme cela a été décrit avec d'autres *Fusarium oxysporum* [24]. Les quelques variabilités notées concernant les résultats du test de la compatibilité végétative, ces dernières ont concerné des différences dans les appariements où sont impliqués des isolats faiblement compatibles (phénomène des réactions différentielles) ou incompatibles (phénomènes des réactions négatives fallacieuses). Par conséquent, ces différences entre les résultats reflèteraient des variabilités dans la capacité des mutants *nit* à compléter les uns avec les autres et non des différences réelles dans la compatibilité végétative des souches.

Le recours à d'autres techniques d'analyse plus raffinées est nécessaire. En effet, l'application de la compatibilité végétative et des marqueurs RAPD adéquats ont permis à Rodríguez-Molina *et al.* [38] de distinguer 2 races de *F.oxysporum* f. sp. *batatas* sur tabac et de conclure qu'elles appartiennent à deux groupes génétiquement différents.

Par impératif de fiabilité, les études portant sur l'identification des isolats fongiques et la caractérisation de leur variabilité morphologique, culturelle et pathogénique, menées au cours des dernières années, ont tenté de combiner les techniques de caractéristiques morphologiques, physiologiques, génétiques et moléculaires [18], [20],[31]

De notre côté, et pour le cas du *F. oxysporum* f.sp. *albedinis*, un travail mettant en œuvre les techniques des marqueurs moléculaires (SSR et AFLP) est en cours. Au stade actuel de notre travail, les résultats préliminaires et fragmentaires obtenus par PCR n'ont révélés aucun polymorphisme ; donc à ce stade, aucune tendance évolutive du pathogène ne peut être prédit. Cette faible diversité ne pourrait être liée à une faible diversité chez la plante hôte vue la grande variabilité génétique chez cette dernière. Un résultat semblable a été obtenu par Tantaoui et Fernandez [46] suite à une étude comparative par analyse du RFLP entre des souches de *F.o.albedinis* et des souches saprophytes de *F.oxysporum*. Techniquement, cela pourrait être attribué au fait que les marqueurs employés seraient inaptes à détecter une probable variabilité. La mise en

évidence de cette dernière, révélerait la tendance des souches de *F.o.albedinis* à se développer en races, ainsi que leur aptitude à surmonter la ou les résistance(s) des variétés qui seraient sélectionnées, en égard à plusieurs autres formes spéciales de l'espèce *Fusarium oxysporum*. Ceci constituerait une menace potentielle pour l'efficacité de la lutte génétique préconisée, car il est à rappeler qu'une résistance ne s'exprime que vis-à-vis des biotypes du parasite à l'égard desquels elle a été sélectionnée. De ce fait, et d'un point de vue épidémiologique, ceci n'écarte pas le danger potentiel de propagation que représente cette maladie pour les zones phénicoles qui en sont indemnes. Dans ce contexte, mis à part l'agent causal et sa structure génétique, d'autres facteurs liés à la maladie doivent être étudiés et analysés. Le recours aux variétés naturellement résistantes et celles issus de la germination naturelle de graines, dans les palmeraies infestées par le bayoud, constitue une meilleure perspective de lutte. D'autre part, l'arrangement spatial des espèces végétales est important pour freiner l'évolution des maladies et ravageurs dans un agro-système [41]. En qui concerne la maladie du bayoud, mis à part le palmier des canaries (*Phoenix canariensis*) et certaines espèces végétales qui ont la faculté d'héberger le *F.o.albedinis* sans extérioriser de symptômes pathologiques, on cite *Medicago sativa* " ou Luzerne ", *Lawsonia inermis* " Henné " et le *Trifolium alexandrinum* " Bersim " [13], [14], on ne connaît pas encore d'hôte alternatif pour ce pathogène. Dans les palmeraies atteintes de bayoud, seul le palmier dattier présente les symptômes de la maladie. On propose donc un recours à des associations de culture, afin de bénéficier de leur effet protecteur ou répulsif. Il s'agit donc d'une diversité protectrice qui pourrait constituer des obstacles à l'évolution de cette maladie.

REFERENCES

- [1] Alabouvette C., 1983.- La réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires. Rôle de la compétition nutritive en microorganismes. Thèse Doctorat ès-Sciences, université de Nancy, 158 p.
- [2] Brasier C.M., 1984. Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi*: their physiological properties and ecological importance. - in: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (ed. D.H. Jennings, and D.M. Rayner), Cambridge University Press, pp.451-497
- [3] Bulit J. Louvet J., Bouhot D. et Toutain G., 1967. recherches sur les fusarioses. I. travaux sur le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du nord.- Ann.Epiphyt., 18 (2) : 213-239.
- [4] Correll J.C., Klittich C.J.R., and Leslie J.F., 1987. nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* their use in vegetative compatibility tests. - Phytopathology, 77: 1640-1646.
- [5] Correll J.C., Klittich C.J.R., and Leslie J.F., 1989. heterocaryons self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) - Mycol.Res, 93 (2): 21-27.
- [6] Correll J.C., Puhalla J.E., and Schneider R.W., 1986. Vegetative compatibility groups among non-pathogenic root-colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. - Can.J.Bot., 64: 2358-2361.
- [7] Cove D.J., 1976a. chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: studies of mutants altered in nitrate assimilation. - molec.gen.genet., 146: 147-159.
- [8] Cove D.J., 1976b. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. - Heredity, 36 (2): 191-203.
- [9] Cove D.J., 1976c. The control of metabolism in *Aspergillus nidulans*. - in: Second international symposium on the genetic of industrial microorganisms. - (ed. K.D. Mac Donald) Academic Press, London, pp. 407-418.
- [10] Cove D.J., 1979. Genetic studies on nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. - Biol.Rev., 54: 291-327.
- [11] Damicone J.P., and Manning W.J., 1982. Avirulent strains of *Fusarium oxysporum* protect asparagus from crown rot. - Can.J.Plant Pathol., 4:2, 143-146.
- [12] Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale, Editions INRA, 384 pages
- [13] Djerbi, M., 1986. les maladies du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). - FAO, projet du centre régional de recherche sur le palmier dattier et les dattes au moyen orient et en Afrique du nord, (ed. El-watan Priting Press), Lebanon, 127 p.
- [14] Djerbi, M., Fredrix, M.J.J., and Braber, K., 1990. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and *f. oxysporum* f. sp. *canariensis* on the basis of vegetative compatibility. - FAO / PNUD / Rab / 88 / 024 / Control of bayoud disease project, INRAA., Alger, 8 p.
- [15] Dubost D., et Kada A., 1974. Etude expérimentale de l'inoculation de jeunes plantules de palmier dattier par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Kill. et Maire) Malençon. - Bull. Agr. Sahar., 2 : 21-38.
- [16] El-ghorfi A., 1987. Contribution à l'étude des porteurs sains du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud ; fusariose vasculaire du palmier dattier. - Thèse D.E.S., Fac. Scien. Cadi Ayyadh, Marrakech, Maroc, 97 p.
- [17] Elias K.S., Schneider R.W., and Lear M.M., 1991. Analysis of vegetative compatibility groups in non-pathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. - Can. J. Bot., 69: 2089-2094.
- [18] Elliott M.L., Des Jardin E.A., Ortiz J.V. and Macias T., 2018. Genetic variability of *Ganoderma zonatum* infecting palms in Florida. Mycologia, DOI: 10.1080/00275514.2018.1442083
- [19] Elmer W.H., and Stephens C.T., 1989. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* into vegetatively compatible groups. - Phytopathology, 79: 88-93.
- [20] Fan R., Cockerton H.M., Armitage A.D., Bates H., Cascant-Lopez E., Antanaviciute L., Xu X., Hu X., and Harrison R.J., 2018. Vegetative compatibility groups partition variation in the virulence of

- Verticillium dahliae* on strawberry. PLoS ONE 13(2): e0191824.
- [21] Fernandes TR., Segorbe D., Prusky D., Di Pietro A., (2017). How alkalization drives fungal pathogenicity. PLoS Pathog, 13(11).
- [22] Garrett R.H., and Amy N.K., 1979. Nitrate assimilation in fungi. - *adv. Microb. Physiol.*, 18: 1-65.
- [23] Gordon T.R., and Okamoto D., 1991. Vegetative compatibility groupings in local population of *Fusarium oxysporum*. - *Can. J. Bot.*, 69: 168-172.
- [24] Huang C.-H., Roberts P.D., Gale L.R., Elmer W.H., Datnoff L.E., 2013. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Florida inferred from vegetative compatibility groups and microsatellites. - *Eur. J. Plant Pathol.*, 136:509–521.
- [25] Joaquim T.R., and Rowe R.C., 1991. Vegetative compatibility and virulence of strains of *Verticillium dahliae* from soil and potato plants. - *Phytopathology*, 81: 552-558.
- [26] Katan T., Hadar E., and Katan J., 1989. Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. - *Plant Pathology*, 38: 376-381.
- [27] Katan T., and Katan J., 1988. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and rhizosphere of cotton plants - *Phytopathology*, 78: 852-855.
- [28] Klittich C.J.R., and Leslie, J.F., 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). - *Genetics*, 118: 417-423.
- [29] Klittich C.J.R., Leslie J.F., and Wilson J.D., 1986. Spontaneous chlorate-resistant mutants of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). (abstr.) - *Phytopathology*, 76: 1142.
- [30] Komada H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. - *Rev. Plant Prot. Res.*, 8: 114-125.
- [31] Lazarotto M., Bovolini M.P., Muniz M.F.B., Harakawa R., Reiniger L.R.S. and Santos A.F.dos., 2014. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 49 (6): 440-448.
- [32] Löffler H.J.M., and Rumine P., 1991. Virulence and vegetative compatibility of dutch and italian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. - *J. Phytopathology*, 132: 12-20.
- [33] Marzluf G., 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. - *Microbiol. Rev.*, 45 (3): 437-461.
- [34] Ndo E. G. D., Bella-Manga F., Ndingeng S. A., Nkem M. N., Fontem A. D., & Cilas C., 2010. Altitude, tree species and soil type are the main factors influencing the severity of *Phaeoramularia* leaf and fruit spot disease of citrus in humid zones of Cameroon. *European Journal of Plant pathology*, 128: 385-397.
- [35] Ogawa K., and Komada H., 1984. Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. - *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 50: 1-9.
- [36] Pateman J.A., Rever B.M., and Cove D.J., 1967. Genetic and biochemical studies of nitrate reductase in *Aspergillus nidulans*. - *Biochem. J.*, 104: 103-111.
- [37] Rapilly F., 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale. *Mycoses aériennes*. 317 P.
- [38] Rodríguez-Molina C., Morales-Rodríguez C., Palo C. Osuna D., Iglesias J., Garcia J.A., 2013. Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. - *Eur. J. Plant Pathol.*, 136: 639–650.
- [39] Puhalla J.E., 1985. Classification of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. - *can. j. bot.*, 63: 179-183.
- [40] Schneider R.W., 1984. Effects of non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the lineweaver-burck double reciprocal plot technique. - *Phytopathology*, 74: 646-653.
- [41] Schroth, G., Krauss, U., Gasparotto, L., Duarte-Aguilar, J. A., & Vohland, K., 2000. Pests and diseases in agroforestry systems of the tropics. *Agroforestry systems*, 50, 199-241.
- [42] Sedra, My.H., 2005. Caractérisation des clones sélectionnés du palmier dattier et prometteurs pour combattre la maladie du Bayoud. Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens, 08-10 mars 2005, Erfoud, Maroc.
- [43] Sedra, My.H., 1994. Mise au point d'une méthode pour l'évaluation rapide de la résistance au bayoud des plantules du palmier dattier issues de semis. *Al.Awamia*, 86: 21-41.
- [44] Strausbaugh L.P., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., and Hanco-ck J.G., 1992. Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. - *Phytopathology*, 82: 61-68.
- [45] Surico G and Graniti A., 1977. Produzione di tossine da *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 16: 30-33.
- [46] Tantaoui A. et Fernandez D., 1993. Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). *Phytophth. Medit.*, 32, 235-244
- [47] Tomsett A.B., and Garrett R.H., 1980. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. - *Genetics*, 95: 649-660.
- [48] Toussoun T.A., 1975. *Fusarium*-suppressive soils. - in : *Biology and control of soil-borne plant pathogens*. (ed. G.W. Bruehl); American Phytopathological Society, Press, St.Paul, M.N., pp 145-151.
- [49] Vylkova S., 2017. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. PLoS Pathog, 13(2).